

اثر محلول پاشی سلنیوم، بور و آهن بر برخی صفات فیزیولوژیک و گلیکوزیدهای استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) تحت تنش شوری

مهدی عقیقی شاهرودی^۱، حشمت امیدی^{۲*} و سید جلال طباطبایی^۳

۱- دانشجوی دکترا، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

پست الکترونیک: omidi@shahed.ac.ir

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶

چکیده

به منظور بررسی محلول پاشی سلنیوم، بور و آهن بر عملکرد برگ، میزان رنگرزه های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و میزان گلیکوزیدهای استویول گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) تحت تنش شوری، آزمایشی در شهرستان انزلی- استان گیلان به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۹۵-۱۳۹۴ اجرا شد. سطوح تنش شوری با استفاده از کلرید سدیم در چهار سطح شاهد (کمتر از ۱۰)، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی مولار و محلول پاشی با استفاده از ترکیب های مختلف از سه عنصر آهن، بور و سلنیوم اعمال شد. نتایج نشان داد که اثر تنش شوری و محلول پاشی بر عملکرد برگ، میزان رنگرزه های کلروفیل (a، b و کل)، کاروتنوئید، محتوی پروتئین، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ترکیب های تشکیل دهنده گلیکوزیدهای استویول معنی دار بودند. بیشترین کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b به ترتیب با میانگین ۳۹/۴، ۲۴/۸ و ۱۴/۶ میکروگرم بر گرم وزن تر در محلول پاشی با ترکیب سه عنصر آهن+بور+سلنیوم در شرایط عدم شوری بدست آمد. بیشترین محتوی پروتئین در محلول پاشی با ترکیب آهن و سلنیوم در سطح شوری ۹۰ میلی مولار بود که موجب افزایش ۵/۳ برابری نسبت به تیمار شاهد شد. بیشترین فعالیت آنزیم CAT و SOD به ترتیب در محلول پاشی با ترکیب سه عنصر و ترکیب سلنیوم و آهن در سطح شوری ۹۰ میلی مولار بود که در مقایسه با تیمار شاهد باعث افزایش حدود ۱۳۰ و ۱۱ برابری فعالیت این آنزیم ها شد. بیشترین و کمترین میزان ریبودیوزاید A، استویوزاید و ریبودیوزاید C به ترتیب در محلول پاشی با ترکیب سه عنصر (آهن + بور + سلنیوم) در سطح شوری ۳۰ میلی مولار و عدم محلول پاشی در سطح شوری ۹۰ میلی مولار بدست آمد. به طور کلی به منظور دستیابی به میزان بالاتر گلیکوزیدهای استویول، محلول پاشی با ترکیب سه عنصر سلنیوم، بور و آهن و تنش شوری تا سطح ۳۰ میلی مولار توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: استویوزاید، آنتی اکسیدان، پروتئین، ریبودیوزاید، کلروفیل.

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni از خانواده آستراسه (Astraceae)، گیاه دارویی چند منظوره (Multipurpose) و چندساله است که خاستگاه آن برزیل و پاراگوئه می‌باشد (Goyal et al., 2010). اصلی‌ترین ویژگی برگ‌های استویا داشتن شیرینی بسیار بالای آن (۲۵۰ تا ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز) می‌باشد که به دلیل ترکیب‌های دی‌ترین به نام گلیکوزیدهای استویول (Steviol glycoside) است (Angela et al., 2014). اصلی‌ترین گلیکوزیدهای استویول در برگ این گیاه، استویوزاید (۱۳-۴٪)، ربودیوزاید A (۲-۴٪)، ربودیوزاید C (۱-۲٪) و دالکوزاید A (۷-۴٪) می‌باشند (Gupta et al., 2016).

تنش شوری به‌عنوان یکی از شایع‌ترین تنش‌های محیطی است که با محدود کردن رشد و نمو گیاه، تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی را به مخاطره می‌اندازد (Waller et al., 2005). کاهش زیست‌توده تولیدی، کم شدن کارایی فتوسنتز و تغییر در میزان آماس برگ از اثرات اولیه شوری در گیاهان است (Munns, 2002). همچنین در طی تنش، همه فرایندهای اصلی گیاه از قبیل تولید انرژی، متابولیسم چربی‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Weisany et al., 2012). تنش اسمزی از اثرات ثانویه حاصل از شوری است که باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. گیاهان برای کاهش اثرات مخرب و پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلولهای گیاهی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (همانند CAT، SOD، POX و غیره) و غیرآنزیمی (همانند پرولین، رنگریزه‌ها، قند محلول و غیره) برخوردارند (Pan et al., 2005; Noori Akandi et al., 2016). هر چند استویا می‌تواند در شرایط مختلف آب و هوایی و خاک، به‌طور موفقیت‌آمیزی رشد کند (Noori Akandi et al., 2016) اما افزایش شوری آب آبیاری موجب کاهش رشد رویشی استویا،

از جمله تعداد شاخه، تعداد، سطح برگ، وزن تر و خشک ساقه می‌گردد (Ebtsam et al., 2014). گزارش شده که افزایش غلظت شوری از صفر تا ۱۲۵ میلی‌مولار، افزایش میزان قند و پرولین و کاهش میزان کلروفیل این گیاه را به‌دنبال داشته است (Noori Akandi et al., 2016).

مصرف بهینه کود در گیاهان ضمن افزایش عملکرد موجب افزایش تحمل در مقابل تنش‌های محیطی از قبیل خشکی و شوری می‌گردد. عناصر غذایی مختلفی برای رشد و نمو گیاهان شناخته شده‌اند که در فرایندهای متابولیک و فیزیولوژیک گیاه نقش‌های مختلفی دارند. از میان عناصر موجود، سلینیوم به‌عنوان یک عنصر غیر ضروری برای گیاهان اما ضروری برای جانوران و انسان شناخته شده است (Bybordi, 2016). سلینیوم از نظر خواص شیمیایی مشابه گوگرد می‌باشد، این تشابه ممکن است در فرایندهای جایگزینی سلول تأثیر بگذارد و سلینیوم جایگزین گوگرد در پروتئین‌ها و دیگر ترکیب‌های گوگردی شود (Nowak et al., 2004). سلینیوم باعث افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی و کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود (Xue et al., 2001). سلینیوم باعث جلوگیری از تخریب کلروفیل در شرایط تنش‌های محیطی (Seppanen et al., 2003) و سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تنش دیده می‌شود (Djanaguiraman et al., 2005) و Sajidi و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که استفاده از سلینیوم به‌طور قابل قبولی اثرات ناشی از خسارت تنش را به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش و باعث پایداری عملکرد می‌شود. Keling و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی نقش سلینیوم در گیاه خربزه در شرایط تنش شوری گزارش کردند که تیمار بذر با سلینیوم به‌طور مستقیم با تأثیر بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (SOD، CAT و POX) در گیاه موجب افزایش عملکرد ماده خشک گیاهچه و عملکرد کل گردید.

