

## اثرات محلول پاشی محرک‌های سالیسیلیک اسید و پرولین بر محتوای گلیکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.)

محسن ثانی خانی\*، عارفه راستگو، عزیزاله خیری و میترا اعلایی

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۲/۱۸)

### چکیده

در این مطالعه به منظور بررسی اثر پرولین و سالیسیلیک اسید بر محتوای گلیکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی گیاه استویا در منطقه زنجان آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل پرولین در سه سطح (صفر، ۱، ۲ میلی‌مولار) و سالیسیلیک اسید در سه سطح (صفر، ۰/۳، ۰/۶ میلی‌مولار) بودند که به صورت محلول پاشی برگ‌ها پس از استقرار نشا در سه مرحله به فاصله ۱۰ روز انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اثر تیمارها بر محتوای گلیکوزیدهای استویول، فنل و فلاونوئید کل معنی‌دار است. تیمار سالیسیلیک اسید بر تمام اجزای گلیکوزیدهای استویول، فنل و فلاونوئید کل تأثیر مثبت داشته و موجب افزایش آنها شد و تیمار پرولین تنها گلیکوزیدهای استویوزاید و ربادیوزاید A، فنل و فلاونوئید کل را افزایش داد. اثرات متقابل تیمارها نیز استویوزاید و ربادیوزاید A، C و فنل کل را افزایش داد. بالاترین میزان گلیکوزیدهای استویوزاید (۶۰/۳۲)، ربادیوزاید A (۲۴/۱۴) و فنل کل (۱۹/۹۴) میلی‌گرم در گرم برگ خشک در تیمار ۱ میلی‌مولار پرولین به همراه ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد و بیشترین میزان فلاونوئید کل (۱۰/۰۲) میلی‌گرم در گرم برگ خشک در تیمار ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید ثبت شد و کمترین مقدار استویوزاید، ربادیوزاید A، فنل و فلاونوئید کل مربوط به تیمار شاهد بود. نتایج به دست آمده می‌توان استنباط نمود که تیمار با پرولین و سالیسیلیک اسید با تأثیر بر فرآیندهای متابولیکی در افزایش تولید گلیکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی استویا مؤثر بود.

کلمات کلیدی: محرک‌ها، استویوزاید، ربادیوزاید A، فنل، فلاونوئید

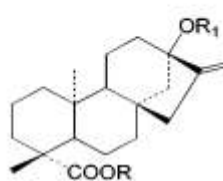
### مقدمه

برخوردار هستند. برگ‌های استویا حاوی گلیکوزیدهای دی‌ترین استویول (استویوزاید و ربادیوزاید A، B، C، D، E و F، دالکوزاید A، استویول بیوزاید و ربوزوزاید) هستند. قدرت شیرین‌کنندگی این ترکیبات ۲۵۰-۴۵۰ برابر ساکارز است. دو گلیکوزید استویوزاید و ربادیوزاید A از اهمیت بیشتری برخوردارند و بیشترین تأثیر را در شیرین‌کنندگی دارند (Yadav et al., 2011).

استویا با نام علمی (*Stevia rebaudiana* Bert.) گیاهی بوته‌ای و چند ساله که به خانواده کاسنی تعلق دارد. این گیاه بومی کشور پاراگوئه است و به طور عمده در منطقه آمامبای پاراگوئه یافت می‌شود. ترکیبات شیمیایی مختلفی در گیاه استویا شناسایی شده است. شناخته‌شده‌ترین و مهم‌ترین این ترکیبات گلیکوزیدهای انت کائورن شیرین مزه است که از ارزش بالایی

\*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: Sani@znu.ac.ir

	R	R <sub>1</sub>
Stevioside	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc
Steviolbioside	H	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc
Rebaudioside A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc   $\beta$
Rebaudioside B	H	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc   $\beta$
Rebaudioside C	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\alpha$ -Rha   $\beta$
Rebaudioside D	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc   $\beta$
Rebaudioside E	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc $\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\beta$ -Glc
Dulcoside A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> - $\alpha$ -Rha



شکل ۱- ساختار شیمیایی مشترک گلیکوزیدهای استویول (Brandle et al., 1998)

فنل‌ها مانند دیگر ترکیبات ثانویه طبیعی به‌طور فعال باعث بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان کاهش شده و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی هستند ( Dragovi-Uzelac, 2010).

در کشت و پرورش استویا عوامل محیطی و زراعی تأثیر بیشتری در مقایسه با عادات رشدی گیاه استویا بر عملکرد و ترکیبات گلیکوزیدی آن دارند (آذرپور و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین عوامل مختلف دیگری از جمله استفاده از محرک‌ها بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه مؤثر هستند. ایستورها به‌عنوان محرک‌های دفاعی و القاکننده استرس در گیاه تعریف می‌شوند که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با فعال‌کردن ژن‌های مرتبط با بیوستنز ترکیبات ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌گردند ( Neumann et al., 2009). از محرک‌ها می‌توان به سالیسیلیک اسید و پرولین اشاره کرد. سالیسیلیک اسید (SA) تنظیم‌کننده رشد گیاهی از گروه فنل‌ها است و در طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی سنتز می‌شود (Hayat et al., 2007). به‌عنوان یک مولکول واسطه‌ای 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 آن دامنه وسیعی از پاسخ‌های رشدی گیاه را تنظیم می‌کند و منجر به القای بیوستنز

پتانسیل شیرین‌کنندگی هر یک از گلیکوزیدها به ماهیت گروه-های R و R<sub>1</sub> بستگی دارد، که ترکیباتی منشعب از گلوکز و یا سایر قندهای منوساکاریدی هستند. با توجه به ساختمان مشترک گلیکوزیدهای استویا و قراردادن گروه‌های R و R<sub>1</sub> در مکان‌های مخصوص به خود (شکل ۱) می‌توان ساختار مربوط به هر گلیکوزید را به‌دست آورد (آذرپور و همکاران، ۱۳۹۲؛ Brandle et al., 1998).

این ترکیبات جذب بدن نمی‌شوند و به‌عنوان شیرین‌کننده به‌کار برده می‌شوند، در درمان چاقی، فشار خون و پیشگیری از پوسیدگی دندان مفید هستند (Pandey and Chikara, 2014). استویوزاید قادر به تحریک ترشح انسولین در پانکراس بیماران دیابتی و دیگر اختلالات متابولیسم کربوهیدراتی است و سطح گلوکز خون را بالا نمی‌برد (Kedik et al., 2003) و به‌عنوان کاهنده سطوح اوریک اسید و ضدتومور به‌شمار می‌آید (Madan et al., 2010). قندهای گلیکوزیده استویا را می‌توان جهت بالابردن حلالیت داروها و پوشاندن مزه تلخ آنها به‌کار برد (Lemus-mondaca et al., 2012). در سال‌های اخیر گرایش مردم به استفاده از گلیکوزیدهای استویول در بیشتر کشورها افزایش داشته است. بنابراین استویا از جمله محصولات با ارزش در نظر گرفته می‌شود ( Singh and Rao, 2005). علاوه بر گلیکوزیدهای استویول، خواص بالای آنتی‌اکسیدانی و میزان بالای فنل و فلاونوئید در گیاه استویا گزارش شده است (Tadhani et al., 2007). فلاونوئیدها و

کشت می‌گردد)، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر محرک‌هایی مانند سالیسیلیک اسید و پرولین بر محتوای گلکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی گیاه استویا در شرایط آب و هوایی استان زنجان بود.

