

اثر تنش خشکی بر رشد و محتوای گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*)

مجتبی کریمی^۱، جواد هاشمی^{۲*}، علی احمدی^۳ و علیرضا عباسی^۴
۱، ۳ و ۴، دانشجوی دکتری، دانشیاران، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشگاه تهران، ۲، استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۸ - تاریخ تصویب: ۹۲/۶/۶)

چکیده

به منظور بررسی اثر تغییرات رطوبتی خاک بر رشد و کیفیت گلیکوزیدهای استویول در استویا (*Stevia rebaudiana* B.)، آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (منطقه مرکزی کشور- اصفهان) در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. تیمارهای رطوبتی براساس تلفیقی از ظهور علائم ظاهری گیاه (عدم پژمردگی تا پژمردگی شدید) و رطوبت خاک اعمال شدند. به این ترتیب تیمارها براساس ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱ درصد رطوبت وزنی خاک آبیاری شدند که با توجه به شرایط گلخانه، این سطوح تنش رطوبتی با دور آبیاری ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز ایجاد شد. نتایج نشان داد کاهش رطوبت خاک تا دور آبیاری ۹ روز، تأثیری در ارتفاع بوته و وزن خشک برگ استویا نداشت، ولی دور آبیاری ۱۲ روز، سبب کاهش معنادار رشد گیاه شد. بیشترین شاخص برداشت با دور آبیاری ۶ روز به دست آمد (۵۱/۳۶ درصد). کاهش رطوبت خاک سبب افزایش معنادار محتوای استویوزاید و دالکوزاید A شد، ولی تأثیری بر انواع ربودیوزایدها (A، F و C) نداشت. محتوای کل گلیکوزیدهای استویول نیز با کاهش رطوبت خاک افزایش یافت و دور آبیاری سه روز، دارای کمترین مقدار گلیکوزید استویول بود. در همه تیمارها مقدار استویوزاید بیشتر از سایر گلیکوزیدهای استویول بود. حداکثر عملکرد قند استویولی با دور آبیاری ۶ روز به دست آمد. نتایج کلی آزمایش نشان داد با کاهش رطوبت خاک (کمتر از ۱۱/۹ درصد وزن خاک) وزن خشک برگ استویا کاهش یافت، ولی محتوای گلیکوزیدهای استویول افزایش معناداری داشت. همچنین با دور آبیاری ۶ روزه بیشترین شاخص برداشت و عملکرد قند استویولی ایجاد شد. اگرچه با کاهش رطوبت خاک مقدار گلیکوزیدهای استویول افزایش یافت، به دلیل کاهش معنادار عملکرد برگ و عملکرد قند استویولی در فواصل آبیاری بیشتر از ۶ روز (کاهش رطوبت خاک زیر ۱۵/۱ درصد وزنی)، به نظر می‌رسد تشدید خشکی بیشتر از این حد سبب افت عملکرد استویا می‌شود.

واژه‌های کلیدی: استویا، استویوزاید، رطوبت خاک، گلیکوزیدهای استویول.

مقدمه

استویا گیاهی چندساله از خانواده Asteracea است. این گیاه بومی دره ریوماندی در پاراگوئه است. گیاهشناسی به نام موپرز اس. برتونی^۱ طی تحقیقاتی در سال ۱۸۸۸ این گیاه را شناسایی کرد و با خود به اروپا برد و سپس

به افتخار شیمیدان پاراگوئه‌ای، دکتر ربودی^۲ که ترکیبات شیمیایی آن را مطالعه کرده بود، اقدام به نامگذاری آن کرد. از این رو به آن *Stevia rebaudiana Bertoni* می‌گویند. از اهلی‌سازی و زراعی کردن استویا زمان چندانی نمی‌گذرد و به همین دلیل کمتر بررسی شده

2. Rebaudi

1. Moises S. Bertoni

خصوص واکنش کمی و کیفی استویا به تنش خشکی مهم خواهد بود.

گزارش شده است که بعضی از متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان در شرایط خشکی افزایش می‌یابد (Jalil et al., 2007). ولی این موضوع در مورد استویا به‌خوبی بررسی نشده است. همچنین واکنش مورفولوژیک و فیزیولوژیک استویا در برابر تغییرات رطوبتی کمتر بررسی شده است.

محققان نشان دادند که آبیاری براساس نسبت آب آبیاری به تبخیر تجمعی از تشتک معادل یک، بیشترین عملکرد برگ را در استویا تولید می‌کند و پیشنهاد کردند که دور آبیاری ۵ تا ۶ روز مناسب کشت تابستانه استویا است (Aladakatti et al., 2012). با وجود این، سازوکار فیزیولوژیکی پاسخ استویا به تغییرات رطوبتی به‌خوبی بررسی نشده است. با مطالعه تأثیرات تنش خشکی بر رشد ژرم‌پلاسماهای مختلف استویا در شرایط گلخانه مشاهده شده است که تا ۵ روز دور آبیاری تغییرات معناداری در فتوسنتز خالص، نسبت تعرق و وزن خشک برگ استویا ایجاد نشد و بیشترین تغییرات در تیمار ۱۰ روز دور آبیاری مشاهده شد (Ren & Shi., 2012). با اعمال رژیم‌های مختلف آبیاری (آبیاری براساس دریافت ۳۳، ۶۶ و ۱۰۰ درصد آب مصرفی مورد نیاز خاک)^۷ در کشت استویا، گزارش شده است که شاخص برداشت در استویا در اثر تغییرات رطوبت خاک از ۶۱ درصد (آبیاری با ۱۰۰ درصد آب مورد نیاز) تا ۷۱ درصد (آبیاری با ۳۳ درصد آب مورد نیاز) تغییر می‌یابد (Lavini et al., 2008). یافته‌های محققان حاکی از آن است که که محتوای استویوزاید در برگ استویا با نسبت برگ به ساقه ارتباط مستقیم دارد (Tatteo et al., 1998). همچنین همبستگی مثبت و معناداری بین مقدار استویوزاید و ربودیوزاید A با ضخامت برگ استویا گزارش شده است (Shyu et al., 1994).

