



## اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز و ترکیبات فنلی در استویا

سیده فاطمه رسولی<sup>۱\*</sup> - منوچهر قلی پور<sup>۲</sup> - کامبیز جهان‌بین<sup>۳</sup> - حمیدرضا اصغری<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۳

### چکیده

اسید سالیسیلیک و جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود بسیار مورد توجه می‌باشند. محلول‌پاشی با این ترکیبات باعث القا تنش کاذب و برانگیخته شدن پاسخ‌های دفاعی در گیاه شده و بدنبال آن تولید متابولیت ثانویه افزایش می‌یابد. این آزمایش به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر پراکسید هیدروژن، هدایت الکتریکی، فعالیت آنزیم‌های GST، GPX، فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز (PAL)، غلظت فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین در استویا در شرایط مزرعه‌ای انجام شد. آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک و ترکیب تیماری از هر دوی آنها بود. محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک و جاسمونیک غلظت پراکسید هیدروژن را در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد؛ بیشترین غلظت پراکسید هیدروژن در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با غلظت ۵/۴۶ میکرومول در بافت تر مشاهده شد؛ گیاه در پاسخ به محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPX و GST را در اغلب تیمارها افزایش داد؛ بیشترین میزان فعالیت آنزیم GPX در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک و تیمار ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۰/۱۴۴ و بیشترین میزان فعالیت آنزیم GST در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۰/۳۵ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد؛ به دنبال افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی میزان هدایت الکتریکی در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) کمتر از شاهد بود؛ کمترین میزان هدایت الکتریکی در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۴۰ درصد مشاهده شد. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک فعالیت آنزیم PAL را در تیمارهای ترکیبی بیشتر افزایش داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. بیشترین میزان غلظت فنل کل و فلاونوئید در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک غلظت آنتوسیانین را در تمام تیمارهای ترکیبی افزایش داد. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک توانست غلظت ترکیبات فلاونوئیدی را به عنوان یکی از ترکیبات مهم استویا افزایش دهد. نکته قابل توجه آن است که در بیشتر صفات، تیمارهای ترکیبی اسید جاسمونیک و سالیسیلیک تأثیر بیشتری در افزایش فعالیت آنزیم PAL، غلظت فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین داشتند.

واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن، فلاونوئید، GPX، GST

### مقدمه

گیاهانی است که در دهه‌های اخیر به دلیل وجود ترکیبات شیرین‌کننده‌ای که در این گیاه وجود دارد، از نظر دارویی و اقتصادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گلیکوزیدهای استویا ۳۵۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز هستند (۱۲). این ترکیبات طبیعی از شیرین‌کننده‌های طبیعی بدون کالری می‌باشند که با توجه به مشکلات روزافزون ناشی از دیابت، چاقی، سکنه‌های قلبی و مغزی استویا می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند باشد (۱).

یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه

*Stevia rebaudiana bertonii* گیاهی علفی، چند ساله از خانواده Asteraceae و بومی پاراگوئه می‌باشد. استویا یکی از

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری اکولوژی گیاهان زراعی و دانشیاران گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود  
( \* - نویسنده مسئول: Email: f.rasouli86@gmail.com )

۳- دانشیار گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود  
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i4.81571

جمله SOD در بیشتر تیمارها افزایش یافت. میزان ترکیبات غیرآنزیمی از جمله فنل کل، فلاونوید، و آنتوسیانین نیز در اغلب تیمارهای سرخارگل افزایش یافت. این ترکیبات که ترکیباتی فنیل پروپانوییدی می‌باشند به موازات افزایش آنزیم PAL افزایش یافتند (۲۷). بنابراین این پژوهش به منظور بررسی اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، PAL و تغییرات ترکیبات فنلی در استویا در شرایط بدون تنش، به صورت مزرعه‌ای انجام شد.

### مواد و روش‌ها

**مشخصات خاک محل اجرای آزمایش:** این آزمایش در یک باغ در شهرستان امل در سال ۱۳۹۶ اجرا شد. قبل از انجام آزمایش از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه نمونه‌برداری شده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در آزمایشگاه تعیین گردید. بر این اساس خاک مزرعه دارای بافت خاک سیلتی‌رسی، کربن آلی خاک ۲/۱۶ درصد، فسفر قابل جذب ۱۳/۵۴ پی‌پی‌ام، پتاسیم قابل جذب ۲۰۰ پی‌پی‌ام، نیتروژن کل ۰/۱۲ درصد،  $pH=7$  و  $EC=0.7$  دسی‌زیمنس بر متر بود.

**اجرای طرح آزمایشی:** آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول پاشی با اسید جاسمونیک (Sigma Jasmonic acid, 7-92-77026)، اسید سالیسیلیک اسید (Merck Ssalicylic acid, K19363231) و محلول پاشی هر دوی آن‌ها بعد از استقرار گیاه، شروع و در سه نوبت تکرار گردید.

تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱: شاهد، ۲: 5ja (۵ میکرومولار اسید جاسمونیک)، ۳: 20ja (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک)، ۴: 50ja (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک)، ۵: 0.5 sa (۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۶: 1sa (۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۷: 5ja-0.5sa (۵ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۸: 5ja-1sa (۵ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۹: 20ja-0.5 sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۱۰: 20ja-1sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۱۱: 50ja-0.5sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک) و ۱۲: 50ja-1sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک). تیمارهای آزمایشی در جدول یک نشان داده شده است.