#### مواد و روش‌ها

برای مطالعه اثر سالیسیلیک اسید و پرولین بر محتوای گلکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی گیاه استویا آزمایشی فاکتوریل در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل: پرولین با سه سطح (صفر، ۱، ۲ میلی‌مولار) و سالیسیلیک اسید با سه سطح (صفر، ۰/۳، ۰/۶ میلی‌مولار) بودند. کاشت نشاها در نیمه دوم اردیبهشت در مرحله ۴ تا ۶ برگگی به صورت دستی انجام گرفت. فاصله ردیف‌ها از یکدیگر ۶۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌های روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. جهت حفظ رطوبت و کنترل علف‌های هرز در ردیف‌های کشت مالچ‌کشی پلاستیکی انجام شد. آبیاری بوته‌ها به روش قطره‌ای و دور آبیاری چهار روز صورت گرفت. تیمار سالیسیلیک اسید و پرولین به صورت محلول پاشی برگگی پس از استقرار نشا در سه مرحله به فاصله ۱۰ روز انجام گرفت. برداشت بوته‌ها در نیمه دوم مرداد ماه قبل از مرحله گلدهی و از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری سطح زمین انجام شد. پس از برداشت بوته‌ها در سایه و مجاورت هوا خشک و آسیاب گردید.

#### تهیه عصاره متانولی برای اندازه‌گیری گلکوزیدهای

استویول: برای تهیه عصاره، ۱۰۰ میلی‌گرم برگ خشک در ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط گردید. این فرآیند دو مرحله دیگر بعد از فیلتر شدن روی پودر برگ انجام شد و عصاره‌ها با هم ترکیب شدند. سپس در مبرد (Evaporator) با حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد متانول تبخیر و به باقیمانده محلول ۲۰ میلی‌لیتر n هگزان جهت چربی زدایی اضافه گردید. بعد از تبخیر حلال ۵ میلی‌لیتر محلول (شامل استونیتریل و آب مقطر به نسبت ۲۰:۸۰) به محلول عصاره گیاه

ترکیبات ثانویه می‌شود (Tanoory et al., 2015). محلول پاشی سالیسیلیک اسید روی بخش‌های هوایی ریحان و مرزنگوش علاوه بر افزایش رشد و عملکرد، آمین‌ها، کربوهیدرات‌ها و درصد و کیفیت اسانس را نیز افزایش داد (Gharib, 2007). استفاده از غلظت‌های مختلف تیمارهای سالیسیلیک اسید سبب افزایش درصد و عملکرد اسانس در گیاه نعنا فلفلی (Saharkhiz and godarzi, 2014) و زیره سبز (Rahimi et al., 2013) گردیده است. کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید میزان فلاونوئید کل را در گیاهان بابونه، ماریتیغال، زنجبیل و گل قاصد را افزایش داده است (Pacheco et al., 2013). علاوه بر آن کاربرد سالیسیلیک اسید با تغییر در ترکیبات اسانس گیاه مرزه سبب افزایش میزان تیمول و گاما - ترپین و کاهش پاراسیمن شد (حیاتی، ۱۳۹۲).

اسید آمینه پرولین به طور گسترده در گیاهان آلی و در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی در سلول‌ها و بافت‌ها تجمع می‌یابد (Ashraf and Foolad, 2007). تجمع پرولین در بسیاری از گونه‌های گیاهی 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 قرار گرفته‌اند نوعی سازگاری برای غلبه بر شرایط تنش است (Szabados et al., 2009). پرولین به عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم اسمزی، کاهش هدر رفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، کاهش تأثیر کندکنندگی یون‌ها بر روی فعالیت آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه پروتئین‌های مختلف، افزایش پایداری برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی، پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها، مهار رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش می‌شود. در نتیجه کاربرد خارجی پرولین در شرایط تنش می‌تواند قابلیت تحمل گیاهان آلی را افزایش دهد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

با توجه به ارزش دارویی و غذایی گیاه استویا و اهمیت محرک‌ها در تولید گیاهان دارویی و سنتز متابولیت‌های ثانویه همچنین افزایش تحمل به تنش‌های مختلف (به خصوص زمانی که گیاه در شرایط آب و هوایی متفاوت از زیستگاه اصلی خود

منحنی استاندارد استفاده شد. محتوای فنل کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد (Meda et al., 2005).

**روش سنجش محتوای فلاونوئید کل:** تعیین محتوای فلاونوئید براساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد. طبق این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۰/۸۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت 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).  
داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS 9.3.1 آنالیز و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

### نتایج و بحث

**گلیکوزیدهای استویول:** آنالیز HPLC محلول استاندارد گلیکوزیدهای استویول (شکل ۲ و ۳) و عصاره استویا (شکل ۴) جهت ارزیابی گلیکوزیدهای استویولی انجام گرفت. بررسی نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس گلیکوزیدهای استویول (جدول ۱) بیانگر تأثیر گذار بودن قابل توجه تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید بر اجزای گلیکوزیدهای قندی است. به طوری که تأثیر اثرات ساده سالیسیلیک اسید در تمامی صفات (استویوزاید، ربادیوزاید A, B, C, F و دالکوزاید A) در سطح یک درصد معنی دار شد. در صورتی که اثرات ساده تیمار پرولین بر گلیکوزیدهای استویول متفاوت بوده و تنها در گلیکوزیدهای استویوزاید، ربادیوزاید A در سطح یک درصد معنی دار بود و تأثیر آن بر دالکوزاید A در سطح پنج درصد معنی دار گردید. صفات ربادیوزاید C, B و F تحت تأثیر تیمار

اضافه شد و پس از حل شدن از صافی (۰/۴۵  $\mu\text{m}$ ) عبور داده شد تا به دستگاه HPLC تزریق گردد (Erkucuk et al., 2009).  
**سنجش گلیکوزیدهای استویول توسط HPLC:** ۱۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی به ستون کروماتوگرافی با مشخصات Cosmosil 5NH<sub>2</sub>-MS به طول ۱۵ سانتی‌متر، قطر ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر متصل به دستگاه HPLC مدل Unicam-Crystal-200 ساخت انگلستان تزریق گردید. فاز متحرک شامل محلول آب مقطر و استونیتریل با شرایط ایزوکراتیک است که با نسبت ۲۰ درصد از آب و ۸۰ درصد استونیتریل با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه توسط پمپ از ستون عبور می‌کند. دتکتور (آشکارساز) از نوع Diode Array detector بوده و در طول موج ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد. فشار پمپ در ۸۰۰ psi تنظیم شده و مقدار هر ماده براساس مقایسه زمان بازداری پیک خروجی آن با پیک استاندارد و سطح زیر منحنی آنها تعیین گردید. در نهایت مقدار هر گلیکوزید استویول براساس میلی‌گرم بر گرم ماده خشک گیاه محاسبه شد (Mamta et al., 2010).

