Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (209-219)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.239138.1298

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص۲۱۹-۲۰۹)

اثر پرولین و اسید سالیسیلیک بر شاخص‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.)

عارفه راستگو[1]، محسن ثانی‌خانی[2*]، عزیزاله خیری[2] و میترا اعلایی[2]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱۷)

چکیده

در این مطالعه به‌منظور بررسی اثر پرولین و اسید سالیسیلیک بر صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه استویا آزمایشی به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل پرولین در سه سطح (صفر، ۱، ۲ میلی‌مولار) و اسید سالیسیلیک در سه سطح (صفر، ۰/۳، ۰/۶ میلی‌مولار) بودند که به‌صورت محلول‌پاشی برگی پس از استقرار نشا، در سه مرحله به فاصله ۱۰ روز انجام شد. صفات مورد بررسی شامل سطح برگ، عملکرد وزن تر و خشک برگ و کل بوته در واحد سطح، کلروفیل (a، b و کل)، کاروتنوئید، فنل کل، فلاونوئید کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند. تیمارها به‌طور قابل‌توجهی در صفات بالا نسبت به شاهد تأثیرگذار بودند. بالاترین میانگین سطح برگ ($5949/39 cm^2$)، عملکرد تر ($787/17 g/m^2$) و خشک برگ ($228/5 g/m^2$) و عملکرد تر ($1339/23 g/m^2$) و خشک کل بوته ($327/52 g/m^2$) در سطح تیمار ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. کاربرد اثرات ساده غلظت‌های ۲ میلی‌مولار پرولین و ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک منجر به افزایش میزان کلروفیل a، b، کاروتنوئید و فلاونوئید کل شد. بالاترین میزان کلروفیل کل (۵/۲۳mg/g fw) در اثرات متقابل تیمار ۲ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و بالاترین میزان فنل (۱۹/۹۴mg/g dw) در ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. می‌توان استنباط نمود که تیمار با پرولین و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر فرآیندهای رشدی و فیزیولوژیکی، در افزایش عملکرد و تولید متابولیت‌های ثانویه استویا مؤثر بودند.

واژه‌های کلیدی: اسید آمینه، اسید سالیسیلیک، عملکرد، کلروفیل، متابولیت‌های ثانویه.

Effect of proline and salicylic acid on morphological and phytochemical characteristics of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Arefeh Rastgoo[1], Mohsen Sanikhani[2*], Azizollah Kheiry[2] and Mitra Aelaei[2]
1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
(Received: Aug. 15, 2017 - Accepted: May 7, 2018)

ABSTRACT

To study the effect of foliar application of proline and salicylic acid on growth, morphological and phytochemical traits of Stevia, an experiment based on completely randomized block design in a factorial arrangement was conducted with three replications in the University of Zanjan. Foliar applications of proline in three levels (0, 1, 2 mM) as well as salicylic acid (0, 0.3, 0.6 mM) were applied after establishment of transplants in the field three times with 10 days intervals. Factors including leaf area, leaf fresh and dry weight, total fresh and dry weight, chlorophyll a, b and total chlorophyll, carotenoid, total phenol, total flavonoid and antioxidant activity were studied. Results showed that salicylic acid and proline applications significantly influenced above mentioned traits. The highest average leaf area/ plant (5949.39 cm^2), leaf fresh (787.17 g/m^2) and dry leaf weight (228.5 g/m^2), total fresh (1339.23 g/m^2) and total dry weight (327.52 g/m^2) were recorded in 1 mM proline in combination with 0.3 mM salicylic acid. Solely applications of proline at 2 mM and salicylic acid at 0.6 mM enhanced chlorophyll a, b, carotenoid and total flavonoid contents. The highest average total chlorophyll (5.23 mg/g fw) observed in 2 mM proline in combination with 0.3 mM salicylic acid and highest phenol (19.94 mg/g dw) recorded in 1 mM proline in combination with 0.6 mM salicylic acid. Collectively, results showed that application of proline and salicylic acid significantly improved vegetative growth and production of active substances in *Stevia rebaudiana*.

Keywords: Active substances, amino acid, chlorophyll, salicylic acid, yield.

* Corresponding author E-mail:

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* (Bert.) گیاهی بوته‌ای، چند ساله و بومی کشور پاراگوئه است که به خانواده کاسنی تعلق دارد. در برگ‌های استویا گلیکوزیدهای دی‌ترپن استویول (استویوزاید و ربادیوزاید A) بدون کالری، با قدرت شیرین‌کنندگی بالا و ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز تولید می‌شود که می‌تواند جایگزین ساکارز و دیگر شیرین‌کننده‌های مصنوعی شود (Yadav *et al*., 2011) این ترکیبات جذب بدن نمی‌شوند و در درمان دیابت، چاقی، فشار خون و پیشگیری از پوسیدگی دندان مفید هستند (Pandy *et al*., 2014). در سال‌های اخیر، گرایش مردم به استفاده از گلیکوزیدهای استویول در بیشتر کشورها افزایش یافته است. بنابراین استویا از جمله محصولات با ارزش در نظر گرفته می‌شود (Singh & Rao, 2005).

خواص بالای آنتی‌اکسیدانی و میزان بالای فنل و فلاونوئید در گیاه استویا گزارش شده است که ارزش غذایی این گیاه را افزایش داده است (Tadhani *et al*., 2007; Shukla *et al*., 2009). آنتی‌اکسیدان‌ها، موادی هستند که قدرت دفاعی سلول را بالا می‌برند و از صدمات اکسیدان‌ها (رادیکال‌های آزاد) به سلول‌های و سرطان می‌شود و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی می‌باشند (Dragovi-Uzelac, 2010).

