



Assessment of the Relationship between Rebaudioside-A and Stevioside Content and Growth, Yield, and Root Characteristics of *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* under Drought Stress

Ali Ghaderi¹, Mohammad Moghaddam^{2*} and Shahram Rezvan³

1- Ph.D. student, Department of Horticultural, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2*- Corresponding author, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: m.moghadam@um.ac.ir

3- Production and Technology of Herbal Medicines Research Center, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Received: February 2024

Revised: May 2024

Accepted: June 2024

Abstract

Background and Objective: Limited research exists on the relationship between different root structures and the content of steviol glycosides in various genotypes of the *Stevia* plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under varying levels of drought stress. This study aimed to assess the relationship between root characteristics and the content of Rebaudioside-A (Reb-A) and Stevioside (Stev) in two *Stevia* genotypes under drought stress.

Methodology: This study evaluated the relationship between root attributes, yield characteristics, and the content of Reb-A and Stev in two *Stevia* genotypes (Chinese and Indian) under hydroponic conditions. Seven drought levels (-2, -4, -6, -8, -10, and -12 bars using polyethylene glycol 6000) were applied in 2023. The experiment consisted of two completely randomized design trials with three replications each. To begin the experiment, pots filled with a 1:1 ratio of vermiculite and perlite were prepared, and three uniform seedlings were planted in early April. Throughout the growth period and the application of drought stress using Hoagland solution, all pots were initially irrigated with distilled water until the establishment of plants. Once plant establishment was ensured, drought treatments were administered by irrigating once every three days with 400 mL of Hoagland solution with varying osmotic potentials based on the designated treatments. After 65 days from planting, all plants were carefully removed from the pots, and their aboveground and underground parts were separated to measure the desired traits. Steviol glycosides were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC) with two C18 columns and a UV-Vis detector at a wavelength of 202 nm. Finally, the results pertaining to each genotype were analyzed and presented separately.

Results: The results indicated that both genotypes experienced significant reductions in yield and growth characteristics, including plant height, leaf number, leaf fresh weight, leaf yield, and total biomass yield, under drought stress conditions. Compared to the control, all mentioned traits decreased notably under stress. At the -12 bar level, the reduction in leaf yield traits was 59.84% and 87.9% in the Chinese and Indian genotypes, respectively, while total biomass yield decreased by 52.51% and 64.19%, respectively. The Indian genotype exhibited a higher average leaf yield at



non-drought stress levels, whereas the Chinese genotype showed a higher yield at higher drought stress levels (beyond -8 bars). This suggests that the Chinese genotype displays greater tolerance in terms of leaf yield under higher stress levels compared to the Indian genotype. Root-related traits, including fresh and dry weight, volume, length, and density, showed the highest averages in the Chinese genotype at the -4 bar level and in the Indian genotype at the -2 bar level. In both genotypes, partial drought stress (-2 bars) resulted in increased average content of Stev when compared to the non-stress treatment, with the highest content of Reb-A and Stev observed at this stress level in both the Chinese and Indian genotypes (2.58% and 2.58%, respectively, and 7.8% and 5.96%, respectively). According to the stepwise regression results, root area, leaf fresh weight, and total biomass yield were identified as influential traits in increasing the combined content of Reb-A and Stev.

Conclusion: Based on the findings, severe drought stress resulted in a decline in growth and yield traits, root characteristics, and the content and yield of the combined Reb-A and Stev. The synthesis of these two glycosides as metabolites in *Stevia* plants peaked at the partial drought stress level (-2 bars), highlighting their pivotal role as influential metabolites in imparting stress tolerance. The Chinese genotype exhibited the highest resistance to drought stress, displaying superior yield and content of combined Reb-A and Stev compared to the Indian genotype in certain instances. Overall, this study illustrates that severe drought stress directly diminishes the yield and content of Reb-A and Stev in *Stevia* plants. In contrast, certain root-related and yield traits can serve as reliable indicators of drought tolerance in this plant.

Keywords: *Stevia*, stevioside, polyethylene glycol, drought stress, rebaudioside, root area.

ارزیابی ارتباط محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید با صفات رشدی، عملکردی و خصوصیات ریشه گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) تحت تنش خشکی

علی قادری^۱، محمد مقدم^{۲*} و شهرام رضوان^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، پست الکترونیک: m.moghadam@um.ac.ir

۳- استادیار، مرکز تحقیقات تولید و فناوری داروهای گیاهی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات در زمینه ارتباط بین ویژگی‌های ریشه و محتوای گلیکوزیدهای استویول در ژنوتیپ‌های استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) تحت سطوح مختلف تنش خشکی بسیار اندک است. از این رو، این پژوهش با هدف ارزیابی ارتباط خصوصیات ریشه با محتوای دو گلیکوزید ربودیوزاید-A و استویوزاید در دو ژنوتیپ استویا تحت تنش خشکی اجرا شد. مواد و روش‌ها: در این پژوهش ارزیابی ارتباط ویژگی‌های ریشه و صفات عملکردی با محتوای دو گلیکوزید ربودیوزاید-A و استویوزاید در دو ژنوتیپ استویا (چینی و هندی) در شرایط هیدروپونیک با هفت سطح خشکی (صفر، -۲، -۴، -۶، -۸، -۱۰، -۱۲ بار) با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (۶۰۰۰) در سال ۱۴۰۲ به صورت دو آزمایش کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی گردید. به منظور اجرای آزمایش، گلدان‌هایی با مخلوط پومیس و پرلیت (به نسبت یک به یک) پر و تعداد سه نشاء یکدست در اوایل اردیبهشت‌ماه کشت شدند. در طول آزمایش، تغذیه و اعمال تنش خشکی با استفاده از محلول هوگلند انجام شد. تمامی گلدان‌ها تا قبل از تثبیت گیاهچه‌ها با آب مقطر آبیاری شدند. بعد از اطمینان از تثبیت گیاهچه‌ها، اعمال تیمارهای خشکی با آبیاری سه روز یکبار با ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند با ظرفیت اسمزی متفاوت بر اساس تیمارهای طراحی شده انجام گردید. پس از گذشت ۶۵ روز از کاشت، تمامی گیاهان داخل گلدان‌ها به طور کامل خارج شده و اندام‌های هوایی و زیرزمینی جدا شدند تا ویژگی‌های مورد نظر اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویول به وسیله کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) با ستون C18 و دتکتور UV-Vis در طول موج ۲۰۲ نانومتر انجام شد. در نهایت نتایج مربوط به هر ژنوتیپ جداگانه آنالیز و ارائه گردید.

نتایج: براساس نتایج صفات عملکردی و رشدی از جمله ارتفاع بوته، تعداد برگ، وزن تر برگ، عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل تحت تأثیر تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری داشتند و تمامی صفات ذکر شده در اثر تنش کاهش نشان دادند. میزان کاهش صفات عملکرد برگ در سطح ۱۲- بار در مقایسه با شاهد به ترتیب در ژنوتیپ چینی و هندی ۵۹/۸۴٪ و ۸۷/۹٪ و عملکرد بیوماس کل ۵۲/۵۱٪ و ۶۴/۱۹٪ بدست آمد. از نظر عملکرد برگ در سطح بدون تنش خشکی، ژنوتیپ هندی دارای میانگین بالاتری بود، در حالی که در سطح بالاتر تنش خشکی (بیشتر از ۸- بار)، ژنوتیپ چینی عملکرد بالاتری را نشان داد. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ژنوتیپ چینی در سطوح بالاتر تنش، تحمل بیشتری از نظر عملکرد برگ از ژنوتیپ هندی دارد. براساس نتایج بیشترین میانگین صفات مرتبط با ریشه از جمله وزن تر و خشک، حجم، طول و چگالی در ژنوتیپ چینی در سطح ۴- بار و در ژنوتیپ هندی در ۲- بار مشاهده شدند. در هر دو ژنوتیپ تنش جزئی خشکی (۲- بار) منجر به افزایش میانگین استویوزاید و ربودیوزاید-A در مقایسه با تیمار بدون تنش شد، به طوری که بالاترین محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید در همین سطح تنش در ژنوتیپ چینی و هندی (به ترتیب ۲/۵۸ و ۲/۵۸ درصد و ۷/۸ و

۵/۹۶ درصد) بدست آمد. براساس نتایج رگرسیون گام به گام سطح ریشه و وزن تر برگ و عملکرد بیوماس کل از صفات اثرگذار در افزایش محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید بودند. نتیجه‌گیری: براساس نتایج، تنش خشکی شدید منجر به کاهش صفات رشدی، عملکردی، ویژگی‌های ریشه و محتوا و عملکرد دو گلیکوزید مورد بررسی شد. محتوای این دو گلیکوزید به‌عنوان متابولیت اصلی در گیاه استویا در سطح تنش خشکی جزئی (۲- بار) بیشترین سنتز را داشتند که می‌توان استنباط کرد که به‌عنوان متابولیت‌های تأثیرگذار در ایجاد تحمل به تنش ایفای نقش می‌کنند. بیشترین مقاومت در برابر تنش خشکی در ژنوتیپ چینی مشاهده شد، به‌طوری که در برخی از موارد عملکرد و محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در این ژنوتیپ بیشتر از ژنوتیپ هندی بود. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که تنش خشکی شدید به‌طور مستقیم بر عملکرد و محتوای گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا تأثیر کاهنده دارد و برخی از صفات مرتبط با ریشه و صفات عملکردی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای تحمل به تنش خشکی در این گیاه استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: استویا، استویوزاید، پلی‌اتیلن گلیکول، تنش خشکی، ربودیوزاید، سطح ریشه.

مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، به‌طور متداول با نام برگ عسلی شناخته می‌شود، یک گیاه چندساله اهل پاراگوئه است و در حال حاضر به‌عنوان یک منبع مهم از شیرین‌کننده‌های طبیعی بدون کالری محسوب می‌شود (Aghighi Shahverdi et al., 2018a؛ Aghighi Shahverdi et al., 2020). این گیاه به‌عنوان یک منبع خوب از کربوهیدرات‌ها، پروتئین، لیاف خام و مواد معدنی است (Schiatti-Sisó et al., 2023). استویا ممکن است به‌عنوان یک جایگزین احتمالی برای ساکارز در نظر گرفته شود که این موضوع می‌تواند مصرف قند ساده را کاهش دهد، کاهشی که برای جلوگیری از پوسیدگی دندان، چاقی، دیابت نوع ۲ و سایر اختلالات سلامت مطلوب است (Wang et al., 2023). این گیاه شامل گلیکوزیدهایی از جمله ربودیوزاید-A (Stevioside: Reb-A) و استویوزاید (Stevioside: Reb-B) و گلیکوزیدهای دیگری مانند ربودیوزاید-B (Rebaudioside-B)، ربودیوزاید-C (Rebaudioside-C)، ربودیوزاید-F (Rebaudioside-F) و دالکوزاید-A (Dulcoside-A) است که مجموعاً از ۷ تا ۱۶٪ متغیر می‌باشد (de Andrade et al., 2023؛ Afshari et al., 2022). تنش خشکی به‌عنوان محدودیت محیطی اصلی که حدود

۲۵٪ از سطح زمین را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در تولید اثرگذار است (Afshari et al., 2022). واکنش‌های گیاه به تنش خشکی شامل کاهش جوانه‌زنی، توقف رشد، کاهش عملکرد و تغییرات در سنتز متابولیت‌ها می‌شود (Sheikhalipour et al., 2023). تنش خشکی به چندین روش رشد، عملکرد، پایداری غشاء، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، تنظیمات اسمزی و فعالیت فتوسنتزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Pradhan et al., 2020؛ Lahijanian et al., 2023). هنگامی که گیاهان با کمبود آب مواجه می‌شوند، رویدادهای مختلفی رخ می‌دهد که منجر به تغییرات مختلفی در فرایندهای فیزیکی و بیوشیمیایی می‌شود، که از آن جمله می‌توان به تغییرات مورفولوژیکی در اندام هوایی و ریشه گیاه، میزان رشد، ظرفیت اسمزی بافت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (Aghighi Shahverdi et al., 2020؛ Lahijanian et al., 2023).

در طول تنش خشکی، تغییراتی در مورفولوژی، معماری و فیزیولوژی ریشه‌ها رخ می‌دهد تا جذب و نگهداری آب را افزایش دهد (Sofi et al., 2021). تغییرات در پارامترهای ریشه مانند طول ریشه، مساحت سطح، حجم و چگالی آن بر عملکرد جذب آب تأثیر می‌گذارد. سیستم ریشه‌های عمیق‌تر و گسترده‌تر می‌تواند حجم بزرگ‌تری از خاک را بررسی کند و

این، سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مانند استویا، شامل گلیکوزیدهای استویول، تحت تأثیر ویژگی‌های ریشه و صفات مورفولوژیکی گیاه قرار دارد. درک این تعاملات برای بهینه‌سازی تولید گیاهان و تولید ترکیبات بیولوژیکی در شرایط خشکی بسیار مهم است. از سوی دیگر، مطالعات مرتبط با ارزیابی پاسخ‌های رشدی، عملکردی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مابین ژنوتیپ‌های مختلف گیاه استویا بسیار اندک انجام شده است. از این رو، این پژوهش با هدف ارزیابی ارتباط محتوای گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید با صفات رشدی، عملکردی و خصوصیات ریشه در دو ژنوتیپ گیاه استویا (هندی و چینی) تحت تنش خشکی ناشی از کاربرد پلی‌اتیلن گلیکول انجام شد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و مواد گیاهی

این پژوهش به صورت آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۴۰۲ اجرا شد. تنش خشکی در هفت سطح صفر، ۲-، ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰- و ۱۲- بار با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG-6000) در محیط کشت هیدروپونیک (به صورت محلول به محیط اضافه شد) بر روی دو ژنوتیپ گیاه استویا (چینی و هندی) در قالب دو طرح جداگانه، ارزیابی گردید. به منظور اجرای آزمایش، گلدان‌هایی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری و قطر ۲۵ سانتی‌متری با مخلوط پومیس و پرلیت (به نسبت یک به یک) انتخاب و در هر گلدان تعداد سه نشاء یک‌دست (چهار تا شش برگی، ارتفاع ۸-۱۰ سانتی‌متر، تهیه شده از مزرعه زرگیاه استان فارس) در اوایل اردیبهشت‌ماه کشت شد. در طول اجرای آزمایش، تغذیه و اعمال تنش خشکی با استفاده از محلول هوگلند انجام شد که ترکیب آن در جدول ۱ ارائه شده است (Aghighi Shahverdi et al., 2019).

به راحتی به منابع آب عمیق‌تر دسترسی پیدا کند که به‌ویژه در شرایط خشکی مفید است (Kou et al., 2022). کاهش در پارامترهای رشدی و عملکردی گیاه استویا، از جمله ارتفاع بوته، تعداد و عملکرد برگ، عملکرد بیولوژیک و پارامترهای مرتبط با ریشه مانند طول، حجم و وزن خشک، تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی ناشی از کاهش آبیاری یا استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول توسط محققان مختلفی گزارش شده است که می‌توان به Lahijanani و همکاران (۲۰۲۳)، Sheikhalipour و همکاران (۲۰۲۳)، Afshari و همکاران (۲۰۲۲) و Kou و همکاران (۲۰۲۲) اشاره کرد.

تولید گلیکوزیدهای استویول به صفات مورفولوژیکی گیاه و ویژگی‌های ریشه و شرایط محیطی و اقلیمی و ژنوتیپ گیاه وابستگی شدیدی دارد (Ahmad et al., 2021). مطالعات نشان داده‌اند که پارامترهای ریشه مانند طول، چگالی و الگوهای شاخه‌بندی ریشه، در جذب آب و مواد غذایی تأثیر می‌گذارند و تولید گلیکوزیدهای استویول را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Aghighi Shahverdi et al., 2020). در پژوهشی گزارش شد که کم‌آبیاری در سطوح کم منجر به افزایش و در سطوح زیاد (تنش شدید) منجر به کاهش محتوای گلیکوزیدهای استویول از جمله ربودیوزاید-A و استویوزاید شد (Afshari et al., 2022). Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تنش خشکی ۳/۵- اتمسفر در مقایسه با تیمار شاهد (آبیاری نرمال) منجر به افزایش محتوای گلیکوزیدهای استویول از جمله ربودیوزاید-A و B، استویوزاید و دالکوزاید-A و عملکرد گلیکوزیدهای استویول شد، در حالی که تنش بالاتر از ۳/۵- اتمسفر کاهش میانگین صفات ذکر شده را در پی داشت.

پارامترهای مرتبط با ریشه گیاهان و ویژگی‌های مورفولوژیکی نقش مهمی را در تحت تأثیر قرار گرفتن پاسخ‌های گیاهان به تنش خشکی ایفاء می‌کنند و به بهبود کارایی جذب آب و مواد غذایی کمک می‌نمایند. علاوه بر

جدول ۱- ترکیب و مواد غذایی مورد استفاده در تهیه محلول هوگلند

Table 1. Nutritional composition used in Hoagland solution preparation

Chemical component	Source	Stock solution concentration	mL of stock solution.mL ⁻¹ of Hoagland solution
KNO ₃	KNO ₃ (2 M)	202 g.L ⁻¹	2.5
H ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄ (pH to 6.0) (1 M)	136 g.L ⁻¹	0.5
Ca(NO ₃) ₂	Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O (1 M)	236 g.0.5L ⁻¹	2.5
NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃ (1 M)	80 g.L ⁻¹	1
Iron	Sprint 138 iron chelate	15 g.L ⁻¹	1.5
MgSO ₄	MgSO ₄ •7H ₂ O (2 M)	493 g.L ⁻¹	1
H ₃ BO ₃	H ₃ BO ₃	2.86 g.L ⁻¹	1
MnCl ₂	MnCl ₂ •4H ₂ O	1.81 g.L ⁻¹	1
ZnSO ₄	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.22 g.L ⁻¹	1
CuSO ₄	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.051 g.L ⁻¹	1
Na ₂ MoO ₄	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.12 g.L ⁻¹	1

عملکرد برگ) و بیوماس کل برای هر گیاه محاسبه شد (Afshari *et al.*, 2022). در بخش زیرزمینی، تمامی ریشه‌ها با آب شسته شدند. به این منظور، خاک هر گلدان به‌طور جداگانه در یک تشت آب خیس شد و ذرات خاک متصل به ریشه‌ها با استفاده از محلول هگزا متافسفات سدیم جدا شدند. بلافاصله پس از آن، وزن تازه ریشه‌ها با استفاده از ترازوی دقیق اندازه‌گیری گردید. حجم ریشه‌ها نیز با تفاوت حجم ایجاد شده پس از قرار دادن آنها در حجم مشخصی از آب در داخل استوانه مدرج با دقت ۰/۱ میلی‌متر محاسبه شد. قطر ریشه و چگالی ریشه با استفاده از فرمول‌های جدول ۲ تعیین گردید و سایر ویژگی‌های ریشه‌ای مانند محتوای ریشه، نسبت وزن خشک ریشه به حجم خاک، نسبت وزن خشک ریشه به حجم ریشه و نسبت طول ریشه به وزن تازه ریشه (ظرافت ریشه) محاسبه شدند (Akhavan *et al.*, 2012؛ Aghighi, Shahverdi *et al.*, 2020).

تمامی گلدان‌ها تا قبل از تثبیت گیاهچه‌ها با آب مقطر آبیاری شدند. بعد از اطمینان از تثبیت گیاهچه‌های کشت شده (۱۵ روز بعد از کاشت)، اعمال تیمارهای خشکی با آبیاری، سه روز یک‌بار با ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند با ظرفیت اسمزی متفاوت، براساس تیمارهای طراحی شده انجام شد. میزان کاربرد PEG-6000 برای سطوح خشکی ۲-، ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰- و ۱۲- بار به ترتیب ۴۷/۸۲، ۷۱/۳۳، ۸۹/۴۶، ۱۰۴/۷۷، ۱۱۸/۲۸ گرم بدست آمد.