### تهیه عصاره متانولی برای اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید

**کل:** مقدار ۵ گرم از هر نمونه برگ خشک آسیاب شده و سپس در ۴۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید و به دنبال آن عصاره‌ها با کاغذ صافی فیلتر شدند. حلال عصاره‌ها در دمای کمتر از ۵۰ درجه توسط دستگاه تقطیر در خلا (rotary evaporator) تبخیر گردید. عصاره‌ها برای انجام آزمایشات بعدی در دمای ۴ درجه در یخچال نگهداری شدند (Ruiz Ruiz et al., 2015).

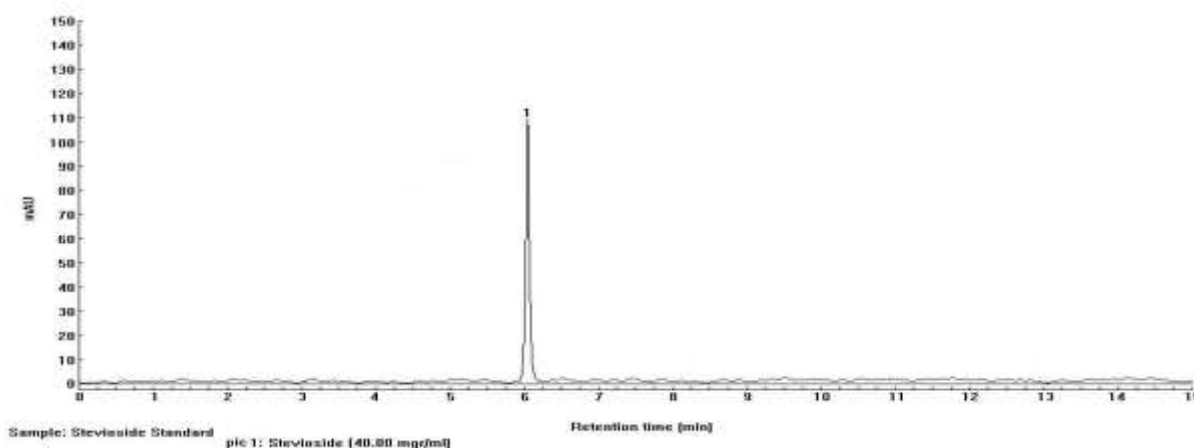
### روش سنجش محتوای فنل کل: محتوای فنل کل براساس

روش فولین سیوکالچو انجام شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۰/۲٪)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو (۰/۵۰٪) اضافه و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. از غلظت‌های مختلف گالیک اسید ۵۰۰-۵۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر به عنوان استاندارد برای رسم

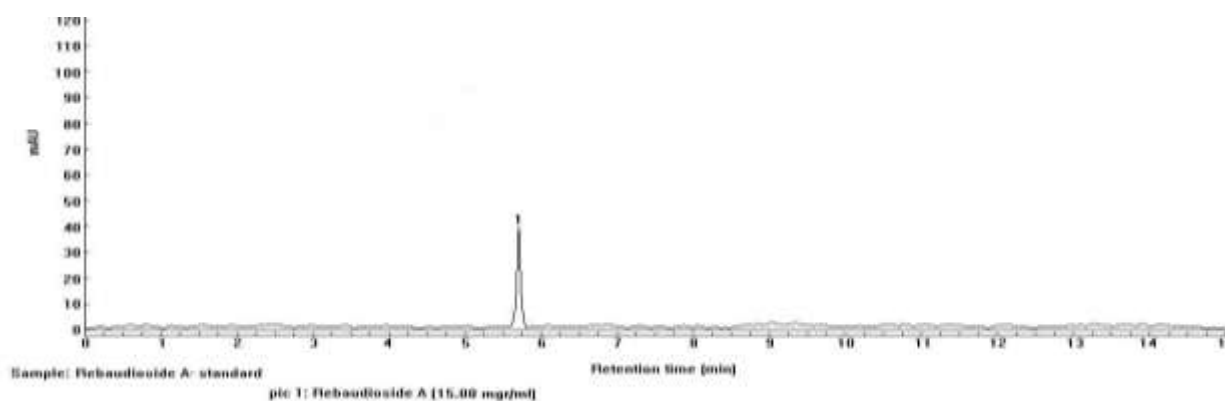
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) گلیکوزیدهای استویول

دالکوزاید	ربادیوزاید	ربادیوزاید	ربادیوزاید	ربادیوزاید	استویوزاید	درجه آزادی	منابع تغییرات
A	F	C	B	A			
۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۹	۰/۲۱	۱/۰۵	۲	بلوک
۰/۸۸*	۰/۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۲۲ <sup>ns</sup>	۰/۱۷ <sup>ns</sup>	۲۳/۴۱**	۴۳/۹۸**	۲	پرولین
۳/۳۷**	۰/۱۵**	۰/۴۳**	۴/۷۸**	۱۲۶/۴۸**	۱۱۴۳/۵۵**	۲	اسید سالیسیلیک
۰/۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۷۴**	۰/۰۴ <sup>ns</sup>	۱۵/۵۸**	۶۷/۷۲**	۴	پرولین × سالیسیلیک اسید
۰/۱۸۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱۳	۰/۰۸۸	۱/۸۲	۵/۵۱	۱۶	خطا
۱۱/۱۰	۹/۴۴	۱۱/۶۸	۱۲/۵۴	۷/۴۷	۵/۲۳		CV

\*\* معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، \* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ns معنی‌دار نبودن