از آنجا که تغییرات عملکرد کمی و کیفی استویا در پاسخ به تنش خشکی به‌خوبی بررسی نشده است و از طرفی محققان کشور ما شناخت مناسبی از تولید استویا، به‌ویژه در مواجهه با شرایط نامطلوب رطوبتی ندارند، این

است. در برگ‌های استویا انواع مختلف گلیکوزیدهای استویول تولید می‌شود که بسیار شیرین‌تر از قند معمولی (ساکارز) هستند (۴۵۰-۲۵۰ برابر) (Crammer & Ikan., 1987) و با وجود مزه بسیار شیرین، جذب بدن نمی‌شوند و بدون کالری هستند (Gregersen et al., 2004). بنابراین به‌عنوان شیرین‌کننده طبیعی برای بیماران دیابتی مناسبند. در سال‌های اخیر نیز گرایش به استفاده از گلیکوزیدهای استویول در بسیاری از کشورها افزایش داشته است و به‌جای قند معمولی (ساکارز) به‌کار می‌روند. کشورهای آمریکا، کانادا، چین، ژاپن و کره در این زمینه پیشتازند (Singh & Rao., 2005). گلیکوزیدهای استویول که در برگ استویا تولید می‌شوند عبارتند از: استویول مونوزاید^۱، ربوسوزاید^۲، استویول بیوزاید^۳، ربودیوزاید^۴ A و ربودیوزاید^۵ B، ربودیوزاید^۶ F، ربودیوزاید^۷ C و دالکوزاید^۸ A. استویوزاید و ربودیوزاید A بیشتر از بقیه گلیکوزیدهای استویول در برگ‌های استویا تولید می‌شوند (به‌ترتیب ۱۰-۵ و ۴-۲ درصد وزن خشک برگ). تنها این دو نوع گلیکوزید استویول به‌صورت تجاری تولید می‌شوند (Yadav et al., 2005). مقدار گلیکوزیدهای استویول در استویا به عوامل متعددی وابسته است و ممکن است به ۲۰ درصد وزن خشک برگ برسد (Branle et al., 1998) در مجموع، دامنه غلظت کل گلیکوزیدهای استویول حدود ۲۰-۴ درصد وزن خشک گزارش شده است (Starrat et al., 2012). ربودیوزاید A نقش بیشتری در کیفیت مجموع قندهای استویولی دارد و نسبت ربودیوزاید A به استویوزاید تعیین‌کننده کیفیت مزه است (Sharma., 2009). کم‌آبی و تنش خشکی جزء جدانشدنی کشاورزی در ایران است، چراکه کشور ما در منطقه خشک واقع شده و کمبود بارندگی شایع است. استویا گیاه غیربومی ایران است و در مسیر زراعی شدن و اهلی‌سازی در کشور ما ناخواسته در معرض تنش خشکی قرار خواهد گرفت. بنابراین داشتن اطلاعات در

1. Steviolmonoside
2. Rubausoside
3. Steviolbioside
4. Stevioside
5. Rebaudioside A
6. Dulcoside A

خاک (عمق ۵ سانتی‌متری) گلدان برداشت و رطوبت آن به‌روش وزنی محاسبه می‌شد تا تیمارها براساس کمیت رطوبت خاک، اعمال و بررسی شود. مشخصات تیمارهای مورد نظر در جدول ۱ گزارش شده است.

جدول ۱. مشخصات تیمارهای رطوبتی استفاده‌شده در این آزمایش

تیمار	دور آبیاری (روز)	درصد وزنی رطوبت خاک
W1	۳	۱۹/۱
W2	۶	۱۵/۱
W3	۹	۱۱/۹
W4	۱۲	۹/۱

پس از ۶۲ روز از کاشت گیاهچه‌ها در گلدان، برداشت انجام گرفت. برگ‌ها و ساقه‌ها جداگانه در آون خشک شدند و صفات زیر اندازه‌گیری شد:

ارتفاع بوته، وزن خشک برگ و ساقه، شاخص برداشت [۱۰۰ × (وزن خشک کل اندام‌های گیاه/وزن خشک برگ)]، نسبت برگ به ساقه (به‌صورت وزن خشک)، محتوای گلیکوزیدهای استویول (استویوزاید، ربودیوزاید A، ربودیوزاید F، ربودیوزاید C و دالکوزاید A)، نسبت ربودیوزاید A به استویوزاید، عملکرد قند استویولی (حاصل‌ضرب محتوای کل گلیکوزیدهای استویول در وزن خشک برگ).

اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویول براساس گزارش FDA^۱ (2009) و به‌صورت زیر انجام گرفت:

استخراج و آماده‌سازی نمونه

برگ‌های استویا در دمای ۶۵ درجه و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون خشک شده و سپس با استفاده از هاون، پودر شد و مقدار ۰/۱ گرم از پودر آن برای استخراج گلیکوزیدها به‌کار رفت. ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه پودر شده اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه گذاشته شد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و عصاره آن ذخیره شد. این فرایند سه بار تکرار شد و عصاره‌ها مخلوط شدند. سپس مجموع عصاره‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و عصاره جدید جداسازی شد. این کار باز هم

مطالعه با هدف بررسی تغییرات رشد و عملکرد استویا و محتوای گلیکوزیدهای استویول آن در پاسخ به تنش خشکی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۱ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (اصفهان)، به‌صورت گلخانه‌ای و در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی انجام گرفت. دمای داخل گلخانه در روز و شب به‌ترتیب ۲۵ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ و ۴۰ درصد و مقدار CO₂ حدود ۵۰۰-۶۰۰ میکرومول بر مول بود. ابتدا از طریق کشت بافت، گیاه استویا تکثیر شد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۷). رقم استفاده‌شده *Stevia rebaudiana*. Bertonی بود.

پس از کشت بافت، گیاهچه‌های تولیدی در بستر حاوی پیت موس کشت داده شد تا مقاوم‌سازی گیاهچه‌ها انجام گیرد. پس از گذشت سه هفته از شروع مقاوم‌سازی، گیاهچه‌های مشابه و یکسان انتخاب و در گلدان‌های حاوی خاک کشت داده شدند. گلدان‌ها دارای ارتفاع و قطر ۳۰ سانتی‌متر بودند و تا ۲ سانتی‌متر زیر لبه گلدان از خاک پر شد. خاک استفاده‌شده دارای بافت رسی-لومی بود. در هر گلدان سه عدد از گیاهچه‌هایی که مقاوم‌سازی شده بودند کشت شد. در دو هفته ابتدایی کشت، به تمام گلدان‌ها به‌صورت یکسان آب داده شد و پس از اطمینان از استقرار موفقیت‌آمیز، تیمارهای مورد نظر اعمال شد. تیمارها براساس علائم ظاهری (درجات مختلف پژمردگی) و اندازه‌گیری رطوبت خاک تعیین شد. به‌این ترتیب برای تیمار شاهد و سه تیمار تنش خفیف، متوسط و شدید به‌ترتیب درصد‌های وزنی رطوبت خاک ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱ تعیین شد. گلدان‌های هر تیمار پس از رسیدن رطوبت خاک به مقادیر یادشده آبیاری می‌شدند. با توجه به شرایط گلخانه، زمان لازم برای حصول درصد‌های رطوبتی مذکور، به‌ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز فاصله آبیاری (دور آبیاری) بود. از این‌رو آبیاری‌های بعدی براساس دور‌های آبیاری ذکرشده انجام گرفت. سپس، هر دو هفته یک‌بار (با توجه به رشد گیاه)، انطباق دور آبیاری و درصد رطوبت خاک تنظیم می‌شد. قبل از آبیاری مقداری از

تیمارها نشان داد و سه تیمار دیگر کاهش معناداری داشتند (جدول ۳). تغییرات وزن خشک برگ در پاسخ به تغییرات رطوبتی خاک معنادار بود، اما وزن خشک ساقه تغییرات معناداری نداشت (جدول ۲). در این آزمایش مشاهده شد که کاهش چشمگیر وزن خشک برگ در تیمار W4 (دور آبیاری ۱۲ روز و درصد رطوبت وزنی خاک = ۹/۱) بروز می‌یابد، و کمیت برگ استویا تا دور آبیاری ۹ روز (درصد رطوبت وزنی خاک = ۱۱/۹) تغییرات معناداری نداشت (شکل ۱). در تحقیق مشابهی که با پنج ژرمپلاسم مختلف استویا و در شرایط گلخانه انجام گرفت، مشاهده شد که دور آبیاری ۵ روز تغییرات معناداری در وزن خشک برگ استویا ایجاد نکرد (Ren & She, 2012). اختلاف در تعداد روز مناسب برای آبیاری استویا در نتایج پژوهش محققان مذکور و نتایج این آزمایش احتمالاً ناشی از نوع ژرمپلاسم‌های استفاده‌شده و شرایط آزمایشی است. نسبت برگ به ساقه استویا تغییرات معناداری در پاسخ به تغییرات رطوبت خاک نداشت (جدول ۲) که این موضوع ممکن است به دلیل عدم تغییر معنادار وزن خشک ساقه در کل تیمارهای آزمایشی و همچنین عدم تغییرات معنادار وزن خشک برگ در سه تیمار اول آزمایش (۳، ۶ و ۹ روز دور آبیاری) باشد.

