Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 3, Page 596-616 (2024)

DOI:10.22092/IJMAPR.2024.365043.3428

# Assessment of the relationship between rebaudioside-A and stevioside content and growth, yield, and root characteristics of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought Stress

**Ali Ghaderi[1], Mohammad Moghaddam[2]* and Shahram Rezvan[3]**

1- Ph.D. student, Department of Horticultural, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: m.moghadam@um.ac.ir
3- Production and Technology of Herbal Medicines Research Center, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Received: February 2024 Revised: May 2024 Accepted: June 2024

## Abstract

**Background and Objective:** Limited research exists on the relationship between different root structures and the content of steviol glycosides in various genotypes of the Stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under varying levels of drought stress. This study aimed to assess the relationship between root characteristics and the content of Rebaudioside-A (Reb-A) and Stevioside (Stev) in two Stevia genotypes under drought stress.

**Methodology:** This study evaluated the relationship between root attributes, yield characteristics, and the content of Reb-A and Stev in two Stevia genotypes (Chinese and Indian) under hydroponic conditions. Seven drought levels (-2, -4, -6, -8, -10, and -12 bars using polyethylene glycol 6000) were applied in 2023. The experiment consisted of two completely randomized design trials with three replications each. To begin the experiment, pots filled with a 1:1 ratio of vermiculite and perlite were prepared, and three uniform seedlings were planted in early April. Throughout the growth period and the application of drought stress using Hoagland solution, all pots were initially irrigated with distilled water until the establishment of plants. Once plant establishment was ensured, drought treatments were administered by irrigating once every three days with 400 mL of Hoagland solution with varying osmotic potentials based on the designated treatments. After 65 days from planting, all plants were carefully removed from the pots, and their aboveground and underground parts were separated to measure the desired traits. Steviol glycosides were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC) with two C18 columns and a UV-Vis detector at a wavelength of 202 nm. Finally, the results pertaining to each genotype were analyzed and presented separately.

**Results:** The results indicated that both genotypes experienced significant reductions in yield and growth characteristics, including plant height, leaf number, leaf fresh weight, leaf yield, and total biomass yield, under drought stress conditions. Compared to the control, all mentioned traits decreased notably under stress. At the -12 bar level, the reduction in leaf yield traits was 59.84% and 87.9% in the Chinese and Indian genotypes, respectively, while total biomass yield decreased by 52.51% and 64.19%, respectively. The Indian genotype exhibited a higher average leaf yield at non-drought stress levels, whereas the Chinese genotype showed a higher yield at higher drought stress levels (beyond -8 bars). This suggests that the Chinese genotype displays greater tolerance in terms of leaf yield under higher stress levels compared to the Indian genotype. Root-related traits, including fresh and dry weight, volume, length, and density, showed the highest averages in the Chinese genotype at the -4 bar level and in the Indian genotype at the -2 bar level. In both genotypes, partial drought stress (-2 bars) resulted in increased average content of Stev when compared to the non-stress treatment, with the highest content of Reb-A and Stev observed at this stress level in both the Chinese and Indian genotypes (2.58% and 2.58%, respectively, and 7.8% and 5.96%, respectively). According to the stepwise regression results, root area, leaf fresh weight, and total biomass yield were identified as influential traits in increasing the combined content of Reb-A and Stev.

**Conclusion:** Based on the findings, severe drought stress resulted in a decline in growth and yield traits, root characteristics, and the content and yield of the combined Reb-A and Stev. The synthesis of these two glycosides as metabolites in Stevia plants peaked at the partial drought stress level (-2 bars), highlighting their pivotal role as influential metabolites in imparting stress tolerance. The Chinese genotype exhibited the highest resistance to drought stress, displaying superior yield and content of combined Reb-A and Stev compared to the Indian genotype in certain instances. Overall, this study illustrates that severe drought stress directly diminishes the yield and content of Reb-A and Stev in Stevia plants. In contrast, certain root-related and yield traits can serve as reliable indicators of drought tolerance in this plant.

**Keywords:** Stevia, stevioside, polyethylene glycol, drought stress, rebaudioside, root area.

# ارزیابی ارتباط محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید با صفات رشدی، عملکردی و خصوصیات ریشه گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* **Bertoni**) تحت تنش خشکی

**علی قادری[1]، محمد مقدم[2]* و شهرام رضوان[3]**

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، پست الکترونیک: m.moghadam@um.ac.ir

۳- استادیار، مرکز تحقیقات تولید و فناوری داروهای گیاهی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۳

## چکیده

**سابقه و هدف:** تحقیقات در زمینه ارتباط بین ویژگی‌های ریشه و محتوای گلیکوزیدهای استویول در ژنوتیپ‌های استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) تحت سطوح مختلف تنش خشکی بسیار اندک است. ازاین‌رو، این پژوهش با هدف ارزیابی ارتباط خصوصیات ریشه با محتوای دو گلیکوزید ربودیوزاید-A و استویوزاید در دو ژنوتیپ استویا تحت تنش خشکی اجرا شد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ارزیابی ارتباط ویژگی‌های ریشه و صفات عملکردی با محتوای دو گلیکوزید ربودیوزاید-A و استویوزاید در دو ژنوتیپ استویا (چینی و هندی) در شرایط هیدروپونیک با هفت سطح خشکی (صفر، ۲-، ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰- و ۱۲- بار با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰) در سال ۱۴۰۲ به‌صورت دو آزمایش کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی گردید. به‌منظور اجرای آزمایش، گلدان‌هایی با مخلوط پومیس و پرلیت (به نسبت یک به یک) پر و تعداد سه نشاء یکدست در اوایل اردیبهشت‌ماه کشت شدند. در طول آزمایش، تغذیه و اعمال تنش خشکی با استفاده از محلول هوگلند انجام شد. تمامی گلدان‌ها تا قبل از تثبیت گیاهچه‌ها با آب مقطر آبیاری شدند. بعد از اطمینان از تثبیت گیاهچه‌ها، اعمال تیمارهای خشکی با آبیاری سه روز یکبار با ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند با ظرفیت اسمزی متفاوت براساس تیمارهای طراحی شده انجام گردید. پس از گذشت ۶۵ روز از کاشت، تمامی گیاهان داخل گلدان‌ها به‌طور کامل خارج شده و اندام‌های هوایی و زیرزمینی جدا شدند تا ویژگی‌های مورد نظر اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویول به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) با ستون C18 و دتکتور UV-Vis در طول موج ۲۰۲ نانومتر انجام شد. در نهایت نتایج مربوط به هر ژنوتیپ جداگانه آنالیز و ارائه گردید.

**نتایج:** براساس نتایج صفات عملکردی و رشدی ازجمله ارتفاع بوته، تعداد برگ، وزن تر برگ، عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل تحت تأثیر تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری داشتند و تمامی صفات ذکر شده در اثر تنش کاهش نشان دادند. میزان کاهش صفات عملکرد برگ در سطح ۱۲- بار در مقایسه با شاهد به‌ترتیب در ژنوتیپ چینی و هندی ۵۹/۸۴٪ و ۸۷/۹٪ و عملکرد بیوماس کل ۵۲/۵۱٪ و ۶۴/۱۹٪ بدست آمد. از نظر عملکرد برگ در سطح بدون تنش خشکی، ژنوتیپ هندی دارای میانگین بالاتری بود، در حالی که در سطوح بالاتر تنش خشکی (بیشتر از ۸- بار)، ژنوتیپ چینی عملکرد بالاتری را نشان داد. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ژنوتیپ چینی در سطوح بالاتر تنش، تحمل بیشتری از نظر عملکرد برگ از ژنوتیپ هندی دارد. براساس نتایج بیشترین میانگین صفات مرتبط با ریشه ازجمله وزن تر و خشک، حجم، طول و چگالی در ژنوتیپ چینی در سطح ۴- بار و در ژنوتیپ هندی در ۲- بار مشاهده شدند. در هر دو ژنوتیپ تنش جزئی خشکی (۲- بار) منجر به افزایش میانگین استویوزاید و ربودیوزاید-A در مقایسه با تیمار بدون تنش شد، به‌طوری که بالاترین محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید در همین سطح تنش در ژنوتیپ چینی و هندی (به‌ترتیب ۲/۵۸ و ۲/۵۸ درصد و ۷/۸ و ۵/۹۶ درصد) بدست

آمد. براساس نتایج رگرسیون گام به گام سطح ریشه و وزن تر برگ و عملکرد بیوماس کل از صفات اثرگذار در افزایش محتوای مجموع ربودیوزاید–A و استویوزاید بودند.
**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج، تنش خشکی شدید منجر به کاهش صفات رشدی، عملکردی، ویژگی‌های ریشه و محتوا و عملکرد دو گلیکوزید مورد بررسی شد. محتوای این دو گلیکوزید به‌عنوان متابولیت اصلی در گیاه استویا در سطح تنش خشکی جزئی (۲- بار) بیشترین سنتز را داشتند که می‌توان استنباط کرد که به‌عنوان متابولیت‌های تأثیرگذار در ایجاد تحمل به تنش ایفای نقش می‌کنند. بیشترین مقاومت در برابر تنش خشکی در ژنوتیپ چینی مشاهده شد، به‌طوری که در برخی از موارد عملکرد و محتوای مجموع ربودیوزاید–A و استویوزاید در این ژنوتیپ بیشتر از ژنوتیپ هندی بود. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که تنش خشکی شدید به‌طور مستقیم بر عملکرد و محتوای گلیکوزیدهای ربودیوزاید–A و استویوزاید در گیاه استویا تأثیر کاهنده دارد و برخی از صفات مرتبط با ریشه و صفات عملکردی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای تحمل به تنش خشکی در این گیاه استفاده شوند.

**واژه‌های کلیدی:** استویا، استویوزاید، پلی‌اتیلن گلیکول، تنش خشکی، ربودیوزاید، سطح ریشه.

## مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، به‌طور متداول با نام برگ عسلی شناخته می‌شود، یک گیاه چندساله اهل پاراگوئه است و در حال حاضر به‌عنوان یک منبع مهم از شیرین‌کننده‌های طبیعی بدون کالری محسوب می‌شود (Aghighi Shahverdi *et al*., 2018a؛ Aghighi Shahverdi *et al*., 2020). این گیاه به‌عنوان یک منبع خوب از کربوهیدرات‌ها، پروتئین، الیاف خام و مواد معدنی است (Schiatti-Sisó *et al*., 2023). استویا ممکن است به‌عنوان یک جایگزین احتمالی برای ساکارز در نظر گرفته شود که این موضوع می‌تواند مصرف قند ساده را کاهش دهد، کاهشی که برای جلوگیری از پوسیدگی دندان، چاقی، دیابت نوع ۲ و سایر اختلالات سلامت مطلوب است (Wang *et al*., 2023). این گیاه شامل گلیکوزیدهایی ازجمله ربودیوزاید–A (Rebaudioside-A: Reb-A) و استویوزاید (Stevioside: Stev) و گلیکوزیدهای دیگری مانند ربودیوزاید–B (Rebaudioside-B)، ربودیوزاید–C (Rebaudioside-C)، ربودیوزاید–F (Rebaudioside-F) و دالکوزاید–A (Dulcoside-A) است که مجموعاً از ۷ تا ۱۶٪ متغیر می‌باشد (Afshari *et al*., 2022؛ de Andrade *et al*., 2023).