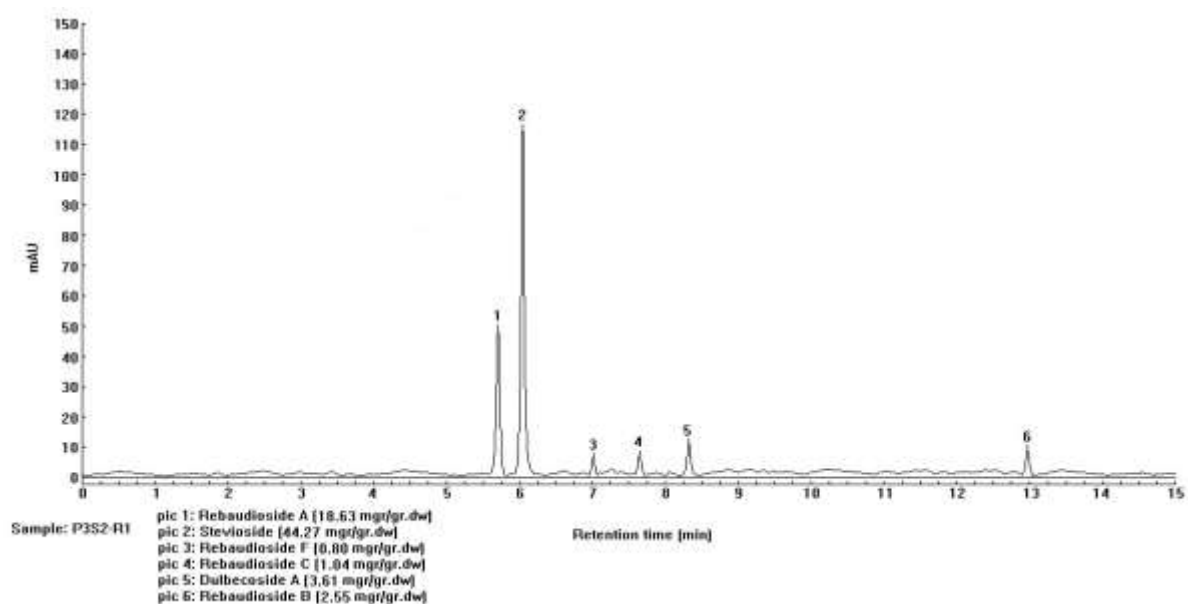


شکل ۲- کرماتوگرام استاندارد استویوزاید

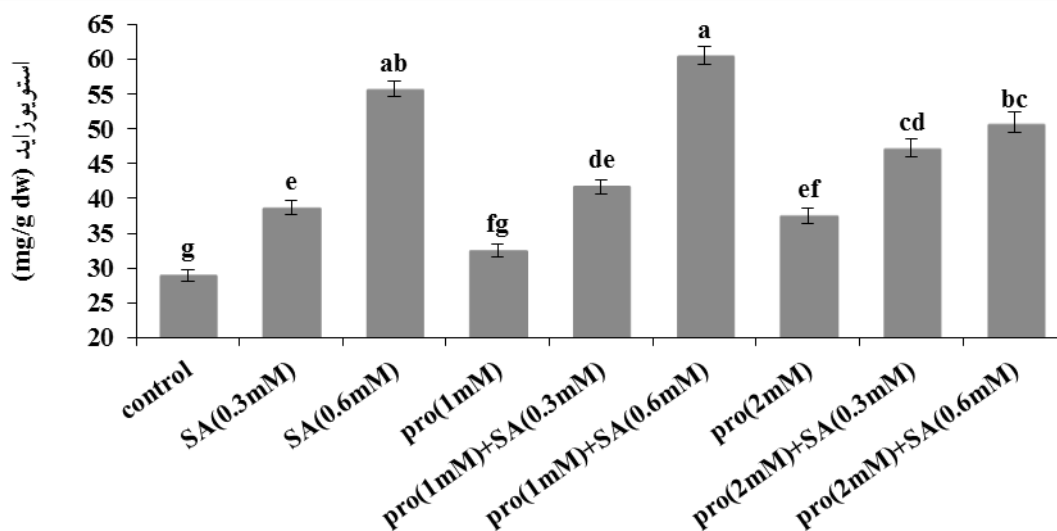


شکل ۳- کرماتوگرام استاندارد ربادیوزاید A

پرولین قرار نگرفته و معنی‌دار نبودند. همچنین اثرات متقابل تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید در سطح ۱ درصد بر اجزای استویوزاید و ربادیوزاید A و در سطح پنج درصد بر ربادیوزاید C مؤثر بود. نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین (شکل ۵) نشان‌دهنده تأثیر قابل ملاحظه تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید بر محتوای



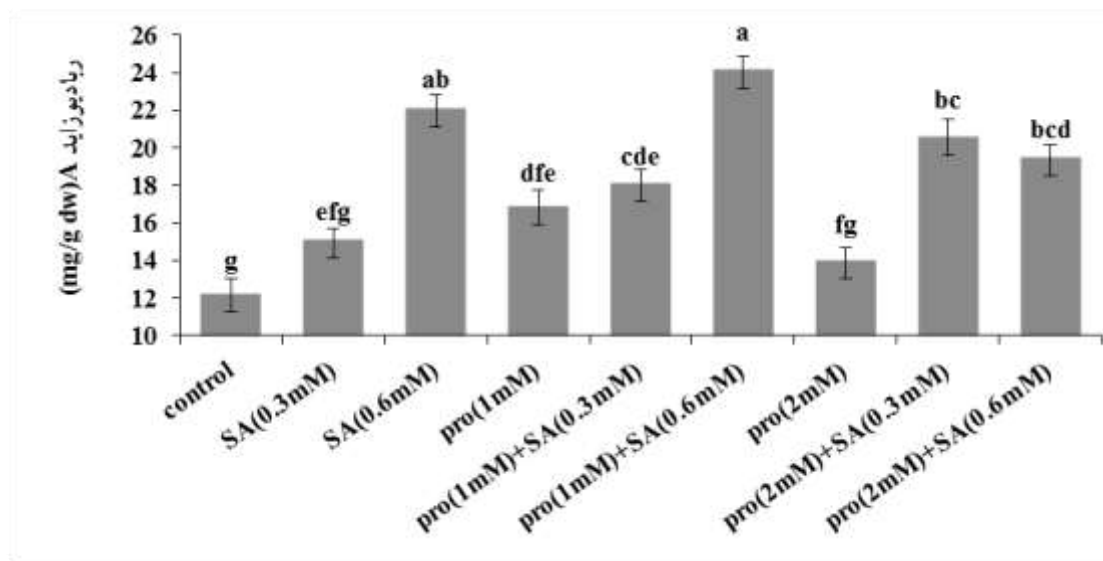
شکل ۴- کرماتوگرام گلیکوزیدهای استویول حاصل از تزریق عصاره استویا به ستون HPLC



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار سالیسیلیک اسید و پرولین بر میزان استویوزاید گیاه استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن است.

تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید بر محتوای گلیکوزید ربادیوزاید A است. تمامی سطوح نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته است. افزایش غلظت تیمار پرولین به ۲ میلی مولار تأثیر منفی در روند افزایش میزان ربادیوزاید A نشان می دهد، که تحت تأثیر اثرات متقابل با سطوح تیمار سالیسیلیک اسید بهبود یافته است. بیشترین میزان ربادیوزاید A با ۲۴/۱۴ میلی گرم در گرم وزن خشک برگ در تیمار اثرات متقابل ۱ میلی مولار

گلیکوزید استویوزاید است. تمامی سطوح تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان می دهد. بیشترین میزان استویوزاید با ۶۰/۳۲ میلی گرم در گرم وزن خشک در تیمار اثرات متقابل ۱ میلی مولار پرولین به همراه ۰/۶ میلی مولار سالیسیلیک اسید به دست آمده است و تیمار ۰/۶ میلی مولار با ۵۵/۶۵ میلی گرم در گرم وزن خشک در رده دوم قرار گرفته است. مقایسه میانگین (شکل ۶) نشان دهنده تأثیر قابل ملاحظه



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار سالیسیلیک اسید و پرولین بر میزان ربادیوزاید A گیاه استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن است.

موجب افزایش دالکوزاید A نسبت به تیمار شاهد شده است. بالاترین میزان دالکوزاید A در تیمار ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده گردید. اما بر خلاف تیمار سالیسیلیک اسید، تیمار پرولین تأثیر منفی بر محتوای دالکوزاید A داشته است. و با افزایش سطوح تیمار پرولین دالکوزاید A روند کاهشی نشان داد و میانگین هر دو سطح تیمار پرولین پایین‌تر از تیمار شاهد قرار گرفت.