ترکیب گلیکوزیدهای استویول در شرایط شوری کلرید سدیمی، آزمایشی در شرایط گلدانی و فضای آزاد (فضای باز مزرعه و عدم استفاده از حفاظ در اطراف گلدان) در مزرعه تحقیقاتی جهاد کشاورزی در شهرستان انزلی- استان گیلان در اواخر اردیبهشت ماه سال ۹۵-۱۳۹۴ به صورت فاکتوریل در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح تنش شوری صفر (به عنوان شاهد و دارای هدایت الکتریکی کمتر از ۱۰ میلی مولار)، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی مولار و محلول پاشی با ترکیب‌های عناصر غذایی در هشت سطح، عدم محلول پاشی (به عنوان شاهد)، محلول پاشی آهن، محلول پاشی بور، محلول پاشی سلنیوم، محلول پاشی آهن + بور، محلول پاشی آهن + سلنیوم، محلول پاشی بور + سلنیوم و محلول پاشی آهن + بور + سلنیوم بودند. کشت در داخل گلدان (سه نشاء در هر گلدان) با خاک دارای بافت شنی لومی، ماده آلی ۰/۶٪ و به ترتیب دارای ۱/۹، ۸/۶، ۳۱۱، ۲/۱ و ۷۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک نیتروژن نیتراتی، فسفر، پتاسیم، آهن و بور بود. از آب دیونیزه با هدایت الکتریکی کمتر از ۱۰ میلی مولار برای تیمار شاهد استفاده شد. اعمال تیمارهای شوری بعد از گذشت ۱۵ روز پس از کاشت نشاء کشت بافتی (پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها) به ازای هر گلدان به صورت روزانه تا روز آخر آزمایش (۷۲ روز پس از کاشت) انجام شد و بعد از گذشت هر هفت روز، برای جلوگیری از تجمع نمک در خاک و ثابت بودن هدایت الکتریکی خاک، آبشویی برای شستشوی نمک‌های تجمع یافته در خاک انجام گردید. در ماه‌های اجرای آزمایش با توجه به آمار سالیانه هواشناسی، بارندگی انجام نشد. داده‌های میزان بارندگی و ساعات آفتابی در شکل ۱ ارائه شده است.

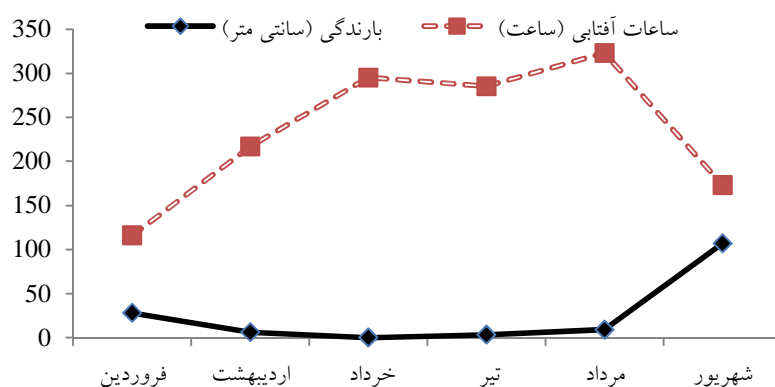
عناصر ریزمغذی برای رشد طبیعی گیاهان مورد نیازند. زیرا در بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه دخالت دارند و تأثیر مثبتی در افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاهان دارویی و معطر دارند (Ramroudi *et al.*, 2011). گیاهان در بین همه ریزمغذی‌ها، بیشترین نیاز را به آهن دارند، زیرا این عنصر بخشی از گروه کاتالیزوری بسیاری از آنزیم‌های اکسیداسیون و احیاء است (Ladan Moghadam *et al.*, 2012).

بور (B) اغلب به صورت اسید بوریک (H_3BO_3) یکی از عناصر ضروری مورد نیاز برای رشد و توسعه متعادل در گیاهان می‌باشد (Abdollahi *et al.*, 2012). عنصر بور دارای اثر بر روی بسیاری از کارکردهای گیاه از جمله جایجایی هورمون‌های جذب نمک، فرایند گلدهی و میوه‌دهی و جوانه‌زنی دانه‌گرده است (Rafeii & Pakkish, 2014). با توجه به اثر بور در افزایش انتقال قند و هیدرات‌های کربن در آوندهای آبکش نقش بسیار مؤثری در بهبود کیفیت گیاه دارد (Ahmadi & Mohammadkhani, 2014).

با توجه به تأثیر عناصر سلنیوم، بور و آهن در تغذیه، متابولیسم و رشد گیاهان و اثرات تعدیلی آنها در شرایط تنش شوری و همچنین به دلیل اهمیت گیاه دارویی استویا و نداشتن اطلاعات کافی درباره تغذیه آن، هدف از این پژوهش، بررسی تغذیه برگی با ترکیب‌های مختلف از سه عنصر آهن، سلنیوم و بور بر میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیب گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا در شرایط تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر محلول پاشی ترکیب‌های مختلف از عناصر سلنیوم، آهن و بور بر برخی صفات فیزیولوژیک و



شکل ۱- داده‌های ماهانه هواشناسی مربوط به میزان بارندگی و ساعات آفتابی

(۷۲ روز بعد از کاشت) نمونه‌گیری به منظور اندازه‌گیری میزان رنگرزه‌های فتوسنتزی، فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سایر صفات از هر واحد آزمایشی (گلدان) انجام شد و بلافاصله در داخل فویل آلومینیومی به داخل ازلت مایع و بعد یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری‌های بعدی انتقال داده شد. اندازه‌گیری رنگرزه‌های فتوسنتزی با استفاده از روش Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) انجام شد. بر طبق این روش، ۰/۲۵ گرم برگ گیاه مورد نظر در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ کاملاً هموژنیزه گردید. بعد از سانتریفیوژ نمونه‌ها میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ قرائت شد. با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل و نیز میزان کاروتنوئید محاسبه گردید.

محلول پاشی عناصر غذایی در طی دو مرحله آغاز رشد گیاه و شاخه‌دهی (V_3 : Plant growth and branching) و رشد دوباره گیاهچه (V_4 : Plant regrowth) انجام شد. آهن از منبع سکوسترن ۱۳۸ به میزان چهار کیلوگرم در هکتار (دارای ۷٪ آهن خالص) (با غلظت ۵ در ۱۰۰۰)، بور از منبع اسید بوریک به میزان ۱/۲ کیلوگرم در هکتار (دارای ۱۷٪ بور خالص) (با غلظت ۵ در ۱۰۰۰) و سلنیوم از منبع سلنیت سدیم به میزان ۲۰ گرم در هکتار (دارای ۱۴/۵٪ سلنیوم خالص) (با غلظت ۲ در ۱۰۰۰) براساس بررسی منابع مختلف مورد استفاده قرار گرفت (Feng et al., Baloch et al., 2008; Keling et al., 2013; 2013). به منظور افزایش جذب عناصر غذایی محلول پاشی شده از سطح برگ از مویان (Surfactants) نیز استفاده شد.

در انتهای دوره رشد رویشی و قبل از گلدهی گیاه

$$Chl a = (12.25 \times A663.2 - 2.79 \times A646.8)$$

$$Chl b = (21.50 \times A646.8 - 5.1 \times A663.2)$$

$$Total Chl = (7.15 \times A663.2 + 18.71 \times A646.8)$$

$$Carotenoids = (1000 \times A470 - 1.82 \times Chl a - 85.02 \times Chl b) / 198$$

نهایی یک میلی‌لیتر برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، ۶۶ میکرولیتر نیتروبولوتترازولیوم ۰/۷۵ میلی‌مولار، ۶۶ میکرولیتر ربیوفلاوین و ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به تیمار شاهد در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آن براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

میزان گلیکوزیدهای استوبول با استفاده از HPLC براساس پروتکل پیشنهادی Karimi و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. ستون استفاده شده در این روش از ستون Chromafix-C18 بود. ۲۰ ماکرولیتر از عصاره تهیه شده به ستون فاز معکوس RP-250 در دستگاه HPLC مدل Unican-crystal-20 ساخت انگلستان تزریق شد. درجه حرارت ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فاز متحرک شامل ۶۵٪ آب و ۳۵٪ استونیتریل با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه بود که با شرایط ایزوکراتیک از ستون عبور می‌کرد. طول موج دتکتور (از نوع فرابنفش) در ۲۱۰ نانومتر تنظیم گردید و در نهایت غلظت هر ماده براساس سطح زیر منحنی پیک خروجی و مقایسه با پیک استاندارد مشخص گردید. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS9.1 تجزیه و تحلیل شد. سپس مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