کل برگ‌های استویا عملکرد اقتصادی آن محسوب می‌شوند، بنابراین تغییرات شاخص برداشت استویا بسیار حائز اهمیت است و همان‌طور که در جدول ۲ آورده شده است، شاخص برداشت استویا به‌طور معناداری تحت تأثیر تغییرات رطوبت خاک قرار گرفت ($P < 0.05$). شاخص برداشت تا دور آبیاری ۶ روزه روند افزایشی و پس از آن کاهش معنادار داشت. تیمار W2 (دور آبیاری ۶ روز و ۱۵/۱ درصد رطوبت وزنی خاک) بیشترین شاخص برداشت را داشت (۵۱/۳۶ درصد، جدول ۳). گرچه وزن خشک برگ تا دور آبیاری ۹ روز (رطوبت خاک = ۱۱/۹) کاهش معنادار نداشت (شکل ۱)، به نظر می‌رسد به دلیل حساسیت بیشتر برگ‌ها نسبت به تنش خشکی و در مقابل ثبات ساقه در چنین شرایطی، پس از فاصله آبیاری ۶ روزه، افت شاخص برداشت مشاهده شده است. گزارش شده است استویا در منطقه بومی خود در خاک‌های شنی رشد می‌کند (Madan et al., 2010) که

تکرار شد و عصاره با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای جداسازی مواد جامد و ناخالصی‌های عصاره، سه میلی‌لیتر از عصاره از فیلتر ($0.45 \mu m$) عبور داده و در ظرف جدید نگهداری شد. در مرحله بعد و به‌منظور خالص‌سازی گلیکوزیدهای استویول، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره فیلترشده از کارتریج C_{18} ، که قبلاً با متانول و آب بهینه شده بود، عبور داده شد. سپس با استفاده از استونیتریل ۲۰ درصد مواد زاید و رنگیزه‌های گیاهی (مانند کلروفیل) شسته شد. سرانجام با استفاده از استونیتریل ۸۰ درصد گلیکوزیدهای استویول از کارتریج جدا و در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری نگهداری شد تا کروماتوگرافی شود.

کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد ($HPLC^1$)

برای کروماتوگرافی (HPLC) از دو ستون C_{18} به‌صورت سری و دتکتور UV-Vis در طول موج ۲۰۲ نانومتر استفاده شد. مخلوط ۵۰ تا ۸۰ درصد استونیتریل و آب به‌عنوان حلال و با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. در این روش پنج نوع گلیکوزید استویول (استویوزاید، ربودیوزاید A، ربودیوزاید F، ربودیوزاید C و دالکوزاید A) اندازه‌گیری شد. سطح زیر پیک مربوط به هر گلیکوزید استویول توسط نرم‌افزار Chromstar 7.0 انتگرال‌گیری شد. با استفاده از رابطه غلظت استاندارد با سطح زیر پیک کروماتوگرام، غلظت گلیکوزیدهای استویول محاسبه و به‌صورت درصد وزن خشک برگ گزارش شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه شده و میانگین صفات با استفاده از آزمون LSD مقایسه شد. نمودارها با نرم‌افزار SigmaPlot رسم شد. اشتباه معیار هر کدام از تیمارها نیز ارائه شده است.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که صفات مورفولوژیک و عملکردی استویا به‌طور معناداری تحت تأثیر تغییرات رطوبت خاک قرار گرفت (جدول ۲). در این راستا، بوته گیاهان به‌طور معناداری در اثر تنش خشکی تغییر کرد ($p < 0.01$) و تیمار W1 (شاهد) افزایش معناداری با بقیه

1. High-performance liquid chromatography

دیگری دامنه تغییرات شاخص برداشت استویا در آزمایشی با رژیم‌های مختلف آبیاری در شرایط مزرعه و طی دو سال، ۶۱-۷۱ درصد گزارش شد (Lavini et al., 2008) که احتمالاً تفاوت موجود به دلیل تفاوت رشد استویا در شرایط مزرعه و گلخانه باشد.

قدرت نگهداری آب کمتر دارند، بنابراین انتظار می‌رود تنش‌های ملایم (مانند W2) تأثیر چندانی بر شاخص برداشت استویا نداشته باشند. در تحقیقی در استرالیا شاخص برداشت استویا در رطوبت‌های مختلف آبی بررسی و گزارش شد که شاخص برداشت استویا تا رسیدن رطوبت خاک به ۵۰ درصد نقطه ظرفیت زراعی، روند افزایش داشته است (Kafle, 2011). در مطالعه

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات بررسی شده در استویا تحت شرایط مختلف رطوبت خاک

میانگین مربعات (MS)										
درجه آزادی	وزن خشک-وزن خشک-نسبت برگ به ساقه	شاخص برگ برداشت	ربودیوزاید A	ربودیوزاید F	ربودیوزاید C	دالکوزاید A	مجموع گلیکوزیدهای استویول	نسبت ربودیوزاید A به استویوزاید	عملکرد قند استویولی	رتفاع بوته
۳	۷۸/۰۸**	۰/۰۸۲	۵/۱۳*	۰/۰۴۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۶۹	۱/۱۹۷*	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۱۴*	۰/۰۸
۸	۵/۰۸	۰/۰۷۳	۱/۲	۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۵	۰/۰۲۰۱	۰/۱۷	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۳	۰/۱۲
-	۲/۸۲	۴/۹۵	۲/۲	۷/۲۶	۵۴/۵۹	۱۱/۶۲	۸/۲۷	۱۱/۵۸	۶/۵۹	۶/۴۹
-	۰/۸۵	۰/۷۱	۰/۶۰	۰/۷۵	۰/۰۶۶	۰/۵۶	۰/۶۷	۰/۲۱	۰/۶۲	۰/۲۰