تنش خشکی به‌عنوان محدودیت محیطی اصلی که حدود ۲۵٪ از سطح زمین را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در تولید اثرگذار است (Afshari *et al*., 2022). واکنش‌های گیاه به تنش خشکی شامل کاهش جوانه‌زنی، توقف رشد، کاهش عملکرد و تغییرات در سنتز متابولیت‌ها می‌شود (Sheikhalipour *et al*., 2023). تنش خشکی به چندین روش رشد، عملکرد، پایداری غشاء، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، تنظیمات اسمزی و فعالیت فتوسنتزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Pradhan *et al*., 2020؛ Lahijanian *et al*., 2023). هنگامی که گیاهان با کمبود آب مواجه می‌شوند، رویدادهای مختلفی رخ می‌دهد که منجر به تغییرات مختلفی در فرایندهای فیزیکی و بیوشیمیایی می‌شود، که از آن جمله می‌توان به تغییرات مورفولوژیکی در اندام هوایی و ریشه گیاه، میزان رشد، ظرفیت اسمزی بافت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (Aghighi Shahverdi *et al*., 2020؛ Lahijanian *et al*., 2023).

در طول تنش خشکی، تغییراتی در مورفولوژی، معماری و فیزیولوژی ریشه‌ها رخ می‌دهد تا جذب و نگهداری آب را افزایش دهد (Sofi *et al*., 2021). تغییرات در پارامترهای ریشه مانند طول ریشه، مساحت سطح، حجم و چگالی آن بر عملکرد جذب آب تأثیر می‌گذارد. سیستم ریشه‌های عمیق‌تر و گسترده‌تر می‌تواند حجم بزرگ‌تری از خاک را بررسی کند و به‌راحتی به منابع آب عمیق‌تر دسترسی پیدا کند که به‌ویژه در

شرایط خشکی مفید است (Kou *et al*., 2022). کاهش در پارامترهای رشدی و عملکردی گیاه استویا، ازجمله ارتفاع بوته، تعداد و عملکرد برگ، عملکرد بیولوژیک و پارامترهای مرتبط با ریشه مانند طول، حجم و وزن خشک، تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی ناشی از کاهش آبیاری یا استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول توسط محققان مختلفی گزارش شده است که می‌توان به Lahijanian و همکاران (۲۰۲۳)، Sheikhalipour و همکاران (۲۰۲۳)، Afshari و همکاران (۲۰۲۲) و Kou و همکاران (۲۰۲۲) اشاره کرد.

تولید گلیکوزیدهای استویول به صفات مورفولوژیکی گیاه و ویژگی‌های ریشه و شرایط محیطی و اقلیمی و ژنوتیپ گیاه وابستگی شدیدی دارد (Ahmad *et al*., 2021). مطالعات نشان داده‌اند که پارامترهای ریشه مانند طول، چگالی و الگوهای شاخه‌بندی ریشه، در جذب آب و مواد غذایی تأثیر می‌گذارند و تولید گلیکوزیدهای استویول را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Aghighi Shahverdi *et al*., 2020). در پژوهشی گزارش شد که کم‌آبیاری در سطوح کم منجر به افزایش و در سطوح زیاد (تنش شدید) منجر به کاهش محتوای گلیکوزیدهای استویول ازجمله ربودیوزاید-A و استویوزاید شد (Afshari *et al*., 2022). Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تنش خشکی ۳/۵- اتمسفر در مقایسه با تیمار شاهد (آبیاری نرمال) منجر به افزایش محتوای گلیکوزیدهای استویول ازجمله ربودیوزاید-A و B، استیویوزاید و دالکوزاید-A و عملکرد گلیکوزیدهای استویول شد، در حالی که تنش بالاتر از ۳/۵- اتمسفر کاهش میانگین صفات ذکرشده را در پی داشت.

پارامترهای مرتبط با ریشه گیاهان و ویژگی‌های مورفولوژیکی نقش مهمی را در تحت تأثیر قرار گرفتن پاسخ‌های گیاهان به تنش خشکی ایفاء می‌کنند و به بهبود کارایی جذب آب و مواد غذایی کمک می‌نمایند. علاوه بر این، سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مانند استویا، شامل گلیکوزیدهای استویول، تحت تأثیر ویژگی‌های ریشه و صفات مورفولوژیکی گیاه قرار دارد. درک این تعاملات برای بهینه‌سازی تولیدی گیاهان و تولید ترکیبات بیولوژیکی در شرایط خشکی بسیار مهم است. از سوی دیگر، مطالعات مرتبط با ارزیابی پاسخ‌های رشدی، عملکردی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مابین ژنوتیپ‌های مختلف گیاه استویا بسیار اندک انجام شده است. از این‌رو، این پژوهش با هدف ارزیابی ارتباط محتوای گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید با صفات رشدی، عملکردی و خصوصیات ریشه در دو ژنوتیپ گیاه استویا (هندی و چینی) تحت تنش خشکی ناشی از کاربرد پلی‌اتیلن گلیکول انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### طرح آزمایشی و مواد گیاهی

این پژوهش به‌صورت آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۴۰۲ اجرا شد. تنش خشکی در هفت سطح صفر، ۲-، ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰- و ۱۲- بار با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG-6000) در محیط کشت هیدروپونیک (به‌صورت محلول به محیط اضافه شد) بر روی دو ژنوتیپ گیاه استویا (چینی و هندی) در قالب دو طرح جداگانه، ارزیابی گردید. به‌منظور اجرای آزمایش، گلدان‌هایی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری و قطر ۲۵ سانتی‌متری با مخلوط پومیس و پرلیت (به نسبت یک به یک) انتخاب و در هر گلدان تعداد سه نشاء یکدست (چهار تا شش برگی، ارتفاع ۱۰-۸ سانتی‌متر، تهیه شده از مزرعه زرگیاه استان فارس) در اوایل اردیبهشت‌ماه کشت شد. در طول اجرای آزمایش، تغذیه و اعمال تنش خشکی با استفاده از محلول هوگلند انجام شد که ترکیب آن در جدول ۱ ارائه شده است (Aghighi Shahverdi *et al*., 2019).

جدول ۱- ترکیب و مواد غذایی مورد استفاده در تهیه محلول هوگلند

**Table 1. Nutritional composition used in Hoagland solution preparation**

| **Chemical component** | **Source** | **Stock solution concentration** | **mL of stock solution.mL$^{-1}$** of Hoagland solution |
|---|---|---|---|
| $KNO_3$ | $KNO_3$ (2 M) | 202 g.L$^{-1}$ | 2.5 |
| $H_2PO_4$ | $KH_2PO_4$ (pH to 6.0) (1 M) | 136 g.L$^{-1}$ | 0.5 |
| $Ca(NO_3)_2$ | $Ca(NO_3)_2$•$4H_2O$ (1 M) | 236 g.0.5L$^{-1}$ | 2.5 |
| $NH_4NO_3$ | $NH_4NO_3$ (1 M) | 80 g.L$^{-1}$ | 1 |
| Iron | Sprint 138 iron chelate | 15 g.L$^{-1}$ | 1.5 |
| $MgSO_4$ | $MgSO_4$•$7H_2O$ (2 M) | 493 g.L$^{-1}$ | 1 |
| $H_3BO_3$ | $H_3BO_3$ | 2.86 g.L$^{-1}$ | 1 |
| $MnCl_2$ | $MnCl_2$•$4H_2O$ | 1.81 g.L$^{-1}$ | 1 |
| $ZnSO_4$ | $ZnSO_4$•$7H_2O$ | 0.22 g.L$^{-1}$ | 1 |
| $CuSO_4$ | $CuSO_4$•$5H_2O$ | 0.051 g.L$^{-1}$ | 1 |
| $Na_2MoO_4$ | $Na_2MoO_4$•$2H_2O$ | 0.12 g.L$^{-1}$ | 1 |

تمامی گلدان‌ها تا قبل از تثبیت گیاهچه‌ها با آب مقطر آبیاری شدند. بعد از اطمینان از تثبیت گیاهچه‌های کشت شده (۱۵ روز بعد از کاشت)، اعمال تیمارهای خشکی با آبیاری، سه روز یک‌بار با ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند با ظرفیت اسمزی متفاوت، براساس تیمارهای طراحی شده انجام شد. میزان کاربرد PEG-6000 برای سطوح خشکی ۲-، ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰- و ۱۲- بار به‌ترتیب ۴۷/۸۲، ۷۱/۳۳، ۸۹/۴۶، ۱۰۴/۷۷، ۱۱۸/۲۸ گرم بدست آمد.

**اندازه‌گیری صفات رشدی، عملکردی و مرتبط با ریشه**

پس از گذشت ۶۵ روز از کاشت، تمامی گیاهان داخل گلدان‌ها به‌طور کامل خارج شده و اندام‌های هوایی و زیرزمینی جدا شدند تا ویژگی‌های مورد نظر اندازه‌گیری شود. در بخش هوایی، ویژگی‌هایی مانند ارتفاع گیاه، تعداد برگ‌ها، تعداد شاخه‌ها، وزن تازه برگ، وزن خشک برگ (به‌عنوان عملکرد برگ) و بیوماس کل برای هر گیاه محاسبه شد (Afshari *et al.*, 2022). در بخش زیرزمینی، تمامی ریشه‌ها با آب شسته شدند. به این منظور، خاک هر گلدان به‌طور جداگانه در یک تشت آب خیس شد و ذرات خاک متصل به ریشه‌ها با استفاده از محلول هگزا متافسفات سدیم جدا شدند. بلافاصله پس از آن، وزن تازه ریشه‌ها با استفاده از ترازوی دقیق اندازه‌گیری گردید. حجم ریشه‌ها نیز با تفاوت حجم ایجاد شده پس از قرار دادن آنها در حجم مشخصی از آب در داخل استوانه مدرج با دقت ۰/۱ میلی‌متر محاسبه شد. قطر ریشه و چگالی ریشه با استفاده از فرمول‌های جدول ۲ تعیین گردید و سایر ویژگی‌های ریشه‌ای مانند محتوای ریشه، نسبت وزن خشک ریشه به حجم خاک، نسبت وزن خشک ریشه به حجم ریشه و نسبت طول ریشه به وزن تازه ریشه (ظرافت ریشه) محاسبه شدند (Akhavan *et al.*, 2012؛ Aghighi Shahverdi *et al.*, 2020).