استویا به‌صورت یک محصول زراعی چند ساله در مناطق نیمه‌گرمسیری جهان می‌روید، درحالی‌که در مناطق معتدل و عرض‌های جغرافیایی بالاتر، به‌صورت محصول یکساله رشد می‌نماید. عوامل محیطی و زراعی تأثیر بیشتری در مقایسه با عادات رشدی گیاه استویا بر عملکرد و ترکیبات مختلف آن دارند (Azarpur *et al*., 2013). از جمله محدودیت‌های موجود در تولید استویا، حساس‌بودن این گیاه به کم‌آبی، مقامت کم به خشکی، حساسیت به سرما و شوری را می‌توان نام برد (Ramesh *et al*., 2006). پرولین و اسید سالیسیلیک از محرک‌هایی هستند که به‌عنوان اسمولیت‌های سازگار شناخته شده و کاربرد آنها می‌تواند در کاهش اثرات تنش‌های محیطی مؤثر باشد. پرولین نوعی آمینواسید با فرمول $C_5H_9NO_2$، درون کلروپلاست تولید می‌شود، اما درون سیتوسول تجمع می‌یابد (Ashton & DeshPal, 1993). پرولین به‌عنوان ماده‌ای محلول، سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدررفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها و حفاظت از ساختار غشایی می‌شود (Barker *et al*., 1993). پرولین در پاسخ به استرس‌های محیطی در بسیاری از گونه‌های گیاهی در سلول‌ها و بافت‌ها تجمع می‌یابد. این تجمع در شرایط تنش خشکی، شوری بالا، نور بالا، تابش اشعه UV و تنش‌های زیستی گزارش شده است. افزایش غلظت پرولین در گیاهانی که تحت تنش قرارگرفته‌اند نوعی سازگاری برای غلبه بر شرایط تنش می‌باشد (Szabados *et al*., 2009). محلول‌پاشی پرولین در گیاهان سیب‌زمینی، تنباکو، ذرت، گندم و سورگوم موجب افزایش پارامترهای رویشی از جمله ارتفاع گیاه، سطح برگ، تعداد شاخه، وزن خشک و عملکرد شده است (Yusry *et al*., 2015).

اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنلی است که به‌طور طبیعی در گیاهان سنتز می‌شود (Raskin, 1992). اسید سالیسیلیک به‌وسیله سلول‌های ریشه تولید می‌شود و نقش محوری در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله رشد و نمو گیاه، جذب یون، فتوسنتز و جوانه‌زنی ایفا می‌کند (El-Tayab, 2005). اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک مولکول واسطه پیام‌رسان، تقریباً بر اکثر واکنش‌های متابولیسمی گیاه تأثیر می‌گذارد و موجب تغییراتی در آنها می‌شود. این تغییرات اغلب به‌صورت سازش‌هایی است که مقدار تحمل و سازگاری گیاهان را در مقابل عوامل محیطی افزایش می‌دهد (Metwally *et al*., 2003). کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک از طریق افزایش بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی، تشکیل متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد؛ به‌طوری که کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک میزان فلاونوئید کل را در گیاهان بابونه، ماریتیغال، زنجبیل و گل قاصد افزایش داده است (Pacheco *et al*., 2013). پژوهش‌های گذشته نشان داده است که استفاده از اسید سالیسیلیک در محصولات مختلف، موجب بهبود عملکرد و اجزای عملکرد می‌شود که ناشی از تأثیر اسید سالیسیلیک بر فرآیندهای فیزیولوژیکی است (Kaydan *et al*., 2007). کاربرد اسید سالیسیلیک در گیاهان ذرت و

www.SID.ir

Archive of SID

سویا موجب افزایش رشد و عملکرد گیاهان شده است (Khan *et al*., 2003). با توجه به محدودیت‌های کشت استویا در مزرعه و اثرات پرولین و اسید سالیسیلیک در بهبود استقرار و سازگاری، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات پرولین و اسید سالیسیلیک بر روی شاخص‌های رشدی وابسته به عملکرد و ترکیبات ثانویه گیاه استویا در شرایط آب‌وهوایی زنجان و با استفاده از مالچ پلاستیک شفاف بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان با ارتفاع ۱۶۶۳ متر از سطح دریا، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۵ دقیقه و طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۱ دقیقه اجرا گردید. این منطقه براساس تقسیمات اقلیمی ایران و داده‌های هواشناسی جزء اقلیم سرد و نیمه‌خشک می‌باشد (جدول ۱). برای مطالعه اثر پرولین و اسید سالیسیلیک بر صفات رویشی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه استویا آزمایشی فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل پرولین با سه سطح (صفر، ۱، ۲ میلی‌مولار) و اسید سالیسیلیک با سه سطح (صفر، ۰/۳، ۰/۶ میلی‌مولار) بودند. کاشت نشاءها در نیمه دوم اردیبهشت در مرحله ۴ تا ۶ برگی به‌صورت دستی انجام گرفت. فاصله ردیف‌ها از یکدیگر ۶۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌های روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تعداد گیاهان در هر کرت ۱۴ بوته در نظر گرفته شد. جهت حفظ رطوبت و کنترل علف‌های هرز در ردیف‌های کشت مالچ‌کشی پلاستیکی انجام شد. آبیاری بوته‌ها به‌روش قطره‌ای و دور آبیاری ۴ روز در نظر گرفته شد. تیمار اسید سالیسیلیک و پرولین به‌صورت محلول‌پاشی برگی، پس از استقرار نشاء در سه مرحله به فاصله ۱۰ روز انجام گرفت. برداشت بوته‌ها در نیمه دوم مرداد ماه، پس از رسیدن به رشد کامل و قبل از مرحله گلدهی و از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری سطح زمین انجام شده و اندازه‌گیری شاخص‌های مورد نظر صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی شامل سطح برگ، عملکرد تر و خشک برگ، عملکرد تر و خشک کل بوته (مجموع وزن برگ و ساقه)، کلروفیل (a، b، کل)، کاروتنوئید، فنل کل، فلاونوئید کل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند. سطح برگ بوته با استفاده از دستگاه اسکنر (model: Mustek). اندازه‌گیری شد. پس از برداشت وزن تر برگ و کل بلافاصله مورد توزین قرار گرفته و برای تعیین وزن خشک برگ و کل بوته‌ها در سایه خشک شده و سپس وزن شدند.