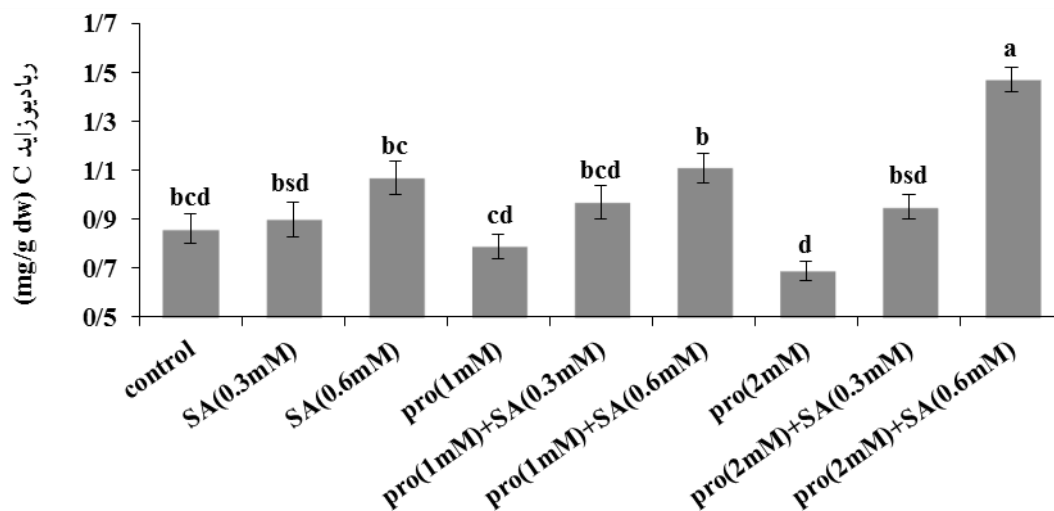
بر پایه نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹) تیمار هر دو سطح سالیسیلیک اسید موجب تغییر محتوای ربادیوزاید B و F در گیاه شده است. غلظت هر دو گلیکوزید نسبت به شرایط عدم تیمار (شاهد) افزایش داشته است. بالاترین میانگین ربادیوزاید B (۳/۱۴) و ربادیوزاید F (۰/۹۱) میلی‌گرم در گرم وزن خشک برگ در تیمار ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

گلیکوزیدها ترکیباتی اغلب درشت مولکول و دارای گروه‌های مختلفی هستند. این ترکیبات همگی دارای یک یا چند قند روی اسکلت مرکزی هستند. این اسکلت مرکزی یک گروه چربی دوست است که روی آن یک یا چند قند مونوساکارید قرار می‌گیرد. اسکلت اصلی گلیکوزیدهای استویا که گلوکز روی آن متصل می‌شود مولکول استویول است که

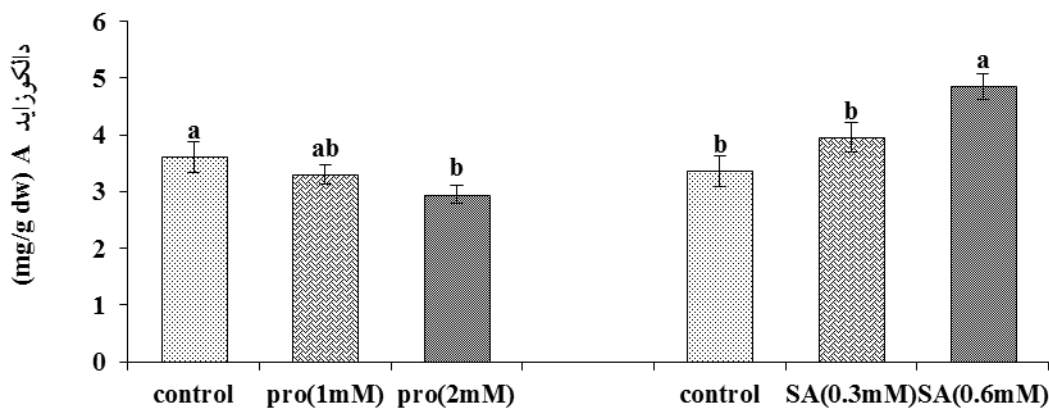
پرولین به‌همراه ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به‌دست آمده است و تیمار ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید با ۲۲/۰۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک برگ در رده بعدی قرار گرفته است.

مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده از آنالیز استویا (شکل ۷) بیانگر آن است که تیمار با سالیسیلیک اسید و پرولین موجب تغییر در میزان ربادیوزاید C شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید میزان ربادیوزاید C افزایش یافته است. اما تیمار پرولین تأثیر منفی بر میزان ربادیوزاید C داشته است. به‌طوری که با افزایش غلظت پرولین روند کاهشی نشان داده و پایین‌تر از سطح تیمار شاهد قرار گرفته است. در مقابل اثرات متقابل پرولین و سالیسیلیک اسید موجب افزایش میزان ربادیوزاید C در مقایسه با اثرات ساده شده است و بالاترین میزان ربادیوزاید C در تیمار اثرات متقابل ۲ میلی‌مولار پرولین به‌همراه ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. به نظر می‌رسد که اثرات متقابل سالیسیلیک اسید با پرولین تأثیرات منفی پرولین بر ربادیوزاید C را تعدیل می‌کند.

مقایسه میانگین (شکل ۸) تیمار سالیسیلیک اسید بیانگر تأثیر مثبت بر میزان دالکوزاید A است. کاربرد سالیسیلیک اسید



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار سالیسیلیک اسید و پرولین بر میزان ربادیوزاید C گیاه استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن است.

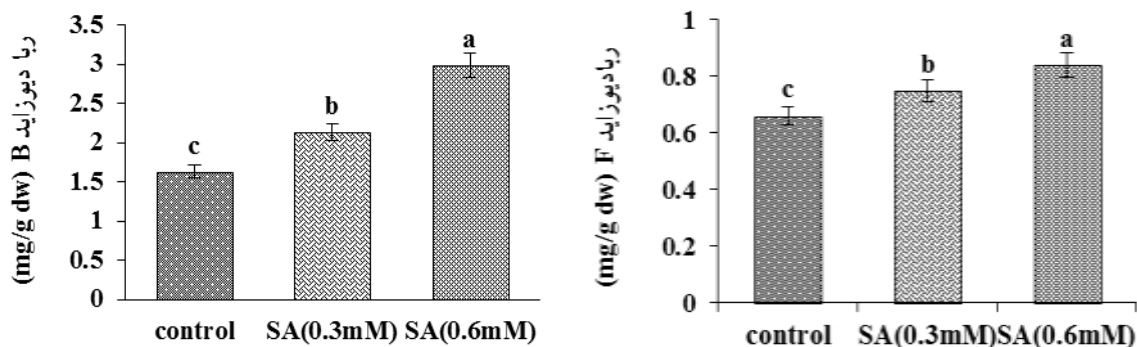


شکل ۸- مقایسه میانگین اثرات ساده تیمار سالیسیلیک اسید و پرولین بر محتوای دالکوزاید A استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن است.

جیبرلین‌ها و کائورنیک اسید ۱۳- هیدروکسیلاز با هیدروکسیله کردن در موقعیت ۱۳، اسکلت کائورنی را به سمت تولید استویول می‌برد. در ادامه با اتصال چند قند گلیکوزیدهای استویول تولید خواهند شد از آنجایی که علت ساخت چنین مولکول پر هزینه‌ای در گیاه استویا روشن نیست؛ این احتمال می‌رود که شاید این ترکیب‌ها نقش دفاعی در شرایط تنش داشته باشند (مرادی پینوندی و همکاران، ۱۳۹۳). عوامل مختلفی از جمله کاربرد محرک‌ها موجب تحریک

شبه اسکلت انت-کائورن برای سنتز جیبرلین است. بنابراین ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها صورت می‌گیرد. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در این گیاه با مسیر سنتز جیبرلین تا تشکیل کائورنیک اسید مشترک است (Gupta et al., 2016a). دو آنزیم سرنوشت کائورنیک اسید را به سوی سنتز جیبرلین‌ها یا به سوی تولید گلیکوزیدها پیش می‌برند. کائورنیک اسید اکسیداز (KAO) با هیدروکسیله کردن در موقعیت کربن ۷، اسکلت کائورنی را به سمت مسیر بیوسنتز





شکل ۹- مقایسه میانگین اثرات ساده سالیسیلیک اسید بر محتوای ربادیوزاید B و F استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن است.