اندازه‌گیری صفات رشدی، عملکردی و مرتبط با ریشه پس از گذشت ۶۵ روز از کاشت، تمامی گیاهان داخل گلدان‌ها به‌طور کامل خارج شده و اندام‌های هوایی و زیرزمینی جدا شدند تا ویژگی‌های مورد نظر اندازه‌گیری شود. در بخش هوایی، ویژگی‌هایی مانند ارتفاع گیاه، تعداد برگ‌ها، تعداد شاخه‌ها، وزن تازه برگ، وزن خشک برگ (به‌عنوان

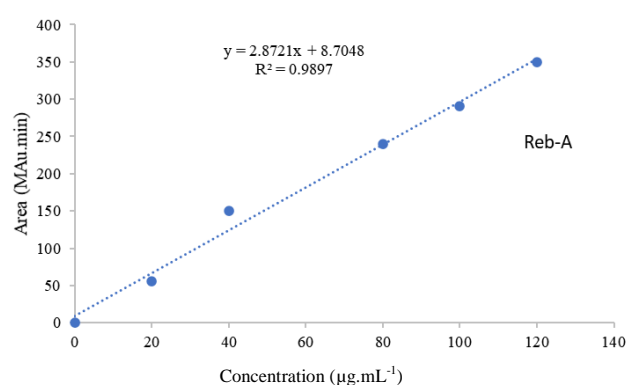
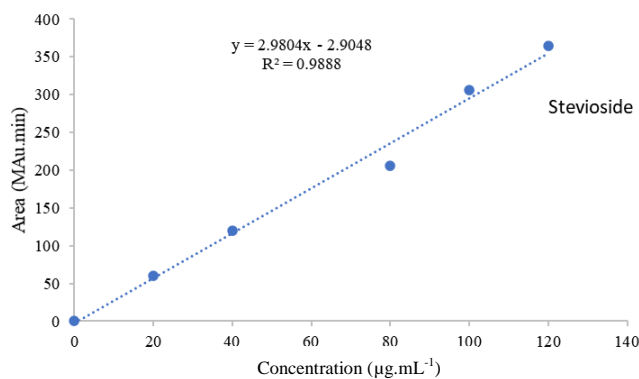
جدول ۲- محاسبه صفات ریشه

Table 2. Root traits calculation

Parameters	Formula	Reference
Root length (RL)	RL= (roots weight) × 0.890	Ganjali <i>et al.</i> (2003)
Root area (RA)	RA= 2 (root volume × π × RL) ^{0.5}	
Root diameter (RD)	RD= 4 × root fresh weight/(RL×π) ^{0.5}	

ستون C18 و دتکتور UV-Vis در طول موج ۲۰۲ نانومتر استفاده گردید. ابتدا، مقدار ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید. درجه حرارت ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و فاز متحرک شامل ۶۰٪ آب و ۳۵٪ استونیتریل با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه می‌باشد که با شرایط ایزوکراتیک از ستون عبور داده شد. سپس مقدار گلیکوزیدهای استویول که شامل ربودیوزاید-A و استویوزاید بود با استفاده از نرم‌افزار Chromstar 7.0 و با استفاده از معادله استاندارد محاسبه (شکل ۱) و به‌صورت درصد وزن خشک برگ گزارش شد (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2018b)؛ (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2019). تمام مواد استفاده شده در این اندازه‌گیری از گرید HPLC با خلوص بالا از Sigma Aldrich بودند.

اندازه‌گیری محتوای گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید برای اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویول، ابتدا برگ‌های استویا در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و بعد به‌وسیله آسیاب پودر گردید و مقدار ۰/۱ گرم از آن برای استخراج گلیکوزیدها استفاده شد. به هر نمونه از پودر گیاه سه میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس عصاره به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ گردید و با استفاده فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، صاف و ذخیره شد. از استونیتریل ۲۰٪ برای شستشوی مواد زاید استفاده شد. برای انجام کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد (Unicam Crystal 200 Series D2 Lamp (UK))، از



شکل ۱- منحنی استاندارد ربودیوزاید-A و استویوزید

Figure 1. Rebaudioside-A and stevioside standard curve

در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید. همبستگی ساده بین صفات مرتبط با محتوای مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A و صفات عملکردی و رشدی با استفاده از نرم‌افزارهای Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۳ و Minitab نسخه ۱۸ انجام شد. تجزیه رگرسیون گام به گام که در آن محتوای

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بعد از جمع‌آوری داده‌ها و آزمایش نرمال بودن، برای هر ژنوتیپ تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)

کرد که ژنوتیپ چینی در سطوح بالاتر تنش، تحمل قابل قبول تری از نظر عملکرد برگ در مقایسه با ژنوتیپ هندی داشت (جدول ۴). درصد کاهش میانگین عملکرد برگ در سطوح مختلف تنش خشکی در شکل ۲ ارائه شده است که نشان می‌دهد، میزان کاهش در ژنوتیپ هندی از ژنوتیپ چینی (در سطوح مشابه) بیشتر بود، به طوری که بیشترین کاهش در ژنوتیپ چینی ۵۹/۸۴٪ و در ژنوتیپ هندی ۸۷/۹۲٪ بدست آمد.

پارامترهای مرتبط با ریشه

نتایج نشان داد که پارامترهای مرتبط با ریشه از جمله وزن تر و خشک، حجم، طول، سطح، چگالی، وزن تر ریشه به حجم خاک و نسبت وزن خشک ریشه به حجم خاک در هر دو گونه چینی و هندی تحت تأثیر سطوح مختلف خشکی تفاوت معنی‌داری با هم داشتند (جدول‌های ۵ و ۶). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های ژنوتیپ چینی، بالاترین میانگین صفات وزن تر و خشک (۳۵/۲) و طول (۴/۹۱ گرم)، حجم (۳۴/۷ سانتی‌متر مکعب)، طول (۴/۳۷ سانتی‌متر)، سطح (۴۳/۶ سانتی‌متر مربع)، چگالی (۴۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب) و نسبت وزن تر و خشک ریشه به حجم خاک (۰/۲۵۵ و ۰/۰۳۶) مربوط به سطح خشکی ۴- بار بود. در حالی که بیشترین میانگین صفات ذکر شده (به ترتیب ۳۶/۱ و ۵/۲۹ گرم، ۲۰/۴ سانتی‌متر مکعب، ۴/۷۱ سانتی‌متر، ۳۳/۹ سانتی‌متر مربع، ۴۶/۲ گرم بر سانتی‌متر مکعب، ۰/۲۶۱ و ۰/۰۳۸) در ژنوتیپ هندی در سطح خشکی ۲- بار مشاهده شد (جدول‌های ۷ و ۸).

مجموع دو گلکوزید به‌عنوان متغیر وابسته و صفات رشدی و عملکردی و صفات مرتبط با ریشه به‌عنوان متغیر مستقل بودند با استفاده از نرم‌افزار Minitab انجام شد.

نتایج

صفات رشدی و عملکردی

نتایج نشان داد که صفات عملکردی و رشدی از جمله ارتفاع بوته، تعداد برگ، تعداد شاخه، وزن تر برگ، عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل در اثر تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری داشتند. البته در مورد تعداد شاخه در بوته در ژنوتیپ چینی تفاوت غیرمعنی‌دار بدست آمد (جدول ۳). سطوح صفر و ۲- بار خشکی دارای بالاترین میانگین صفات ذکر شده در هر دو ژنوتیپ بودند. به بیان دیگر، خشکی ۲- بار، منجر به کاهش معنی‌دار میانگین صفات نشد. در حالی که سطوح بالاتر تنش خشکی، کاهش معنی‌دار میانگین این صفات را در پی داشت. میزان کاهش صفات ارتفاع بوته در سطح تنش ۱۲- بار در مقایسه با شاهد به ترتیب در ژنوتیپ چینی و هندی ۲۷/۱۹٪ و ۴۲/۱۶٪، تعداد برگ در بوته ۶۰/۸۷٪ و ۶۷/۳۳٪، تعداد شاخه در بوته ۲۰/۳۵٪ و ۵۳/۰٪، وزن تر برگ ۶۶/۵٪ و ۳۷/۲۵٪، عملکرد برگ ۵۹/۸۴٪ و ۸۷/۹٪ و عملکرد بیوماس کل ۵۲/۵۱٪ و ۶۴/۱۹٪ بدست آمد (جدول ۴). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های بین دو ژنوتیپ، از نظر عملکرد برگ در سطح بدون تنش خشکی، ژنوتیپ هندی دارای میانگین بالاتری بود، در حالی که در سطوح بالاتر تنش خشکی (بیشتر از ۸- بار)، ژنوتیپ چینی عملکرد بیشتری را نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر صفات رشدی و عملکردی ژنوتیپ‌های چینی و هندی استویا

Table 3. ANOVA of drought stress effects on growth and yield traits of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes

S.O.V.	d.f.	M.S.											
		Plant height		Number of leaves		Number of branches		Leaf fresh weight		Leaf yield		Total biomass yield	
		Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian
Drought	6	78.27**	76.07**	514.7**	700.7**	0.09 ^{ns}	0.74*	59.85**	65.4*	3.93**	23.5**	17.54**	105.2**
Experimental error	20	28.16	32.30	171.3	247.5	0.26	0.39	26.26	30.8	1.68	7.72	7.77	39.6
C.V. (%)	-	6.67	14.05	14.01	18.58	27.88	23.59	23.83	14.12	19.97	22.74	18.33	21.36

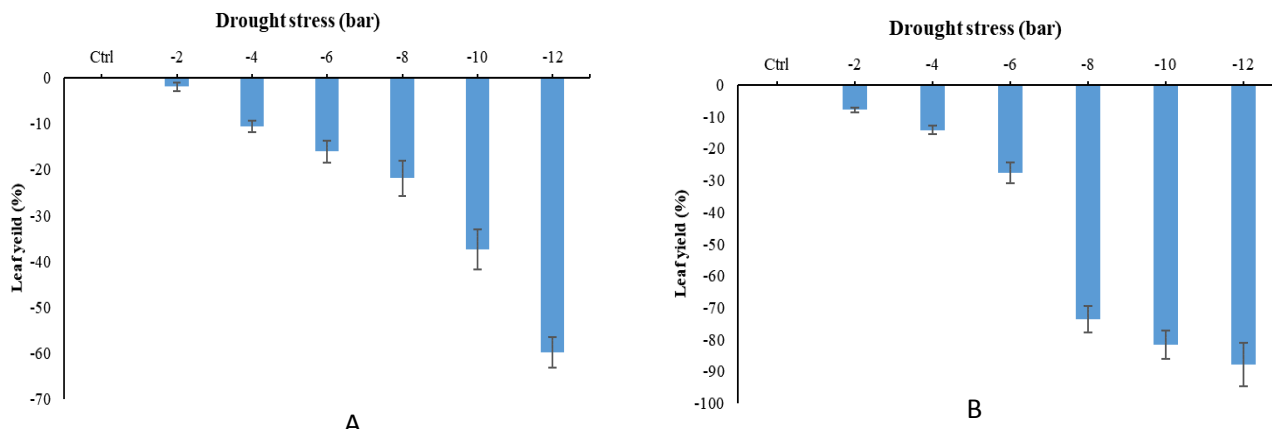
n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر صفات رشدی و عملکردی ژنوتیپ‌های چینی و هندی استویا

Table 4. Means comparison of drought stress effects on growth and yield traits of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes

Drought stress (bar)	Plant height (cm)		Number of leaves.plant ⁻¹		Number of branches.plant ⁻¹		Leaf fresh weight (g.plant ⁻¹)		Leaf yield (g.plant ⁻¹)		Total biomass yield (g.plant ⁻¹)	
	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian
0	44.5±1.2 ^a	35.1±3.4 ^a	52.4±3.4 ^a	60.3±4.0 ^a	-	2.83±0.29 ^a	20±3.0 ^a	35.7±2.9 ^a	5.39±0.27 ^a	7.4±0.03 ^a	13.9±2.2 ^a	24.3±1.3 ^a
-2	44.7±2.6 ^a	29.1±2.2 ^{ab}	51.8±1.5 ^a	50.3±9.3 ^{ab}	-	2.33±0.3 ^{ab}	17.7±1.7 ^{ab}	31.9±2.2 ^{ab}	5.28±1.03 ^a	6.82±0.75 ^{ab}	12.2±2.5 ^{ab}	21.5±0.9 ^a
-4	42.3±1.1 ^a	28.2±1.7 ^{bc}	39.8±3.1 ^b	48.7±3.1 ^{ab}	-	2.33±0.3 ^{ab}	17±2.3 ^{ab}	30.5±1.0 ^{a-c}	4.81±0.55 ^{ab}	6.34±0.18 ^{ab}	11.3±0.64 ^{a-c}	18.7±1.5 ^{ab}
-6	37.6±1.2 ^b	25.2±0.61 ^{b-d}	30.1±4.4 ^c	37.7±0.3 ^b	-	2.33±0.3 ^{ab}	15.4±2.8 ^{ab}	27.1±0.1 ^{b-d}	4.52±0.76 ^{ab}	5.36±0.79 ^b	10.2±1.8 ^{bc}	14.3±0.42 ^{bc}
-8	36.9±1.6 ^b	23.5±1.1 ^{b-d}	26.5±0.76 ^{cd}	38±1.5 ^b	-	2±0.3 ^{a-c}	12.7±1.6 ^{bc}	26.9±1.9 ^{b-d}	4.21±0.14 ^{ab}	1.95±0.25 ^c	9.6±0.46 ^{b-d}	14.4±0.37 ^{bc}
-10	33.2±0.88 ^{bc}	22±2.8 ^{cd}	24.4±2.3 ^{cd}	20.3±0.88 ^c	-	1.67±0.28 ^{bc}	11.7±2.8 ^{bc}	23.8±2.5 ^{cd}	3.37±0.34 ^{bc}	1.35±0.53 ^c	8.4±1.3 ^{cd}	9.2±1.2 ^c
-12	32.4±0.92 ^c	20.3±1.2 ^d	20.5±2.6 ^d	19.7±2.6 ^c	-	1.33±0.28 ^c	6.7±0.92 ^c	22.4±1.6 ^d	2.16±0.24 ^c	0.89±0.3 ^c	6.6±1.9 ^d	8.7±1.0 ^c
LSD =0.05	4.53	6.44	8.60	12.78	-	0.87	6.03	7.0	1.48	1.71	3.31	5.93

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).



شکل ۲- درصد تغییرات عملکرد برگ استویا تحت تنش خشکی در مقایسه با تیمار شاهد

در ژنوتیپ‌های چینی (A) و هندی (B)

Figure 2. Changes percentage in *Stevia rebaudiana* leaf yield under drought stress compared to control treatment in Chinese (A) and Indian (B) genotypes

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ چینی گیاه استویا

Table 5. ANOVA of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Chinese genotype

S.O.V.	d.f.	M.S.									
		Root fresh weight	Root volume	Root dry weight	Root length	Root area	Root diameter	Root density	RFW/SO ratio	RDW/SO ratio	Root fineness
Drought	6	263.8**	133.0**	6.08**	4.82**	290.8**	0.07 ^{ns}	449.0**	0.013**	0.00032**	0.0005 ^{ns}
Experimental error	20	93.26	55.64	2.04	1.62	102.0	0.09	151.4	0.004	0.0001	0.0005
C.V. (%)	-	18.69	25.90	16.10	16.11	20.54	10.16	16.04	18.69	16.11	18.24

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

Root fresh weight to soil volume ratio (RFW/SO ratio); Root dry weight to soil volume ratio (RDW/SO ratio)

خشکی بدست آمد. میزان کاهش وزن تر و خشک ریشه و حجم و طول ریشه در سطح ۱۲- بار در مقایسه با شاهد در ژنوتیپ چینی به ترتیب ۷۰/۹، ۶۰/۴، ۴۷/۲ و ۶۰/۴ درصد بود، در حالی که در ژنوتیپ هندی ۶۸/۰، ۶۴/۱، ۷۰/۱ و ۶۳/۹ درصد بدست آمد (جدول‌های ۷ و ۸).

در برخی از صفات، سطوح خشکی ۴- بار در ژنوتیپ هندی نیز دارای بالاترین میانگین بود. با افزایش محتوای PEG-6000 در محیط رشد، کاهش معنی‌داری در صفات ریشه مشاهده شد، به طوری که کمترین میانگین صفات مرتبط با ریشه در هر دو گونه در بالاترین سطح تنش

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ هندی گیاه استویا

Table 6. ANOVA of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Indian genotype

M.S.											
S.O.V.	d.f.	Root fresh weight	Root volume	Root dry weight	Root length	Root area	Root diameter	Root density	RFW/SO ratio	RDW/SO ratio	Root fitness
Drought	6	296.7**	275.8**	5.11**	4.04**	403.8**	0.142 ^{ns}	429.0**	0.015**	0.0002**	0.0018 ^{ns}
Experimental error	20	113.2	115.3	1.89	1.50	146.2	0.109	155.0	0.005	0.00009	0.0017
C.V. (%)	-	21.59	25.90	23.09	23.90	23.51	10.81	24.26	21.59	23.09	25.07

^{ns}, *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

Root fresh weight to soil volume ratio (RFW/SO ratio); Root dry weight to soil volume ratio (RDW/SO ratio)

جدول ۷- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ چینی گیاه استویا

Table 7. Means comparison of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Chinese genotype

Drought stress (bar)	Root fresh weight (g)	Root volume (cm ³)	Root dry weight (g)	Root length (cm)	Root area (cm ²)	Root density (g.cm ⁻³)	Fresh root weight to soil volume ratio	Dry root weight to soil volume ratio
0	23.4±2.6 ^{bc}	19.7±1.8 ^{bc}	3.72±0.35 ^{ab}	3.31±0.31 ^{ab}	28.6±2.6 ^{bc}	31±3.0 ^{bc}	0.169±0.019 ^{bc}	0.027±0.002 ^{ab}
-2	25.2±2.4 ^{ab}	29.3±6.4 ^{ab}	4.45±0.17 ^a	3.96±0.15 ^a	37.4±5.3 ^{ab}	34.8±2.2 ^{ab}	0.182±0.017 ^{ab}	0.032±0.001 ^a
-4	35.2±1.9 ^a	34.7±2.08 ^a	4.91±0.15 ^a	4.37±0.13 ^a	43.6±1.6 ^a	44±1.0 ^a	0.255±0.013 ^a	0.036±0.001 ^a
-6	16.8±3.3 ^{b-d}	16.3±1.44 ^c	2.77±0.59 ^{bc}	2.47±0.52 ^{bc}	22.3±3.1 ^{cd}	22.8±4.5 ^{cd}	0.122±0.024 ^{b-d}	0.02±0.004 ^{bc}
-8	13.2±2.11 ^{cd}	11.2±0.55 ^c	2.73±0.34 ^{b-d}	2.43±0.30 ^{b-d}	18.3±0.39 ^{cd}	20±2.7 ^{de}	0.096±0.015 ^{cd}	0.02±0.002 ^{b-d}
-10	9.7±3.0 ^d	11.5±0.37 ^c	1.75±0.28 ^{cd}	1.55±0.25 ^{cd}	14.9±1.0 ^d	13.7±2.4 ^{de}	0.07±0.022 ^d	0.013±0.002 ^{cd}
-12	6.8±2.3 ^d	10.4±0.32 ^c	1.47±0.06 ^d	1.31±0.06 ^d	13±0.17 ^d	10.6±1.8 ^e	0.049±0.016 ^d	0.011±0.0005 ^d
LSD = 0.05	10.29	11.95	1.26	1.12	10.48	10.73	0.07	0.009

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

تنش خشکی، سنتر این دو متابولیت با کاهش معنی‌داری در هر دو ژنوتیپ مواجه، به طوری که کمترین میانگین این دو ترکیب در بالاترین سطح تنش خشکی (۱/۸۴ و ۰/۸۳٪ و ۳/۹ و ۲/۲۲٪) به ترتیب در ژنوتیپ چینی و هندی مشاهده شد. میزان کاهش ربودیوزاید-A و استویوزاید در ژنوتیپ چینی ۳۵/۹٪ و ۳۱/۶٪ در سطح ۱۲- بار خشکی در مقایسه با شاهد بود. در حالی که در ژنوتیپ هندی ۶۴/۶٪ و ۶۰/۵٪ محاسبه شد. بنابراین در سطوح بالاتر تنش خشکی، محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید در ژنوتیپ چینی بیشتر از ژنوتیپ هندی بود (جدول ۱۰).

مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A دو ترکیب استویوزاید و ربودیوزاید-A از شاخص‌ترین ترکیبات گلیکوزیدهای گیاه استویا هستند (شکل ۳). نتایج نشان داد که محتوای این دو ترکیب تحت تأثیر تنش خشکی تفاوت معنی‌داری با هم داشتند و در بین دو ژنوتیپ هندی و چینی نیز تغییراتی نشان دادند (جدول ۹). به طور کلی، در هر دو ژنوتیپ، تنش جزئی خشکی (۲- بار) منجر به افزایش میانگین این دو ترکیب در مقایسه با تیمار بدون تنش شد. بالاترین محتوای ربودیوزاید-A و استویوزاید در همین سطح تنش در ژنوتیپ چینی و هندی به ترتیب با میانگین ۲/۵۸ و ۲/۵۸٪ و ۷/۸ و ۵/۹۶٪ بود. با افزایش شدت

جدول ۸- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریشه ژنوتیپ‌های هند و استویا

Table 8. Means comparison of drought stress effects on root characteristics of *Stevia rebaudiana* Indian genotype

Drought stress (bar)	Root fresh weight (g)	Root volume (cm ³)	Root dry weight (g)	Root length (cm)	Root area (cm ²)	Root density (g.cm ⁻³)	Fresh root weight to soil volume ratio	Dry root weight to soil volume ratio
0	33.2±5.5 ^{ab}	24.1±3.0 ^a	4.74±0.69 ^a	4.22±0.62 ^a	35.7±4.8 ^a	41.9±6.3 ^a	0.24±0.03 ^{ab}	0.034±0.005 ^a
-2	36.1±5.9 ^a	20.4±9.3 ^{ab}	5.29±0.64 ^a	4.71±0.57 ^a	33.9±7.0 ^{ab}	46.2±5.0 ^a	0.261±0.03 ^a	0.038±0.004 ^a
-4	28.2±1.5 ^b	13.7±2.6 ^{bc}	4.51±0.22 ^a	4.01±0.20 ^a	26±2.4 ^{bc}	37.7±1.3 ^{ab}	0.204±0.011 ^b	0.033±0.001 ^a
-6	25.7±1.5 ^{bc}	11.3±2.0 ^c	3.5±0.13 ^b	3.12±0.11 ^b	21±1.3 ^{cd}	31.6±1.5 ^{bc}	0.186±0.011 ^{bc}	0.025±0.0009 ^b
-8	18.8±1.9 ^{cd}	7.8±0.8 ^c	2.64±0.38 ^{bc}	2.35±0.34 ^{bc}	15±0.7 ^{de}	23.5±2.7 ^{cd}	0.136±0.014 ^{cd}	0.019±0.002 ^{bc}
-10	15.7±2.3 ^{de}	8±0.5 ^c	1.94±0.25 ^c	1.72±0.22 ^c	13.1±1.2 ^{de}	18.2±2.6 ^{de}	0.114±0.017 ^{de}	0.014±0.001 ^c
-12	10.6±0.84 ^e	7.2±0.4 ^c	1.7±0.14 ^c	1.52±0.13 ^c	11.7±0.63 ^e	14.1±1.1 ^e	0.077±0.006 ^e	0.012±0.001 ^c
LSD =0.05	7.86	8.30	0.98	0.87	8.04	8.55	0.057	0.0071

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

جدول ۹- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی بر محتوای استویوزید و ربودیوزید-A در ژنوتیپ‌های چینی و هند و استویا

Table 9. ANOVA of drought stress effects on stevioside (Stev) and rebaudioside-A (Reb-A) content of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes

S.O.V. Drought	d.f.	M.S.							
		Reb-A (%)		Stev (%)		Reb-A + Stev content (%)		Reb-A + Stev yield (g.plant ⁻¹)	
		Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian
Experimental error	6	1.22 ^{**}	0.20 ^{**}	7.37 ^{**}	6.86 ^{**}	14.25 ^{**}	9.23 ^{**}	0.18 ^{**}	0.064 ^{**}
C.V. (%)	20	0.43	0.07	2.82	2.14	5.01	2.86	0.06	0.022
S.O.V.	-	17.17	6.30	25.17	6.73	18.88	5.01	27.46	20.53

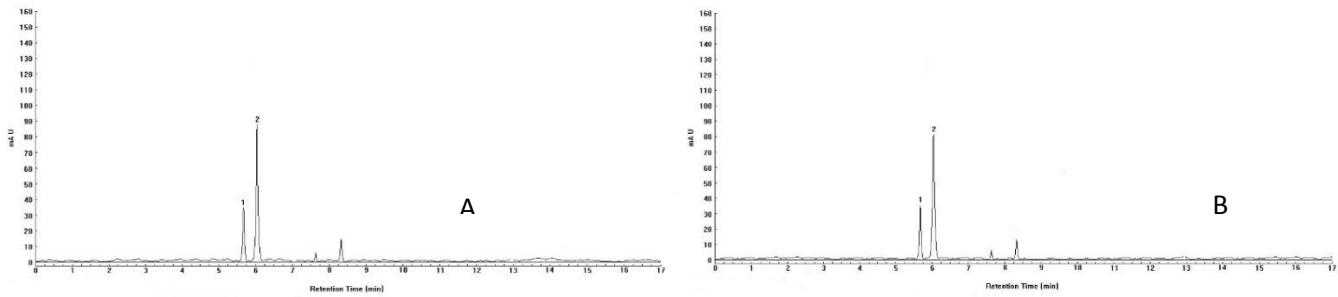
** : significant at 1% probability level

جدول ۱۰- مقایسه میانگین تأثیر تنش خشکی بر محتوای استویوزید و ربودیوزید-A در ژنوتیپ‌های چینی و هند و استویا

Table 10. Means comparison of drought stress effects on stevioside (Stev) and rebaudioside-A (Reb-A) content of *Stevia rebaudiana* Chinese and Indian genotypes

Drought stress (bar)	Reb-A (%)		Stev (%)		Reb-A + Stev content (%)		Reb-A + Stev yield (g.plant ⁻¹)	
	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian	Chinese	Indian
0	2.03±0.17 ^{bc}	2.35±0.01 ^{ab}	5.71±1.2 ^c	5.63±0.34 ^{ab}	7.74±1.4 ^c	7.98±0.35 ^a	0.417±0.10 ^b	0.589±0.018 ^a
-2	2.58±0.16 ^a	2.58±0.11 ^a	7.8±0.30 ^a	5.96±0.15 ^a	10.38±0.30 ^a	8.53±0.25 ^a	0.545±0.10 ^a	0.586±0.072 ^a
-4	2.39±0.13 ^a	2.04±0.09 ^b	6.77±0.42 ^b	4.1±0.04 ^{bc}	9.16±0.28 ^b	6.14±0.05 ^b	0.441±0.05 ^{ab}	0.392±0.015 ^b
-6	2.14±0.22 ^b	1.86±0.07 ^{bc}	4.39±0.29 ^d	3.14±0.15 ^{cd}	6.54±0.50 ^d	5±0.22 ^{bc}	0.295±0.04 ^c	0.269±0.054 ^b
-8	1.98±0.13 ^{bc}	1.38±0.10 ^{cd}	4.45±0.06 ^d	2.44±0.24 ^d	6.43±0.08 ^d	3.83±0.15 ^{cd}	0.271±0.004 ^c	0.074±0.019 ^c
-10	1.98±0.20 ^{bc}	1.18±0.01 ^{de}	4.02±0.04 ^d	2.4±0.19 ^d	6±0.16 ^{de}	3.57±0.28 ^{cd}	0.202±0.013 ^{cd}	0.049±0.031 ^c
-12	1.84±0.15 ^c	0.83±0.04 ^e	3.9±0.03 ^d	2.22±0.16 ^d	5.74±0.12 ^e	3.05±0.11 ^d	0.124±0.007 ^d	0.027±0.017 ^c
LSD =0.05	0.23	0.52	0.62	1.63	0.065	1.79	0.11	0.186

In each column, means (±SE) with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

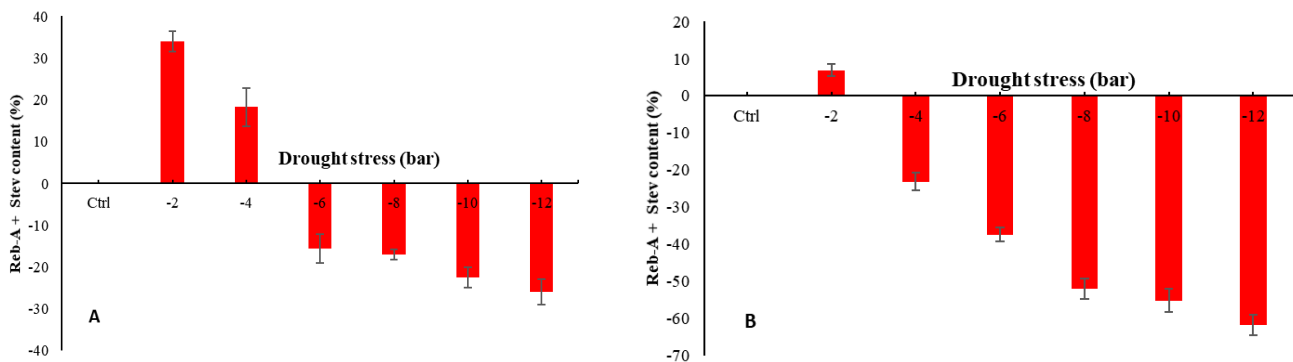


شکل ۳- کروماتوگرام HPLC دو ژنوتیپ هندی (A) و چینی (B) استویا برای ترکیب‌های استویوزید (پیک شماره ۱) و ربودیوزید-A (پیک شماره ۲)

Figure 3. HPLC chromatogram of *Stevia rebaudiana* Indian (A) and Chinese (B) genotypes for stevioside (Peak No.1) and rebaudioside-A (Peak No.2) compounds

میزان کاهش یا افزایش محتوای مجموع دو گلیکوزید تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ در شکل ۴ ارائه شده است که نشان می‌دهد میزان کاهش در ژنوتیپ چینی از سطح تنش خشکی ۶- بار اتفاق می‌افتد، در حالی که در ژنوتیپ هندی از سطح ۴- بار رخ داد. علاوه بر این، میزان کاهش در سطوح بالای تنش خشکی در ژنوتیپ هندی در مقایسه با چینی در سطوح یکسان خشکی، بیش از دو برابر بدست آمد.

بیشترین میانگین مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A در ژنوتیپ چینی مربوط به سطح ۲- بار (۱۰/۳۸٪) بود، در حالی که سطوح صفر و ۲- در ژنوتیپ هندی بالاترین میانگین این صفت را نشان داد (به ترتیب ۷/۹۸٪ و ۸/۵۳٪). افزایش میزان PEG-6000 در محیط رشد منجر به کاهش معنی‌دار محتوای مجموع این دو گلیکوزید شد، به طوری که کمترین محتوا مربوط به بالاترین سطح تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ چینی و هندی (به ترتیب ۵/۷۴ و ۳/۰۵٪) بود (جدول ۱۰).



شکل ۴- درصد تغییرات محتوای استویوزید + ربودیوزید-A گیاه استویا تحت تنش خشکی در مقایسه با تیمار شاهد در ژنوتیپ‌های چینی (A) و هندی (B)

Figure 4. Changes percentage in stevioside + rebaudioside-A content of *Stevia rebaudiana* under drought stress compared to control treatment in Chinese (A) and Indian (B) genotypes

مرتبط با ریشه (به غیر از قطر ریشه و ظرافت ریشه) در هر دو ژنوتیپ همبستگی مثبت و معنی‌داری با محتوای این گلیکوزیدها و عملکرد آنها دارند. در ژنوتیپ چینی، تعداد شاخه در بوته همبستگی غیر معنی‌داری داشت. به بیان دیگر، با افزایش میانگین بیشتر صفات مرتبط با ریشه، میزان سنتز این گلیکوزیدها در گیاه استویا در هر دو ژنوتیپ افزایش نشان داد.