تهیه عصاره متانولی

مقدار ۵ گرم از هر نمونه برگی خشک آسیاب‌شده و سپس در ۴۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد خیسانده و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید و به‌دنبال آن، عصاره‌ها با کاغذ صافی فیلتر شدند. حلال عصاره‌ها، در دمای کمتر از ۵۰ درجه توسط دستگاه روتاری تبخیر گردید. عصاره‌ها برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه در یخچال نگهداری شدند (Ruiz Ruiz *et al*., 2015).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی به‌روش Arnon (1967) صورت گرفت. ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از بافت تازه نمونه برگی وزن شده و در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع خرد و به‌خوبی ساییده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه اضافه شد و سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس میزان جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر از محلول رو شناور، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در نهایت با استفاده از روابط زیر، میزان کلروفیل a، b، کاروتنوئید و کلروفیل کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید (Ashraf *et al*., 1994).

رابطه ۱) $$\text{Chlorophyll (a) (mg/g fw)} = 12.7(A_{663}) - 2.69(A_{645}) \times V/1000W$$

رابطه ۲) $$\text{Chlorophyll (b) (mg/g fw)} = 22.9(A_{645}) - 4.68(A_{663}) \times V/1000W$$

رابطه ۳) $$\text{Chlorophyll tatol (mg/g fw)} = 20.2(A_{645}) + 8.02\,(A_{663}) \times V/1000W$$

رابطه ۴) $$\text{Carotenoid (mg/g fw)} = \{1000(A_{470}) - 1.8(\text{chlorophyll a}) - 85.02(\text{chlorophyll b})\}\ /198$$

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. خلاصه آمار پارامترهای اقلیمی شهرستان زنجان

Table 1. Climatic parameters of Zanjan

Station	Average rainfall (mm)	Average annual min temperature (°C)	Average annual max temperature (°C)	Average annual temperature (°C)	Average annual relative humidity (%)	Total average frost days per year
Zanjan	313.1	4	18	11	54	120.4

منبع: Mahtabi *et al.*, 2013

روش سنجش محتوای فنل کل

محتوای فنل کل براساس روش فولین سیوکالچو[1] انجام شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه، ۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم (۲٪)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو (۵۰٪) اضافه و نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. از غلظت‌های مختلف اسید گالیک ۵۰-۵۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. محتوای فنل کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد (Meda *et al.*, 2005).

روش سنجش محتوای فلاونوئید کل

تعیین محتوای فلاونوئید براساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم‌کلراید انجام شد. طبق این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم‌کلراید ۱۰٪ و ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. از غلظت‌های مختلف کوئرستین ۱۲/۵-۲۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید کل برحسب معادل کوئرستین /گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Ruiz Ruiz *et al.*, 2015).

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد مبتنی بر استفاده از ۲و۲ دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) بود. در این روش ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH (با غلظت ۰/۱۵mM از طریق حل‌کردن در متانول) را داخل لوله آزمایش ریخته و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر عصاره را به آن افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه داشته شده و میزان جذب آن در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه ۵ محاسبه گردید (Brand-Williams *et al.*, 1992):

$$I(\%) = (A_0 - A_s)/A_0 \times 100 \quad \text{رابطه ۵}$$

که در آن A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزاء واکنشگر بدون نمونه) و A_s جذب هر نمونه بود.

داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات رویشی (جدول۲) داده‌ها نشان داد پرولین و اسید سالیسیلیک بر صفات مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری تأثیرگذار بودند؛ به‌طوری که صفات سطح برگ بوته، عملکرد وزن تر و خشک برگ در واحد سطح، عملکرد تر و خشک کل بوته در واحد سطح در اثرات ساده و متقابل تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شدند.

سطح برگ

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد که تیمار با پرولین و اسید سالیسیلیک موجب افزایش سطح برگ بوته در تمام سطوح نسبت به شاهد شده است. بالاترین میانگین سطح برگ بوته، با ۵۹۴۹/۳۹ سانتی‌متر مربع، در تیمار اثرات متقابل سطح ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌دست آمد و کمترین میانگین سطح برگ بوته در تیمار شاهد، با ۲۷۴۱/۱۱ سانتی‌متر مربع

1. Folin-ciocalteu

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شد. سطوح ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۲ میلی‌مولار پرولین نیز تأثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش سطح برگ داشتند و در رده‌های بعدی قرار گرفتند. در تحقیقی دیگر، کاربرد اسید سالیسیلیک به‌صورت محلول‌پاشی برگی در گیاه ذرت، باعث افزایش سطح برگ و تعداد برگ شده است (Khodary, 2004). به‌نظر می‌رسد اسید سالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و در نتیجه بهبود فتوسنتز سبب افزایش سطح برگ می‌شود (Khan *et al*., 2003). کاربرد ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک شاخص سطح برگ لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) را در شرایط تنش خشکی و نرمال ۲۹٪ افزایش داد. تنش کم‌آبی موجب کاهش رشد برگ، سطح برگ و فتوسنتز در بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌شود. در چنین شرایطی تیمار اسید سالیسیلیک موجب حفظ محتوای نسبی آب برگ و بهبود فتوسنتز شده و سطح برگ را افزایش می‌دهد (Sadeghipuor & Aghaei, 2012). در تحقیقی دیگر کاربرد پرولین موجب افزایش سطح برگ در گیاه سورگوم شد (Ryahy *et al*., 2011). همچنین کاربرد ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین سطح برگ در گوجه‌فرنگی را افزایش داد (Kahlaoui *et al*., 2013) که مطالعات قبلی با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند.