استفاده از الیسیتورها است. الیسیتورها مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین‌ها (phytoalexin) را در گیاه القا کنند (۳۱). استفاده از اسید سالیسیلیک (۲۵، ۲۶ و ۳۱) و جاسمونات‌ها (الیسیتور شیمیایی) به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا، برانگیخته شدن پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه بسیار مورد توجه می‌باشند (۳۱ و ۳۲). این مولکول‌های پیام‌رسان در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القا کننده آنزیم‌های خاص کاتالیزکننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مثل پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند (۳۱). مطالعات متعددی بر نقش این دو هورمون بر میزان میزان متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است، در گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) تحت اثر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده است که تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنلی و فلاونوئید تحت تأثیر نسبت‌های مختلف متحرک قرار داشته و نسبت به هم همبستگی نشان دادند و بیان گر نقش PAL در تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی بود (۲۸). تیمار با متیل جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت در گیاهچه‌های ۴ برگی سبب افزایش ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL و تجمع اسیدهای فنولیک گردید (۳). متیل جاسمونات در میوه‌های گوا (*Psidium guajava*) باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL شد، اما مقدار فنل کل را تحت تأثیر قرار نداده بود (۳۱). افزایش در غلظت فلاونوئیدها از کالوس گیاه *Thevetia Peruviana* در پاسخ به ترکیبی از ۱۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک گزارش شده است (۲۱). تحریک فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنلی هشت ساعت بعد از اعمال با اسید سالیسیلیک بر بافت سلولی گیاه *Salvia miltiorrhiza* گزارش شده است، همچنین گزارش شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، POD و CAT بعد از اعمال تیمار با اسید سالیسیلیک به شدت بهبود یافت، اثر تحریک‌کنندگی اسید سالیسیلیک بر تجمع ترکیبات فنلی در غلظت 5 mg/L - ۲۲ - ۶/۲۵ بود، همچنین بین فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنلی همبستگی وجود داشت (۱۰). در یک پژوهش به منظور بررسی اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر آنزیم‌های محرک تنش اکسیداتیو، دفاعی و برخی مواد موثره، عملکرد و اجرای عملکرد در سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای گزارش شده است که محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر صفات اندازه‌گیری شده با اطمینان ۹۹ درصد اثرگذار بوده است. محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز را در بیشتر تیمارها افزایش داد. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک

Table 1. Experimental treatments of Jasmonic and salicylic acid foliar application.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	5ja	20ja	50ja	0.5sa	1sa	5ja-0.5sa	5ja-1sa	20ja-0.5sa	20ja-1sa	50ja-0.5sa	50ja-1sa

حجم ۳ میلی‌لیتر شامل ۲/۷ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH = ۶/۸، گایاکول ۰/۶ مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر)، آب اکسیژنه ۱/۲ مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، بود. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. بلانک فاقد آب اکسیژنه بود. افزایش جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر در ۱ دقیقه اول بعد از افزودن آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میکرومول تراگایاکول تشکیل شده ضریب خاموشی (ε) برابر با ۲۶/۶ m M<sup>-1</sup>Cm<sup>-1</sup> در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

#### استخراج عصاره‌ی گلوکوتایون S – ترانسفراز (GST): جهت

استخراج عصاره آنزیم از روش (۴) همراه با تغییراتی استفاده شد.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GST:** اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به روش (۶) صورت گرفت. مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۵ (۸۷۰ میکرولیتر)، گلوکوتایون احیا شده (GSH) ۳/۶ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر)، ۱-کلرو، ۲ و ۴-دی نیترو بنزن یک میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر) و عصاره بود (۳۰ میکرولیتر) بود. افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و ضریب خاموشی (ε) برابر ۹/۶ m M<sup>-1</sup>Cm<sup>-1</sup> با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. از فعالیت آنزیم در ۱ دقیقه اول برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید.

#### استخراج و اندازه‌گیری آنزیم PAL: سنجش آنزیم PAL بر

طبق روش (۱۷) انجام شد. ۰/۰۵ گرم از بافت تر در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۸ pH) هم‌وزن گردید. سپس هم‌وزن در دمای ۴ °C، سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر فنیل‌آلانیل ۰/۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم با اسیدیته ۸ و ۶۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ °C که اوج فعالیت PAL است قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl ۶ مولار برای غیرفعال کردن PAL به مخلوط اضافه شد. شست و شوی نمونه با ۳ میلی‌لیتر اتیل استات انجام گردید. سپس نمونه در جریان هوا تبخیر و به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد اسید سینامیک تعیین شد. یک واحد از PAL برابر با یک میکروگرم از اسید سینامیک تولید شده در ساعت است.

**مراقبت زراعی:** در این مطالعه، نشا چهل روزه گیاه استویا (*Stevia rebaudiana (Bertoni)*) از شرکت گل‌ساران شمال تهیه شد. عملیات تهیه‌ی زمین شامل یک شخم عمیق، دو دیسک عمود بر هم و کشت به صورت ردیفی انجام شد، فاصله‌ی ردیف‌ها و بوته‌ها از هم ۳۰ سانتی‌متر بود. هر واحد آزمایشی به ابعاد ۲×۳ متر دارای ۱۰ خط کاشت و تراکم ۱۱ بوته در متر مربع بود. نشاها ۱۵ اردیبهشت به زمین اصلی منتقل شد و آبیاری هفته‌ای یکبار صورت می‌گرفت.