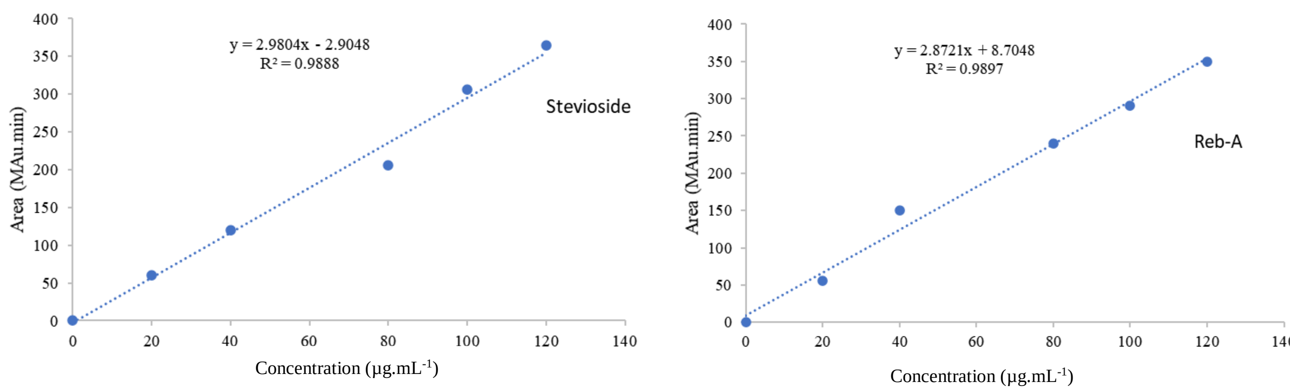
جدول ۲- محاسبه صفات ریشه

**Table 2. Root traits calculation**

| **Parameters** | **Formula** | **Reference** |
|---|---|---|
| Root length (RL) | RL= (roots weight) × 0.890 | |
| Root area (RA) | RA= 2 (root volume × π × RL)$^{0.5}$ | Ganjali *et al*. (2003) |
| Root diameter (RD) | RD= 4 × root fresh weight/(RL×π)$^{0.5}$ | |

**اندازه‌گیری محتوای گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید**

برای اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویول، ابتدا برگ‌های استویا در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و بعد به‌وسیله آسیاب پودر گردید و مقدار ۰/۱ گرم از آن برای استخراج گلیکوزیدها استفاده شد. به هر نمونه از پودر گیاه سه میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس عصاره به مدت پنج دقیقه با سرعت g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و با استفاده فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، صاف و ذخیره شد. از استونیتریل ۲۰٪ برای شستشوی مواد زاید استفاده شد. برای انجام کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد ( Unicam Crystal 200 Series D2 Lamp (UK))، از ستون C18 و دتکتور UV-Vis در طول موج ۲۰۲ نانومتر استفاده گردید. ابتدا، مقدار ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید. درجه حرارت ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فاز متحرک شامل ۶۰٪ آب و ۳۵٪ استونیتریل با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه می‌باشد که با شرایط ایزوکراتیک از ستون عبور داده شد. سپس مقدار گلیکوزیدهای استویول که شامل ربودیوزاید-A و استویوزاید بود با استفاده از نرم‌افزار Chromstar 7.0 و با استفاده از معادله استاندارد محاسبه (شکل ۱) و به‌صورت درصد وزن خشک برگ گزارش شد (Aghighi Shahverdi *et al*., 2018b؛ Aghighi Shahverdi *et al*., 2019). تمام مواد استفاده شده در این اندازه‌گیری از گرید HPLC با خلوص بالا از Sigma Aldrich بودند.




شکل ۱- منحنی استاندارد ربودیوزید-A و استویوزید

**Figure 1**. **Rebaudioside-A and stevioside standard curve**

**تجزیه‌وتحلیل داده‌ها**

بعد از جمع‌آوری داده‌ها و آزمایش نرمال بودن، برای هر ژنوتیپ تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید. همبستگی ساده بین صفات مرتبط با محتوای مجموع استویوزاید و ربودیوازید-A و صفات عملکردی و رشدی با استفاده از نرم‌افزارهای Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۳ و Minitab نسخه ۱۸ انجام شد. تجزیه رگرسیون گام به گام که در آن محتوای مجموع دو گلیکوزید

به‌عنوان متغیر وابسته و صفات رشدی و عملکردی و صفات مرتبط با ریشه به‌عنوان متغیر مستقل بودند با استفاده از نرم‌افزار Minitab انجام شد.

## نتایج

### صفات رشدی و عملکردی

نتایج نشان داد که صفات عملکردی و رشدی ازجمله ارتفاع بوته، تعداد برگ، تعداد شاخه، وزن تر برگ، عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل در اثر تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری داشتند. البته در مورد تعداد شاخه در بوته در ژنوتیپ چینی تفاوت غیرمعنی‌دار بدست آمد (جدول ۳). سطوح صفر و ۲- بار خشکی دارای بالاترین میانگین صفات ذکرشده در هر دو ژنوتیپ بودند. به بیان دیگر، خشکی ۲- بار، منجر به کاهش معنی‌دار میانگین صفات نشد. در حالی که سطوح بالاتر تنش خشکی، کاهش معنی‌دار میانگین این صفات را در پی داشت. میزان کاهش صفات ارتفاع بوته در سطح تنش ۱۲- بار در مقایسه با شاهد به‌ترتیب در ژنوتیپ چینی و هندی ۲۷/۱۹٪ و ۴۲/۱۶٪، تعداد برگ در بوته ۶۰/۸۷٪ و ۶۷/۳۳٪، تعداد شاخه در بوته ۲۰/۳۵٪ و ۵۳/۰٪، وزن تر برگ ۶۶/۵٪ و ۳۷/۲۵٪، عملکرد برگ ۵۹/۸۴٪ و ۸۷/۹٪ و عملکرد بیوماس کل ۵۲/۵۱٪ و ۶۴/۱۹٪ بدست آمد (جدول ۴). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های بین دو ژنوتیپ، از نظر عملکرد برگ در سطح بدون تنش خشکی، ژنوتیپ هندی دارای میانگین بالاتری بود، در حالی که در سطوح بالاتر تنش خشکی (بیشتر از ۸- بار)، ژنوتیپ چینی عملکرد بیشتری را نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ژنوتیپ چینی در سطوح بالاتر تنش، تحمل قابل قبول‌تری از نظر عملکرد برگ در مقایسه با ژنوتیپ هندی داشت (جدول ۴). درصد کاهش میانگین عملکرد برگ در سطوح مختلف تنش خشکی در شکل ۲ ارائه شده است که نشان می‌دهد، میزان کاهش در ژنوتیپ هندی از ژنوتیپ چینی (در سطوح مشابه) بیشتر بود، به‌طوری که بیشترین کاهش در ژنوتیپ چینی ۵۹/۸۴٪ و در ژنوتیپ هندی ۸۷/۹۲٪ بدست آمد.

### پارامترهای مرتبط با ریشه

نتایج نشان داد که پارامترهای مرتبط با ریشه ازجمله وزن تر و خشک، حجم، طول، سطح، چگالی، وزن تر ریشه به حجم خاک و نسبت وزن خشک ریشه به حجم خاک در هر دو گونه چینی و هندی تحت تأثیر سطوح مختلف خشکی تفاوت معنی‌داری با هم داشتند (جدول‌های ۵ و ۶). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های ژنوتیپ چینی، بالاترین میانگین صفات وزن تر و خشک (۳۵/۲ و ۴/۹۱ گرم)، حجم (۳۴/۷ سانتی‌متر مکعب)، طول (۴/۳۷ سانتی‌متر)، سطح (۴۳/۶ سانتی‌متر مربع)، چگالی (۴۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب) و نسبت وزن تر و خشک ریشه به حجم خاک (۰/۲۵۵ و ۰/۰۳۶) مربوط به سطح خشکی ۴- بار بود. در حالی که بیشترین میانگین صفات ذکرشده (به‌ترتیب ۳۶/۱ و ۵/۲۹ گرم، ۲۰/۴ سانتی‌متر مکعب، ۴/۷۱ سانتی‌متر، ۳۳/۹ سانتی‌متر مربع، ۴۶/۲ گرم بر سانتی‌متر مکعب، ۰/۲۶۱ و ۰/۰۳۸) در ژنوتیپ هندی در سطح خشکی ۲- بار مشاهده شد (جدول‌های ۷ و ۸).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر صفات رشدی و عملکردی ژنوتیپ‌های چینی و هندی استویا

**Table 3. ANOVA of drought stress effects on growth and yield traits of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes**

| S.O.V. | d.f. | M.S. | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Plant height | | Number of leaves | | Number of branches | | Leaf fresh weight | | Leaf yield | | Total biomass yield | |
| | | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian |
| Drought | 6 | $78.27^{**}$ | $76.07^{**}$ | $514.7^{**}$ | $700.7^{**}$ | $0.09^{ns}$ | $0.74^{*}$ | $59.85^{**}$ | $65.4^{*}$ | $3.93^{**}$ | $23.5^{**}$ | $17.54^{**}$ | $105.2^{**}$ |
| Experimental error | 20 | 28.16 | 32.30 | 171.3 | 247.5 | 0.26 | 0.39 | 26.26 | 30.8 | 1.68 | 7.72 | 7.77 | 39.6 |
| C.V. (%) | - | 6.67 | 14.05 | 14.01 | 18.58 | 27.88 | 23.59 | 23.83 | 14.12 | 19.97 | 22.74 | 18.33 | 21.36 |

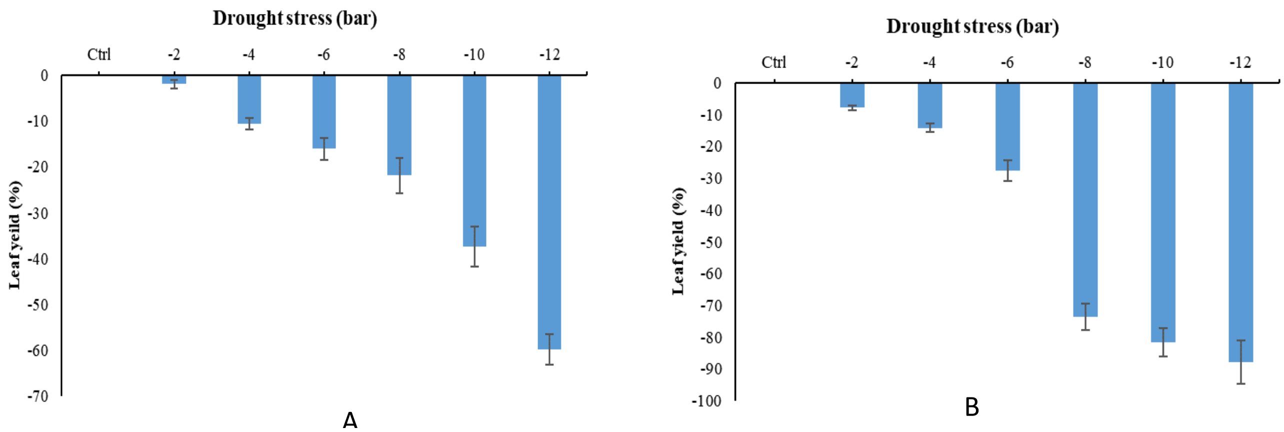
n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر صفات رشدی و عملکردی ژنوتیپ‌های چینی و هندی استویا