استویا شده است. در تحقیقی دیگر پیش تیمار گیاه استویا با ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید تحت تنش سرمایی موجب افزایش محتوای گلیکوزیدهای استویول شده است (Soufi et al., 2016). در مطالعه‌ای بر روی کالوس استویا افزودن ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به محیط کشت MS موجب افزایش میزان ربادیوزاید A شده است (Golkar et al., 2018). نتایج بررسی اثر محرک‌های مختلف بر سنتز گلیکوزیدهای استویول در بافت کالوس استویا نشان داد که با کاربرد ۱۰۰ میلی مولار سالیسیلیک اسید در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درصد استویوزاید افزایش یافت و بیشترین میزان افزایش ربادیوزاید A در تیمار ۱۰ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد (Mejia-Espejel et al., 2018). در گیاهان دیگر کاربرد ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید موجب افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله گلیسرین در ریشه‌های مویی شیرین بیان در شرایط کشت درون شیشه‌ای گردیده (شیرازی و همکاران، ۱۳۹۳) و به طور قابل توجهی محتوا و درصد اسانس بومادران (*Achillea millefolium* L.) را نسبت به عدم تیمار افزایش داده است (Gorni and Pacheco, 2016). در نعنا فلفلی (Saharkhiz and godarzi, 2014) کاربرد ۰/۱۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید درصد و محتوای اسانس را بهبود بخشید همچنین در تحقیقی دیگر تیمار پرولین میزان گلیکوزیدهای استویول (استویوزاید و ربادیوزاید A) را در شرایط کشت درون شیشه‌ای افزایش داد (Gupta et al., 2016b).

بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و انباشت آنها می‌شوند، مطالعات گذشته نشان می‌دهد که کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید از طریق افزایش بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی، تشکیل متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Pacheco et al., 2013). نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار با سالیسیلیک اسید و پرولین بر روند افزایش محتوای گلیکوزیدهای استویول تأثیرگذار بوده است. تیمار سالیسیلیک اسید نسبت به تیمار پرولین مؤثرتر بوده و نتایج بهتری را در افزایش این ترکیبات نشان داد. بیشترین افزایش در محتوای گلیکوزیدهای استویوزاید و ربادیوزاید A مشاهده شد. تحقیقات نشان داده است که غلظت استویوزاید می‌تواند ۶۰-۷۰ درصد کل گلیکوزیدهای استویول باشد. بنابراین استویوزاید به دلیل بالابودن میزان آن تأثیر مهمی در شیرین بودن گیاه استویا دارد. (Yadav et al., 2011). همچنین در بین انواع گلیکوزیدهای استویول ربادیوزاید A در کیفیت گلیکوزیدهای استویولی و مزه کلی آنها (Sharma et al., 2009) و استویوزاید به دلیل کمیت بیشتر نقش مهمی دارد بنابراین افزایش نسبت ربادیوزاید A به استویوزاید می‌تواند کیفیت کلی قند استویا را افزایش دهد (Yadav et al., 2011). نتایج این پژوهش با نتایج برخی تحقیقات انجام شده مطابقت دارد. هاشم‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند که کاربرد ۰/۵ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید موجب افزایش محتوای گلیکوزیدهای استویول در شرایط درون شیشه‌ای

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فنل و فلاونوئید کل گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* (Bert.))

منابع تغییرات	درجه آزادی	فنل کل	فلاونوئید کل
بلوک	۲	۰/۱۰	۰/۰۳
پرولین	۲	۰/۲۵**	۲/۸۶**
اسید سالیسیلیک	۲	۰/۶۱۹**	۱۰/۸۶**
پرولین × سالیسیلیک اسید	۴	۰/۱۶۵*	۰/۴۴ <sup>ns</sup>
خطا	۱۶	۰/۰۳۹	۰/۳۷
CV		۴/۲۹	۵/۳۶

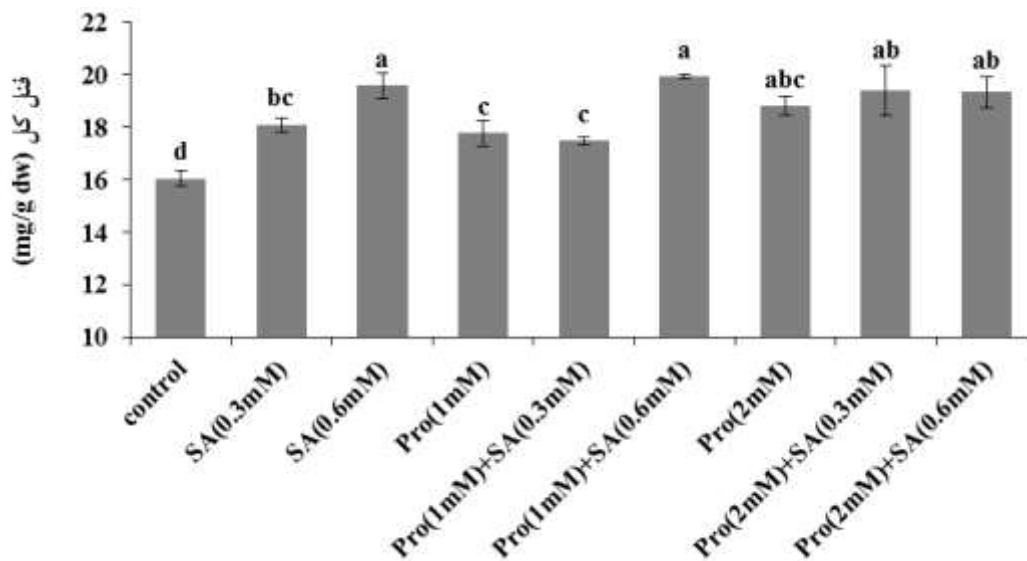
\*\* معنی دار در سطح ۰/۰۱، \* معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ns معنی دار نبودن

میکرومولار سالیسیلیک اسید در گیاه جینسنگ موجب افزایش ترکیبات فنلی (۶۲٪) و فلاونوئیدها (۸۸٪) در مقایسه با شاهد شد (Ali et al., 2007) که با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد.