عملکرد وزن تر و خشک برگ و کل بوته در واحد سطح

طبق نتایج به‌دست‌آمده از مقایسات میانگین (جدول ۳) بیشترین عملکرد وزن تر برگ ۷۸۷/۱۷ (گرم در متر مربع) و عملکرد وزن تر کل بوته ۱۳۳۹/۲۳ (گرم در متر مربع) در تیمار اثرات متقابل سطح ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌دست آمد و کمترین مقدار عملکرد تر برگ و کل بوته به‌ترتیب ۴۱۰/۷۵ (گرم در متر مربع) و ۷۴۷/۵ (گرم در متر مربع) در تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین بیشترین عملکرد وزن خشک برگ ۲۲۸/۵ (گرم در متر مربع) و عملکرد وزن خشک کل بوته ۳۲۷/۵۲ (گرم در متر مربع) در تیمار اثرات متقابل سطح ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌دست آمد.

جدول ۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر پرولین، اسید سالیسیلیک و اثرات متقابل آنها بر صفات مورفولوژیکی استویا *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Table 2. Analysis of variance for proline, salicylic acid and their interaction on morphological traits of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Variation Source	df	Leaf area/ plant	Yield of leaf fresh weight	Yield of leaf dry weight	Total fresh weight yield	Total dry weight yield
Block	2	18649.83	5984.15	133.75	1537.88	238.06
P	2	2498741.47**	25600.93**	2289.32**	2399.4**	4139.48**
SA	2	6115272.70**	66423.40**	4118.58**	70383.64**	5552.35**
P × SA	4	4308203.47**	56785.35**	6436.97**	277849.89**	14285.54**
Error	16	161249.14	3180.93	243.71	3676.61	223.83
CV		8.80	9.43	9.29	6.09	6.33

*, **, ns: Non significant, significant at 5 and 1%, respectively. ns، *، **: به‌ترتیب معنی‌دار نبودن، معنی‌دار درسطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۳. مقایسات اثر پرولین، اسید سالیسیلیک و اثرات متقابل آنها بر صفات مورفولوژیکی استویا (*Stevia rebaudiana* (Bert.

Table 3. Effects proline, salicylic acid and their interaction on morphological traits of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Treatment	Leaf area plant (cm^2)	Yield of leaf fresh weight (g/m^2)	Yield of leaf dry weight (g/m^2)	Total fresh weight yield (g/m^2)	Total dry weight yield (g/m^2)
P_0SA_0	2741.21±27.58 c	410.75±43d	114.6±4.10 d	748.5±6.92 c	170.82±7.82d
P_0SA_1	3550.27±94.6 c	472.27±33 cd	131.44±9.93 cd	780.02±25.47 c	182.55±5.31 d
P_0SA_2	5558.74±248 ab	7.57±15 a	202.4± 16.8ab	1300.42±78.49 a	282.95±12.51 b
P_1SA_0	2977.77±95 c	481.68±68cd	117.97±4.48 d	763.23±8.85 c	169.31±3.81 d
P_1SA_1	5949.39±239.44 a	787.17±25a	228.5± 4.18a	1339.23±35.62 a	327.52±5.79a
P_1SA_2	5660.69±246.69 ab	690.6±46 ab	185.4±12.59 b	1036.29±42.5 b	262.82±8.28 b
P_2SA_0	5260.79±220 ab	611.47±49 bc	199.5±7.21 ab	1193.65±94.7 ab	283.95±12.5 b
P_2SA_1	4708.14±169 b	619.75±20 bc	163.07±6.39 bc	894.41±26.5 bc	226.12±6.43 c
P_2SA_2	4619.47±400 b	549.81±31 cd	168.17±2.72 bc	896.82±10.9 bc	219.52± 10.66 c

P= proline & SA= Salicylic acid

Means with similar letters are not significant in Duncan. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

سطوح دوم هر دو تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک نیز عملکرد تر و خشک برگ و کل بوته را افزایش داد؛ به‌طوری‌که در صفت عملکرد وزن تر برگ و کل تیمار ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با تیمار اثرات متقابل ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در یک سطح قرار گرفتند. در گیاهان تیمارشده با اسید سالیسیلیک، افزایش عملکرد محصول می‌تواند ناشی از تأثیر اسید سالیسیلیک بر تثبیت بیشتر CO_2، افزایش کلروفیل، کاروتنوئیدها، افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و تأمین بیشتر ATP و NADPH برای تثبیت کربن و تولید بیشتر آسیمیلات باشد (Khan *et al*., 2003). وزن کل اندام هوایی و عملکرد گیاهان رابطه مستقیمی با میزان فتوسنتز دارد و افزایش کارایی فتوسنتز می‌تواند منجر به افزایش عملکرد شود (Hirose *et al*., 1997). محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر روی گیاهان ریحان و مرزنجوش، باعث افزایش وزن تر و خشک گیاه، درصد و عملکرد اسانس شد (Garib, 2006). بررسی‌ها نشان می‌دهد پرولین علاوه بر اینکه طی فرآیند تنش افزایش می‌یابد و به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ اسمزی سبب افزایش حفظ آب می‌شود؛ بعد از رفع تنش نیز به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و انرژی برای بازیابی و بهبود رشد مصرف می‌شود (Zhang & Verma, 1997). ریاحی و همکاران گزارش کردند که کاربرد پرولین در شرایط تنش خشکی و شرایط نرمال موجب افزایش سطح برگ و وزن تر و خشک اندام هوایی در گیاه سورگوم شد (Ryahy *et al*., 2011). در گزارشی دیگر تیمار با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین موجب افزایش وزن تازه و خشک برگ در گیاه چغندر شد (Rashad El-SHerbeny & Teixeira Da Silva, 2013). همچنین محلول‌پاشی پرولین موجب افزایش وزن تر و خشک و عملکرد در گیاه بابونه گردید (Gamal El-Din & bd El-Wahed, 2005) که نتایج تحقیقات ذکر شده با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

کلروفیل a، b و کل

براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) اثرات ساده تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک بر کلروفیل a، b و کل در سطح یک درصد معنی‌دار شد. اثرات متقابل تیمارها نیز در سطح ۱ درصد به‌طور معنی‌داری میزان کلروفیل کل را تحت تأثیر قرار داد.