**اعمال تیمار و نمونه‌برداری:** برای محلول‌سازی اسید جاسمونیک با سمپلر و اسید سالیسیلیک پس از وزن کردن در دو میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ حل شد و سپس با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانیده شد. در گیاه شاهد نیز محلول‌پاشی با آب مقطر به همراه دو میلی‌لیتر الکل صورت گرفت. یک هفته بعد از پایان محلول‌پاشی آخر، نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی صورت گرفت، نمونه‌برداری از آخرین برگ کاملاً توسعه یافته فوقانی صورت گرفت. اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد.

#### استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: استخراج و

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن با استفاده از رنگ‌سنجی و بر طبق روش (۱۳) انجام شد.

#### اندازه‌گیری نفوذپذیری غشاء: اندازه‌گیری نفوذپذیری غشاء

برگ بر طبق روش (۳۳) انجام شد. ۰/۲ گرم وزن تر برگ (از قسمت تحتانی) از هر تکرار را به دقت شسته و سپس به تکه‌های یک سانتی‌متری بریده و درون لوله‌های فآلکون به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ °C در حمام آب گرم قرار گرفتند. بعد از سه ساعت، هدایت الکتریکی محلول‌ها با استفاده از هدایت سنج الکتریکی مدل (PT-20) اندازه‌گیری شد. سپس لوله‌های فآلکون در دمای ۱۰۰ °C در حمام آب گرم به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. آنگاه برای بار دوم هدایت الکتریکی آنها پس از سرد شدن و رسیدن به دمای اتاق اندازه‌گیری شد. نشت الکترولیتی محلول‌ها با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\frac{C_1}{C_2} \times 100 \text{ (درصد)} = EC$$

که در این فرمول C<sub>1</sub> و C<sub>2</sub> به ترتیب هدایت الکتریکی محلول قبل و بعد از جوش می‌باشد.

#### گایاکول پراکسیداز (GPX): استخراج عصاره، به روش (۱۶) و

سنجش فعالیت آنزیم از روش (۵) استفاده شد. مخلوط واکنش به

دور در دقیقه سانتیفریوژ شد، پس از سانتیفریوژ به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای °C ۸۰ قرار گرفت، سپس شدت جذب در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید.

**سنجش آنتوسیانین:** اندازه گیری میزان آنتوسیانین با استفاده از روش (۲۳) انجام شد.

داده‌های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و مقایسه‌ی میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

### نتایج و بحث

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر صفات پراکسید هیدروژن، هدایت الکتریکی GPX، GST، PAL، فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین در استویا اثر معنی داری در سطح یک درصد داشت (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فنیل‌آلانیل‌آمونیا لیا ز و ترکیبات فنلی در استویا تحت تاثیر محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و اسید جاسمونیک

**Table 2. Analysis of variance of antioxidant enzymes, PAL and phenolic compounds affected salicylic and jasmonic acid on stevia.**

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	Mean square							
		پراکسید هیدروژن H2O2	هدایت الکتریکی EC	گایاکول پراکسیداز GPX	گلوکاتایون-S- ترانسفراز GST	فنیل-آلانیل-آمونیا لیا ز PAL	فنل کل Total phenol	فلاونوئید Flavonoid	آنتوسیانین Anthocyanin
Block	2	0.0377 <sup>n.s</sup>	12.5 <sup>n.s</sup>	0.00003 <sup>n.s</sup>	0.00003 <sup>n.s</sup>	7739 <sup>ns</sup>	72.17 <sup>n.s</sup>	16.2 <sup>n.s</sup>	0.0034 <sup>n.s</sup>
محلول پاشی Foliar application	11	2.581 <sup>**</sup>	635.86 <sup>**</sup>	0.003 <sup>**</sup>	0.004 <sup>**</sup>	87084.5 <sup>**</sup>	3505.7 <sup>**</sup>	1448 <sup>**</sup>	0.89 <sup>**</sup>
خطا Error	22	0.281	6.45	0.0003	0.001	2514	154.4	13.1	0.04
CV (%)		5.2	3.24	4.04	4.66	6.4	4.8	5	9.7

\*\* Significant at 1% probability level and n.s not significant

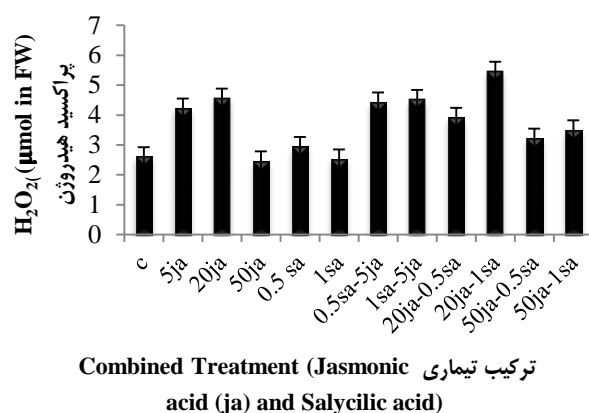
\*\* معنی داری در سطح ۱ درصد و n.s عدم معنی داری

حرکت کرده، موجب القای تنش کاذب در گیاه، بیان و فعالیت یک سری از ژن‌های دفاعی می‌گردند (۸ و ۷). در این بررسی نیز محلول پاشی سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در اغلب تیمارها (۹ تیمار) نسبت به شاهد شد.