نتایج رگرسیون گام به گام که در آن محتوای کل مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شده بود در جدول‌های ۱۳ و ۱۴ ارائه شده است. در ژنوتیپ چینی صفات عملکرد بیوماس کل، سطح ریشه و نسبت وزن تر ریشه به حجم خاک وارد مدل رگرسیونی شدند و در مجموع ۹۸/۹۱٪ از تغییرات محتوای مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A با این سه صفت قابل توجیه بود. در حالی که در ژنوتیپ هندی، صفات ارتفاع بوته، وزن تر برگ و سطح ریشه وارد مدل رگرسیونی شدند و در مجموع ۹۳/۷۹٪ از تغییرات قابل توجیه بود.

عملکرد مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A که حاصل ضرب عملکرد برگ در محتوای این دو گلیکوزید می‌باشد در هر دو ژنوتیپ تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی تفاوت معنی‌داری داشت. بیشترین عملکرد مجموع دو گلیکوزید در ژنوتیپ چینی و هندی (به ترتیب ۰/۵۴۵ و ۰/۵۸۶ گرم در بوته) مربوط به سطوح خشکی ۲- بار بود و افزایش شدت تنش خشکی منجر به کاهش عملکرد شد، به طوری که در ژنوتیپ چینی کمترین عملکرد مربوط به سطح ۱۲- بار خشکی (۰/۱۲۴ گرم در بوته) بود، در حالی که سطوح ۸، ۱۰- و ۱۲- بار در ژنوتیپ هندی، کمترین میانگین این صفت (به ترتیب ۰/۰۷۴، ۰/۰۴۹ و ۰/۰۲۷ گرم در بوته) را نشان داد (جدول ۱۰).

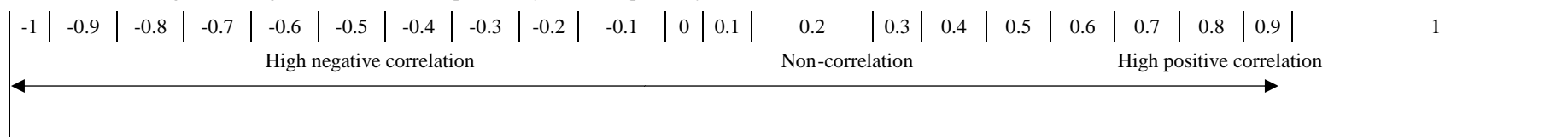
همبستگی ساده بین صفات و تجزیه رگرسیون گام به گام نتایج همبستگی ساده بین صفات رشدی و عملکردی با صفات مرتبط با مجموع استویوزاید و ربودیوزاید-A در هر دو ژنوتیپ چینی و هندی در جدول‌های ۱۱ و ۱۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که صفات رشدی و عملکردی و صفات

جدول ۱۱- همبستگی ساده صفات رشدی، عملکردی و ویژگی‌های ریشه با محتوای استویوزید + رבודیوزید-A ژنوتیپ چینی گیاه استویا تحت تنش خشکی

Table 11. Simple correlation between growth, yield, or root traits with stevioside (Stev) + rebaudioside-A (Reb-A) content in *Stevia rebaudiana* Chinese genotype under drought stress

	Reb-A	Stev	Reb-A + Stev content	Reb-A + Stev yield
Plant height	0.28 ^{ns}	0.52 ^{**}	0.5 ^{**}	0.69 ^{**}
Number of leaves per plant	0.54 ^{**}	0.68 ^{**}	0.68 ^{**}	0.82 ^{**}
Number of branches per plant	-0.01 ^{ns}	-0.11 ^{ns}	-0.1 ^{ns}	-0.06 ^{ns}
Leaf fresh weight	0.43 [*]	0.53 ^{**}	0.53 ^{**}	0.61 ^{**}
Leaf yield	0.5 ^{**}	0.59 ^{**}	0.59 ^{**}	0.9 ^{**}
Total biomass yield	0.44 [*]	0.55 ^{**}	0.55 ^{**}	0.75 ^{**}
Root fresh weight	0.61 ^{**}	0.7 ^{**}	0.7 ^{**}	0.77 ^{**}
Root volume	0.73 ^{**}	0.73 ^{**}	0.75 ^{**}	0.76 ^{**}
Root dry weight	0.71 ^{**}	0.81 ^{**}	0.81 ^{**}	0.75 ^{**}
Root length	0.71 ^{**}	0.81 ^{**}	0.81 ^{**}	0.75 ^{**}
Root area	0.76 ^{**}	0.8 ^{**}	0.82 ^{**}	0.8 ^{**}
Root diameter	0.24 ^{ns}	0.29 ^{ns}	0.29 ^{ns}	0.52 ^{**}
Root density	0.66 ^{**}	0.76 ^{**}	0.76 ^{**}	0.78 ^{**}
Fresh root weight to soil volume ratio	0.61 ^{**}	0.7 ^{**}	0.7 ^{**}	0.77 ^{**}
Dry root weight to soil volume ratio	0.71 ^{**}	0.81 ^{**}	0.81 ^{**}	0.75 ^{**}
Root fineness	-0.11 ^{ns}	-0.17 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.43 [*]

^{ns}, ^{*}, and ^{**}: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

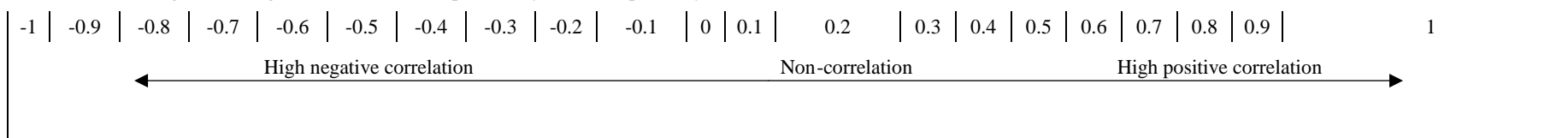


جدول ۱۲- همبستگی ساده صفات رشدی، عملکردی و ویژگی‌های ریشه با محتوای استویوزید + ربودیوزید-A ژنوتیپ هندی گیاه استویا تحت تنش خشکی

Table 12. Simple correlation between growth, yield, or root traits with stevioside (Stev) + rebaudioside-A (Reb-A) content in *Stevia rebaudiana* Indian genotype under drought stress

	Reb-A	Stev	Reb-A + Stev content	Reb-A + Stev yield
Plant height	0.89**	0.78**	0.85**	0.78**
Number of leaves per plant	0.86**	0.83**	0.87**	0.90**
Number of branches per plant	0.54**	0.56**	0.58**	0.57**
Leaf fresh weight	0.51**	0.55**	0.56**	0.67**
Leaf yield	0.83**	0.79**	0.84**	0.93**
Total biomass yield	0.75**	0.73**	0.76**	0.86**
Root fresh weight	0.99**	0.80**	0.89**	0.85**
Root volume	0.69**	0.87**	0.85**	0.93**
Root dry weight	0.95**	0.85**	0.92*	0.90**
Root length	0.95**	0.85**	0.92**	0.90**
Root area	0.85**	0.92**	0.94**	0.98**
Root diameter	0.15 ^{ns}	-0.14 ^{ns}	-0.06 ^{ns}	-0.13 ^{ns}
Root density	0.98**	0.84**	0.92**	0.89**
Fresh root weight to soil volume ratio	0.99**	0.80**	0.89**	0.85**
Dry root weight to soil volume ratio	0.95**	0.85**	0.92**	0.90**
Root fineness	-0.26 ^{ns}	0.05 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}

^{ns}, *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.



جدول ۱۳- تجزیه رگرسیون گام به گام در ژنوتیپ چینی استویا (محتوای استویوزید + ربودیوزید-A به عنوان متغیر وابسته و سایر صفات رشدی و عملکردی به عنوان متغیرهای مستقل)

Table 13. Stepwise regression analysis of *Stevia rebaudiana* Chinese genotype (stevioside + rebaudioside-A content as a dependent variable and other growth and yield traits as independent variables)

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	1.545	0.415	3.73	0.034
Total biomass yield (X1)	0.1984	0.0482	4.11	0.026
Root area (X2)	0.4152	0.0347	11.98	0.001
Fresh root weight to soil volume ratio (X3)	-49.94	5.91	-8.45	0.003

R-sq(adj) = 98.91%; Y = 1.545 + 0.1984 (X1) + 0.4152 (X2) - 49.94 (X3)

جدول ۱۴- تجزیه رگرسیون گام به گام در ژنوتیپ هندی استویا (محتوای استویوزید + ربودیوزید-A به عنوان متغیر وابسته و سایر صفات رشدی و عملکردی به عنوان متغیرهای مستقل)

Table 14. Stepwise regression analysis of *Stevia rebaudiana* Indian genotype (stevioside + rebaudioside-A content as a dependent variable and other growth and yield traits as independent variables)

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	-2.29	1.30	-1.77	0.035
Plant height (X1)	0.1444	0.0403	3.58	0.002
Leaf fresh weight (X2)	-0.0606	0.0327	-1.85	0.022
Root area (X3)	0.1724	0.0225	7.65	0.000

R-sq(adj) = 93.79%; Y = -2.29 + 0.1444 (X1) - 0.0606 (X2) + 1724 (X3)

بحث

نشده. براساس این نتایج می توان استنباط کرد که گیاه استویا به تنش خشکی تحمل متوسط رو به پایین دارد. در این زمینه، Karimi و همکاران (۲۰۱۵) و Afshari و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که سطوح پایین تر تنش خشکی منجر به اُفت منفی در رشد گیاه و وزن خشک برگ گیاه استویا نمی شود که با یافته های این پژوهش مطابقت دارد. به موجب تنش خشکی، بسته شدن روزنه ها، کاهش رشد برگ ها و کاهش تولید آسیمیلات ایجاد می شود که در نتیجه منجر به کاهش وزن خشک کل گیاه می گردد (Gorzi *et al.*, 2020).