جدول ۴. تجزیه واریانس(میانگین مربعات) اثر پرولین، اسید سالیسیلیک و اثرات متقابل آنها بر صفات فیزیولوژیکی و ترکیبات ثانویه استویا *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Table 4. Analysis of variance for proline, salicylic acid and their interactions on physiological traits and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Variation Source	df	Chlorophyll a (mg/g fw)	Chlorophyll b (mg/g fw)	Total Chlorophyll (mg/g fw)	Carotenoid (mg/g fw)	Phenol (mg/g dw)	Total flavonoid (mg/g dw)	Antioxidant activity (%)
Block	2	0.7	0.1	0.2	1.38	0.10	0.037	5.31
P	2	0.51^{**}	0.13^{**}	1.09^{**}	13.73^{**}	0.25^{**}	2.86^{**}	3.17^{ns}
SA	2	1.1^{**}	0.32^{**}	2.2^{**}	13.63^{**}	0.619^{**}	10.86^{**}	1.35^{*}
P × SA	4	0.1^{ns}	0.3^{ns}	0.14^{**}	1.98^{ns}	0.165^{*}	0.44^{ns}	13.97^{*}
Error	16	0.3	0.1	0.02	0.3	0.039	0.37	3.02
CV		5.41	10.88	3.54	7.16	4.29	5.36	2.15

*,**, ns: Non significant, significant at 5 and 1%, respectively. ns، *، **: به‌ترتیب معنی‌دار نبودن، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک بر صفات فیزیولوژیکی و ترکیبات ثانویه *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Table 5. Effects of proline and salicylic acid on physiological traits and secondary compounds of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Treatment (mM)	Chlorophyll a (mg/g fw)	Chlorophyll b (mg/g fw)	Carotenoid (mg/g fw)	Flavonoid Total (mg/g dw)
Control	3.33b	1,01b	16.61b	8.59b
P (1mM)	3.34b	1.11ab	17.31ab	9.17ab
P (2mM)	3.78a	1.26a	19.01a	9.46a
Control	3.11b	0.91b	16.28b	8.28b
SA (0.3mM)	3.68a	1.23a	17.96ab	8.91b
SA (0.6mM)	3.80a	1.28a	18.68a	10.02a

P= proline & SA= Salicylic acid

Means with similar letters are not significant in Duncan. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir

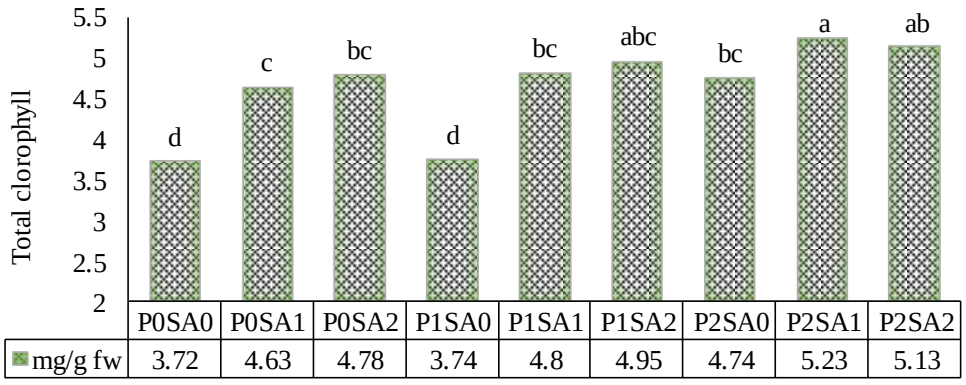
Archive of SID

نتایج مقایسات میانگین تیمارها (جدول ۵) نشان داد که با افزایش غلظت تیمارها میزان کلروفیل a وb نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. بالاترین مقدار کلروفیل a با کاربرد ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۲ میلی‌مولار پرولین به‌ترتیب ۳/۸۰ و ۳/۷۸ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ به‌دست آمد و همین‌طور بالاترین میزان کلروفیل b با ۱/۲۸ و ۱/۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ به‌ترتیب در تیمارهای اسید سالیسیلیک ۰/۶ میلی‌مولار و تیمار پرولین ۲ میلی‌مولار مشاهده شد. همچنین مقایسه میانگین شاخص کلروفیل کل (نمودار ۱) نشان داد که افزایش سطوح تیمارها موجب افزایش کلروفیل کل در استویا شده است. بیشترین کلروفیل کل با ۵/۲۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ در اثرات متقابل تیمار ۲ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌دست آمد. سایر سطوح اثرات متقابل هم موجب افزایش کلروفیل کل نسبت به شاهد شدند.