عملکرد برگ

تنش شوری و محلول‌پاشی اثر معنی‌داری بر عملکرد برگ داشتند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش این دو عامل نشان داد که بیشترین عملکرد برگ در عدم تنش شوری و محلول‌پاشی با ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلنیوم با میانگین ۲۲/۹ گرم به‌ازای بوته بدست آمد و کمترین میانگین در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار و عدم محلول‌پاشی بود

به‌منظور اندازه‌گیری محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، عصاره‌گیری با استفاده از ۲ میلی‌لیتر از ترکیب Tris و Polyvinylpyrrolidone و ۰/۵ گرم نمونه گیاهی انجام شد. برای تعیین مقدار کل پروتئین محلول از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین، ۲۰ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده را در ۸۰ میکرولیتر بافر استخراج رقیق کرده و پنج میلی‌لیتر معرف کوماکسی بریانت بلو تازه به آن افزوده و دو دقیقه به هم زده شد و پس از پنج دقیقه، میزان جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer ساخت آمریکا، مدل Lambda 25) قرائت گردید و با استفاده منحنی استاندارد تهیه شده با سرم آلبومین گاوی میزان پروتئین در نمونه محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم POX از روش MacAdam و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. اندازه‌گیری براساس میزان اکسید شدن گوایکول توسط این آنزیم انجام می‌شود. برای اندازه‌گیری، ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز، که شامل ۱۳ میلی‌مولار گوایکول، ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) بود، مخلوط کرده و جذب آن به مدت یک دقیقه با فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم CAT از روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) استفاده شد. براساس این روش ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری CAT، که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و ۱۵ میلی‌مول پراکسید هیدروژن بود، مخلوط گردید. سپس جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD براساس روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۵) انجام شد. محلول واکنش در حجم

شوری ۹۰ میلی مولار با میانگین ۸۶/۹ میلی گرم بر گرم وزن تر بود که باعث افزایش ۵/۳ برابری نسبت به تیمار شاهد شد. کمترین مقدار در سطح شوری شاهد و عدم محلول پاشی و محلول پاشی با بور بود (جدول ۲).

فعالیت آنزیم CAT

اثر تنش شوری، محلول پاشی و برهم کنش این دو بر فعالیت آنزیم CAT معنی دار بودند (جدول ۱). بیشترین فعالیت این آنزیم در محلول پاشی با ترکیب سه عنصر (آهن، بور و سلینیوم) در سطح شوری ۹۰ میلی مولار با میانگین ۱۲۷/۶ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه بود که در مقایسه با تیمار شاهد باعث افزایش حدود ۱۳۰ برابری فعالیت این آنزیم شد. کمترین فعالیت نیز در تیمار شاهد (عدم محلول پاشی و عدم تنش شوری) با میانگین فعالیت ۰/۹ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه بدست آمد (جدول ۲).

فعالیت آنزیم POX

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر تنش شوری و محلول پاشی بر میزان فعالیت آنزیم POX معنی دار بودند (جدول ۱). محلول پاشی با ترکیب آهن + سلینیوم، آهن + بور + سلینیوم و سلینیوم بیشترین فعالیت این آنزیم (به ترتیب با میانگین ۴۶۴/۳، ۴۵۲/۲ و ۴۲۰/۴ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) را نشان دادند و کمترین فعالیت در عدم محلول پاشی (با میانگین ۱۵۶/۶ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) بود (جدول ۳). با افزایش سطوح تنش شوری، میزان فعالیت این آنزیم افزایش معنی دار نشان داد، به طوری که بیشترین فعالیت (۴۹۰/۳) واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) در سطح شوری ۹۰ میلی مولار بود و کمترین فعالیت با میانگین ۱۹۴/۷ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه در سطح شوری شاهد بدست آمد (جدول ۳).

(جدول ۲). تنش شوری باعث کاهش عملکرد گردید ولی محلول پاشی به ویژه با ترکیب‌های آهن، بور و سلینیوم اثرات منفی ناشی از تنش شوری را تعدیل کرد.

کلروفیل و کاروتنوئید

اثر تنش شوری، محلول پاشی و برهم کنش تنش شوری در محلول پاشی بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بودند (جدول ۱). در محلول پاشی با ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلینیوم در شرایط عدم تنش شوری، بیشترین میانگین کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b به ترتیب با میانگین ۳۹/۴، ۲۴/۸ و ۱۴/۶ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. کمترین میانگین کلروفیل کل در عدم محلول پاشی در تنش شوری ۶۰ و ۹۰ میلی مولار (به ترتیب ۹/۴ و ۹/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) و کمترین مقدار کلروفیل a و b در تنش شوری ۶۰ میلی مولار در عدم محلول پاشی به ترتیب با میانگین ۷/۲ و ۲/۲ میکروگرم بر گرم وزن تر بودند (جدول ۲).

میزان کاروتنوئید تحت تأثیر تنش شوری، محلول پاشی و برهم کنش این دو عامل تغییر معنی دار نشان داد (جدول ۱). بیشترین محتوی کاروتنوئید در ترکیب تیماری محلول پاشی با ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلینیوم در سطح تنش شوری ۳۰ میلی مولار با میانگین ۲/۰ میکروگرم بر گرم وزن تر بود که این تیمار باعث افزایش ۷۱ درصدی در مقایسه با تیمار شاهد شد (جدول ۲).

محتوی پروتئین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش شوری، محلول پاشی و برهم کنش تنش شوری و محلول پاشی بر محتوی پروتئین معنی دار بودند (جدول ۱). مقایسه میانگین برهم کنش شوری و محلول پاشی نشان داد که بیشترین محتوی پروتئین در محلول پاشی با ترکیب آهن و سلینیوم در سطح

فعالیت آنزیم SOD

نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که اثر تنش شوری، محلول پاشی و برهم‌کنش این دو (تنش شوری × محلول پاشی) بر فعالیت آنزیم SOD معنی دار بودند (جدول ۱). بیشترین فعالیت این آنزیم در محلول پاشی با ترکیب سلنیوم و آهن در سطح شوری ۹۰ میلی مولار با میانگین ۱۱۸/۲ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه بدست آمد که افزایش حدود ۱۱ برابری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. کمترین فعالیت این آنزیم در سطح شوری شاهد و محلول پاشی با عنصر بور مشاهده شد (جدول ۲).

ترکیب‌های گلیکوزیدهای استویول

نتایج حاصل از آنالیز ترکیب‌های گلیکوزیدهای استویول توسط دستگاه HPLC نشان داد که اثر شوری و محلول پاشی عناصر بر میزان ریبودیوزاید A، استویوزاید، ریبودیوزاید C، دالکوزاید A و ریبودیوزاید B معنی دار بودند. همچنین برهم‌کنش شوری در محلول پاشی بر میزان ریبودیوزاید A، استویوزاید و ریبودیوزاید C معنی دار بود (جدول ۱).