** معنادار در سطح ۱ درصد، * معنادار در سطح ۵ درصد

جدول ۳. مقایسه میانگین ارتفاع بوته و شاخص برداشت در استویا تحت شرایط مختلف رطوبت خاک (W1، W2، W3 و W4) به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز دور آبیاری و درصد رطوبت وزنی رطوبت خاک به ترتیب ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱

شاخص برداشت	ارتفاع بوته (cm)
۵۰/۵۹	۸۶/۳۳
۵۱/۳۶	۸۱/۶۷
۴۸/۹۲	۷۶/۳۳
۴۸/۶۵	۷۵/۳۳
۲/۰۹	۴/۲۴

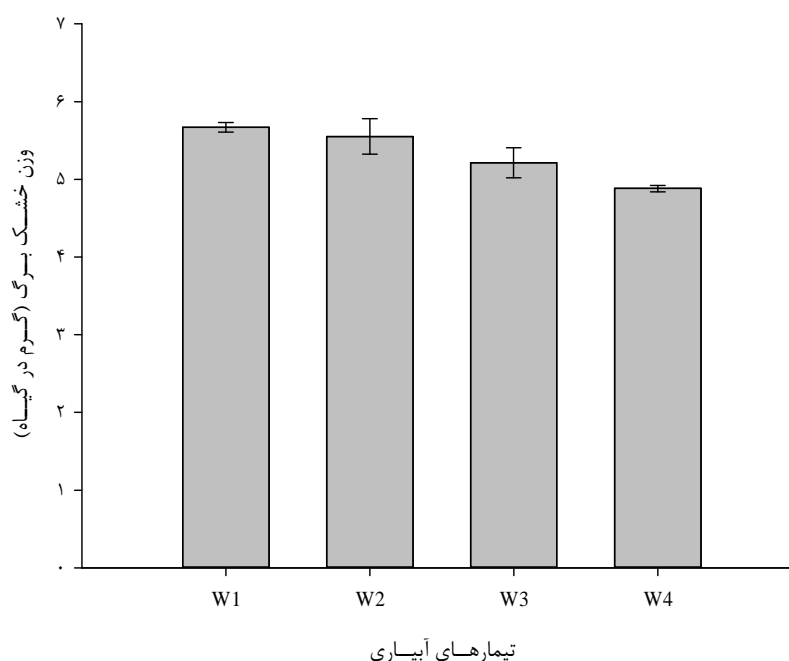
LSD(P<۰/۰۵)

W4 (دور آبیاری ۱۲ روز) دارای بیشترین مقدار گلیکوزیدهای استویول بود (۵/۷۴ درصد ماده خشک برگ). مقایسه کروماتوگرام مربوط به تیمار شاهد (W1، دور آبیاری ۳ روز) و تیمار تنش شدید خشکی (W4، ۱۲ روز دور آبیاری) نیز به وضوح تفاوت مقادیر گلیکوزیدهای استویول را نشان می‌دهد (شکل ۳) که در آن افزایش گلیکوزیدهای استویول در شرایط تنش خشکی کاملاً مشهود است. در مطالعه مشابهی مشاهده شد که تنش ملایم خشکی (۸-۴ روز) تأثیر معناداری بر محتوای گلیکوزیدهای استویول نداشت (Guzman, 2010). در این آزمایش نیز تغییر معناداری در محتوای

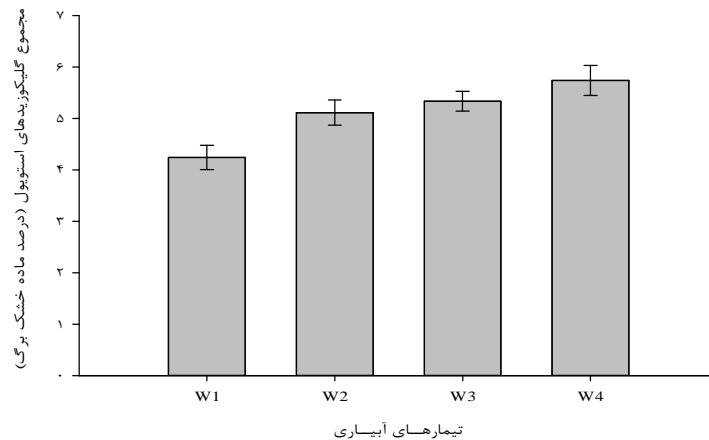
در کنار عملکرد کمی استویا، عملکرد کیفی آن نیز اهمیت فراوانی دارد. قند حاصل از استویا مخلوطی از انواع گلیکوزیدهای استویول است که هر کدام نقش خاص خود را در کیفیت قند دارند. کیفیت و تولید گلیکوزیدهای استویول متأثر از عوامل محیطی و غیرمحیطی است و در این آزمایش مشاهده شد که محتوای گلیکوزیدهای استویول تحت تأثیر تغییرات رطوبتی قرار گرفت (جدول ۲). بررسی محتوای کل گلیکوزیدهای استویول در شرایط تنش خشکی نشان داد که با کاهش رطوبت خاک، غلظت گلیکوزیدهای استویول افزایش یافت (شکل ۲) و در این راستا، تیمار