**Table 4. Means comparison of drought stress effects on growth and yield traits of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes**

| Drought stress (bar) | Plant height (cm) | | Number of leaves.plant$^{-1}$ | | Number of branches.plant$^{-1}$ | | Leaf fresh weight (g.plant$^{-1}$) | | Leaf yield (g.plant$^{-1}$) | | Total biomass yield (g.plant$^{-1}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian |
| 0 | $44.5\pm1.2^{a}$ | $35.1\pm3.4^{a}$ | $52.4\pm3.4^{a}$ | $60.3\pm4.0^{a}$ | - | $2.83\pm0.29^{a}$ | $20\pm3.0^{a}$ | $35.7\pm2.9^{a}$ | $5.39\pm0.27^{a}$ | $7.4\pm0.03^{a}$ | $13.9\pm2.2^{a}$ | $24.3\pm1.3^{a}$ |
| -2 | $44.7\pm2.6^{a}$ | $29.1\pm2.2^{ab}$ | $51.8\pm1.5^{a}$ | $50.3\pm9.3^{ab}$ | - | $2.33\pm0.3^{ab}$ | $17.7\pm1.7^{ab}$ | $31.9\pm2.2^{ab}$ | $5.28\pm1.03^{a}$ | $6.82\pm0.75^{ab}$ | $12.2\pm2.5_{ab}$ | $21.5\pm0.9^{a}$ |
| -4 | $42.3\pm1.1^{a}$ | $28.2\pm1.7^{bc}$ | $39.8\pm3.1^{b}$ | $48.7\pm3.1^{ab}$ | - | $2.33\pm0.3^{ab}$ | $17\pm2.3^{ab}$ | $30.5\pm1.0^{a-c}$ | $4.81\pm0.55^{ab}$ | $6.34\pm0.18^{ab}$ | $11.3\pm0.64^{a-c}$ | $18.7\pm1.5_{ab}$ |
| -6 | $37.6\pm1.2^{b}$ | $25.2\pm0.61^{b-d}$ | $30.1\pm4.4^{c}$ | $37.7\pm0.3^{b}$ | - | $2.33\pm0.3^{ab}$ | $15.4\pm2.8^{ab}$ | $27.1\pm0.1^{b-d}$ | $4.52\pm0.76^{ab}$ | $5.36\pm0.79^{b}$ | $10.2\pm1.8^{bc}$ | $14.3\pm0.42_{bc}$ |
| -8 | $36.9\pm1.6^{b}$ | $23.5\pm1.1^{b-d}$ | $26.5\pm0.76^{cd}$ | $38\pm1.5^{b}$ | - | $2\pm0.3^{a-c}$ | $12.7\pm1.6^{bc}$ | $26.9\pm1.9^{b-d}$ | $4.21\pm0.14^{ab}$ | $1.95\pm0.25^{c}$ | $9.6\pm0.46^{b-d}$ | $14.4\pm0.37^{bc}$ |
| -10 | $33.2\pm0.88^{bc}$ | $22\pm2.8^{cd}$ | $24.4\pm2.3^{cd}$ | $20.3\pm0.88^{c}$ | - | $1.67\pm0.28^{bc}$ | $11.7\pm2.8^{bc}$ | $23.8\pm2.5^{cd}$ | $3.37\pm0.34^{bc}$ | $1.35\pm0.53^{c}$ | $8.4\pm1.3^{cd}$ | $9.2\pm1.2^{c}$ |
| -12 | $32.4\pm0.92^{c}$ | $20.3\pm1.2^{d}$ | $20.5\pm2.6^{d}$ | $19.7\pm2.6^{c}$ | - | $1.33\pm0.28^{c}$ | $6.7\pm0.92^{c}$ | $22.4\pm1.6^{d}$ | $2.16\pm0.24^{c}$ | $0.89\pm0.3^{c}$ | $6.6\pm1.9^{d}$ | $8.7\pm1.0^{c}$ |
| LSD =0.05 | 4.53 | 6.44 | 8.60 | 12.78 | - | 0.87 | 6.03 | 7.0 | 1.48 | 1.71 | 3.31 | 5.93 |

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).




شکل ۲- درصد تغییرات عملکرد برگ استویا تحت تنش خشکی در مقایسه با تیمار شاهد در ژنوتیپ‌های چینی (**A**) و هندی (**B**)

**Figure 2. Changes percentage in *Stevia rebaudiana* leaf yield under drought stress compared to control treatment in Chinese (A) and Indian (B) genotypes**

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ چینی گیاه استویا

**Table 5. ANOVA of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Chinese genotype**

| S.O.V. | d.f. | M.S. | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Root fresh weight** | **Root volume** | **Root dry weight** | **Root length** | **Root area** | **Root diameter** | **Root density** | **RFW/SO ratio** | **RDW/SO ratio** | **Root fineness** |
| Drought | 6 | $263.8^{**}$ | $133.0^{**}$ | $6.08^{**}$ | $4.82^{**}$ | $290.8^{**}$ | $0.07^{ns}$ | $449.0^{**}$ | $0.013^{**}$ | $0.00032^{**}$ | $0.0005^{ns}$ |
| Experimental error | 20 | 93.26 | 55.64 | 2.04 | 1.62 | 102.0 | 0.09 | 151.4 | 0.004 | 0.0001 | 0.0005 |
| C.V. (%) | - | 18.69 | 25.90 | 16.10 | 16.11 | 20.54 | 10.16 | 16.04 | 18.69 | 16.11 | 18.24 |

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

Root fresh weight to soil volume ratio (RFW/SO ratio); Root dry weight to soil volume ratio (RDW/SO ratio)

در برخی از صفات، سطوح خشکی ۴- بار در ژنوتیپ هندی نیز دارای بالاترین میانگین بود. با افزایش محتوای PEG-6000 در محیط رشد، کاهش معنی‌داری در صفات ریشه مشاهده شد، به‌طوری که کمترین میانگین صفات مرتبط با ریشه در هر دو گونه در بالاترین سطح تنش خشکی بدست آمد. میزان کاهش وزن تر و خشک ریشه و حجم و طول ریشه در سطح ۱۲- بار در مقایسه با شاهد در ژنوتیپ چینی به‌ترتیب ۷۰/۹، ۶۰/۴، ۴۷/۲ و ۶۰/۴ درصد بود، در حالی که در ژنوتیپ هندی ۶۸/۰، ۶۴/۱، ۷۰/۱ و ۶۳/۹ درصد بدست آمد (جدول‌های ۷ و ۸).

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ هندی گیاه استویا

**Table 6. ANOVA of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Indian genotype**

| | | M.S. | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **S.O.V.** | **d.f.** | **Root fresh weight** | **Root volume** | **Root dry weight** | **Root length** | **Root area** | **Root diameter** | **Root density** | **RFW/SO ratio** | **RDW/SO ratio** | **Root fineness** |
| Drought | 6 | 296.7$^{**}$ | 275.8$^{**}$ | 5.11$^{**}$ | 4.04$^{**}$ | 403.8$^{**}$ | 0.142$^{ns}$ | 429.0$^{**}$ | 0.015$^{**}$ | 0.0002$^{**}$ | 0.0018$^{ns}$ |
| Experimental error | 20 | 113.2 | 115.3 | 1.89 | 1.50 | 146.2 | 0.109 | 155.0 | 0.005 | 0.00009 | 0.0017 |
| C.V. (%) | - | 21.59 | 25.90 | 23.09 | 23.90 | 23.51 | 10.81 | 24.26 | 21.59 | 23.09 | 25.07 |

$^{n.s.}$, $^{*}$, and $^{**}$: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.
Root fresh weight to soil volume ratio (RFW/SO ratio); Root dry weight to soil volume ratio (RDW/SO ratio)

جدول ۷- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ چینی گیاه استویا

**Table 7. Means comparison of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Chinese genotype**

| **Drought stress (bar)** | **Root fresh weight (g)** | **Root volume (cm$^3$)** | **Root dry weight (g)** | **Root length (cm)** | **Root area (cm$^2$)** | **Root density (g.cm$^{-3}$)** | **Fresh root weight to soil volume ratio** | **Dry root weight to soil volume ratio** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 23.4±2.6$^{bc}$ | 19.7±1.8$^{bc}$ | 3.72±0.35$^{ab}$ | 3.31±0.31$^{ab}$ | 28.6±2.6$^{bc}$ | 31±3.0$^{bc}$ | 0.169±0.019$^{bc}$ | 0.027±0.002$^{ab}$ |
| -2 | 25.2±2.4$^{ab}$ | 29.3±6.4$^{ab}$ | 4.45±0.17$^{a}$ | 3.96±0.15$^{a}$ | 37.4±5.3$^{ab}$ | 34.8±2.2$^{ab}$ | 0.182±0.017$^{ab}$ | 0.032±0.001$^{a}$ |
| -4 | 35.2±1.9$^{a}$ | 34.7±2.08$^{a}$ | 4.91±0.15$^{a}$ | 4.37±0.13$^{a}$ | 43.6±1.6$_{a}$ | 44±1.09$^{a}$ | 0.255±0.013$^{a}$ | 0.036±0.001$^{a}$ |
| -6 | 16.8±3.3$^{b-d}$ | 16.3±1.44$^{c}$ | 2.77±0.59$^{bc}$ | 2.47±0.52$^{bc}$ | 22.3±3.1$^{cd}$ | 22.8±4.5$^{cd}$ | 0.122±0.024$^{b-d}$ | 0.02±0.004$^{bc}$ |
| -8 | 13.2±2.11$^{cd}$ | 11.2±0.55$^{c}$ | 2.73±0.34$^{b-d}$ | 2.43±0.30$^{b-d}$ | 18.3±0.39$^{cd}$ | 20±2.7$^{de}$ | 0.096±0.015$^{cd}$ | 0.02±0.002$^{b-d}$ |
| -10 | 9.7±3.0$^{d}$ | 11.5±0.37$^{c}$ | 1.75±0.28$^{cd}$ | 1.55±0.25$^{cd}$ | 14.9±1.0$^{d}$ | 13.7±2.4$^{de}$ | 0.07±0.022$^{d}$ | 0.013±0.002$^{cd}$ |
| -12 | 6.8±2.3$^{d}$ | 10.4±0.32$^{c}$ | 1.47±0.06$^{d}$ | 1.31±0.06$^{d}$ | 13±0.17$^{d}$ | 10.6±1.8$^{e}$ | 0.049±0.016$^{d}$ | 0.011±0.0005$^{d}$ |
| LSD =0.05 | 10.29 | 11.95 | 1.26 | 1.12 | 10.48 | 10.73 | 0.07 | 0.009 |