بیشترین و کمترین میزان ریبودیوزاید A، استویوزاید و

ریبودیوزاید C به ترتیب در محلول پاشی با ترکیب سه عنصر (آهن + بور + سلنیوم) در سطح شوری ۳۰ میلی مولار و عدم محلول پاشی در سطح شوری ۹۰ میلی مولار بدست آمد (شکل ۲). محلول پاشی با ترکیب سه عنصر در سطح شوری ۳۰ میلی مولار باعث افزایش ۷۲/۹، ۹۷/۶ و ۵۶/۵ درصد به ترتیب در میانگین ریبودیوزاید A، استویوزاید و ریبودیوزاید C در مقایسه با تیمار شاهد گردید. تنش شوری کم تا متوسط (۳۰ و ۶۰ میلی مولار) باعث افزایش معنی دار ترکیب‌های تشکیل دهنده گلیکوزیدهای استویول شد، ولی سطوح بالای تنش شوری (۹۰ میلی مولار) کمترین میانگین این ترکیب‌ها را داشت. بیشترین میانگین دالکوزاید A و ریبودیوزاید B در سطح شوری ۳۰ میلی مولار به ترتیب با ۸/۳ و ۴/۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک برگ بدست آمد. محلول پاشی با ترکیب سه عنصر (آهن، سلنیوم و بور) بیشترین دالکوزاید A (۸/۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک برگ) و ریبودیوزاید B (۴/۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک برگ) را تولید کرد، همچنین محلول پاشی با ترکیب سلنیوم و بور نیز بیشترین ریبودیوزاید B (۴/۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک برگ) را داشت (جدول ۳).

جدول ۱- نتایج میانگین مربعات اثر محلول پاشی ترکیب‌های مختلف سلنیوم، آهن و بور بر عملکرد برگ، میزان رنگریشه‌های فتوسنتزی، صفات فیزیولوژیک

و ترکیب‌های گلیکوزیدهای استویول

میانگین مربعات (MS)							درجه	منابع تغییر	
فعالیت CAT	محتوی پروتئین	کاروتنوئید	نسبت کلروفیل a/b	کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل کل	عملکرد برگ	آزادی	(S.O.V)
۱۱۸۴۸/۴**	۴۸/۴**	۰/۴۶**	۰/۲۶**	۷/۱۹**	۵۰۵/۴**	۱۲۶۵/۷**	۱۷۵/۸**	۳	شوری (S)
۴۰۷۶/۵**	۱۵/۷**	۰/۱۵*	ns۰/۱۰	۱/۰۳**	۷۰/۲**	۱۷۳/۲**	۱۰۴/۸**	۷	محلول پاشی (F)
۴۴۹/۵**	۱/۰**	۰/۱۳*	ns۰/۰۷	۰/۲۳**	۱۲/۰**	۲۹/۴**	۱۸/۵**	۲۱	S×F
۷۶/۶	۰/۳۷	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۸	۲/۵۲	۴/۹۴	۷/۱۷	۶۴	خطا
۱۹/۹۱	۹/۵۱	۱۷/۴۳	۱۴/۵۱	۱۳/۹۰	۱۲/۸۰	۱۲/۷۶	۲۴/۷۲	-	ضریب تغییرات (%)

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح ۵٪ و ۱٪

ادامه جدول ۱-

میانگین مربعات (MS)							درجه	منابع تغییر
ریبودیوزاید B	دالکوزاید A	ریبودیوزاید C	استویوزاید	ریبودیوزاید A	فعالیت SOD	فعالیت POX	آزادی	(S.O.V)
۲۵/۴۴**	۱۸/۸۲**	۳/۸۲**	۱۱۹۶۵/۱**	۵۷۹/۴**	۱۷۲۲۱/۶**	۳۸۹۳۳۰/۷**	۳	شوری (S)
۳/۰۰**	۴/۰۲**	۰/۴۲**	۶۷۷/۳**	۶۵/۶**	۱۵۳۴/۵**	۱۳۰۷۲۷/۱**	۷	محلول پاشی (F)
۰/۳۶ ns	۰/۴۸ ns	۰/۱۰**	۳۹/۶**	۱۰/۴**	۱۲۵۲/۲**	۶۵۸۵/۸ ns	۲۱	S×F
۰/۴۲	۱/۲۹	۰/۰۱۸	۵/۲۹	۳/۲۲	۲۲۲/۱	۴۷۲۲/۷	۶۴	خطا
۱۸/۰۷	۱۵/۸۳	۷/۰۰	۳/۱۶	۶/۹۲	۲۱/۴۰	۱۹/۹۲	-	ضریب تغییرات (%)

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح ۵٪ و ۱٪

جدول ۲- مقایسه میانگین برهم کنش ترکیب‌های مختلف سلنیوم، آهن و بور و شوری بر عملکرد برگ، میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی و برخی صفات فیزیولوژیک

فعالیت آنزیم SOD (U/mg protein.min)	فعالیت CAT (U/mg protein.min)	محتوی پروتئین (mg/g FW)	کاروتنوئید (µg/g FW)	کلروفیل b (µg/g FW)	کلروفیل a (µg/g FW)	کلروفیل کل (µg/g FW)	عملکرد برگ (g per plant)	ترکیب‌های محلول پاشی	سطوح شوری (mM)
۱۰/۴۹ lm	۰/۹۷ s	۱۶/۳ k	۱/۲۱ efg	۴/۱۰ fg	۱۰/۹۵ f	۱۵/۰۵ f-i	۳/۹۷ h.k	عدم محلول پاشی	
۷/۱۷ m	۶/۵۷ rs	۱۹/۹ k	۱/۹۲ ab	۴/۷۳ efg	۱۷/۱۰ d	۲۱/۸۳ e	۴/۶۱ g.k	بور	
۱۶/۱۱ lm	۲۸/۹۳ k-p	۵۳/۰ hi	۱/۳۸ c-g	۱۰/۴۳ b	۱۷/۸۱ d	۲۸/۲۴ bcd	۱۰/۳۰ b.f	سلنیوم	
۵۵/۶۶ h-k	۱۹/۰۳ o-r	۵۳/۱ hi	۱/۸۰ a-d	۱۰/۲۶ b	۲۰/۶۹ bc	۳۰/۹۶ bc	۱۱/۵۰ bcd	آهن	شاهد
۴۴/۴۸ ijk	۱۳/۶۴ p-s	۵۳/۴ hi	۱/۸۸ abc	۷/۰۶ cde	۱۸/۸۴ bcd	۲۵/۸۹ d	۱۱/۴۰ bcd	بور+آهن	
۳۰/۲۰ klm	۴۱/۴۹ g-m	۶۶/۴ fg	۱/۷۴ a-d	۱۰/۴۰ b	۲۱/۳۷ b	۳۱/۷۶ b	۱۲/۱۳ bc	سلنیوم+آهن	
۴۵/۶۲ ijk	۲۱/۵۵ o-r	۴۸/۹ ij	۱/۶۷ a-e	۸/۷۴ bc	۱۸/۳۱ cd	۲۷/۰۵ d	۱۰/۷۸ b.e	سلنیوم + بور	
۵۶/۰۱ h-k	۳۸/۶۴ h-n	۵۱/۱ ij	۱/۶۶ a-f	۱۴/۶۳ a	۲۴/۸۶ a	۳۹/۴۸ a	۲۲/۹۰ a	آهن+بور+سلنیوم	
۳۸/۸۴ jkl	۸/۸۶ qrs	۴۱/۶ j	۱/۴۹ b-g	۲/۷۸ g	۹/۶۸ fgh	۱۲/۴۶ h-k	۳/۰۰ zk	عدم محلول پاشی	
۶۵/۶۴ f-j	۱۵/۳۸ p-s	۴۷/۳ ij	۱/۴۲ b-g	۳/۴۸ fg	۹/۸۴ fgh	۱۳/۳۱ g-k	۸/۶۴ b.i	بور	
۴۴/۳۶ ijk	۵۰/۵۱ e-i	۶۷/۸ efg	۱/۴۶ b-g	۴/۱۰ fg	۱۰/۶۷ fg	۱۴/۷۷ f-j	۶/۴۲ d.j	سلنیوم	
۶۶/۱۹ f-j	۲۵/۳۴ m-p	۷۳/۷ b-g	۱/۷۳ a-e	۴/۰۶ f	۱۳/۷۷ e	۱۷/۸۶ f	۸/۷۴ b.h	آهن	۳۰
۸۴/۰۶ c-h	۲۶/۰۱ l-p	۵۲/۵ hij	۱/۱۵ fg	۶/۲۱ c-f	۱۰/۸۳ f	۱۷/۰۴ fg	۹/۷۶ b.g	بور+آهن	
۱۰۶/۰۱ a-d	۴۱/۳۶ g-m	۷۸/۱ a-f	۱/۶۹ a-e	۶/۰۲ def	۱۶/۱۶ de	۲۲/۱۸ e	۱۰/۵۶ b.f	سلنیوم+آهن	
۶۴/۰۴ g-j	۳۲/۱۴ j-o	۵۵/۶ hi	۰/۹۸ g	۶/۲۱ c-f	۱۰/۳۱ fgh	۱۶/۵۳ fgh	۹/۸۰ b.g	سلنیوم + بور	
۶۳/۹۷ g-j	۴۵/۳۸ f-k	۷۰/۰ d-g	۲/۰۷ a	۷/۵۴ cd	۲۱/۳۱ b	۲۸/۸۵ bcd	۱۳/۷۱ b	آهن+بور+سلنیوم	