نیز دلیل محتمل است. تجزیه واریانس انواع گلیکوزیدهای استویول حاکی از آن است که مقدار استویوزاید و دالکوزاید A به‌طور معناداری متأثر از تغییرات رطوبت خاک بود و تغییر رطوبت خاک تأثیر معناداری بر ربودیوزایدها (A، F و C) نداشت. در بین انواع گلیکوزیدهای استویول، استویوزاید غلظت بیشتری داشت (شکل‌های ۳ و ۴)، بنابراین نقش تغییرات و تأثیر آن در کیفیت کلی گلیکوزیدهای استویول بیشتر و تعیین‌کننده‌تر است. تحقیقات نیز نشان داده است که غلظت استویوزاید می‌تواند ۶۰-۷۰ درصد کل گلیکوزیدهای استویول باشد (Yadav *et al.*, 2010). در این آزمایش مشاهده شد که با کاهش رطوبت خاک، غلظت استویوزاید به‌طور معناداری افزایش داشت و مشابه با تغییرات کل گلیکوزیدهای استویول، تیمار W4 دارای بیشترین مقدار استویوزاید بود (۲/۹۵ درصد ماده خشک برگ) (شکل ۴). در تحقیقات گذشته گزارش شده است که مقدار استویوزاید موجود در برگ استویا به رقم و شرایط رشد آن بستگی دارد و براساس مطالعات انجام‌گرفته می‌تواند حدود ۲۰-۴ درصد ماده خشک برگ باشد (Geuns, 2003).

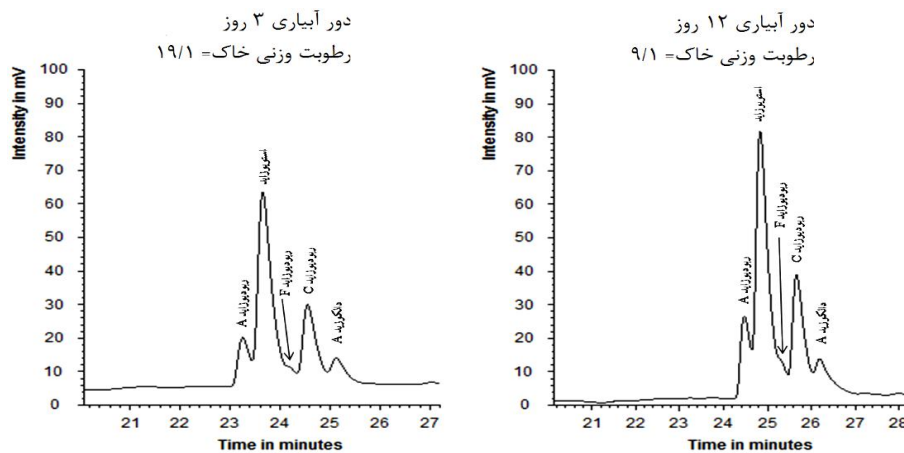
کل گلیکوزیدهای استویول در تنش‌های ملایم خشکی (دور آبیاری ۹-۶ روز) مشاهده نشد، اما با اعمال تنش شدید (دور آبیاری ۱۲ روز) محتوای کل گلیکوزیدهای استویول افزایش معناداری داشت. به‌نظر می‌رسد سازوکار تولید گلیکوزیدهای استویول در استویا در مواجهه با تنش خشکی مشابه با سازوکار تولید متابولیت‌های ثانویه در سایر گیاهان در چنین شرایطی باشد، چرا که تحقیقات نشان داده است که در مواجهه با خشکی تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان افزایش می‌یابد (Jalil *et al.*, 2007). علاوه بر این گزارش شده است که گلیکوزیدهای استویول قابلیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه را دارند که در واقع افزایش تولید آنها در شرایط خشکی می‌تواند نوعی سازوکار دفاعی برای استویا تلقی شود (Geuns & Struyf, 2010). همچنین پژوهشی مبنی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ استویا نشان داد که برگ استویا سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است (Kim *et al.*, 2010). استفاده از گلیکوزیدهای استویول به‌عنوان ترکیبات مؤثر در تنظیم وضعیت اسمزی و به‌کارگیری این ترکیبات برای تنظیم فشار اسمزی در مواجهه با شرایط تنش کم‌آبی در استویا



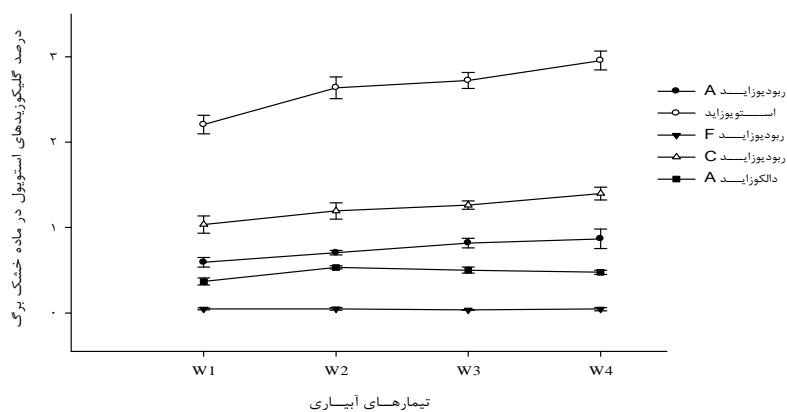
شکل ۱. وزن خشک برگ در استویا تحت شرایط مختلف رطوبت خاک (W1، W2، W3 و W4 به‌ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز دور آبیاری و درصد رطوبت وزنی رطوبت خاک به‌ترتیب ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱)