افزایش میزان کلروفیل در گیاهان تیمارشده با اسید سالیسیلیک می‌تواند به‌دلیل تأثیر این هورمون بر کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد باشد که در نتیجه از تخریب کلروفیل جلوگیری می‌کند (Zawaznik *et al*., 2007). از دلایل دیگر افزایش کلروفیل، می‌توان تنظیم سازوکار باز و بسته‌شدن روزنه‌ها و حفظ ساختار کلروپلاست در نتیجه تیمار با اسید سالیسیلیک را دانست (Khan *et al*., 2010). در این راستا و در تحقیقی دیگر کاربرد اسید سالیسیلیک در گندم (*Triticum aestivum* L.) میزان کلروفیل a و b را افزایش داد (Kaydan *et al*., 2007). Gasemi *et al*. (2015) گزارش کردند که محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک باعث افزایش تعداد برگ و میزان کلروفیل در گیاه زنیان شده و منجر به بهبود عملکرد زنیان شد. همچنین تیمار با پرولین موجب افزایش کلروفیل a، b و کل در گیاه چغندر گردید (Rashad El-Sherbeny & Teixeira da Silva, 2013).

کاروتنوئید

محتوای کاروتنوئیدها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثرات ساده تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک در سطح ۱ درصد قرار گرفت (جدول ۴). افزایش غلظت پرولین و اسید سالیسیلیک موجب افزایش میزان کاروتنوئید در استویا نسبت به شاهد شد. بیشترین سطح کاروتنوئید به‌میزان ۱۹/۰۱ و ۱۸/۶۸ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ به‌ترتیب با کاربرد ۲ میلی‌مولار پرولین و ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌دست آمد (جدول ۵). کاروتنوئیدها قادرند که انرژی زیاد طول موج‌های کوتاه را گرفته و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن منفرد و تبدیل آن‌ها به اکسیژن سه‌تایی نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کنند (Qinghuo & Zhujun, 2008). کاربرد محلول پاشی پرولین موجب افزایش سطح کاروتنوئید در برگ‌های چغندر می‌شود (Rashad El-Sherbeny & Teixeira da Silva, 2013). در بررسی‌های انجام‌شده در مورد گیاهچه‌های گندم تیمار با اسید سالیسیلیک تولید کاروتنوئیدها را در این گیاه افزایش داده است (Kaydan, 2007) که با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش همخوانی دارد.



شکل ۱. اثر متقابل پرولین و اسید سالیسیلیک بر کلروفیل کل استویا

Figure 1. Interaction effect of proline and salicylic acid on total chlorophyll of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

www.SID.ir

Archive of SID

محتوای فنل کل

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) بیانگر اثرات ساده تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک بر افزایش معنی‌دار میزان ترکیبات فنلی در سطح ۱ درصد می‌باشد. همچنین اثرات متقابل تیمارها به‌طور معنی‌داری در سطح ۵ درصد میزان فنل کل را تحت تأثیر قرار داد. بالاترین میزان فنل با ۱۹/۹۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک در تیمار سطح پرولین ۱ میلی‌مولار به‌همراه ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد که با تیمار ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با ۱۹/۵۹ میلی‌گرم در گرم اختلاف چندانی نداشت و در یک سطح قرار گرفت. سایر سطوح اثرات متقابل نیز موجب افزایش میزان فنل کل در مقایسه با شاهد شدند (شکل۲). پرولین نقش اساسی در سنتز ترکیبات فنلی در شرایط تنش دارد که خواص آنتی‌اکسیدانی آن را نشان می‌دهد. گزارش شده است که پرولین محرک بیوسنتز فنل‌ها در مسیر شیکیمات با فعال‌سازی آنزیم فنیل‌پروپانوئید می‌باشد. در این راستا در تحقیقی بر روی گیاه کاکله (*Cakile maritima*) مشاهده گردید که کاربرد خارجی پرولین موجب افزایش محتوای ترکیبات فنلی شد (Messedi *et al*., 2016). در مطالعات دیگر، محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک موجب افزایش ترکیبات فنلی در کشت درون‌شیشه‌ای شیرین‌بیان (Shbani & Ehsanpour, 2009) و همیشه بهار (Ghasemi Pirbaloti *et al*., 2012) شده است. در تحقیقی Ali *et al.* (2007) گزارش کردند کاربرد ۲۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک در گیاه جینسنگ، موجب افزایش ترکیبات فنلی (۶۲٪) و فلاونوئیدها (۸۸٪) در مقایسه با شاهد شد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد.

محتوای فلاونوئید کل

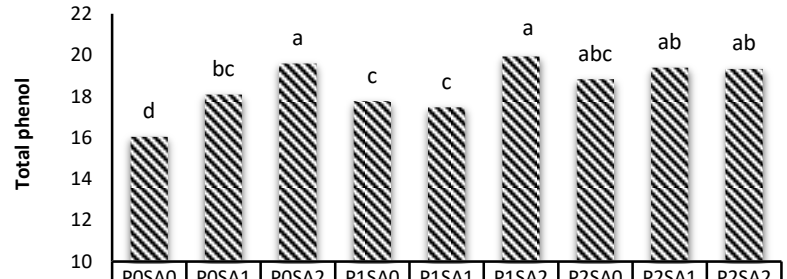
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) بیانگر تأثیر معنی‌دار اثرات ساده تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید کل استویا در سطح ۱ درصد بود. با افزایش غلظت تیمارها میزان فلاونوئید کل در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت. بالاترین میزان فلاونوئید کل با ۱۰/۰۲ میلی‌گرم در گرم در تیمار ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۹/۴۶ میلی‌گرم در گرم در تیمار ۲ میلی‌مولار پرولین به‌دست آمد (جدول ۵). اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود. پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی از جمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی می‌گردد که گیاهان می‌توانند از طریق القای آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، به طیف وسیعی از تنش‌ها پاسخ دهند (Mueller *et al*., 1993). در تحقیقی مشاهده گردید که اسید سالیسیلیک به‌طور قابل‌توجهی سبب افزایش میزان فلاونوئید کل در کشت درون‌شیشه‌ای شیرین‌بیان گردید (Shbani & Ehsanpour, 2009). در گیاه همیشه‌بهار کاربرد غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک موجب افزایش محتوای فلاونوئید کل شد (Pacheco *et al*., 2013). همچنین محلول‌پاشی پرولین موجب افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecom* L.) در شرایط آبیاری کامل و تنش کم‌آبی شد (Abd-Elhamid *et al*., 2016).