ادامه جدول ۲-...

فعالیت آنزیم SOD (U/mg protein.min)	فعالیت CAT (U/mg protein.min)	محتوی پروتئین (mg/g FW)	کاروتنوئید (µg/g FW)	کلروفیل b (µg/g FW)	کلروفیل a (µg/g FW)	کلروفیل کل (µg/g FW)	عملکرد برگ (g per plant)	ترکیب‌های محلول‌پاشی	سطوح شوری (mM)
۸۵/۱۰ b-g	۲۳/۸۱ n-q	۵۴/۷ hi	۱/۲۸ d-g	۲/۲۲ g	۷/۲۶ h	۹/۴۸ k	۲/۹۸ jk	عدم محلول‌پاشی	۶۰
۱۰۵/۹۹ a-d	۴۸/۶۷ f-j	۶۷/۶ efg	۱/۲۸ d-g	۴/۱۴ fg	۹/۶۶ fgh	۱۳/۸۰ f-k	۷/۱۶ c.j	بور	
۹۹/۹۸ a-e	۶۶/۳۷ cde	۸۰/۲ a-d	۱/۳۰ d-g	۳/۷۳ fg	۹/۱۱ fgh	۱۲/۸۵ g-k	۶/۳۶ d.j	سلنیوم	
۸۸/۹۱ b-g	۶۸/۰۶ cd	۷۷/۹ a-f	۱/۴۸ b-g	۳/۰۵ g	۹/۷۵ fgh	۱۲/۸۰ g-k	۴/۵۷ g.k	آهن	
۹۷/۳۱ a-e	۳۴/۳۵ i-o	۷۱/۵ c-g	۱/۳۸ c-g	۲/۵۷ g	۸/۳۴ fgh	۱۰/۹۱ ijk	۷/۲۴ c.j	بور+آهن	
۸۱/۸۵ c-h	۵۲/۹۴ d-h	۸۴/۸ ab	۱/۴۷ b-g	۲/۷۹ g	۹/۷۹ fgh	۱۲/۵۹ h-k	۷/۳۰ c.j	سلنیوم+آهن	
۸۹/۸۳ a-g	۵۵/۶۴ d-g	۷۱/۰ c-g	۱/۴۸ b-g	۲/۷۸ g	۹/۷۴ fgh	۱۲/۵۲ h-k	۴/۴۷ g.k	سلنیوم + بور	
۳۰/۹۴ klm	۷۷/۳۸ c	۷۷/۵ a-f	۱/۳۰ d-g	۴/۴۹ efg	۱۰/۶۴ fg	۱۵/۱۳ f-i	۹/۱۱ b.h	آهن+بور+سلنیوم	
۶۷/۰۵ f-j	۳۳/۲۵ j-o	۶۳/۸ gh	۱/۳۲ d-g	۲/۲۵ g	۷/۵۵ gh	۹/۸۰ k	۰/۴۴ k	عدم محلول‌پاشی	۹۰
۷۷/۰۳ d-h	۴۲/۲۹ g-l	۷۰/۶ c-g	۱/۳۸ c-g	۲/۴۲ g	۸/۲۰ fgh	۱۰/۶۲ jk	۲/۹۲ jk	بور	
۹۴/۲۵ a-f	۱۰۹/۸۰ b	۸۱/۳ a-d	۱/۳۵ d-g	۳/۰۹ g	۸/۷۲ fgh	۱۱/۸۱ ijk	۷/۸۸ c.j	سلنیوم	
۱۰۶/۶۲ abc	۵۹/۰۰ def	۷۹/۵ a-e	۱/۲۹ d-g	۲/۹۵ g	۸/۱۵ fgh	۱۱/۱۰ ijk	۳/۳۸ ijk	آهن	
۹۹/۹۲ a-e	۶۱/۷۷ c-f	۷۳/۰ b-g	۱/۳۲ d-g	۳/۱۱ g	۸/۹۸ fgh	۱۲/۰۹ ijk	۷/۱۱ c.j	بور+آهن	
۱۱۸/۲۲ a	۷۵/۷۳ c	۸۶/۹ a	۱/۲۹ c-g	۳/۸۶ fg	۹/۹۶ fgh	۱۳/۸۳ f-k	۵/۳۶ f.k	سلنیوم+آهن	
۷۳/۱۵ e-i	۵۴/۳۴ d-h	۷۶/۱ a-f	۱/۳۲ d-g	۲/۴۰ g	۷/۶۰ gh	۱۰/۹۹ jk	۵/۴۶ e.k	سلنیوم + بور	
۱۱۳/۷۸ ab	۱۲۷/۶۱ a	۸۲/۳ abc	۱/۴۹ b-g	۴/۰۵ fg	۱۱/۰۹ f	۱۵/۱۴ f-i	۶/۸۰ d.j	آهن+بور+سلنیوم	

براساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن، حروف غیرمشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تنش شوری و محلول پاشی بر برخی صفات مورد مطالعه