**استخراج و اندازه گیری فنل کل:** از عصاره متانولی استخراج شده بر اساس روش (۱۷) برای اندازه گیری فنل استفاده گردید. جهت سنجش فعالیت آنزیم، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به همراه ۳ میلی لیتر معرف فولین سیوکاتیو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰) درون لوله‌ی فالكون ریخته شد و در بن ماری با دمای °C ۲۲ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس به آن ۳ میلی لیتر محلول بیکربنات سدیم ۶٪ افزوده و مجدداً در بن ماری با دمای °C ۲۲ به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. همچنین بلانک نیز مانند نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به جای عصاره، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر به لوله‌ی فالكون اضافه گردید. و با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک مقدار فنل کل بر اساس میلی گرم اسید گالیک در هر عصاره تعیین شد.

**سنجش فلاونوئیدها:** سنجش فلاونوئیدها بر طبق روش (۱۸) انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ با ۳ میلی لیتر اتانول اسیدی به نسبت حجمی ۹۹ میلی لیتر اتانول و ۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال هموزن گردیده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰

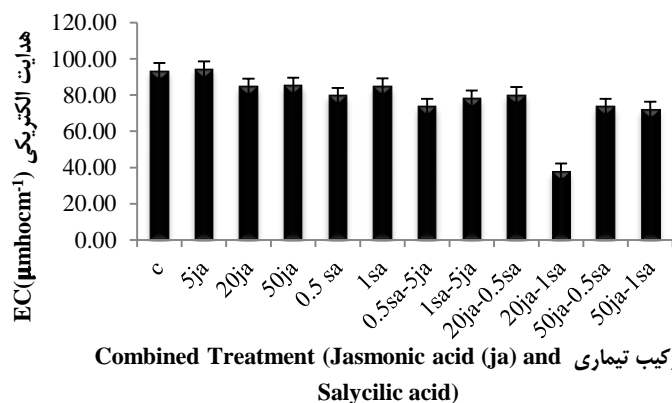
**پراکسید هیدروژن:** روند تغییرات پراکسید هیدروژن تحت اثر محلول پاشی در شکل ۱ ارائه شده است. محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در ۹ تیمار نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان غلظت پراکسید هیدروژن در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - یک میلی مولار اسید سالیسیلیک مشاهده گردید که غلظت آن ۵/۴۶ میکرومول در بافت تر بود. وقتی مولکول‌های پیام‌رسان اسید جاسمونیک و سالیسیلیک به صورت خارجی بکار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه



شکل ۱- اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان پراکسید هیدروژن برگ استویا، LSD=۰/۳۲  
 Figure 1- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on hydrogen peroxide concentration in stevia leaf, LSD=0.32.

شاهد سبب افزایش میزان هدایت الکتریکی نگردید که می‌توان به افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی (شکل‌های ۳، ۴، ۶ و ۸) که پالاینده گونه‌های فعال اکسیژن هستند نسبت داد؛ فعالیت آنها مانع از تولید و انباشتگی رادیکال‌های آزاد و خسارت به اسیدهای چرب غیراشباع غشاهای سلولی گردید. در نهایت این تغییرات مانع از اختلال در عملکرد غشاء، کاهش ویسکوزیته، نفوذپذیری و نشت مواد از غشاء سلول گردید.

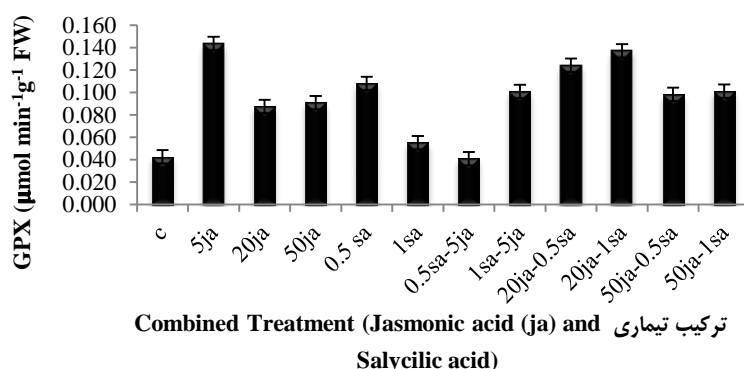
**هدایت الکتریکی:** هدایت الکتریکی شاخصی از پایداری غشاهای می‌باشد؛ همان‌طور که نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان می‌دهد بیشتر تیمارهای محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک (۱۰ تیمار) میزان هدایت الکتریکی کمتری نسبت به شاهد داشته‌اند یا به عبارت دیگر از پایداری غشای بیشتری نسبت به شاهد برخوردار بوده‌اند (شکل ۲). افزایش میزان پراکسید هیدروژن در اغلب تیمارها نسبت به



شکل ۲- اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر هدایت الکتریکی برگ استویا، LSD=۴/۳  
 Figure 2- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on electrical leakage in stevia leaf, LSD=4.3.

فعالیت آنزیم GPX در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) گردیده است (۲۲). تیمار با متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار در گیاه جنسینگ (*Saponins Triterpenoid*) فعالیت آنزیم GPX را در روز سوم، پنجم و هفتم افزایش داد و در روز نهم به اوج فعالیت رسید (۳۲).