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

## مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A

دو ترکیب استویوزاید و ربودیوزاید-A از شاخص‌ترین ترکیبات گلیکوزیدهای گیاه استویا هستند (شکل ۳). نتایج نشان داد که محتوای این دو ترکیب تحت تأثیر تنش خشکی تفاوت معنی‌داری با هم داشتند و در بین دو ژنوتیپ هندی و چینی نیز تغییراتی نشان دادند (جدول ۹). به‌طور کلی، در هر دو ژنوتیپ، تنش جزئی خشکی (۲- بار) منجر به افزایش میانگین این دو ترکیب در مقایسه با تیمار بدون تنش شد. بالاترین محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید در همین سطح تنش در ژنوتیپ چینی و هندی به‌ترتیب با میانگین ۲/۵۸ و ۲/۵۸٪ و ۷/۸ و ۵/۹۶٪ بود. با افزایش شدت تنش خشکی، سنتز این دو متابولیت با کاهش معنی‌داری در هر دو ژنوتیپ مواجه ، به‌طوری که کمترین میانگین این دو ترکیب در بالاترین سطح تنش خشکی (۱/۸۴ و ۰/۸۳٪ و ۳/۹ و ۲/۲۲٪) به‌ترتیب در ژنوتیپ چینی و هندی مشاهده شد. میزان کاهش ربودیوزاید-A و استویوزاید در ژنوتیپ چینی ۹/۳۵٪ و ۳۱/۶٪ در سطح ۱۲- بار خشکی در مقایسه با شاهد بود. در حالی که در

ژنوتیپ هندی ۶۴/۶٪ و ۶۰/۵٪ محاسبه شد. بنابراین در سطوح بالاتر تنش خشکی، محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید در ژنوتیپ چینی بیشتر از ژنوتیپ هندی بود (جدول ۱۰).

جدول ۸- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ هندی گیاه استویا

**Table 8. Means comparison of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Indian genotype**

| Drought stress (bar) | Root fresh weight (g) | Root volume ($cm^3$) | Root dry weight (g) | Root length (cm) | Root area ($cm^2$) | Root density ($g.cm^{-3}$) | Fresh root weight to soil volume ratio | Dry root weight to soil volume ratio |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 33.2±5.5$^{ab}$ | 24.1±3.0$^{a}$ | 4.74±0.69$^{a}$ | 4.22±0.62$^{a}$ | 35.7±4.8$^{a}$ | 41.9±6.3$^{a}$ | 0.24±0.03$^{ab}$ | 0.034±0.005$^{a}$ |
| -2 | 36.1±5.9$^{a}$ | 20.4±9.3$^{ab}$ | 5.29±0.64$^{a}$ | 4.71±0.57$^{a}$ | 33.9±7.0$^{ab}$ | 46.2±5.0$^{a}$ | 0.261±0.03$^{a}$ | 0.038±0.004$^{a}$ |
| -4 | 28.2±1.5$^{b}$ | 13.7±2.6$^{bc}$ | 4.51±0.22$^{a}$ | 4.01±0.20$^{a}$ | 26±2.4$^{bc}$ | 37.7±1.3$^{ab}$ | 0.204±0.011$^{b}$ | 0.033±0.001$^{a}$ |
| -6 | 25.7±1.5$^{bc}$ | 11.3±2.0$^{c}$ | 3.5±0.13$_{b}$ | 3.12±0.11$^{b}$ | 21±1.3$^{cd}$ | 31.6±1.5$^{bc}$ | 0.186±0.011$^{bc}$ | 0.025±0.0009$^{b}$ |
| -8 | 18.8±1.9$^{cd}$ | 7.8±0.8$^{c}$ | 2.64±0.38$^{bc}$ | 2.35±0.34$^{bc}$ | 15±0.7$^{de}$ | 23.5±2.7$^{cd}$ | 0.136±0.014$^{cd}$ | 0.019±0.002$^{bc}$ |
| -10 | 15.7±2.3$^{de}$ | 8±0.5$^{c}$ | 1.94±0.25$^{c}$ | 1.72±0.22$^{c}$ | 13.1±1.2$^{de}$ | 18.2±2.6$^{de}$ | 0.114±0.017$^{de}$ | 0.014±0.001$^{c}$ |
| -12 | 10.6±0.84$^{e}$ | 7.2±0.4$^{c}$ | 1.7±0.14$^{c}$ | 1.52±0.13$^{c}$ | 11.7±0.63$^{e}$ | 14.1±1.1$^{e}$ | 0.077±0.006$^{e}$ | 0.012±0.001$^{c}$ |
| LSD =0.05 | 7.86 | 8.30 | 0.98 | 0.87 | 8.04 | 8.55 | 0.057 | 0.0071 |

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

جدول ۹- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر محتوای استویوزید و ربودیوزید-A در ژنوتیپ‌های چینی و هندی استویا

**Table 9. ANOVA of drought stress effects on stevioside (Stev) and rebaudioside-A (Reb-A) content of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes**

| S.O.V. Drought | d.f. | M.S. | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Reb-A (%) | | Stev (%) | | Reb-A + Stev content (%) | | Reb-A + Stev yield ($g.plant^{-1}$) | |
| | | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian | Chinese | Indian |
| Experimental error | 6 | 1.22** | 0.20** | 7.37** | 6.86** | 14.25** | 9.23** | 0.18** | 0.064** |
| C.V. (%) | 20 | 0.43 | 0.07 | 2.82 | 2.14 | 5.01 | 2.86 | 0.06 | 0.022 |
| S.O.V. | - | 17.17 | 6.30 | 25.17 | 6.73 | 18.88 | 5.01 | 27.46 | 20.53 |

**: significant at 1% probability level

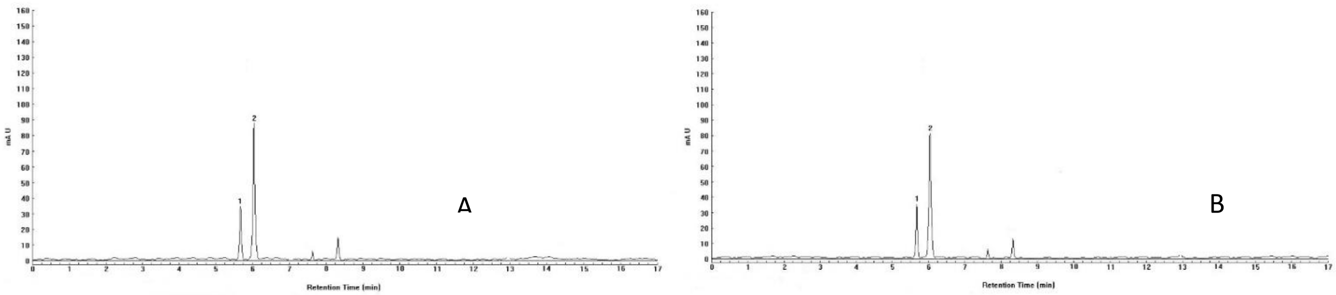
جدول ۱۰- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر محتوای استویوزید و ربودیوزید-A در ژنوتیپ‌های چینی و هندی استویا

**Table 10. Means comparison of drought stress effects on stevioside (Stev) and rebaudioside-A (Reb-A) content of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes**

| Drought stress (bar) | Reb-A (%) | | Stev (%) | | Reb-A + Stev content (%) | | Reb-A+ Stev yield ($g.plant^{-1}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Chinese** | **Indian** | **Chinese** | **Indian** | **Chinese** | **Indian** | **Chinese** | **Indian** |
| 0 | 2.03±0.17$^{bc}$ | 2.35±0.01$^{ab}$ | 5.71±1.2$^{c}$ | 5.63±0.34$^{ab}$ | 7.74±1.4$^{c}$ | 7.98±0.35$^{a}$ | 0.417±0.10$^{b}$ | 0.589±0.018$^{a}$ |
| -2 | 2.58±0.16$^{a}$ | 2.58±0.11$^{a}$ | 7.8±0.30$^{a}$ | 5.96±0.15$^{a}$ | 10.38±0.30$^{a}$ | 8.53±0.25$^{a}$ | 0.545±0.10$^{a}$ | 0.586±0.072$^{a}$ |
| -4 | 2.39±0.13$^{a}$ | 2.04±0.09$^{b}$ | 6.77±0.42$^{b}$ | 4.1±0.04$^{bc}$ | 9.16±0.28$^{b}$ | 6.14±0.05$_{b}$ | 0.441±0.05$^{ab}$ | 0.392±0.015$^{b}$ |
| -6 | 2.14±0.22$^{b}$ | 1.86±0.07$^{bc}$ | 4.39±0.29$^{d}$ | 3.14±0.15$^{cd}$ | 6.54±0.50$^{d}$ | 5±0.22$^{bc}$ | 0.295±0.04$^{c}$ | 0.269±0.054$^{b}$ |
| -8 | 1.98±0.13$^{bc}$ | 1.38±0.10$^{cd}$ | 4.45±0.06$^{d}$ | 2.44±0.24$^{d}$ | 6.43±0.08$^{d}$ | 3.83±0.15$^{cd}$ | 0.271±0.004$^{c}$ | 0.074±0.019$^{c}$ |
| -10 | 1.98±0.20$^{bc}$ | 1.18±0.01$^{de}$ | 4.02±0.04$^{d}$ | 2.4±0.19$^{d}$ | 6±0.16$^{de}$ | 3.57±0.28$^{cd}$ | 0.202±0.013$^{cd}$ | 0.049±0.031$^{c}$ |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -12 | 1.84±0.15c | 0.83±0.04e | 3.9±0.03d | 2.22±0.16d | 5.74±0.12e | 3.05±0.11d | 0.124±0.007d | 0.027±0.017c |
| LSD =0.05 | 0.23 | 0.52 | 0.62 | 1.63 | 0.065 | 1.79 | 0.11 | 0.186 |

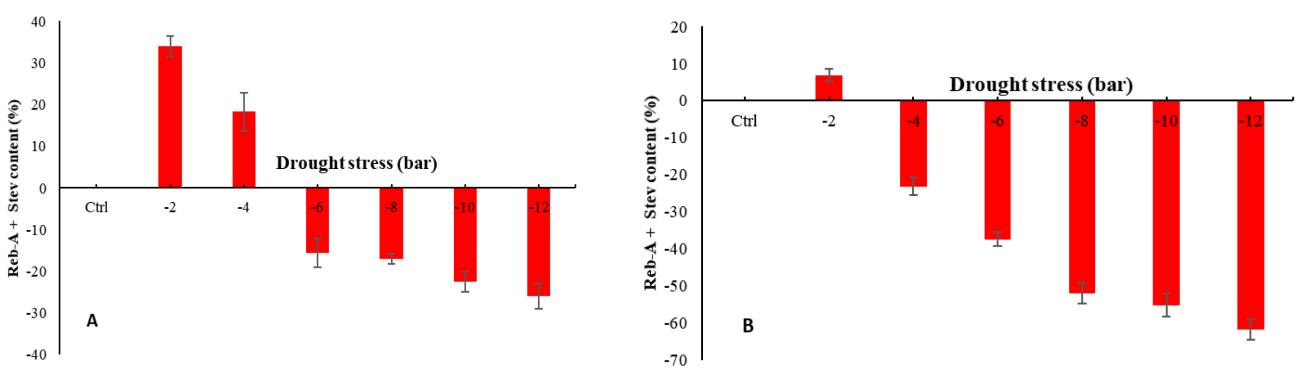
In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).