شکل ۲. مجموع گلیکوزیدهای استویبول در استویا تحت شرایط مختلف رطوبت خاک (W1، W2، W3، W4 به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز دور آبیاری و درصد رطوبت وزنی خاک به ترتیب ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱)



شکل ۳. کروماتوگرام گلیکوزیدهای استویبول در تیمار شاهد (۳ روز دور آبیاری) و تیمار خشکی شدید (۱۲ روز دور آبیاری) در استویا



شکل ۴. غلظت انواع گلیکوزید استویبول در استویا تحت شرایط مختلف رطوبت خاک (W1، W2، W3، W4 به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز دور آبیاری و درصد رطوبت وزنی خاک به ترتیب ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱)

رطوبت خاک تأثیر معناداری بر غلظت ربودیوزاید A نداشت (جدول ۲). با کاهش درصد رطوبت خاک (۱۵/۱) درصد وزنی، مقدار دالکوزاید A به طور معناداری افزایش

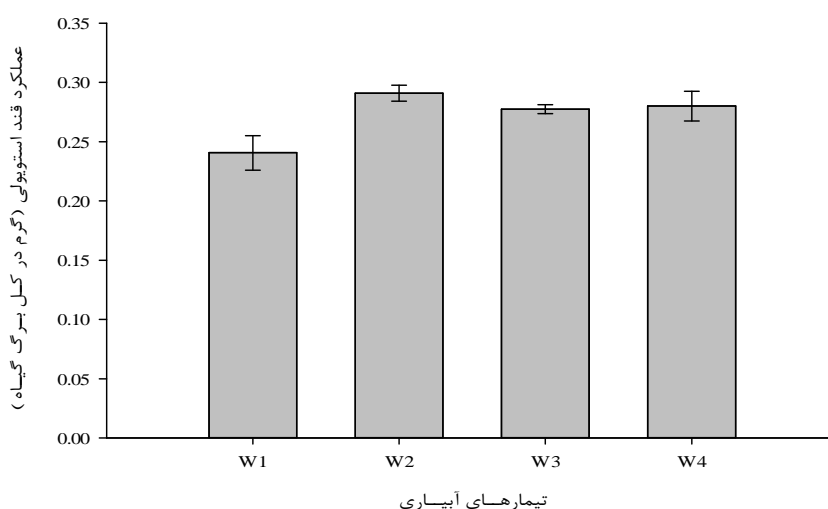
ربودیوزاید A گلیکوزید استویبول دیگری است که به صورت تجاری تولید می‌شود، بنابراین تغییرات آن نیز مهم است. نتایج این آزمایش نشان داد که تغییرات

نبودن تغییرات ربودیوزاید A سبب شده این شاخص تغییرات چندانی نداشته باشد. با این شرایط وابستگی این شاخص به سایر عوامل (سایر عوامل محیطی و ژنتیکی) نمود پیدا می‌کند.

عملکرد قند استویولی استویا به‌طور معناداری تحت تأثیر تغییرات رطوبتی خاک قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین عملکرد قند استویولی در تیمارهای مختلف نشان داد که تیمار W2 (دور آبیاری ۶ روز) بیشترین عملکرد قند استویولی را داشت و دور آبیاری بیش از ۶ روز سبب کاهش معنادار عملکرد قند استویولی شد (شکل ۴). دیگر نتایج این آزمایش مشخص کرد که با شدت تنش خشکی عملکرد برگ استویا کاهش می‌یابد و در سوی دیگر مقدار گلیکوزیدهای استویول افزایش می‌یابد. بنابراین شناخت تیمار مناسب و درواقع تیمار دربرگیرنده نقطه تعادل بین افزایش قند استویولی و کاهش عملکرد برگ در چنین شرایطی حائز اهمیت است که با توجه به نتایج حاصل دوره آبیاری ۶ (درصد رطوبت وزنی = ۱۵/۱) مناسب‌ترین نقطه تعادل و شرایط برای ایجاد بیشترین عملکرد قند استویولی را فراهم کرد.

یافت ولی شیب افزایش آن در مقایسه با استویوزاید کندتر بود (شکل ۴). کمترین مقدار گلیکوزیدهای استویول مربوط به ربودیوزاید F بود که تغییرات معناداری نداشت (جدول ۲، شکل ۴). کمبود این نوع گلیکوزید در کروماتوگرام‌های مربوط نیز به‌وضوح دیده می‌شود (شکل ۳). در مجموع مشخص شد که مقادیر انواع ربودیوزاید‌های (A، F و C) موجود در برگ استویا متأثر از تنش رطوبتی نیست و استویوزاید و دالکوزاید A در چنین شرایطی متغیرند که سازوکار این تغییرات در مواجهه با شرایط خشکی ناشناخته باقی مانده است.