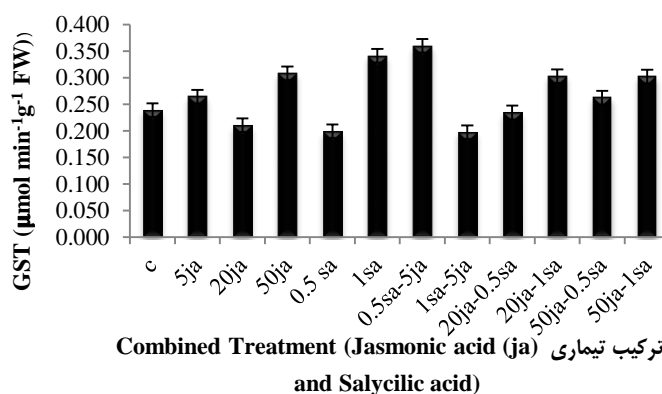
**فعالیت آنزیم GPX:** گیاه در جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی خود از جمله فعالیت آنزیم GPX را در اغلب تیمارها (۱۰ تیمار) افزایش داد (شکل ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک، ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک-۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۰/۱۴۴ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. گزارش شده است که متیل جاسمونات باعث افزایش



شکل ۳- اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم GPX برگ استویا، LSD= ۰/۰۰۶  
 Figure 3- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on GPX enzyme activity in stevia leaf, LSD=0.006

آنتوسیانین و سینامیک اسید ایفا می کند. رنگدانه های آنتوسیانین در سیتوپلاسم ساخته می شوند و در واکوئول جای می گیرد. فعالیت B Z 2- سبب انتقال Cyanidin-3-glucoside به واکوئل می گردند، جایی که آنتوسیانین به رنگ قرمز یا بنفش دیده می شود. B Z 2- (Bronze 2) نوعی از GST می باشد که سبب تشکیل ترکیبات GSH-آنتوسیانین می گردند که به این فرم اجازه ی انتقال به واکوئل با پمپ گلوکوتایون را می گیرد، افزایش فعالیت آنزیم GST می تواند سبب افزایش برخی از متابولیت های ثانویه گردند (۲۰ و ۲۴).

**فعالیت آنزیم GST:** شکل ۴ مقایسه ی میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم GST را تحت اثر محلول پاشی نشان می دهد. محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم GST در ۷ تیمار بیشتر از شاهد شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۰/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک و ۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۰/۳۵ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر و در تیمار شاهد ۰/۲۴ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بود. GST گیاهی نقش مهمی را در سنتز متابولیت های ثانویه نظیر



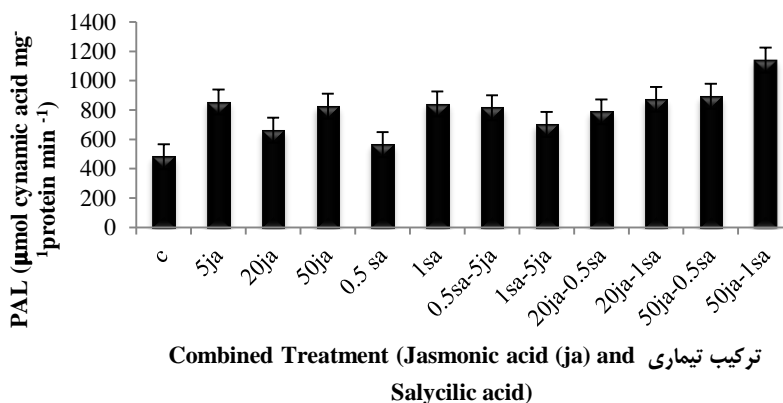
شکل ۴- اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم G-S-T برگ استویا، LSD= ۰/۰۱۳  
 Figure 4- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on G-S-T enzyme activity in stevia leaf, LSD=0.013

فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت و معنی داری با میزان پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم GST داشت (داده ها نشان داده نشد)؛ آنزیم PAL آغازگر مسیر فنیل پروپانوییدی می باشد که L- فنیل آلانین را با دامیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می کند (۲ و ۹). افزایش فعالیت آنزیم PAL که اولین آنزیم مسیر

**فعالیت آنزیم PAL:** محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) نسبت به شاهد گردید (شکل ۵)، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ترکیبی ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۱۱۴۰ میکرومول سینامیک اسید بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه حاصل گردید.

عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان نیز در نظر گرفته شود، زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (۲۸).

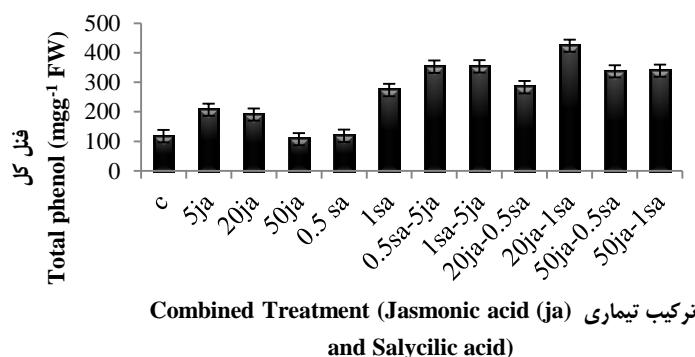
بیوستنزی ترکیبات فنلی است در واکنش به الیستورها در بررسی‌های (۲، ۹، ۲۸ و ۳۲) گزارش شده است. فعالیت آنزیم PAL حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است. آنزیم PAL می‌تواند به



شکل ۵- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم PAL برگ استویا، LSD= ۸۴/۹  
 Figure 5- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on PAL enzyme activity in stevia leaf, LSD=84.9.