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس (جدول۳) اثرات ساده تیمار اسید سالیسیلیک و اثرات متقابل اسید سالیسیلیک و پرولین در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشند. در تیمار اسید سالیسیلیک غلظت ۰/۳ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به تیمار شاهد شده است؛ اما با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک به ۰/۶ میلی‌مولار، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته است. اثرات متقابل تیمارها موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با اثرات ساده شد به‌طوری که اثرات متقابل سطوح دوم هر دو تیمار با تیمار شاهد در یک سطح قرار گرفت (شکل ۳). در مطالعه‌ای بر روی تاج‌خروس از بین غلظت‌های به‌کار رفته، اسید سالیسیلیک بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به سطح ۰/۱ میلی‌مولار بود و در غلظت‌های بالاتر کاهش یافت (Kandaker *et al*., 2011). در تحقیقی بر روی گیاه نخود، کاربرد ۰/۰۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک در مقایسه با ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نشان داد (Boukraâ *et al*., 2015) که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

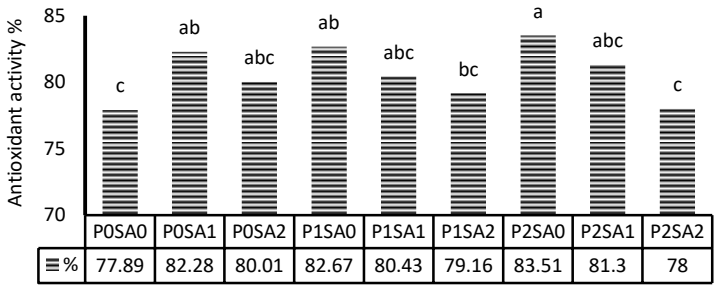
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. اثر متقابل پرولین و اسید سالیسیلیک بر سطح فنل در گیاه استویا

Figure 2. Interaction effect of proline and salicylic acid on phenol content of *Stevia rebaudiana* (Bert.)



شکل ۳. اثر متقابل پرولین و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه استویا

Figure 3. Interaction effect of proline and salicylic acid on antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق به‌عنوان اولین مطالعه کشت مزرعه‌ای استویا در شرایط زنجان، نشان داد استقرار و تولید این محصول خصوصا تحت تأثیر تیمارهای آزمایش موفقیت‌آمیز می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده اثرات مطلوب کاربرد تیمار پرولین و اسید سالیسیلیک بر عمده صفات رویشی، رنگیزه‌های نوری و شاخص‌های فیتوشیمیایی گیاه استویا بوده که در افزایش عملکرد گیاه مؤثر می‌باشند. اثرات ساده تیمار ۲ میلی‌مولار پرولین و ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک عملکرد رویشی محصول را به‌طور قابل‌توجهی نسبت به تیمار شاهد افزایش داد و علاوه بر آن صفات کلروفیل (a، b و کل)، کاروتنوئید، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها را نیز تحت تأثیر قرار داده و موجب افزایش آنها شدند. در اکثر صفات مورد مطالعه، تیمار ۰/۶ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک تأثیر بهتری نسبت به تیمار ۲ میلی‌مولار پرولین نشان داد. بهترین اثرات متقابل در تیمار ۱ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۳ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد؛ به‌طوری که منجر به بیشترین عملکرد پیکره رویشی (سطح برگ بوته، عملکرد وزن تر و خشک برگ، عملکرد تر و خشک کل بوته) در بین تمام سطوح تیمارها شد؛ بنابراین استفاده از اسید سالیسیلیک و پرولین با نسبت‌های ذکر شده، برای افزایش عملکرد محصول و ترکیبات ثانویه مهم در استویا قابل توصیه است.