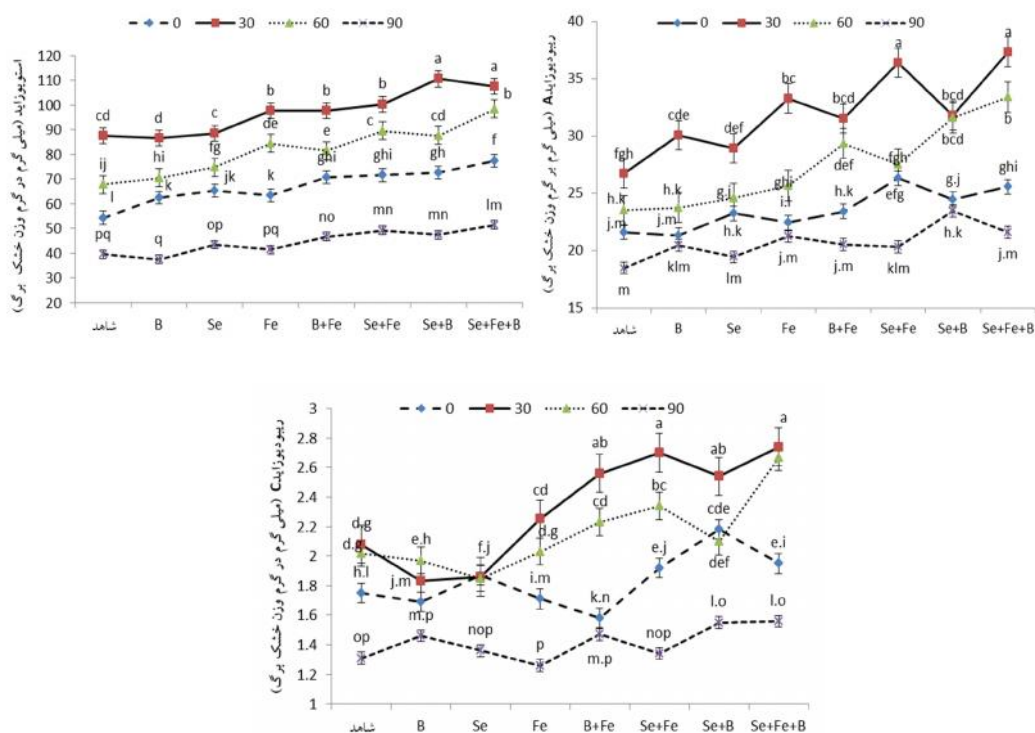
ریبودیوزاید B (mg/g DW)	دالکوزاید A (mg/g DW)	فعالیت آنزیم POX (U/mg protein.min)	سطوح تنش شوری (میلی مولار)
۳/۲۱ c	۶/۸۰ bc	۱۹۴/۷۸ a	صفر (شاهد)
۴/۸۰ a	۸/۳۸ a	۲۹۷/۳۶ b	۳۰
۴/۰۲ b	۷/۲۵ b	۳۹۷/۰۶ c	۶۰
۲/۴۱ d	۶/۳۱ c	۴۹۰/۳۳ d	۹۰
ترکیب‌های محلول پاشی			
۲/۹۳ c	۶/۴۳ c	۱۵۶/۶۵ d	عدم محلول پاشی
۳/۰۹ c	۷/۰۴ bc	۲۵۰/۶۸ c	بور
۳/۳۰ bc	۶/۶۲ c	۴۲۰/۴۳ a	سلنیوم
۳/۵۰ bc	۷/۰۳ bc	۳۵۰/۳۱ b	آهن
۳/۸۰ ab	۷/۲۰ abc	۳۳۹/۴۸ b	بور+آهن
۳/۸۰ ab	۷/۸۴ ab	۴۶۴/۳۳ a	سلنیوم+آهن
۴/۱۲ a	۷/۱۶ bc	۳۲۴/۹۵ b	سلنیوم + بور
۴/۳۷ a	۸/۱۷ a	۴۵۲/۲۱ a	آهن+ بور + سلنیوم

بر اساس مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن، حروف غیرمشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.

بحث

Sarani (2014)، (Noori Akandi *et al.*, 2016)، (Sarani *et al.*, 2013) و چغندر قند (Koyro, 2000) مشاهده شده است. کلروفیل یکی از اجزای کلروپلاست است که برای فتوسنتز مهم است و محتوی نسبی کلروفیل، رابطه‌ای مثبت با میزان فتوسنتز دارد. غلظت‌های پایین رنگدانه‌های فتوسنتزی به‌طور مستقیم می‌تواند قابلیت فتوسنتز و تولید اولیه را محدود کند (Anjum *et al.*, 2011).

آثار شوری بر گیاهان شامل ممانعت از رشد و تولید، کاهش فتوسنتز، تنفس و سنتز پروتئین‌ها و در نهایت، در سطوح بالاتر تنش شوری مرگ است (Karimi *et al.*, 2015). کاهش کلروفیل در شرایط تنش شوری ممکن است نتیجه توقف مسیر بیوسنتز، تحریک سازوکار تخریبی آن و یا هر دو حالت باشد (Sarani *et al.*, 2013). کاهش کلروفیل تحت تنش شوری در گیاهان مختلف از جمله استویا (Rathore



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر تنش شوری و ترکیب‌های مختلف محلول پاشی با عناصر

بور (B)، آهن (Fe) و سلینیوم (Se) بر محتوی استویوزاید، ریبودیوزاید A و ریبودیوزاید

مثبت داشته و از این طریق باعث افزایش کلروفیل می‌گردد (Hassanzadeh *et al.*, 2016). سلینیوم نیز از راه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود سنتز کلروفیل می‌گردد (Shekari *et al.*, 2016)، در کل می‌توان گفت که محلول پاشی ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلینیوم موجب افزایش میانگین کلروفیل‌های a، b و کل می‌گردد. به‌طور کلی بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه در شرایط تنش باعث حفاظت گیاه در برابر سمیت نمک می‌گردد.

کاروتنوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بیولوژیکی نقش بسیار مهمی در حفاظت از بافت گیاهی ایفاء می‌کنند. به‌نحوی که عدم حضور کاروتنوئیدها ممکن است باعث آسیب فتواکسیداتیو شدید در بافت گیاهی گردد (Gill & Tuteja, 2010). افزایش غلظت کاروتنوئیدها همراه با افزایش جزئی

محلول پاشی با ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلینیوم در سطح شوری شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار به ترتیب باعث افزایش ۲/۶۲، ۲/۳۱، ۱/۵۹ و ۱/۵۴ برابری میزان کلروفیل کل در مقایسه با تیمار شاهد گردید (جدول ۲). عناصر ریزمغذی، آنزیم‌های دخیل در سنتز کلروفیل (مانند کربنیک دهیدروژناز، تریپتوفان سنتتاز و غیره) را فعال کرده و محلول پاشی آنها باعث افزایش میزان انواع کلروفیل می‌گردد (Mohammadzadeh Toutouchi & Amirnia, 2016)، به‌طوری‌که نتایج بدست آمده از این پژوهش را تأیید می‌کند. در این پژوهش محلول پاشی با ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلینیوم کارآمدترین تیمار بود. عنصر آهن یک کوفاکتور مهم برای تعدادی از آنزیم‌هاست که در مسیر بیوسنتز کلروفیل نقش دارند (Sarani *et al.*, 2013). بور بر متابولیسم نیتروژن تأثیر

گزارش شده است (Yong *et al.*, 2006). همچنین گزارش شده که در شرایط تنش، سلنیوم باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان مختلف می‌شود (Chang-Quan, 2011; Hajiboland *et al.*, 2014)، در واقع سلنیوم از آسیب‌های ناشی از تنش جلوگیری کرده که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار شوری باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد که محلول‌پاشی به‌ویژه با عنصر سلنیوم و آهن این افزایش را در مورد آنزیم‌های CAT و SOD تشدید کرد. پژوهشگران گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های CAT و POX با افزایش تنش شوری، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Karray-Bouraoui *et al.*, 2011; Siddiqi *et al.*, 2011). با توجه به اهمیت آنزیم‌های CAT، SOD و POX در پاکسازی رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن و جلوگیری از تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری، به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت هم‌زمان هر سه آنزیم (به‌ویژه کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) باعث می‌گردد که اثرات منفی تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن کمتر انجام شود، در نتیجه گیاه نسبت به شرایط تنش شوری تحمل نشان دهد.