Tardieu (۲۰۲۲) گزارش کرد که تنش خشکی موجب کاهش رشد اندام های مختلف گیاه، از جمله ریشه ها و برگ ها، کاهش سطح برگ، ارتفاع و وزن خشک می شود. کاهش تعداد و سطح برگ در شرایط تنش خشکی، باعث کاهش ناحیه سطحی تعرق، افزایش جذب آب از خاک و در نهایت مقاومت گیاه در برابر تنش می شود (Mahdavi *et al.*, 2020). کاهش سطح برگ می تواند ناشی از کاهش تقسیم سلولی و ریزش و پیری برگ باشد. افزایش

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی ناشی از کاربرد PEG-6000 در محیط رشد هر دو ژنوتیپ استویا، منجر به کاهش معنی دار ارتفاع بوته، تعداد برگ در بوته، وزن تر برگ، عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل شد. براساس نتایج، میزان کاهش میانگین این صفات با افزایش غلظت PEG-6000 رابطه مستقیمی داشت. به طوری که در سطوح پایین تر تنش خشکی (۲- و ۴- بار) میزان کاهش در بیشتر صفات غیر معنی دار بود، ولی کاهش معنی دار آماری از سطح ۶- بار در برخی از صفات از جمله عملکرد برگ و عملکرد بیوماس کل مشاهده شد. Afshari و همکاران (۲۰۲۲) به این نکته اشاره کردند که واکنش گیاه به تنش خشکی با مراحل رشد، شدت و زمان تنش، گونه های گیاهی و شرایط محیطی مرتبط است. در این مطالعه، ویژگی های رشدی و عملکردی به طور متقابل با تشدید تنش خشکی، به ویژه زیر ۶- بار اُفت معنی دار را نشان دادند. علاوه بر این، کاهشی در ویژگی های رشدی و عملکردی در سطح کمتر تنش خشکی نسبت به شرایط بدون تنش مشاهده

خشک ریشه به ساقه عمدتاً مربوط به کاهش بیشتر بیوماس اندام هوایی نسبت به ریشه در شرایط تنش خشکی است (Pradhan *et al.*, 2020). کمبود آب، تعداد برگ در بوته، اندازه هر برگ و طول عمر برگ را به دلیل کاهش ظرفیت آب در محیط رشد کاهش می‌دهد. اثر مشترک نامطلوب تنش خشکی در گیاهان، کاهش وزن تر و خشک برگ از طریق اختلال در تبادلات گازی برگ و نیز انتقال اسیملات‌ها و تخصیص ماده خشک است (Karimi *et al.*, 2019; Afshari *et al.*, 2022).

بر اساس نتایج، پارامترهای مرتبط با ریشه با افزایش شدت تنش خشکی کاهش معنی‌داری داشت. این کاهش در دو ژنوتیپ چینی و هندی از سطوح مختلفی اتفاق افتاد. در ژنوتیپ چینی بالاترین میانگین صفات در سطح خشکی ۴- بار مشاهده شد، در حالی که در ژنوتیپ هندی، بالاترین میانگین صفات مرتبط با ریشه در سطح خشکی ۲- بار بدست آمد. به بیان دیگر، سطوح کم تنش خشکی منجر به افزایش پارامترهای ریشه از جمله وزن تر و خشک، طول و حجم ریشه گردید و بعد از این سطوح خشکی، اُفت میانگین صفات رخ داده است، به طوری که کمترین پارامترهای مرتبط با ریشه در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۲- بار) مشاهده شد. Ma و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تنش خشکی بر مورفولوژی ساختار ریشه‌ها در گیاه استویا تأثیر می‌گذارد. در شرایط ملایم تنش خشکی، ریشه‌های استویا به افزایش ریشه‌های جانبی و طول می‌پردازند که این موضوع به گیاه امکان می‌دهد تا حجم بزرگ‌تری از محیط رشد را برای جذب آب دربرگیرد. با این حال، تنش خشکی شدید رشد ریشه را مهار می‌کند که منجر به کاهش بیوماس و سطح ریشه می‌شود. نتایج مشابهی در آزمایش‌های Pordel و همکاران (۲۰۱۵) و Gorzi و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه استویا گزارش شده است. Pordel و همکاران (۲۰۱۵) و Aghighi Shahverdi و همکاران (۲۰۲۰) به ترتیب تحت تنش خشکی و شوری گزارش کردند که پارامترهای مرتبط با ریشه از جمله وزن تر و خشک، حجم، طول، سطح، چگالی، وزن تر ریشه به حجم خاک و وزن خشک ریشه به حجم خاک در گیاه استویا تحت تنش شدید کاهش معنی‌داری داشتند. بر اساس نتایج، تنش خشکی جزئی (۲- بار) در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش منجر به ایجاد بالاترین میزان ربودیوزاید-A و استویوزاید و محتوا و عملکرد مجموع این دو گلیکوزید شد. در راستای نتایج بدست آمده، سایر پژوهشگران از جمله Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) و Afshari و همکاران (۲۰۲۲) نتایج مشابهی در گیاه استویا گزارش کردند. بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا از پلاستید شروع شده و در سیتوزول به پایان می‌رسد. مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت کائورن برای سنتز جیبرلین است. بنابراین، ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها انجام می‌شود و یک دی‌ترین است. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای شیرین در این گیاه با مسیر سنتز جیبرلین تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است (Gorzi *et al.*, 2020). به نظر می‌رسد که وجود گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا منجر به افزایش تحمل به تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی شود و دلیل افزایش میزان سنتز این ترکیبات در سطوح تنش خشکی ۲- بار این موضوع باشد (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2018b; Afshari *et al.*, 2022). Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که تولید و کیفیت گلیکوزیدهای استویول و سایر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی و عوامل محیطی و غیر محیطی قرار دارند. Aghighi Shahverdi و همکاران (۲۰۱۸b) و Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) نتیجه‌گیری کردند که گلیکوزیدها، نوعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای ساختار گسترده‌ای می‌باشند و در برخی موارد در متابولیسم اولیه گیاهان نقش دارند. از آنجایی که علت تولید چنین ترکیبات پرهزینه‌ای در گیاه استویا مشخص نیست، احتمال وجود نقش‌های دفاعی برای این ترکیبات در شرایط تنش وجود دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که پارامترهای رشدی و عملکردی و ویژگی‌های مرتبط با ریشه در سنتز دو گلیکوزید (ربودیوزاید-A و استویوزاید) اثرگذار هستند و

نسبت ریشه به ساقه عمدتاً مربوط به کاهش بیشتر بیوماس اندام هوایی نسبت به ریشه در شرایط تنش خشکی است (Pradhan *et al.*, 2020). کمبود آب، تعداد برگ در بوته، اندازه هر برگ و طول عمر برگ را به دلیل کاهش ظرفیت آب در محیط رشد کاهش می‌دهد. اثر مشترک نامطلوب تنش خشکی در گیاهان، کاهش وزن تر و خشک برگ از طریق اختلال در تبادلات گازی برگ و نیز انتقال اسیملات‌ها و تخصیص ماده خشک است (Karimi *et al.*, 2019; Afshari *et al.*, 2022).

بر اساس نتایج، پارامترهای مرتبط با ریشه با افزایش شدت تنش خشکی کاهش معنی‌داری داشت. این کاهش در دو ژنوتیپ چینی و هندی از سطوح مختلفی اتفاق افتاد. در ژنوتیپ چینی بالاترین میانگین صفات در سطح خشکی ۴- بار مشاهده شد، در حالی که در ژنوتیپ هندی، بالاترین میانگین صفات مرتبط با ریشه در سطح خشکی ۲- بار بدست آمد. به بیان دیگر، سطوح کم تنش خشکی منجر به افزایش پارامترهای ریشه از جمله وزن تر و خشک، طول و حجم ریشه گردید و بعد از این سطوح خشکی، اُفت میانگین صفات رخ داده است، به طوری که کمترین پارامترهای مرتبط با ریشه در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۲- بار) مشاهده شد. Ma و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تنش خشکی بر مورفولوژی ساختار ریشه‌ها در گیاه استویا تأثیر می‌گذارد. در شرایط ملایم تنش خشکی، ریشه‌های استویا به افزایش ریشه‌های جانبی و طول می‌پردازند که این موضوع به گیاه امکان می‌دهد تا حجم بزرگ‌تری از محیط رشد را برای جذب آب دربرگیرد. با این حال، تنش خشکی شدید رشد ریشه را مهار می‌کند که منجر به کاهش بیوماس و سطح ریشه می‌شود. نتایج مشابهی در آزمایش‌های Pordel و همکاران (۲۰۱۵) و Gorzi و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه استویا گزارش شده است. Pordel و همکاران (۲۰۱۵) و Aghighi Shahverdi و همکاران (۲۰۲۰) به ترتیب تحت تنش خشکی و شوری گزارش کردند که پارامترهای مرتبط با ریشه از جمله وزن تر و خشک، حجم، طول، سطح، چگالی، وزن تر ریشه به حجم خاک و وزن خشک ریشه به حجم خاک در گیاه استویا تحت تنش شدید کاهش معنی‌داری داشتند. بر اساس نتایج، تنش خشکی جزئی (۲- بار) در هر دو ژنوتیپ مورد آزمایش منجر به ایجاد بالاترین میزان ربودیوزاید-A و استویوزاید و محتوا و عملکرد مجموع این دو گلیکوزید شد. در راستای نتایج بدست آمده، سایر پژوهشگران از جمله Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) و Afshari و همکاران (۲۰۲۲) نتایج مشابهی در گیاه استویا گزارش کردند. بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا از پلاستید شروع شده و در سیتوزول به پایان می‌رسد. مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت کائورن برای سنتز جیبرلین است. بنابراین، ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها انجام می‌شود و یک دی‌ترین است. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای شیرین در این گیاه با مسیر سنتز جیبرلین تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است (Gorzi *et al.*, 2020). به نظر می‌رسد که وجود گلیکوزیدهای ربودیوزاید-A و استویوزاید به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا منجر به افزایش تحمل به تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی شود و دلیل افزایش میزان سنتز این ترکیبات در سطوح تنش خشکی ۲- بار این موضوع باشد (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2018b; Afshari *et al.*, 2022). Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که تولید و کیفیت گلیکوزیدهای استویول و سایر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی و عوامل محیطی و غیر محیطی قرار دارند. Aghighi Shahverdi و همکاران (۲۰۱۸b) و Gorzi و همکاران (۲۰۲۰) نتیجه‌گیری کردند که گلیکوزیدها، نوعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای ساختار گسترده‌ای می‌باشند و در برخی موارد در متابولیسم اولیه گیاهان نقش دارند. از آنجایی که علت تولید چنین ترکیبات پرهزینه‌ای در گیاه استویا مشخص نیست، احتمال وجود نقش‌های دفاعی برای این ترکیبات در شرایط تنش وجود دارد.