شکل ۳- کروماتوگرام **HPLC** دو ژنوتیپ هندی (**A**) و چینی (**B**) استویا برای ترکیب‌های استویوزید (پیک شماره۱) و ربودیوزید-**A** (پیک شماره۲)

**Figure 3. HPLC chromatogram of *Stevia rebaudiana* Indian (A) and Chinese (B) genotypes for stevioside (Peak No.1) and rebaudioside-A (Peak No.2) compounds**

بیشترین میانگین مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A در ژنوتیپ چینی مربوط به سطح ۲- بار (۱۰/۳۸٪) بود، در حالی که سطوح صفر و ۲- در ژنوتیپ هندی بالاترین میانگین این صفت را نشان داد (به‌ترتیب ۷/۹۸٪ و ۸/۵۳٪). افزایش میزان PEG-6000 در محیط رشد منجر به کاهش معنی‌دار محتوای مجموع این دو گلیکوزید شد، به‌طوری که کمترین محتوا مربوط به بالاترین سطح تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ چینی و هندی (به‌ترتیب ۵/۷۴ و ۳/۰۵٪) بود (جدول ۱۰). میزان کاهش یا افزایش محتوای مجموع دو گلیکوزید تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ در شکل ۴ ارائه شده است که نشان می‌دهد میزان کاهش در ژنوتیپ چینی از سطح تنش خشکی ۶- بار اتفاق می‌افتد، در حالی که در ژنوتیپ هندی از سطح ۴- بار رخ داد. علاوه بر این، میزان کاهش در سطوح بالای تنش خشکی در ژنوتیپ هندی در مقایسه با چینی در سطوح یکسان خشکی، بیش از دو برابر بدست آمد.




شکل ۴- درصد تغییرات محتوای استویوزید + ربودیوزید-**A** گیاه استویا تحت تنش خشکی در مقایسه با تیمار شاهد در ژنوتیپ‌های چینی (**A**) و هندی (**B**)

**Figure 4. Changes percentage in stevioside + rebaudioside-A content of *Stevia rebaudiana* under drought stress compared to control treatment in Chinese (A) and Indian (B) genotypes**

عملکرد مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A که حاصل‌ضرب عملکرد برگ در محتوای این دو گلیکوزید می‌باشد در هر دو ژنوتیپ تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی تفاوت معنی‌داری داشت. بیشترین عملکرد مجموع دو گلیکوزید در ژنوتیپ چینی و هندی (به‌ترتیب ۰/۵۴۵ و ۰/۵۸۶ گرم در بوته) مربوط به سطوح خشکی ۲- بار بود و افزایش شدت تنش خشکی منجر به کاهش عملکرد شد، به‌طوری که در ژنوتیپ چینی کمترین عملکرد مربوط به سطح ۱۲- بار خشکی (۰/۱۲۴ گرم در بوته) بود، در حالی که سطوح ۸، ۱۰- و ۱۲- بار در ژنوتیپ هندی، کمترین میانگین این صفت (به‌ترتیب ۰/۰۷۴، ۰/۰۴۹ و ۰/۰۲۷ گرم در بوته) را نشان داد (جدول ۱۰).

**همبستگی ساده بین صفات و تجزیه رگرسیون گام به گام**

نتایج همبستگی ساده بین صفات رشدی و عملکردی با صفات مرتبط با مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A در هر دو ژنوتیپ چینی و هندی در جدول‌های ۱۱ و ۱۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که صفات رشدی و عملکردی و صفات مرتبط با ریشه (به غیر از قطر ریشه و ظرافت ریشه) در هر دو ژنوتیپ همبستگی مثبت و معنی‌داری با محتوای این گلیکوزیدها و عملکرد آنها دارند. در ژنوتیپ چینی، تعداد شاخه در بوته همبستگی غیر معنی‌داری داشت. به بیان دیگر، با افزایش میانگین بیشتر صفات مرتبط با ریشه، میزان سنتز این گلیکوزیدها در گیاه استویا در هر دو ژنوتیپ افزایش نشان داد.

نتایج رگرسیون گام به گام که در آن محتوای کل مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شده بود در جدول‌های ۱۳ و ۱۴ ارائه شده است. در ژنوتیپ چینی صفات عملکرد بیوماس کل، سطح ریشه و نسبت وزن تر ریشه به حجم خاک وارد مدل رگرسیونی شدند و در مجموع ۹۸/۹۱٪ از تغییرات محتوای مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A با این سه صفت قابل توجیه بود. در حالی که در ژنوتیپ هندی، صفات ارتفاع بوته، وزن تر برگ و سطح ریشه وارد مدل رگرسیونی شدند و در مجموع ۹۳/۷۹٪ از تغییرات قابل توجیه بود.

جدول ۱۱- همبستگی ساده صفات رشدی، عملکردی و ویژگی‌های ریشه با محتوای استویوزید + ربودیوزید-A ژنوتیپ چینی گیاه استویا تحت تنش خشکی

**Table 11. Simple correlation between growth, yield, or root traits with stevioside (Stev) + rebaudioside-A (Reb-A) content in *Stevia rebaudiana* Chinese genotype under drought stress**

| | Reb-A | Stev | Reb-A + Stev content | Reb-A + Stev yield |
|---|---|---|---|---|
| Plant height | 0.28$^{ns}$ | 0.52$^{**}$ | 0.5$^{**}$ | 0.69$^{**}$ |
| Number of leaves per plant | 0.54$^{**}$ | 0.68$^{**}$ | 0.68$^{**}$ | 0.82$^{**}$ |
| Number of branches per plant | -0.01$^{ns}$ | -0.11$^{ns}$ | -0.1$^{ns}$ | -0.06$^{ns}$ |
| Leaf fresh weight | 0.43$^{*}$ | 0.53$^{**}$ | 0.53$^{**}$ | 0.61$^{**}$ |
| Leaf yield | 0.5$^{**}$ | 0.59$^{**}$ | 0.59$^{**}$ | 0.9$^{**}$ |
| Total biomass yield | 0.44$^{*}$ | 0.55$^{**}$ | 0.55$^{**}$ | 0.75$^{**}$ |
| Root fresh weight | 0.61$^{**}$ | 0.7$^{**}$ | 0.7$^{**}$ | 0.77$^{**}$ |
| Root volume | 0.73$^{**}$ | 0.73$^{**}$ | 0.75$^{**}$ | 0.76$^{**}$ |
| Root dry weight | 0.71$^{**}$ | 0.81$^{**}$ | 0.81$^{**}$ | 0.75$^{**}$ |
| Root length | 0.71$^{**}$ | 0.81$^{**}$ | 0.81$^{**}$ | 0.75$^{**}$ |
| Root area | 0.76$^{**}$ | 0.8$^{**}$ | 0.82$^{**}$ | 0.8$^{**}$ |
| Root diameter | 0.24$^{ns}$ | 0.29$^{ns}$ | 0.29$^{ns}$ | 0.52$^{**}$ |
| Root density | 0.66$^{**}$ | 0.76$^{**}$ | 0.76$^{**}$ | 0.78$^{**}$ |
| Fresh root weight to soil volume ratio | 0.61$^{**}$ | 0.7$^{**}$ | 0.7$^{**}$ | 0.77$^{**}$ |
| Dry root weight to soil volume ratio | 0.71$^{**}$ | 0.81$^{**}$ | 0.81$^{**}$ | 0.75$^{**}$ |
| Root fineness | -0.11$^{ns}$ | -0.17$^{ns}$ | -0.16$^{ns}$ | -0.43$^{*}$ |

$^{n.s.}$, $^{*}$, and $^{**}$: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -1 | -0.9 | -0.8 | -0.7 | -0.6 | -0.5 | -0.4 | -0.3 | -0.2 | -0.1 | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |

High negative correlation — Non-correlation — High positive correlation

جدول ۱۲- همبستگی ساده صفات رشدی، عملکردی و ویژگی‌های ریشه با محتوای استویوزید + ربودیوزید-A ژنوتیپ هندی گیاه استویا تحت تنش خشکی

**Table 12. Simple correlation between growth, yield, or root traits with stevioside (Stev) + rebaudioside-A (Reb-A) content in *Stevia rebaudiana* Indian genotype under drought stress**

| | **Reb-A** | **Stev** | **Reb-A + Stev content** | **Reb-A + Stev yield** |
|---|---|---|---|---|
| Plant height | $0.89^{**}$ | $0.78^{**}$ | $0.85^{**}$ | $0.78^{**}$ |
| Number of leaves per plant | $0.86^{**}$ | $0.83^{**}$ | $0.87^{**}$ | $0.90^{**}$ |
| Number of branches per plant | $0.54^{**}$ | $0.56^{**}$ | $0.58^{**}$ | $0.57^{**}$ |
| Leaf fresh weight | $0.51^{**}$ | $0.55^{**}$ | $0.56^{**}$ | $0.67^{**}$ |
| Leaf yield | $0.83^{**}$ | $0.79^{**}$ | $0.84^{**}$ | $0.93^{**}$ |
| Total biomass yield | $0.75^{**}$ | $0.73^{**}$ | $0.76^{**}$ | $0.86^{**}$ |
| Root fresh weight | $0.99^{**}$ | $0.80^{**}$ | $0.89^{**}$ | $0.85^{**}$ |
| Root volume | $0.69^{**}$ | $0.87^{**}$ | $0.85^{**}$ | $0.93^{**}$ |
| Root dry weight | $0.95^{**}$ | $0.85^{**}$ | $0.92^{*}$ | $0.90^{**}$ |
| Root length | $0.95^{**}$ | $0.85^{**}$ | $0.92^{**}$ | $0.90^{**}$ |
| Root area | $0.85^{**}$ | $0.92^{**}$ | $0.94^{**}$ | $0.98^{**}$ |
| Root diameter | $0.15^{ns}$ | $-0.14^{ns}$ | $-0.06^{ns}$ | $-0.13^{ns}$ |
| Root density | $0.98^{**}$ | $0.84^{**}$ | $0.92^{**}$ | $0.89^{**}$ |
| Fresh root weight to soil volume ratio | $0.99^{**}$ | $0.80^{**}$ | $0.89^{**}$ | $0.85^{**}$ |
| Dry root weight to soil volume ratio | $0.95^{**}$ | $0.85^{**}$ | $0.92^{**}$ | $0.90^{**}$ |
| Root fineness | $-0.26^{ns}$ | $0.05^{ns}$ | $-0.04^{ns}$ | $0.04^{ns}$ |