گلیکوزیدها شکلی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای ساختار وسیعی می‌باشند که در مواردی در متابولیسم اولیه گیاهان نقش دارند. سنتز گلیکوزیدهای استویول که تنها در گیاه استویا تولید می‌شود، از مسیر ترپنوئیدی کلروپلاستی آغاز می‌شود (Moradi Peynevandi *et al.*, 2014). گلیکوزیدها ترکیب‌هایی اغلب درشت مولکول و دارای گروه‌های مختلف هستند. این ترکیب‌ها همگی دارای یک یا چند قند روی یک اسکلت مرکزی می‌باشند. این اسکلت مرکزی یک مولکول چربی‌دوست (لیپوفیل) است که روی گروه‌های -SH، -NH₂، -COOH، -OH و C-C آن، قند

تنش شوری (۳۰ میلی‌مولار) احتمالاً بخشی از سازوکارهای دفاعی گیاه در مقابله با تنش شوری می‌باشد. این نکته که گیاهان مقاوم به شوری کاروتنوئید بالاتری را دارند، توسط محققان مختلف گزارش شده است (Kholova *et al.*, 2010; Yildiz & Terzi, 2013).

سمیت بیش از حد یون‌های سدیم موجب آسیب به غشای پلاسمایی، اندامک‌های سلولی و اختلال در فتوسنتز، تنفس و سنتز پروتئین‌ها و نیز موجب عدم پایداری ترکیب رنگریزه‌های پروتئین در گیاه می‌گردد (Noori Akandi *et al.*, 2016). البته افزایش میزان پروتئین کل در اثر تنش توسط برخی پژوهشگران گزارش شده است (Amini *et al.*, 2014). Luo و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که در اثر تنش خشکی بر دم‌روباهی (*Setaria viridis*) و دیجیتاریا (*Digitaria ciliaris*) سنتز پروتئین‌های دهیدرین (Dehydration) القاء می‌شود و باعث افزایش پروتئین کل می‌گردد. این پروتئین‌ها مانع می‌شوند که گیاه آب بیشتری از دست بدهد (Jiang & Huang, 2002).

وقتی گیاه در معرض تنش‌های محیطی نامطلوب مختلف از جمله شوری قرار می‌گیرد، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند موجب آسیب سلول‌ها و اجزای سلولی شود. آنزیم‌هایی شامل SOD، CAT و POX نقش اساسی در دفع مسمومیت گونه‌های فعال اکسیژن ایفاء می‌کنند (Hartikainen *et al.*, 2008). آنزیم SOD اولین خط دفاعی را بر علیه رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول تشکیل می‌دهد (Alscher *et al.*, 2002) و احیای رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. پراکسید هیدروژن حاصل در مرحله بعدی به‌وسیله آنزیم آسکوربات پراکسیداز، CAT و POX پاکسازی می‌شود (Zeid & Shedeed, 2006). در این پژوهش، فعالیت آنزیم SOD در اثر تنش شوری افزایش معنی‌داری داشت. چنین نتیجه‌ای به‌وسیله سایر محققان نیز

- on vegetative and reproductive growth of strawbeery cv. Selva. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 14: 357-363.
- Ahmadi, F. and Mohammadkhani, A., 2014. Effect of potassium and boron nutrition on some quantitative and qualitative characteristics of grape 'Askari'. *Agricultural Crop Management*, 16(2): 417-430.
 - Alscher, R.G., Erturk, A.N.D. and Heath, L.S., 2002. Role of superoxide (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 372: 1331-1341.
 - Amini, Z., Moalemi, N. and Saadati, S., 2014. Effects of water deficit on proline content and activity of antioxidant enzymes among three olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of Plant Research*, 27(2): 156-167.
 - Angela, P., Georgios, K. and Isabel, E., 2014. Composition of antioxidants and amino acids in *Stevia* leaf infusions. *Plant Foods Human Nutrition*, 69: 1-7.
 - Anjum, S.A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M.F., Man, C. and Lei, W., 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9): 2026-2032.
 - Baloch, Q.B., Chachar, Q.I. and Tareen, M.N., 2008. Effect of foliar application of macro and micro nutrients on production of green chilies (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agriculture Technology*, 4(2): 177-184.
 - Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287.
 - Bowles, D., Lim, E.K., Poppenberger, B. and Vaistij, F.E., 2006. Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 567-597.
 - Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 248-254.
 - Bybordi, A., 2016. Effect of zeolite, selenium and silicon on yield, yield components and some physiological traits of canola under salt stress conditions. *Iranian Journal of Field Crop Research*, 14(1): 154-170.
 - Chang-Quan, W., 2011. Water-stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. *Plant Nutrition*, 174: 276-282.
 - Dhindsa, R.H., Plumb-Dhindsa, R. and Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence correlated with increased level of membrane permeability, lipid peroxidation and decreased level of SOD and CAT. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.
 - Djanaguiraman, M., Shanker, A.K., Sheeba, J.A., Devi, D.D. and Bangarusamy, U., 2005. Selenium-an-

مونوساکارید قرار می‌گیرد (Bowles *et al.*, 2006). از آنجایی که علت ساخت چنین مولکول پر هزینه‌ای در گیاه استویا روشن نیست، این احتمال می‌رود که شاید این ترکیب‌ها نقش دفاعی در شرایط تنش داشته باشند (Moradi Peynevandi *et al.*, 2014). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که در شرایط تنش شوری ۳۰ و ۶۰ میلی‌مولار میانگین این ترکیب‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد که این افزایش در جهت ایجاد تحمل در برابر تنش وارده می‌باشد و این فرضیه (نقش دفاعی این ترکیب‌ها در شرایط تنش) را تأیید می‌کند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که با توجه به نتایج این پژوهش تنش شوری سبب کاهش میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b گردید و از آنجایی که میزان کلروفیل گیاه همبستگی بسیار بالایی با عملکرد برگ دارد، بنابراین عملکرد برگ نیز کاهش معنی‌داری نشان داد. در کل نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه استویا نیمه متحمل به تنش شوری است. محلول پاشی با ترکیب سه عنصر آهن، بور و سلنیوم میزان کاهش عملکرد گیاه را در اثر این تنش بهبود بخشید. از طرف دیگر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (SOD، POX، CAT) سازوکار دفاعی بسیار مهمی است و افزایش فعالیت آنها در زمان تنش شوری توانست تنش اکسیداتیو را کاهش دهد و یا از وقوع آن جلوگیری کند و این امر یکی از دلایل تحمل نسبی این گیاه به تنش شوری متوسط است. عنصر سلنیوم با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در افزایش فعالیت این آنزیم بسیار مؤثر بود. تنش شوری کم (۳۰ میلی‌مولار) موجب تحریک سنتز ترکیب‌های گلیکوزیدهای استویول شد و در شرایط محلول پاشی با ترکیب عناصر آهن، بور و سلنیوم، بیشترین میانگین ریودیوزاید A، استویوزاید، ریودیوزاید C، دالکوزاید A و ریودیوزاید B بدست آمد.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi, M., Eshghi, S., Tafazzoli, E. and Moosavi, N., 2012. Effects of paclobutrazol, boric acid and zinc sulfate

- Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Attia, H., Harbaoui, F., Jallali, I., Ksouri, R., Msilini, N. and Lachaâl, M., 2011. Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of *Carthamus tinctorius* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 1435-1444.
- Keling, H., Ling, Z., JiTao, W. and Yang, Y., 2013. Influence of selenium on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in melon (*Cucumis melo* L.) seedlings under salt stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82(3): 193-197.
- Kholova, J., Sairam, R.K. and Meena, R.C., 2010. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 477-486.
- Koyro, H.W., 2000. Effect of high NaCl-salinity on plant growth, leaf morphology and ion composition in leaf tissues of *Beta vulgaris* ssp. *Maritima*. *Journal of Applied Botany*, 74: 67-73.
- Ladan Moghadam, A., Vattani, H., Baghaei, N. and Keshavarz, N., 2012. Effect of different levels of fertilizer nano iron chelates on growth and yield characteristics of two varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.): varamin 88 and viroflay. *Research Applied Sciences, Engineering and Technology*, 4(12): 4813-4818.
- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.
- Luo, Y., Zhao, X., Zhou, R., Zuo, X., Zhang, J. and Li, Y., 2010. Physiological acclimation of two psammophytes to repeated soil drought and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 79-91
- MacAdam, J.W., Nelson, R. and Sharp, E., 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology*, 99: 872-878.
- Mohammadzadeh Toutouchi, P. and Amirnia, R., 2016. Effect of foliar application of micronutrients on some morphological traits of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(2): 301-308.
- Moradi Peynevandi, K., Sharifi, M. and Behmanesh, M., 2014. Effects of methyl jasmonate, on stevioside and rebaudioside A content and expression of the ent-Kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bert. in vitro. *Iranian Journal of Plant Biology*, 21(6): 99-110.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, 25: 239-250.
- antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil*, 272: 77-86.
- Ebtsam, A., El-Housini, M.A., Ahmed, M.S., Hassanein, M. and Tawfik, M., 2014. Effect of salicylic acid (SA) on growth and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) under salt stress. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 14(4): 275-281.
- Feng, R., Weic, C. and Tu, S., 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 87: 58-68.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Goyal, S.K., Samsher, R. and Goyal, R.K., 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61: 1-10.
- Gupta, P., Sharma S. and Saxena, S., 2016. Effect of abiotic stress on growth parameters and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised in vitro. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(4): 160-167.
- Hajiboland, R., Keivanfar, N., Jodmand, A., Rezaei, H. and Nezhadmohammad, Y., 2014. Effect of selenium treatment on drought tolerance of canola plant. *Plant Research*, 27(4): 557-568.
- Hartikainen, H., Xue, T. and Piironen, V., 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, 225: 193-200.
- Hassanzadeh, A., Heidari, M., Khoshghalb, J. and Ghorbani Ghozhdi, H., 2016. Effects of nitrogen and foliar application of boron on yield and some physiological characteristics in karela (*Momordica charantia* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(4): 634-644.
- Jiang, Y. and Huang, B., 2002. Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscise acid. *Crop Science*, 42: 202-207.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A. and Angelini, L.G., 2014. Effect of two plant growth retardants on steviol glycosides content and antioxidant capacity in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 1211-1219.
- Karimi, S., Arzani, A. and Saeidi, G., 2015. Effect of salinity stress on antioxidant enzymes and chlorophyll content of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Journal of Plant Process and Function*, 4(13): 25-35.

- Seppanen, M., Turakainen, M. and Hartikainen, H., 2003. Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Science*, 165: 311-319.
- Shekari, L., Kamelmanesh M.M., Mozafariyane-Meymandi, M. and Sadeghi, F., 2016. Effect of selenium on some morphological and physiological traits of spicy pepper. *Journal of Horticultural Science*, 29(4): 594-600.
- Siddiqi, E.H., Ashraf, M., Al-Qurainy, F. and Akram, N.A., 2011. Salt-induced modulation in inorganic nutrients, antioxidant enzymes, proline content and seed oil composition in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 2785-2793.
- Waller, F., Achatz, B. and Baltrusch, H., 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance and higher yield. *Procardia Environmental Sciences*, 102: 13386-13391.
- Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, Gh., Siosemardeh, A. and Ghassemi-Golezani, K., 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Omics Journal*, 5: 60-67.
- Xue, T.L., Hartikainen, H. and Piironen, V., 2001. Antioxidative and growth-promoting effects of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237: 55-61.
- Yildiz, M. and Terzi, H., 2013. Effect of NaCl stress on chlorophyll biosynthesis, proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive barley cultivars. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences*, 19: 79-88.
- Yong, T., Zongsuo, L., Hongbo, S. and Feng, D., 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix astragalii* seedling stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49: 60-65.
- Zeid, I.M. and Shedeed, Z.A., 2006. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum*, 50(4): 635-640.
- Noori Akandi, Z., Pirdashti, P., Yaghoobian, Y. and Ghasemi Omran, V., 2016. Investigation of antioxidant enzymes activity and photosynthetic pigments content changes of stevia medicinal plant inoculated with *Piriformospora indica* fungi under salt stress. *Agricultural Crop Management*, 18(3): 639-653.
- Nowak, J., Kaklewski, K. and Ligocki, M., 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1553-1558.
- Pan, J., Wang, Q. and Snell, W.J., 2005. Cilium-generated signaling and ciliarelated disorders. *Laboratory Investigation*, 85: 452-463.
- Rafeii, S. and Pakkish, Z., 2014. Effect of Boric acid spray on growth and development of 'Camarosa' strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(4): 1060-1063.
- Ramroudi, M., Keilha Jaleh, M., Galavi, M., Seghatoleslami, M.J. and Baradran, R., 2011. The effect of various micronutrient foliar applications and irrigation regimes on quantitative and qualitative yields of isabgol (*Plantago ovata* Forsk.). *Agroecology*, 3(2): 219-226.
- Rathore, Sh., Singh, N. and Singh, S.K., 2014. Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated in vitro. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 10(2): 287-296.
- Sajidi, N.A., Ardakani, M.R., Naderi, A., Madani, H. and Mashhadi Akbarbujar, M., 2008. Effect of nutrition elements application on agronomical characters of maize hybrid (KSC.704) under water deficit stress at different growth stages. *Agronomy and Plant Breeding*, 4(1): 85-98.
- Sarani, S., Heidari, M., Glavi, M. and Siahshar, B.A., 2013. Effects of salinity and iron on growth, photosynthetic pigments and electrophoresis bands in two genus chamomile (*Matricaria chamomilla* L. and *Anthemis nobilis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29(4): 732-746.

Effect of foliar application of selenium, boron and iron on some physiological traits and glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under salinity stress

M. Aghighi Shahverdi¹, H. Omid^{2*} and S.J. Tabatabaei³

1- Ph.D. student, Agricultural College and Medicinal Plant Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Agricultural College and Medicinal Plant Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

E-mail: omidi@shahed.ac.ir

3- Agricultural College and Medicinal Plant Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

Received: June 2017

Revised: November 2017

Accepted: November 2017

Abstract

This research was aimed to investigate the foliar application of selenium, boron and iron on leaf yield, the photosynthetic pigments rate, antioxidant enzymes activity and the steviol glycosides content under sodium chloride stress conditions. The study was conducted in a factorial experiment in Anzali of Guilan Province based on a completely randomized design in three replications in 2105-16. The salinity stress levels were used by sodium chloride at four levels: control (less than 10), 30, 60 and 90 mM, and the foliar application of iron, boron, and selenium was applied. The results showed that the effect of salinity stress and foliar application was significant on the leaf yield, the chlorophyll pigments rate (a, b and total), carotenoid, protein content, antioxidant activity catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) and the steviol glycosides composition. The highest total chlorophyll content, chlorophyll a and chlorophyll b were obtained in the integrated application of iron, boron and selenium in free-salinity conditions (with means of 39.48, 24.86 and 14.63 mg/g fresh weight, respectively). The highest protein content was observed in the foliar application of iron and selenium at 90 mM NaCl, resulted in an increase of 5.3 times compared to the control treatment. The highest CAT and SOD activities were in the integrated foliar application of three elements and selenium and iron composition at salinity level of 90 mM, increasing the activity of these enzymes by approximately 130 and 11 times, respectively. The highest and lowest rates of rebaudioside A, stevioside, and rebaudioside C were obtained in the integrated application of three elements (iron, boron, and selenium) at salinity levels of 30 mM and non-spraying in 90 mM salinity, respectively. Generally, to achieve a higher amount of steviol glycosides, the integrated application of three elements iron, boron, and selenium and salinity stress up to 30 mM is recommended.

Keywords: Stevioside, antioxidant, protein, rebaudioside, chlorophyll.