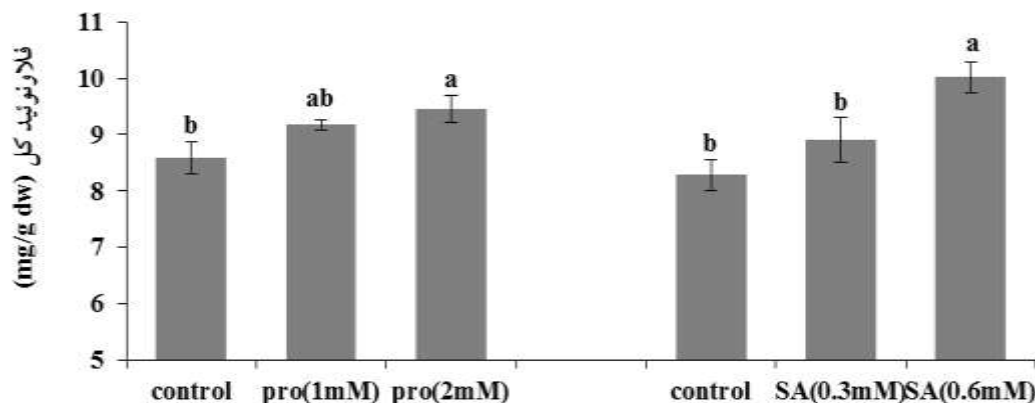
**محتوای فلاونوئید کل:** نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) بیانگر تأثیر معنی دار اثرات ساده تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید بر میزان فلاونوئید کل استویا در سطح ۱ درصد بود. با افزایش غلظت تیمارها میزان فلاونوئید کل در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت. بالاترین میزان فلاونوئید کل با ۱۰/۰۲ میلی گرم در گرم در تیمار ۰/۶ میلی مولار سالیسیلیک اسید و ۹/۴۶ میلی گرم در گرم در تیمار ۲ میلی مولار پرولین به دست آمد (شکل ۱۱). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از سازوکارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئید استفاده می‌کنند. این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی دارند و جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Ali et al., 2006). سالیسیلیک اسید به‌عنوان مولکول پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود. پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به کاهش تولید مواد اولیه و بیوستز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی از جمله فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی می‌گردد (Neumann et al., 2009). در مطالعه حاضر تیمار سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر را در افزایش فلاونوئید نشان داد. مطالعات دیگر نیز افزایش محتوای فلاونوئید را در تیمار با سالیسیلیک اسید گزارش کردند. در تحقیقی مشاهده گردید که سالیسیلیک اسید به‌طور

محلول پاشی پرولین در شرایط تنش خشکی میزان قابل توجهی درصد و عملکرد اسانس را در گیاهان ریحان و بابونه افزایش داد (Gamal El-Din, 2005).

**محتوای فنل کل:** نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) بیانگر اثرات ساده تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید بر افزایش معنی دار میزان ترکیبات فنلی در سطح ۱ درصد است. همچنین اثرات متقابل تیمارها به‌طور معنی‌داری در سطح ۵ درصد میزان فنل کل را تحت تأثیر قرار داد. بالاترین میزان فنل با ۱۹/۹۴ میلی گرم در گرم وزن خشک در تیمار سطح پرولین ۱ میلی مولار به‌همراه ۰/۶ میلی مولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد که با تیمار ۰/۶ میلی مولار سالیسیلیک اسید با ۱۹/۵۹ میلی گرم 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 (شکل ۱۰). پرولین نقش اساسی در سنتز ترکیبات فنلی در شرایط تنش دارد که خواص آنتی‌اکسیدانی آن را نشان می‌دهد. گزارش شده است که پرولین محرک بیوستز فنل‌ها در مسیر شیکیمات با فعال‌سازی آنزیم فنیل پروپانویید (PAL) است. 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 تیمار با سالیسیلیک اسید موجب افزایش ترکیبات فنلی در کشت درون شیشه‌ای شیرین بیان (شبانی و احسان‌پور، ۱۳۸۸) و همیشه‌بهار (قاسمی پیر بلوطی و همکاران، ۱۳۹۱) شده است. همچنین کاربرد ۲۰۰



شکل ۱۰- اثر متقابل پرولین و سالیسیلیک اسید بر سطح فنل در گیاه استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن است.



شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثرات ساده تیمار پرولین و سالیسیلیک اسید بر محتوای فلاونوئید کل استویا. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن است.

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده اثرات مطلوب کاربرد تیمار سالیسیلیک اسید و پرولین بر اجزای گلیکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی گیاه استویا است. تیمار سالیسیلیک اسید بر تمامی اجزای گلیکوزیدهای استویول اندازه‌گیری شده و محتوای فنل و فلاونوئید کل تأثیر مثبت داشته و موجب افزایش قابل ملاحظه مقدار آنها شد. تیمار پرولین تنها در میزان استویوزاید، ربادیوزاید A، فنل و فلاونوئید کل افزایش نشان داد و سطح ربادیوزاید C و دالکوزاید A با تیمار پرولین کاهش

قابل توجه سبب افزایش میزان فلاونوئید کل در کشت درون شیشه‌ای شیرین‌بیان گردید (شبانی و احسان‌پور، ۱۳۸۸). در گیاه همیشه‌بهار کاربرد غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید موجب افزایش محتوای فلاونوئید کل شد (Pacheco et al., 2013). همچنین محلول‌پاشی پرولین موجب افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در گیاه سنبله *(Trigonella foenum-graecum L.)* در شرایط آبیاری کامل و تنش کم‌آبی شد (Abd-Elhamid et al., 2016).

استویول و فنل کل را نشان داد. در نتیجه استفاده از این سطوح تیمارها برای افزایش عملکرد متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا قابل توصیه است.

یافت. تیمار سالیسیلیک اسید در مقایسه با تیمار پرولین نتایج بهتر و مؤثرتری در افزایش گلیکوزیدهای استویول، فنل و فلاونوئید نشان داد. اثرات متقابل تیمارها نیز تأثیر مثبت در افزایش دو گلیکوزید مهم استویوزاید و ربادیوزاید A، C و همچنین فنل داشت. تیمار ۰/۶ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به همراه ۱ میلی‌مولار پرولین بیشترین مقدار گلیکوزیدهای

## منابع

- آذرپور، ا.، معتمد، م. ک. و بزرگی، ح. ر. (۱۳۹۲) زراعت و ترویج استویا. چاپ اول، ناشر دانشگاه آزاد واحد لاهیجان.
- حیاتی، پ. و روشن، و. (۱۳۹۲) بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر پارامترهای رشدی و کمیت و کیفیت اسانس گیاه مرزه. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۹: ۸۰۸-۸۱۷.
- شبان، ل. و احسان‌پور، ع. ا. (۱۳۸۸) القا آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده از متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک. نشریه زیست‌شناسی ایران ۲۲: ۷۰۳-۶۹۱.
- شیرازی، ز.، پیری، خ.، میرزایی اصل، ا.، حسنلو، ط. و قیاسوند، ط. (۱۳۹۳) اثر محرک‌های سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان تولید ماده مؤثره گلیسرین و ایزولیکویریتیجین در ریشه‌های مویین شیرین‌بیان. مجله پژوهش‌های گیاهی ۲۷: ۴۴۹-۴۴۰.
- قاسمی پیربلوطی، ع.، موسوی هریس، س. ع.، تیرگیر، ف. و بهزاد، ح. (۱۳۹۱) اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در عصاره گل همیشه‌بهار. نشریه داروهای گیاهی ۳: ۱۸۰-۱۷۵.
- کافی، م.، زند، آ.، کامکار، ب.، مهدوی دامغانی، ع.، عباسی، ف. و شریفی، ح. (۱۳۸۸) فیزیولوژی گیاهی ۱. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد.
- مرادی پینوندی، ک.، شریفی، م. و بهمنش، م. (۱۳۹۳) تأثیر متیل ژاسمونات بر میزان استویوزید و ربادیوزید A و بیان ژن کائورنوئیک اسید ۳۱ هیدروکسیلاز در گیاه استویا در شیشه. مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران ۶: ۱۱۰-۹۹.
- هاشم‌زاده، ه. و محبعلی‌پور، ن. (۱۳۹۳) اثر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر محتوای استویوزاید استویا در شرایط درون شیشه‌ای. اولین کنگره بین‌المللی و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات و سومین همایش علوم و تکنولوژی بذر. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران.
- Ali, M. B., Khatun, S., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2006) Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in *Phalaenopsis* orchid and their influence on plant acclimatization at different levels of photosynthetic photon flux. *Plant Growth Regulator* 49: 137-146.
- Ali, M. B., Hahn, E. J. and 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.
- Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216.
- Abd Elhamid, E. M., Sada, M. S. and 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: 580-594.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N. and Gijzen, M. (1998) *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal Plant Science* 78: 527-536.
- Dragovi-Uzelac, V., Savi, Z., Brala, A., Levaj, B., BursaKovaevi, D. and Bisko, A. (2010) Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the northwest Croatia. *Food Technology and Biotechnology* 48: 214-221.
- Erkucuk, A., Akgun, I. H. and Yesil-celiktas, O. (2009) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of glycosides from stevia rebaudiana leaves: Identification and composition. *Journal Supercritical Fluids* 51: 29-35.