$^{n.s.}$, $^{*}$, and $^{**}$: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -1 | -0.9 | -0.8 | -0.7 | -0.6 | -0.5 | -0.4 | -0.3 | -0.2 | -0.1 | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |

High negative correlation ⟵ Non-correlation ⟶ High positive correlation

جدول ۱۳- تجزیه رگرسیون گام به گام در ژنوتیپ چینی استویا (محتوای استویوزید + ربودیوزید–A به‌عنوان متغیر وابسته و سایر صفات رشدی و عملکردی به‌عنوان متغیرهای مستقل)

**Table 13. Stepwise regression analysis of Stevia rebaudiana Chinese genotype (stevioside + rebaudioside-A content as a dependent variable and other growth and yield traits as independent variables)**

| Term | Coef | SE Coef | T-Value | P-Value |
|---|---|---|---|---|
| Constant | 1.545 | 0.415 | 3.73 | 0.034 |
| Total biomass yield (X1) | 0.1984 | 0.0482 | 4.11 | 0.026 |
| Root area (X2) | 0.4152 | 0.0347 | 11.98 | 0.001 |
| Fresh root weight to soil volume ratio (X3) | -49.94 | 5.91 | -8.45 | 0.003 |

R-sq(adj) = 98.91%; Y = 1.545 + 0.1984 (X1) + 0.4152 (X2) – 49.94 (X3)

جدول ۱۴- تجزیه رگرسیون گام به گام در ژنوتیپ هندی استویا (محتوای استویوزید + ربودیوزید–A به‌عنوان متغیر وابسته و سایر صفات رشدی و عملکردی به‌عنوان متغیرهای مستقل)

**Table 14. Stepwise regression analysis of *Stevia rebaudiana* Indian genotype (stevioside + rebaudioside-A content as a dependent variable and other growth and yield traits as independent variables)**

| Term | Coef | SE Coef | T-Value | P-Value |
|---|---|---|---|---|
| Constant | -2.29 | 1.30 | -1.77 | 0.035 |
| Plant height (X1) | 0.1444 | 0.0403 | 3.58 | 0.002 |
| Leaf fresh weight (X2) | -0.0606 | 0.0327 | -1.85 | 0.022 |
| Root area (X3) | 0.1724 | 0.0225 | 7.65 | 0.000 |

R-sq(adj) = 93.79%; Y = -2.29 + 0.1444 (X1) – 0.0606 (X2) + 1724 (X3)

## بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی ناشی از کاربرد PEG-6000 در محیط رشد هر دو ژنوتیپ استویا، منجر به کاهش معنی‌دار ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته، وزن تر برگ، عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل شد. براساس نتایج، میزان کاهش میانگین این صفات با افزایش غلظت PEG-6000 رابطه مستقیمی داشت. به‌طوری که در سطوح پایین‌تر تنش خشکی (۲- و ۴- بار) میزان کاهش در بیشتر صفات غیر معنی‌دار بود، ولی کاهش معنی‌دار آماری از سطح ۶- بار در برخی از صفات ازجمله عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل مشاهده شد. Afshari و همکاران (۲۰۲۲) به این نکته اشاره کردند که واکنش گیاه به تنش خشکی با مراحل رشد، شدت و زمان تنش، گونه‌های گیاهی و شرایط محیطی مرتبط است. در این مطالعه، ویژگی‌های رشدی و عملکردی به‌طور متقابل با تشدید تنش خشکی، به‌ویژه زیر ۶- بار اُفت معنی‌دار را نشان دادند. علاوه بر این، کاهشی در ویژگی‌های رشدی و عملکردی در سطح کمتر تنش خشکی نسبت به شرایط بدون تنش مشاهده نشد. براساس این نتایج می‌توان استنباط کرد که گیاه استویا به تنش خشکی تحمل متوسط رو به پایین دارد. در این زمینه، Karimi و همکاران (۲۰۱۵) و Afshari و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که سطوح پایین‌تر تنش خشکی منجر به اُفت منفی در رشد گیاه و وزن خشک برگ گیاه استویا نمی‌شود که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. به‌موجب تنش خشکی، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش رشد برگ‌ها و کاهش تولید آسیمیلات ایجاد می‌شود که در نتیجه منجر به کاهش وزن خشک کل گیاه می‌گردد (Gorzi *et al.*, 2020).

Tardieu (۲۰۲۲) گزارش کرد که تنش خشکی موجب کاهش رشد اندام‌های مختلف گیاه، ازجمله ریشه‌ها و برگ‌ها، کاهش سطح برگ، ارتفاع و وزن خشک می‌شود. کاهش تعداد و سطح برگ در شرایط تنش خشکی، باعث کاهش ناحیه سطحی تعرق، افزایش جذب آب از خاک و در نهایت مقاومت گیاه در برابر تنش می‌شود (Mahdavi Khorami *et al.*, 2020). کاهش سطح برگ می‌تواند ناشی از کاهش تقسیم سلولی و ریزش و پیری برگ باشد. افزایش نسبت ریشه به ساقه عمدتاً مربوط به کاهش بیشتر بیوماس اندام هوایی نسبت

به ریشه در شرایط تنش خشکی است (Pradhan *et al.*, 2020). کمبود آب، تعداد برگ در بوته، اندازه هر برگ و طول عمر برگ را به دلیل کاهش ظرفیت آب در محیط رشد کاهش می‌دهد. اثر مشترک نامطلوب تنش خشکی در گیاهان، کاهش وزن تر و خشک برگ از طریق اختلال در تبادلات گازی برگ و نیز انتقال اسیمیلات‌ها و تخصیص ماده خشک است (Afshari *et al.*, 2022 ؛Karimi *et al.*, 2019).

براساس نتایج، پارامترهای مرتبط با ریشه با افزایش شدت تنش خشکی کاهش معنی‌داری داشت. این کاهش در دو ژنوتیپ چینی و هندی از سطوح مختلفی اتفاق افتاد. در ژنوتیپ چینی بالاترین میانگین صفات در سطح خشکی ۴- بار مشاهده شد، در حالی که در ژنوتیپ هندی، بالاترین میانگین صفات مرتبط با ریشه در سطح خشکی ۲- بار بدست آمد. به بیان دیگر، سطوح کم تنش خشکی منجر به افزایش پارامترهای ریشه ازجمله وزن تر و خشک، طول و حجم ریشه گردید و بعد از این سطوح خشکی، اُفت میانگین صفات رخ داده است، به‌طوری که کمترین پارامترهای مرتبط با ریشه در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۲- بار) مشاهده شد. Ma و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تنش خشکی بر مورفولوژی ساختار ریشه‌ها در گیاه استویا تأثیر می‌گذارد. در شرایط ملایم تنش خشکی، ریشه‌های استویا به افزایش ریشه‌های جانبی و طول می‌پردازند که این موضوع به گیاه امکان می‌دهد تا حجم بزرگ‌تری از محیط رشد را برای جذب آب دربرگیرد. با این حال، تنش خشکی شدید رشد ریشه را مهار می‌کند که منجر به کاهش بیوماس و سطح ریشه می‌شود. نتایج مشابهی در آزمایش‌های Pordel و همکاران (۲۰۱۵) و Gorzi و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه استویا گزارش شده است. Pordel و همکاران (۲۰۱۵) و Aghighi Shahverdi و همکاران (۲۰۲۰) به‌ترتیب تحت تنش خشکی و شوری گزارش کردند که پارامترهای مرتبط با ریشه ازجمله وزن تر و خشک، حجم، طول، سطح، چگالی، وزن تر ریشه به حجم خاک و وزن خشک ریشه به حجم خاک در گیاه استویا تحت تنش شدید کاهش معنی‌داری داشتند.

براساس نتایج، تنش خشکی جزئی (۲- بار) در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش منجر به ایجاد بالاترین میزان ربودیوزاید-A و استویوزاید و محتوا و عملکرد مجموع این دو گلیکوزید شد. در راستای نتایج بدست آمده، سایر پژوهشگران ازجمله Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) و Afshari و همکاران (۲۰۲۲) نتایج مشابهی در گیاه استویا گزارش کردند. بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا از پلاستید شروع شده و در سیتوزول به پایان می‌رسد. مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت کائورن برای سنتز جیبرلین است. بنابراین، ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها انجام می‌شود و یک دی‌ترپن است. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای شیرین در این گیاه با مسیر سنتز جیبرلین تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است (Gorzi *et al.*, 2020). به نظر می‌رسد که وجود گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا منجر به افزایش تحمل به تنش‌های محیطی ازجمله شوری و خشکی شود و دلیل افزایش میزان سنتز این ترکیبات در سطوح تنش خشکی ۲- بار این موضوع باشد (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2018b; Afshari *et al.*, 2022). Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که تولید و کیفیت گلیکوزیدهای استویول و سایر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی و عوامل محیطی و غیر محیطی قرار دارند. Aghighi Shahverdi و همکاران (۲۰۱۸b) و Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) نتیجه‌گیری کردند که گلیکوزیدها، نوعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای ساختار گسترده‌ای می‌باشند و در برخی موارد در متابولیسم اولیه گیاهان نقش دارند. از آنجایی که علت تولید چنین ترکیبات پرهزینه‌ای در گیاه استویا مشخص نیست، احتمال وجود نقش‌های دفاعی برای این ترکیبات در شرایط تنش وجود دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که پارامترهای رشدی و عملکردی و ویژگی‌های مرتبط با ریشه در سنتز دو گلیکوزید (ربودیوزاید-A و استویوزاید) اثرگذار هستند و همبستگی مثبتی بین این صفات وجود دارد. از بین ویژگی‌های ریشه در ژنوتیپ چینی سطح ریشه و نسبت وزن ریشه به حجم خاک و در ژنوتیپ هندی سطح ریشه وارد مدل رگرسیونی شدند که

اثرگذاری بالایی در سنتز محتوای مجموع این دو گلیکوزید داشتند. علاوه بر این، وزن تر برگ، ارتفاع بوته و عملکرد بیوماس کل از صفات رشدی اثرگذار در محتوای مجموع این دو گلیکوزید بودند. به نظر می‌رسد ویژگی مورفولوژیکی ریشه در سنتز ربودیوزاید-A و استویوزاید بسیار تأثیرگذار می‌باشد که نیاز به بررسی‌های مولکولی و ژنومی بیشتری در این زمینه است. بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول با بیان پانزده ژن تنظیم می‌شود. سنتز این ترکیبات ممکن است با استفاده از شار متابولیک از مسیرهای Methylerythritol Phosphate (MEP) و mevalonate (MVA) انجام شود که هر دو در پلاستید انجام می‌گردد. سلول‌های مزوفیل برگ‌ها این دو متابولیت اصلی را تولید می‌کنند که به‌طور کلی در ریشه‌ها قابل شناسایی نیستند (Biswas *et al*., 2024). علاوه بر این، Libik-Konieczny و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که چندین گلیکوزید استویول در ریشه گیاه استویا سنتز می‌شود. Afshari و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که بین صفات رشدی و عملکردی گیاه استویا با میزان سنتز استویوزاید-A و ربودیوزاید همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که با یافته‌های این پژوهش همخوانی دارد.