REFERENCES

1. Ashton, J. D. & Deshpal, S. V. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4(2), 215-223.
2. Ashraf, M. Y., Azmi, A. R., Khan, A. H. & Ala, S. A. (1994). Effect of water on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat. *Acta Phsiologiae Plantarum*, 16, 185-191.
3. Ali, M. B., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2007). Methyl jasmonat and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolic in *Panax ginseng* Bioreactor root suspension culture. *Journal Molecules*, 12, 607-621.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Azarpur, E., Motamed, K. M. & Bozorgi, H. R. (2013). Stevia agronomy and extension (Botany, cultivation, maintenance, harvesting, chemistry, industry and processing). (1st ed). Azad University of Lahijan. (in Farsi)
5. Abd Elhamid, E. M., Sadak, M. S. & Tawfik, M. M. (2016). Physiological response of Fenugreek plant to the application of proline under different water regimes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(3), 580-594.
6. Barker, D. J., Sullivan, C. Y. & Moser, L. E. (1993). Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity and proline in five forage grasses. *Agronomy Journal*, 85, 270-275.
7. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
8. Boukraâ, D., Belabid, L., Benabdelli, K. & Bennabi, F. (2015). Implication of salicylic acid in chickpea growth to salt resistance. *Advances in Environmental Biology*, 9(27), 270-277.
9. Dragovi-Uzelac, V., Savi, Z., Brala, A., Levaj, B., BursaKovaevi, D. & Bisko, A. (2010). Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the northwest Croatia. *Food Technology and Biotechnol*ogy, 48(2), 214-221.
10. El-Tayeb, M. A. (2005). Response of Barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45(6), 215-255.
11. Gamal El-Din, K. M. & Abd El-Wahed, M. S. A. (2005). Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 7, 376-380.
12. Gharib, F. A. L. (2006). Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and majoram. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4, 485-492.
13. Ghasemi Pirbaloti, A., Mousavi Haris, S. A., Tyrksh, F. & Hamedi, B. (2012). Effect of Jasmonic acid and Salicylic acid on phenolic compounds and flavonoids of flower extract in *Calendula officinalis*. *Journal of Herbal Drugs*, 3(3), 175-180. (in Farsi)
14. Ghasemi, S. & Ghasemi-Golezani, K. (2015). Assessment of leaf number and chlorophyll content of *Carum copticom* in response to salicylic acid and abscisic acid. *International Conference on Sustainable Development, Strategies and Challenges with a Focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism.* Tabriz, Iran. (in Farsi)
15. Hirose, T., Ackerly, D. D., Traw, M. B., Ramseier, D. & Bazzaz, F. A. (1997). CO_2 elevation, canopy photosynthesis and optimal leaf area index. *Ecology*, 78, 2339-50.
16. Khan, W., Prithiviraj, B. & Smith, D. (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Plant Physiology*, 160, 485-92.
17. Khan, N. A., Syeed, S., Masood, A., Nazar, R. & Iqbal, N. (2010). Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *International Journal of Plant Biology*, 1(5), 1-8.
18. Khodary, S. F. A. (2004). Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, 5-8.
19. Kaydan, D., Yagmur, M. & Okut, N. (2007). Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarim Bilimleri Dergisi*, 13(2), 114-119.
20. Khandaker, L., Masum Akond, A. S. M .G. & Oba, S. (2011). Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (*amaranthus tricolor* L.).*Unauthenticated*, 74, 77-86.
21. Kahlaoui, B., Hachicha, M., Teixeira, J., Misle, E., Fidalgo, F. & Hanchi, B. (2013). Response of two tomato cultivars to field-applied proline and salt stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 9, 357-365.
22. Mahtabi, G., Fazeli Fard, M. H. & Majnooni, A. (2013). Climate classification of Zanjan state. (2013). *First National Conference on Climatology of Iran*. Kerman Graduate University of Advanced Technology. (in Farsi)
23. Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. & Dietz, k. J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*, 132(1), 273 -281.
24. Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-577.
25. El Far, M. M. & Taie, H. A. (2009). Antioxidant activities, total anthocyanins, phenolic and flavonoids contents of some sweet potato genotypes under Stress of different concentrations of sucrose and sorbitol. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3609-3616.
26. Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E. & Zenk, M. H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7490-7494.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Messedi, D., Farhani, F., Ben-Hamid, K., Trablsi, N., Ksouri, R., Ather, H. U. R. & Abdelly, C. (2016). Highlighting the mechanisms by which proline can confer tolerance to salt stress in *Cakile maritima*. *Pakistan Journal of Botany*, 48(2), 417-427.
28. Pacheco, A. C., Silva Cabral, C. D., Silva Fermino, E. S. D. & Aleman, C. C. (2013). Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *Journal of Medicinal Plant Research*, 7(42), 3158-3163.
29. Pandey, M. & Chikara, S. K. (2014). *In vitro* Regeneration and effect of abiotic stress on physiological and biochemical content of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni). *Journal of Plant Science Research*, 1(3), 113.
30. Qinghua, S. H. & Zhujun, Z. (2008). Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 317-326.
31. Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43,439-463.
32. Ramesh, K., Singh, V. & Megeji, N. W. (2006). Cultivation of *Stevia rebaudiana* (BERT), a comprehensive review. *Advances in Agronomy*, 89, 137-177.
33. Ryahy, N., Farahbakhsh, H. & Pasandy Pour, A. (2011). Foliar application of proline, glycine betaine, salicylic acid, ascorbic acid mitigate the drought effects on sorghum, *11th Congress on Irrigation and evaporation reduction. Shahid Bahonar University of Kerman*, Iran. (in Farsi)
34. Rashad EL-Sherbeny, M. & Teixeira da Silva, J. A. (2013). Foliar treatment with proline and tyrosine effect the growth and yield of beetroot and some pigments in beetroot leaves. *Journal of Horticultural Research*, 21(2), 95-99.
35. Ruiz Ruiz, J. C., Moguel Ordonez, Y. B., Basto, A. M. & Segura Campos, M. R. (2015). Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutricion Hospitalaria*, 31(3), 1163-1170.
36. Shukla, S., Mehta, A. & Bajpai, V. K. (2009). *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2338-2343.
37. Shbani, L. & Ehsanpour, A. (2009). Induced antioxidant enzymes, phenolic compounds and flavonoids under in vitro cultivation of *Glycrrihiza glabra*. *Biological Science Promotion*, 22(4), 691-703. (in Farsi)
38. Singh, S. D. & Rao, G. P. (2005). Stevia: The herbal sugar of the 21st century. *Sugar Technology*, 7, 17-24.
39. Szabados, L. & Savoure, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 82-97.
40. Sadeghipour, O. & Aghaei, P. (2012). Impact of exogenous salicylic acid application on some traits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under water stress conditions. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(11), 685-690.
41. Tadhani, M. B., Patel, V. H. & Subhash, R. (2007). *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 323-329.
42. Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of Stevia. *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Canadian Journal Plant Science*, 91, 1-27.
43. Yousry, M. M., El-Mesirry, D. S. & Shama, M. A. (2015). Effect of Proline on Resistance of Potato Crop (*Solanum tuberosum* L.) for the Negative Effects of Water Irrigation Salinity. *Current Science International*, 4(1), 172-177.
44. Zawoznik, M. S., Gropp, M. D., Tomaro, M. & Benavides, M. P. (2007). Endogenous salicylic acid potentiates cadmium- induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Plant Science*, 173, 190-197.
45. Zhang, C. S., Lu, Q. & Verma, D. P. S. (1997). Characterization of Δ-1-pyrroline-5-carboxylatesynthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Science*, 129, 81-89.

www.SID.ir