- Hayat, S., Ali, B. and Ahmad, A. (2007) Salicylic Acid: A Plant Hormone, Biosynthesis Metabolism and Physiological Role in Plants. Springer.
- Gamal EL-Din, K. M. and Abd EL-Wahed, M. S. A. (2005) Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 376-380.
- Gharib, F. A. (2007) Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of *Basiland marjoram*. *International Journal of Agriculture and Biology* 14: 85-92.
- Gorni, P. H. and Pacheco, A. C. (2016) Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L. *African Journal of Biotechnology* 15: 657-665.
- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., Tripathi, P. and Rai, G. (2016a) Stevioside and rebaudioside A – predominant ent-kaurene diterpene glycosides of therapeutic potential. A review. *Czech Journal of Food Sciences* 34: 281-299.
- Gupta, P., sharma, S. and Saxena, S. (2016b) Effect of abiotic stress on growth parameters and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised in vitro. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 3: 160-167.
- Golkar, P., Moradi, M. and Garousi, G. A. (2018) Elicitation of Stevia glycosides using salicylic acid and silver nanoparticles under callus culture. *Journal Sugar Tech* 1-9.
- Kedik, S. A., Fedorov, S. V., Yanul, N. A., Prokhorova, L. V., Smirnova, E. V. and Panov, A. V. (2003) Chromatographic determination of stevioside in raw plant material. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 37: 529-532.
- Lemus-Mondaca, R., Vaga-Galvez, A., Zura-Bravo, L. and Ah-Hen, K. (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132: 1121-1132.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K. J. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132: 273-281.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. and 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.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. and Garg, M. (2010) *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1: 267-287.
- Mamta, P. R., Vijaylata, P., Gulati, A., Singh, B. and Bhanwra, R. K. (2010) Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudiosid-A content of *Stevia rebaudiana* Bertony. *Applied Soil Ecology* 46: 222-229.
- Messeddi, D., Farhani, F., Ben-Hamid, K., Trablsi, N., Ksouri, R., Ather, H. U. R. and Abdelly, C. (2016) Highlighting the mechanisms by which proline can confer tolerance to salt stress in *Cakile maritima*. *Pakistan Jurnal Botany* 48: 417-427.
- Mejia-Espejel, L., Robledo-Paz, A., Lozoya-Gloria, E., Pena-Valdivia, C. B. and Carrillo-Salazar, J. A. (2018) Elicitors on steviosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni calli. *Scientia Horticulturae* 242: 95-102.
- Neumann, K. H., Kumar, A. and Imani, J. (2009) Plant cell and tissue culture. A tool in biotechnology. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Pacheco, A. C., Silva Cabral, C. D., Silva Fermino, E. S. D. and Aleman, C. C. (2013) Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *Journal of Medicinal Plant Research* 7: 3158-3163.
- Pandey, M. and 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: 113.
- Rahimi, A. R., Rokhzadi, A., Amini, Sh. and Karami, E. (2013) Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on growth and secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 3: 140-149.
- Ruiz Ruiz, J. C., Moguel Ordonez, Y. B., Basto, A. M. and Segura Campos, M. R. (2015) Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutricion Hospitalaria* 31: 1163-1170.
- Singh, S. D. and Rao, G. P. (2005) Stevia: The herbal sugar of the 21<sup>st</sup> century. *Sugar Technology* 7: 17-24.
- Szabados, L. and Savoure, A. (2009) Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 82-97.
- Sharma, M., Thakral, N. K. and Thakral, S. (2009) Chemistry and in vivo profile of ent-kaurene glycosides of *Stevia rebaudiana* bertoni. An overview. *Natural Product Radiance* 8: 181-189.
- Saharkhiz, M. J. and Goudarzi, T. (2014) Foliar application of salicylic acid changes essential oil content and chemical compositions of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plant* 17: 435-440.
- Soufi, S., D'Urso, G., Pizza, C., Rezgui, S., Bettaieb, T. and Montoro, P. (2016) Steviol glycosides targeted analysis in leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from plants cultivated under chilling stress conditions. *Food Chemistry* 190: 572-580.
- Tadhani, M. B., Patel, V. H. and Subhash, R. (2007) In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 323-329.

- Tanoory, A., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. (2015) In vitro estimation of antioxidant compounds of artichoke (*Cynara scolymus* L.) as affected by methyl jasmonate and salicylic acid. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7: 991-996.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. and Ahuja, P. S. (2011) A review on the improvement of Stevia. *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Canadian Journal Plant Science* 91: 1-27.

## Effect of foliar stimulative salicylic acid and proline on steviol glycosides and phenolic contents of *Stevia rebaudiana* (Bert.)

Mohsen Sanikhani\*, Arefeh Rastgoo, Azizollah Kheiry and Mitra Aelaei

Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran  
(Received: 19/11/2018, Accepted: 08/05/2019)

### Abstract

To study the effect of foliar application of proline and salicylic acid on steviol glycosides and phenolic of *Stevia*, an experiment was conducted based on a completely randomized block design in a factorial arrangement with three replications in the University of Zanjan. Foliar application 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. Results showed that salicylic acid and proline applications significantly influenced steviol glycosides, phenol and flavonoid. The treatment with salicylic acid had positive effects on all steviol glycosides, phenol and flavonoid, but proline only enhanced contents of glycosides stevioside, rebaudioside A, phenol and flavonoid. The highest average steviol glycosides stevioside (60.32 mg/g dw), rebaudioside A (24.14 mg/g dw) and total phenol (19.94 mg/g dw) were recorded in 1 mM proline in combination with 0.6 mM salicylic acid. The highest average flavonoid (10.02 mg/g dw) in 0.6 mM salicylic acid, and lowest average steviol glycosides and phenolic contents were observed in the control. Collectively, the results showed that application of proline and salicylic acid significantly improved production of active substances in *Stevia rebaudiana*.

**Key words:** Elicitors, Stevioside, Rebaudioside A, Flavonoid, Phenol