در مقایسه بین دو ژنوتیپ باید بیان کرد که از نظر صفات عملکرد برگ و بیوماس کل و بیشتر ویژگی‌های مرتبط با ریشه، ژنوتیپ هندی دارای برتری در مقایسه با ژنوتیپ چینی بود. در مورد محتوا و عملکرد مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید، تنش خشکی اثرگذار بود، به‌طوری که در سطح بدون تنش خشکی ژنوتیپ هندی میانگین بالاتری داشت ولی در شرایط تنش خشکی، ژنوتیپ چینی از میانگین بالاتر این صفات برخوردار بود. علاوه بر این، میزان کاهش عملکرد برگ در سطوح مختلف تنش خشکی در ژنوتیپ چینی کمتر از ژنوتیپ هندی بود. به بیان دیگر، از نظر این صفت ژنوتیپ چینی دارای تحمل بالایی بود. از نظر محتوای گلیکوزیدهای استویول نیز ژنوتیپ چینی در سطوح بالاتر تنش خشکی، میزان کاهش کمتری در مقایسه با ژنوتیپ هندی نشان داد. به نظر می‌رسد بین میزان کاهش کمتر گلیکوزیدهای استویول با میزان کاهش کمتر عملکرد برگ در ژنوتیپ چینی رابطه‌ای وجود داشته باشد. در این راستا، می‌توان استنباط کرد که وجود گلیکوزیدهای استویول بیشتر در ژنوتیپ چینی در شرایط وجود تنش خشکی در مقایسه با ژنوتیپ هندی، یکی از دلایل کاهش کمتر عملکرد برگ در این ژنوتیپ باشد. بر همین اساس، پژوهشگران بیان کردند که وجود گلیکوزیدهای استویول به‌نوعی سازوکار دفاعی گیاه در مقابله با تنش‌های محیطی ازجمله شوری و خشکی محسوب می‌شود (Aghighi Shahverdi *et al*., 2018b؛ Afshari *et al*., 2022).

تأثیر تنش خشکی بر صفات رشدی و عملکردی، پارامترهای مرتبط با ریشه و محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا بررسی شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث تغییرات معنی‌دار در این صفات گردید. همچنین، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف به طریق متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. بیشترین مقاومت در برابر تنش خشکی در ژنوتیپ چینی مشاهده شد، به‌طوری که عملکرد و محتوای مجموع این دو گلیکوزید در این ژنوتیپ بیشتر از ژنوتیپ هندی بود. همچنین، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین صفات رشدی و عملکردی با محتوای این گلیکوزیدها مشاهده شد که نشان می‌دهد افزایش در میانگین این صفات منجر به افزایش سنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا می‌گردد. در نهایت، رگرسیون گام به گام نشان داد که صفاتی مانند عملکرد بیوماس کل و سطح ریشه در ژنوتیپ چینی و ارتفاع بوته و وزن تر برگ در ژنوتیپ هندی می‌توانند به‌عنوان صفات اثرگذار برای تعیین محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا استفاده گردند. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که تنش خشکی به‌طور مستقیم بر عملکرد و محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا تأثیر معنی‌داری دارد و برخی از صفات رشدی و عملکردی

می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای تحمل به تنش خشکی در این گیاه استفاده شوند.

## References


- Afshari, F., Nakhaei, F., Mosavi, S. and Seghatoleslami, M., 2022. Physiological and biochemical responses of *Stevia rebaudiana* Bertoni to nutri-priming and foliar nutrition under water supply restrictions. Industrial Crops and Products, 176: 114399.
- Aghighi Shahverdi, M., Omidi, H. and Tabatabaei, S.J., 2018a. Effect of foliar application of selenium, boron and iron on some physiological traits and glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under salinity stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 33(6): 1017-1033.
- Aghighi Shahverdi, M.A., Omidi, H. and Tabatabaei, S.J., 2018b. Plant growth and steviol glycosides as affected by foliar application of selenium, boron, and iron under NaCl stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Industrial Crops and Products, 125: 408-415.
- Aghighi Shahverdi, M.A., Omidi, H. and Tabatabaei, S.J., 2019. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 18: 355-360.
- Aghighi Shahverdi, M.A., Omidi, H. and Damalas, C.A., 2020. Foliar fertilization with micronutrients improves *Stevia rebaudiana* tolerance to salinity stress by improving root characteristics. Brazilian Journal of Botany, 43: 55-65.
- Ahmad, N., Rab, A., Sajid, M., Ahmad, N., Fazal, H., Ali, M. and Egertsdotter, U., 2021. Sucrose-dependent production of biomass and low-caloric steviol glycosides in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Industrial Crops and Products, 164: 113382.
- Akhavan, S., Shabanpour, M. and Esfahani, M., 2012. Soil Compaction and texture effects on the growth of roots and shoots of wheat. Water and Soil, 26: 12-18.
- Biswas, P., Kumari, A., Modi, A. and Kumar, N., 2024. Improvement and regulation of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Gene, 891: 147809.
- De Andrade, M.V., Lucho, S.R., do Amaral, M.N., Braga, E.J., Ribeiro, P.R. and de Castro, R.D., 2023. Long-day photoperiodic requirements for steviol glycosides and gibberellins biosynthesis and bio-sweetener levels optimization in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Industrial Crops and Products, 204: 117363.
- Ganjali, A., Kafi, M., Bagheri, A. and Ahmadi, F.S., 2003. Allometric relationships for root and shoot characteristics of chickpea seedlings (*Cicer arietinum* L.). Journal of Agriculture Sciences and Technology, 18: 67-80.
- Gorzi, A., Omidi, H. and Bostani, A., 2017. Morpho-physiological responses of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to various priming treatments under drought stress. Applied Ecology and Environmental Research, 16: 4753-4771.
- Gorzi, A.R., Omidi, H. and Bostani, A., 2020. Effects of chemical treatments (iron, zinc and salicylic acid) and soil water potential on steviol glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 39: 297-311.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L. and Angelini, L.G., 2015. The effect of soil moisture depletion on stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. Scientia Horticulturae, 183: 93-99.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Pompeiano, A., Guglielminetti, L. and Angelini, L., 2019. Plant growth retardants (PGRs) affect growth and secondary metabolite biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under drought stress. South African Journal of Botany, 121: 394-401.
- Kou, X., Han, W. and Kang, J., 2022. Responses of root system architecture to water stress at multiple levels: A meta-analysis of trials under controlled conditions. Frontiers in Plant Science, 13: 1085409.
- Lahijanian, S., Eskandari, M., Akhbarfar, G., Azizi, I., Afazel, M. and Ghobadi, C., 2023. Morphological, physiological and antioxidant response of *Stevia rebaudiana* under in vitro agar induced drought stress. Journal of Agriculture and Food Research, 11: 100495.
- Libik-Konieczny, M., Michalec-Warzecha, Ż., Dziurka, M., Zastawny, O., Konieczny, R., Rozpądek, P. and Pistelli, L., 2020. Steviol glycosides profile in *Stevia rebaudiana* Bertoni hairy roots cultured under oxidative stress-inducing conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, 104: 5929-5941.
- Ma, Y., Dias, M.C. and Freitas, H., 2020. Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. Frontiers in Plant Science, 11: 591911.
- Mahdavi Khorami, A., Masoud Sinaki, J., Amini Dehaghi, M., Rezvan, S. and Damavandi, A., 2020.

Sesame (*Sesame indicum* L.) biochemical and physiological responses as affected by applying chemical, biological, and nano-fertilizers in field water stress conditions. Journal of Plant Nutrition, 43: 456-475.
- Pordel, R., Esfahani, M., Kafi, M. and Nezami, A., 2015. Response of *Stevia rebaudiana* Bertoni root system to waterlogging and terminal drought stress. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 6: 238-247
- Pradhan, N., Singh, P., Dwivedi, P. and Pandey, D.K., 2020. Evaluation of sodium nitroprusside and putrescine on polyethylene glycol induced drought stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni under in vitro condition. Industrial Crops and Products, 154: 112754.
- Schiatti-Sisó, I.P., Quintana, S.E. and García-Zapateiro, L.A., 2023. Stevia (*Stevia rebaudiana*) as a common sugar substitute and its application in food matrices: an updated review. Journal of Food Science and Technology, 60: 1483-1492.
- Sheikhalipour, M., Gohari, G., Esmaielpour, B., Panahirad, S., Milani, M.H., Kulak, M. and Janda, T., 2023. Melatonin and $TiO_2$ application-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidant enzymes activities and secondary metabolites in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress conditions. Journal of Plant Growth Regulation, 42: 2023-2040.
- Sofi, P., Rehman, K., Gull, M., Kumari, J., Djanaguiraman, M. and Prasad, P., 2021. Integrating root architecture and physiological approaches for improving drought tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiology Reports, 26: 4-22.
- Tardieu, F., 2022. Different avenues for progress apply to drought tolerance, water use efficiency and yield in dry areas. Current Opinion in Biotechnology, 73: 128-134.
- Wang, Y., Luo, X., Chen, L., Mustapha, A.T., Yu, X., Zhou, C. and Okonkwo, C.E., 2023. Natural and low-caloric rebaudioside A as a substitute for dietary sugars: A comprehensive review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 22: 615-642.