و افزایش فعالیت این آنزیم نسبت داده اند از آن‌جا که این آنزیم یک آنزیم کلیدی در بیوستنزی ترکیبات فنلی می‌باشد (۷، ۲۸ و ۳۲)، به نظر می‌رسد که در تحقیق حاضر نیز افزایش فعالیت این آنزیم یکی از دلایل افزایش مقدار ترکیبات فنلی در گیاه استویا باشد. استویا دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد قند خون و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد. گزارش شده است که این خواص به سبب حضور ترکیبات فنلی در استویا می‌باشد که دارای خاصیت ریایش و پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۴). محققین وجود یک رابطه مثبت بین کاربرد خارجی متیل جاسمونات و سنتز ترکیب‌های فنلی، را به عنوان بخشی از واکنش دفاعی گیاه گزارش نمودند (۱۴).

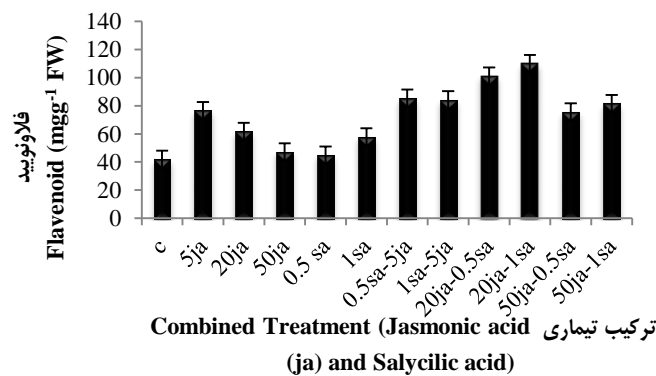
**فنل کل:** محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت فنل کل در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد شد، نکته حائز اهمیت آن است که میزان افزایش فنل کل بیشتر در تیمارهای ترکیبی نسبت به استفاده‌ی جداگانه آنها مشاهده گردید (شکل ۶)؛ بیشترین میزان فنل کل نیز در تیمار ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۴۲۳/۷ میلی‌گرم بر گرم بافت تر مشاهده گردید. بین تغییرات PAL و فنل کل همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح پنج درصد مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشد). کاربرد متیل جاسمونات مقدار ترکیبات فنلی را در سیب‌زمینی، مارچوبه و لوبیا سبز افزایش داده است (۳۲ و ۱۹). محققین علت افزایش ترکیبات فنلی در تیمار با متیل جاسمونات را اثر این ماده بر فعالیت آنزیم PAL



شکل ۶- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل برگ استویا، LSD= ۲۱  
 Figure 6. The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application effect on total phenol content in stevia leaf, LSD=21.

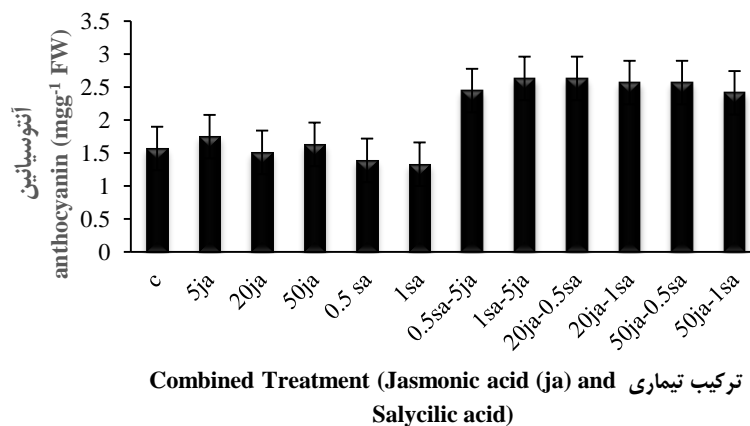
پروتون دهنده فعالیت می کنند (۲۹ و ۳۰). خواص آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها به اثر بازدارندگی آنها در تنفس میتوکندریایی بر می گردد (۲۹). ایزوفلاونوئیدها (ایزوفلاون ها) فعالیت ضد میکروبی دارند. ایزوفلاونوئیدها به خاطر نقش فیتوالکسینی شان به خوبی شناخته شده اند، فیتوالکسین ها ترکیبات ضد میکروبی هستند که در پاسخ به آلودگی های باکتریایی و قارچی ایجاد می شوند، این ترکیبات گسترش عوامل بیماری زای مهاجم را محدود می کنند. از این رو دارای ارزش دارویی نیز می باشند (۱۳).

**روند تغییرات فلاونوئید:** محلول پاشی سبب افزایش غلظت فلاونوئید در بیشتر تیمارها (۹ تیمار) نسبت به شاهد گردید (شکل ۷). بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک با میانگین های ۱۱۰ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید. فلاونوئیدها به دلیل نقش آنتی اکسیدانی خود به طور مستقیم با وارد شدن به واکنش های احیایی و به طور غیرمستقیم به وسیله کی لیت کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می شوند و مانند بسیاری از پلی فنل های دیگر جمع کننده ی رادیکال های آزاد هستند، زیرا به عنوان گروه های قوی دهنده ی الکترون و



شکل ۷- اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید برگ استویا، LSD= ۶/۱۲

Figure 7- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on flavonoid concentration in stevia leaf, LSD=6.12.



شکل ۸- اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان آنتوسیانین برگ استویا، LSD= ۰/۳۳

Figure 8- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on anthocyanin concentration in stevia leaf, LSD=0.33.