دارای تحمل بالایی بود. از نظر محتوای گلیکوزیدهای استویول نیز ژنوتیپ چینی در سطوح بالاتر تنش خشکی، میزان کاهش کمتری در مقایسه با ژنوتیپ هندی نشان داد. به نظر می‌رسد بین میزان کاهش کمتر گلیکوزیدهای استویول با میزان کاهش کمتر عملکرد برگ در ژنوتیپ چینی رابطه‌ای وجود داشته باشد. در این راستا، می‌توان استنباط کرد که وجود گلیکوزیدهای استویول بیشتر در ژنوتیپ چینی در شرایط وجود تنش خشکی در مقایسه با ژنوتیپ هندی، یکی از دلایل کاهش کمتر عملکرد برگ در این ژنوتیپ باشد. بر همین اساس، پژوهشگران بیان کردند که وجود گلیکوزیدهای استویول به نوعی سازوکار دفاعی گیاه در مقابله با تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی محسوب می‌شود (Aghighi Shahverdi *et al.*, 2018b; Afshari *et al.*, 2022).

تأثیر تنش خشکی بر صفات رشدی و عملکردی، پارامترهای مرتبط با ریشه و محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا بررسی شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث تغییرات معنی‌دار در این صفات گردید. همچنین، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف به طریق متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. بیشترین مقاومت در برابر تنش خشکی در ژنوتیپ چینی مشاهده شد، به طوری که عملکرد و محتوای مجموع این دو گلیکوزید در این ژنوتیپ بیشتر از ژنوتیپ هندی بود. همچنین، ارتباط مثبت و معنی‌داری بین صفات رشدی و عملکردی با محتوای این گلیکوزیدها مشاهده شد که نشان می‌دهد افزایش در میانگین این صفات منجر به افزایش سنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا می‌گردد. در نهایت، رگرسیون گام به گام نشان داد که صفاتی مانند عملکرد بیوماس کل و سطح ریشه در ژنوتیپ چینی و ارتفاع بوته و وزن تر برگ در ژنوتیپ هندی می‌توانند به‌عنوان صفات اثرگذار برای تعیین محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا استفاده گردند. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که تنش

همبستگی مثبتی بین این صفات وجود دارد. از بین ویژگی‌های ریشه در ژنوتیپ چینی سطح ریشه و نسبت وزن ریشه به حجم خاک و در ژنوتیپ هندی سطح ریشه وارد مدل رگرسیونی شدند که اثرگذاری بالایی در سنتز محتوای مجموع این دو گلیکوزید داشتند. علاوه بر این، وزن تر برگ، ارتفاع بوته و عملکرد بیوماس کل از صفات رشدی اثرگذار در محتوای مجموع این دو گلیکوزید بودند. به نظر می‌رسد ویژگی مورفولوژیکی ریشه در سنتز ربودیوزاید-A و استویوزاید بسیار تأثیرگذار می‌باشد که نیاز به بررسی‌های مولکولی و ژنومی بیشتری در این زمینه است. بیوستنژ گلیکوزیدهای استویول با بیان پانزده ژن تنظیم می‌شود. سنتز این ترکیبات ممکن است با استفاده از شار متابولیک از مسیرهای Methylethritol Phosphate (MEP) و mevalonate (MVA) انجام شود که هر دو در پلاستید انجام می‌گردد. سلول‌های مزوفیل برگ‌ها این دو متابولیت اصلی را تولید می‌کنند که به‌طور کلی در ریشه‌ها قابل شناسایی نیستند (Biswas *et al.*, 2024). علاوه بر این، چندین گلیکوزید استویول در ریشه گیاه استویا سنتز می‌شود. Afshari و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که بین صفات رشدی و عملکردی گیاه استویا با میزان سنتز استویوزاید-A و ربودیوزاید همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که با یافته‌های این پژوهش همخوانی دارد.

در مقایسه بین دو ژنوتیپ باید بیان کرد که از نظر صفات عملکرد برگ و بیوماس کل و بیشتر ویژگی‌های مرتبط با ریشه، ژنوتیپ هندی دارای برتری در مقایسه با ژنوتیپ چینی بود. در مورد محتوا و عملکرد مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید، تنش خشکی اثرگذار بود، به طوری که در سطح بدون تنش خشکی ژنوتیپ هندی میانگین بالاتری داشت ولی در شرایط تنش خشکی، ژنوتیپ چینی از میانگین بالاتر این صفات برخوردار بود. علاوه بر این، میزان کاهش عملکرد برگ در سطوح مختلف تنش خشکی در ژنوتیپ چینی کمتر از ژنوتیپ هندی بود. به بیان دیگر، از نظر این صفت ژنوتیپ چینی

می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای تحمل به تنش خشکی در این گیاه استفاده شوند.

خشکی به‌طور مستقیم بر عملکرد و محتوای مجموع ربودیوزاید-A و استویوزاید در گیاه استویا تأثیر معنی‌داری دارد و برخی از صفات رشدی و عملکردی

References

- Afshari, F., Nakhaei, F., Mosavi, S. and Seghatoleslami, M., 2022. Physiological and biochemical responses of *Stevia rebaudiana* Bertoni to nutri-priming and foliar nutrition under water supply restrictions. *Industrial Crops and Products*, 176: 114399.
- Aghighi Shahverdi, M., Omid, H. and Tabatabaei, S.J., 2018a. Effect of foliar application of selenium, boron and iron on some physiological traits and glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under salinity stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33(6): 1017-1033.
- Aghighi Shahverdi, M.A., Omid, H. and Tabatabaei, S.J., 2018b. Plant growth and steviol glycosides as affected by foliar application of selenium, boron, and iron under NaCl stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Industrial Crops and Products*, 125: 408-415.
- Aghighi Shahverdi, M.A., Omid, H. and Tabatabaei, S.J., 2019. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18: 355-360.
- Aghighi Shahverdi, M.A., Omid, H. and Damalas, C.A., 2020. Foliar fertilization with micronutrients improves *Stevia rebaudiana* tolerance to salinity stress by improving root characteristics. *Brazilian Journal of Botany*, 43: 55-65.
- Ahmad, N., Rab, A., Sajid, M., Ahmad, N., Fazal, H., Ali, M. and Egertsdotter, U., 2021. Sucrose-dependent production of biomass and low-caloric steviol glycosides in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Industrial Crops and Products*, 164: 113382.
- Akhavan, S., Shabanpour, M. and Esfahani, M., 2012. Soil Compaction and texture effects on the growth of roots and shoots of wheat. *Water and Soil*, 26: 12-18.
- Biswas, P., Kumari, A., Modi, A. and Kumar, N., 2024. Improvement and regulation of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Gene*, 891: 147809.
- De Andrade, M.V., Lucho, S.R., do Amaral, M.N., Braga, E.J., Ribeiro, P.R. and de Castro, R.D., 2023. Long-day photoperiodic requirements for steviol glycosides and gibberellins biosynthesis and bio-sweetener levels optimization in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Industrial Crops and Products*, 204: 117363.
- Ganjali, A., Kafi, M., Bagheri, A. and Ahmadi, F.S., 2003. Allometric relationships for root and shoot characteristics of chickpea seedlings (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Agriculture Sciences and Technology*, 18: 67-80.
- Gorzi, A., Omid, H. and Bostani, A., 2017. Morpho-physiological responses of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to various priming treatments under drought stress. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16: 4753-4771.
- Gorzi, A.R., Omid, H. and Bostani, A., 2020. Effects of chemical treatments (iron, zinc and salicylic acid) and soil water potential on steviol glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 39: 297-311.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L. and Angelini, L.G., 2015. The effect of soil moisture depletion on stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*, 183: 93-99.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Pompeiano, A., Guglielminetti, L. and Angelini, L., 2019. Plant growth retardants (PGRs) affect growth and secondary metabolite biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under drought stress. *South African Journal of Botany*, 121: 394-401.
- Kou, X., Han, W. and Kang, J., 2022. Responses of root system architecture to water stress at multiple levels: A meta-analysis of trials under controlled conditions. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1085409.
- Lahijanlian, S., Eskandari, M., Akhbarfar, G., Azizi, I., Afazel, M. and Ghobadi, C., 2023. Morphological, physiological and antioxidant response of *Stevia rebaudiana* under in vitro agar induced drought stress. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11: 100495.
- Libik-Konieczny, M., Michalec-Warzecha, Ż., Dziurka, M., Zastawny, O., Konieczny, R., Rozpadek, P. and Pistelli, L., 2020. Steviol glycosides profile in *Stevia rebaudiana* Bertoni hairy roots cultured under oxidative stress-inducing

- conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 5929-5941.
- Ma, Y., Dias, M.C. and Freitas, H., 2020. Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 591911.
 - Mahdavi Khorami, A., Masoud Sinaki, J., Amini Dehaghi, M., Rezvan, S. and Damavandi, A., 2020. Sesame (*Sesame indicum* L.) biochemical and physiological responses as affected by applying chemical, biological, and nano-fertilizers in field water stress conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 43: 456-475.
 - Pordel, R., Esfahani, M., Kafi, M. and Nezami, A., 2015. Response of *Stevia rebaudiana* Bertoni root system to waterlogging and terminal drought stress. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6: 238-247
 - Pradhan, N., Singh, P., Dwivedi, P. and Pandey, D.K., 2020. Evaluation of sodium nitroprusside and putrescine on polyethylene glycol induced drought stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni under in vitro condition. *Industrial Crops and Products*, 154: 112754.
 - Schiatti-Sisó, I.P., Quintana, S.E. and García-Zapateiro, L.A., 2023. Stevia (*Stevia rebaudiana*) as a common sugar substitute and its application in food matrices: an updated review. *Journal of Food Science and Technology*, 60: 1483-1492.
 - Sheikhalipour, M., Gohari, G., Esmailpour, B., Panahirad, S., Milani, M.H., Kulak, M. and Janda, T., 2023. Melatonin and TiO₂ application-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidant enzymes activities and secondary metabolites in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42: 2023-2040.
 - Sofi, P., Rehman, K., Gull, M., Kumari, J., Djanaguiraman, M. and Prasad, P., 2021. Integrating root architecture and physiological approaches for improving drought tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology Reports*, 26: 4-22.
 - Tardieu, F., 2022. Different avenues for progress apply to drought tolerance, water use efficiency and yield in dry areas. *Current Opinion in Biotechnology*, 73: 128-134.
 - Wang, Y., Luo, X., Chen, L., Mustapha, A.T., Yu, X., Zhou, C. and Okonkwo, C.E., 2023. Natural and low-caloric rebaudioside A as a substitute for dietary sugars: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22: 615-642.