در بین انواع گلیکوزیدهای استویول، ربودیوزاید A نقش مهمی در کیفیت گلیکوزیدهای استویولی و مزه کلی آنها دارد (Sharma, 2009). از طرف دیگر استویوزاید به‌دلیل کمیت بیشتر نیز نقش مهمی دارد. بنابراین، نسبت ربودیوزاید A به استویوزاید می‌تواند شاخص مهمی در تعیین کیفیت کلی گلیکوزیدهای استویول باشد و به‌عقیده محققان، هر چه این نسبت بیشتر باشد، کیفیت قند حاصل از استویا بهتر خواهد بود (Yadav et al., 2010). نتایج این آزمایش نشان داد که این شاخص تغییرات معناداری در اثر تغییرات رطوبت خاک نداشته است (جدول ۲). به‌نظر می‌رسد معنادار



شکل ۵. عملکرد قند استویولی در استویا تحت شرایط مختلف رطوبت خاک (W1، W2، W3 و W4 به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز دور آبیاری و درصد رطوبت وزنی رطوبت خاک به ترتیب ۱۹/۱، ۱۵/۱، ۱۱/۹ و ۹/۱)

در این راستا، استویوزاید و دالکوزاید A افزایش معناداری داشتند، ولی مقدار انواع ربودیوزاید‌ها (A، C، F) تغییرات

نتایج کلی این آزمایش نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش گلیکوزیدهای استویول در استویا شد و

گلیکوزیدهای استویول ناشی از تنش خشکی در استویا حاکی از آن بود که عملکرد بهینه قند استویولی با ۶ روز دور آبیاری (رطوبت خاک=۱/۱۵ درصد وزنی) می‌آید و تشدید خشکی بیشتر از این سبب کاهش معنادار عملکرد قند استویولی شد.

معنادار نداشت. از طرف دیگر وزن خشک برگ، به‌عنوان عملکرد اقتصادی استویا، در تنش‌های حاصل از دور آبیاری بیش از ۹ روز (کاهش رطوبت خاک کمتر از ۱۱/۹ درصد وزنی خاک) کاهش معنادار داشت و افت شاخص برداشت نیز در تنش‌های متوسط و شدید معنادار بود. برآیند کاهش وزن خشک برگ و افزایش

REFERENCES

- Ebrahimi, M. Mofid, m. Khayyam Nekoui, M. Fakhari, Z. (2010). Techniques for mass propagation of Stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.).
- Aladakatti, Y. R., Palled, Y. B., Chetti, M. B., Halikatti, S. I., Alagundagi, S. C., Patil, P. L., Patil V. C. & Janawade, A. D. (2012). Effect of irrigation schedule and planting geometry on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Karnataka Journal of Agricultural Science*, 25 (1), 30-35.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N. & Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78, 527 - 536.
- Crammer, B. & Ikan, R. (1987). Progress in the chemistry and properties of the rebaudiosides. In *Developments in Sweeteners-3*, T.H.Grenby (Ed.), *Elsevier Applied Science*, London, pp. 45–64.
- Generally Recognized As Safe (GRAS) notification for SweetLeaf Stevia submitted by Wisdom Natural Brands, (2009). FDA. Available: www.accessdata.fda.gov/scripts/cfn/gras_notices/grn000287.pdf.
- Geuns, J. & Struyf, T. (2010). Radical scavenging activity of steviol glycosides and steviol glucuronide. Stevia, Science no Fiction location. Leuven. 29-30 June. Proceedings of the 4th EUSTAS Stevia Symposium, 4 pages, 191-207.
- Geuns, J. M. C. (2003). Stevioside. *Phytochemistry*, 64, 913-921
- Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J. & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism Clinical and Experimental*, 53, 73–76.
- Guzman, R. A. R. (2010). *Autoecological role of steviol glycosides in Stevia rebaudiana Bertoni'*, PhD thesis, Central Queensland University, Rockhampton.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram R. & Panneerselvam, R. (2007a). Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 60, 201-206.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2007b). Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 60, 110-116.
- Kim, S., Yang, M., Lee, O. H. & Kang, S. K. (2010). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science and Technology*, Xxx, 1-5.
- Kinghorn, A. D. (2002). Stevia, the genus of stevia. *Taylor & Francis*, 213 pages.
- Lavini, A., Riccardi, M., Palvento, C., De luca, S., Scamosci, M. & D andria, R. (2008). Yield, quality and water consumption of *Stevia rebaudiana bertoni* grown under different irrigation regimes in southern Italy. *Italian Journal of Agronomy / Riv. Agron.* 2, 135-143.
- Madan, S., Amad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. & Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-a review. *Indian Journal of Natural Product and Resources*, 1(3), 267-286.
- Ren, G. & Y. Shi. (2012). The effects of drought stress on the photosynthetic parameters and dry leaf yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Advanced Materials Research*, 518 – 523, 4786-4789.
- Sharma, M., Thakral, N. K. & Thakral. S. (2009). Chemistry and in vivo profile of ent-kaurene glycosides of *Stevia rebaudiana bertoni* – An overview. *Natural Product Radiance*, 8(2), 181-189.
- Shyu, Y. T., Liu, S. Y., Lu, H. Y., Wu, W. K. & Su, C. G. (1994). Effects of harvesting dates on the characteristics, yield, and sweet components of *Stevia rebaudiana* Bertoni lines. *Journal of Agricultural Research of China*, 43(1), 29-39.

19. Singh, S. D. & Rao, G. P. (2005). Stevia: The herbal sugar of the 21st century. *Sugar Technology*, 7, 1724.
20. Starrat, A. N., Kirby, C. W., Pocs, R. & Brandle, J. E. (2002). Rebaudioside F a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 59, 367-370.
21. Tateo, F., Mariotti, M., Bononi, M., Lubian, E., Martello, S. & Cornara, L. (1998). Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. *Italian Journal of Food Science*, 10, 261-267.
22. Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91, 127.