ترکیبی گردید. آنتوسیانین ها (فلاونوئیدهای رنگی)، گلیکوزیدهایی هستند که در موقعیت کربن شماره ۳ خود و در برخی مواقع سایر موقعیت ها واجد قند هستند (۳۱). آنتوسیانین ها مهم ترین گروه از

**روند تغییرات آنتوسیانین:** شکل ۸ روند تغییرات آنتوسیانین را تحت اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می دهد محلول پاشی سبب افزایش غلظت آنتوسیانین در همه ی تیمارهای



آنتوسیانین در همه‌ی تیمارهای ترکیبی مشاهده گردید و با افزایش فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان دادند (داده‌ها نشان داده نشد). استویا دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد قند خون و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد. گزارش شده است که این خواص به سبب حضور ترکیبات فنلی در استویا می‌باشد که دارای خاصیت ربایش و پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد. بنابراین افزایش ترکیبات فنلی تحت تأثیر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در گیاه استویا مفید می‌باشد.

رنگدانه‌های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که در حفاظت نوری نقش دارند. افزایش میزان آنتوسیانین در شرایط تنش در *Begonia Semperflorens* گزارش شده است (۳۴). این افزایش به علت نقش حفاظت نوری آنتوسیانین به وسیله حذف مستقیم ROS در طول تنش اکسیداتیو می‌باشد (۳۴).

### نتیجه‌گیری کلی

بیشترین میزان فنل کل و فلاونوئید در تیمار ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و

### منابع

- 1-Ashok Kumar F., Yadav S., Singh D., Dhyan P., and Ahuja S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Plant Science Journal, 91: 1-27.
- 2-Bagal U.R., Leebens mack J.H., Walter Lorenz W., and Dean J.F.D. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. BMC Genoms, 13: (3) 1471-2164.
- 3-Bi H.H., Zeng R.S., Su L.M., An M., and Luo S.M., 2007. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. Journal of Chemical Ecology – Springer, 33(5): 1089-1103 -
- 4- Carlberg I., and Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. Methode Enzymol, 113: 484-490.
- 5- Chance B., and Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol, 11: 764-755.
- 6-Carmanol F., Sinet P.M., Rapin J., and Jerome H. 1981. Glutathione S-transferase of humen red blood cells assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: iperbillirubinemia and impaired renal function. Clinica chimica Acta Journal, 117 (3): 209-217.
- 7- Chan Z., and Tian S. 2006. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizing enzyme and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry. Postharvest Biology, Technology, 39: 314-320.
- 8-Chen J., Cheng Z., and Zhong S. 2007. Effect of exogenous salicylic acid on growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress. Journal of Environment Science, 19: 44-49.
- 9-Divya P., Puthusseri B., and Neelwarne B. 2013. The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compound in foliage of Coriander. Food ScienceTechnology, 56: 101-110
- 10 -Dong J., Wan G., and Liang Z. 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology, 148: 99-104
- 11-Goyal R., Samsher K., and Goyal S.K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 61 (1): 1-10.
- 12-Gupta P., Sharma S., and Saxena S. 2015. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. Applied Biochemistry and Biotechnology- Springer, 176(3): 863-74.
- 13- Haji\_Mehdipour H., Khanavi M., Shkrchy M., Abadi Z., and Pirali-Hamadani M. 2008. The investigation of best method for phenolic compound extraction in *Echinacea purpurea*. Journal of Medicinal Plant, 8: 145-152.
- 14- Heredia J.B., and Cisneros-Zevallos L. 2009. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on PAL activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. Post Biology Technology, 51(2): 242-249.
- 15- Jana S., and Choudhuri M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Botany, 12: 342-354.
- 16- Kar M., and Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.
- 17-Kovacik J., and Bklejdus B. 2012. Tissue and method specificities of phenylalanine ammonia-lyase assay. Plant Physiology Journal, 169: 1317-1320
- 18-Krizek D.T., Britz S.J., and Mirecki R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiology Plantarum, 103: 1-7.
- 19-Kumari G. J., Reddy A.M., Naik S. T., Kumar S.G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P.C., and Sudhakar C. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase enzymes in peanut seedlings. Biologia Plantarum, 50: 219-226

- 20- Marrs K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferase in plants. *Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, 47:127-58
- 21-Mendoza D., Cuaspud O., Ariasa J.P., Ruiz O., and Arias M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, (19): 1-19
- 20-Mikkelsen M. D., Petersen B. L., Glawischnig E., Jensen A. B., Andreasson E., and Halkier B. A. 2003. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiology Journal*, 131(1): 298-308.
- 23- Mita S., Murano N., Akaike M., and Nakamura K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin those are inducible by sugars. *Plant Journal*, 11:841-851.
- 24- Moons A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Plant Hormones*; 72: 155-202.
- 25- Popova L., Ananieva E., Hristova V., Christov K., Georgieva K., Alexieva V., and Stoinova Z.H. 2003. Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress *Bulg. Journal of Plant Physiology*, 13: 133-152.
- 26- Rao M.V., Paliyath G., Ormord D.P., and Watkins C.B. 1997. Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizing enzymes Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 115: 137-149.
- 27-Rasouli F., Gholipour M., Jahanbin K., and Asghari H.R. 2018. Effect of salicylic acid and jasmonic acid on induction of oxidative stress, increasing resistance and yield of *Echinacea purpurea* L. *Crop Plant Production*, 11(2): 109-122. (In Persian)
- 28-Samadi S., Ghasemnezhad A., and Alizadeh M. 2014. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *Journal of Plant Production Research*, 21: 135-148.
- 29- Sangtarash M.H., Qaderi M.M., Chinnappa C.C., and Reid D.M. 2009b. Carotenoid differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66 (2): 212-219
- 30- Suzuki A., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., and Mittler R. 2011. Respiratory burst toxic diseases: the role in ROS signaling. *Curr Opin. Plant Biology*, 14, 691-699
- 31-Taiz L., and Ziger A. 2006. *Plant Physiology*. 13, pp: 619-6230
- 32-Wasternack C., and Hause B. 2013. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 2013; 111: 1021±1058
- 33- Yan B., Dai Q., Liu X., Huang S.h., and Wang Z. 1996. Flooding induce membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in Corn leaves. *Plant and Soil Journal*, 179:261-268.
- 34- Zhao J.L., Davis C., and Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances Journal – Elsevier*, 23: 283-333.



## Effect of Jasmonic and Salicylic Acid on Antioxidant Enzymes, PAL and Phenolic Compounds in *Stevia rebaudiana bertonii*

F. Rasouli<sup>1\*</sup>-M. Gholipoor<sup>2</sup>-K. Jahanbin<sup>3</sup>- H.R. Asghari<sup>4</sup>

Received: 28-08-2019

Accepted: 04-12-2019

**Introduction:** Salicylic acid and jasmonates (chemical elicitors) are considered as key signaling compounds in induction process, which leads to accumulate of secondary metabolites. External uses of these compounds cause to induce pseudo stress in plants and excites defensive replies in plants, in response to induction of oxidative stress, the plant increases amount of antioxidant genes expression and increase enzymatic activity and non-enzymatic antioxidants concentration (they often have a medicinal aspect).

**Material and methods:** The present study investigated the effects of jasmonic acid and salicylic acid on hydrogen peroxide content, electrical lockage, GPX, GST and PAL activity, total phenol, flavonoid and anthocyanin changing in *Stevia rebaudiana bertonii* under field conditions. The experiment arranged as a randomized complete block design with 12 treatments and three replications in 2015-2016 at Amol city in Mazandaran Province in Iran. Experimental treatments were spraying by different concentration of jasmonic acid, salicylic acid and components of jasmonic acid- salicylic acid. Foliar application started after plant establishment in vegetative phase. Each experimental plot was 2 m× 3 m consisting 10 rows with 30 cm row spaces and seedling transplanted on 15 May. At the end of foliar application, sampling was done for the measuring. Sampling for biochemical analyses from second fully developed leaf was done and freezed in liquid nitrogen, then quickly carried out to laboratory.

**Results and Discussion:** The analysis of variance showed that different concentration of jasmonic acid and salicylic acid and spraying both of them in 7-day intervals appeared to be effective (with 99% confidence) on studied traits (data not shown). Spraying with jasmonic and salicylic acid increased hydrogen peroxide content in 9 treatments compared to the control. The highest amount of hydrogen peroxide content in compounds treatment 20  $\mu\text{M}$  JA -1 mM SA with mean of 5.46  $\mu\text{mol}$  in fresh weight observed. Plant in response to jasmonic and salicylic acid spraying increased GPX activity in 10 treatments and GST activity in 7 treatments compared to the control and follow them electrical lockage in most treatments (10) was lower than control. The highest amount of GPX activity in treatments 5  $\mu\text{M}$ JA and 5  $\mu\text{M}$ JA with average of 0.11  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$  FW observed. The highest amount of GST activity was obtained from treatments of 0.5 mM SA- 5  $\mu\text{M}$  JA and 1 mM SA with average of 0.35  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$  FW. The PAL enzyme activity (the first enzyme in phenyl propanoid compounds biosynthesis pathway) in 10 treatment increased. The highest amount of PAL activity was in compounds treatment of 50  $\mu\text{M}$  JA -1 mM SA with average of 1140  $\mu\text{mol}$  cynamic acid  $\text{mg}^{-1}$  protein  $\text{min}^{-1}$ . The PAL enzyme activity had correlation with hydrogen peroxide concentration and GST activity. The PAL enzyme initiates a phenylpropanoid route that converts L-phenylalanine to trans-cyanamide acid deamination. The PAL enzyme can consider as an antioxidant enzyme because it has the role of depositing oxygen radicals through phenolic compounds. Spraying increased total phenol content in 8 treatments compared to the control. The highest amount of total phenol content was observed in compounds treatment of 20  $\mu\text{M}$  JA -1 mM SA with mean of 423.7  $\text{mgg}^{-1}$  FW. Spraying with jasmonic acid and salicylic acid increased flavonoid concentration in 9 treatments compared to the control. The highest amount of flavonoid content was in treatment of 20  $\mu\text{M}$  JA -1 mM SA with mean of 110  $\text{mgg}^{-1}$  FW. Spraying increased anthocyanin concentration in 6 treatments compared to the control. Anthocyanins are the most important group of natural pigments after chlorophyll that are involved in light protection. The noticeable point is that in most treatment PAL enzyme activity, total phenol, flavonoid and anthocyanin content in compound treatment increased.

**Conclusion:** The highest amount of total phenol and flavonoid content observed in compounds treatment of

1-PhD Educated and Associate Professors, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood

(\*-Corresponding Author Email: f.rasouli86@gmail.com)

3-Associate Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood

20  $\mu\text{M}$  JA -1 mM SA and anthocyanin increased in total compounds treatment and using PAL enzyme activity had correlation and significant effect (data not shown). Stevia has anti-cancer effect, anti-blood glucose effect and anti-cardiovascular effect. This effects for the existence phenolic compounds in stevia such that had the ability to remove ROS, so increasing phenolic component by jasmonic acid and salicylic acid spraying in stevia was useful.

**Keywords:** Flavenoid, GPX, GST, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.