نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، ص. ۷۸۰-۷۶۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.4, Winter 2020, P. 769-780
ISSN: 2008 - 4730

اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و ترکیبات فنلی در استویا

سیده فاطمه رسولی[1*]- منوچهر قلی پور[2]- کامبیز جهان‌بین[3] - حمیدرضا اصغری[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۳

چکیده

اسید سالیسیلیک و جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود بسیار مورد توجه می‌باشند. محلول‌پاشی با این ترکیبات باعث القا تنش کاذب و برانگیخته شدن پاسخ‌های دفاعی در گیاه شده و بدنبال آن تولید متابولیت ثانویه افزایش می‌یابد. این آزمایش به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر پراکسید هیدروژن، هدایت الکتریکی، فعالیت آنزیم‌های GPX، GST، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)، غلظت فنل کل، فلاونویید و آنتوسیانین در استویا در شرایط مزرعه‌ای انجام شد. آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک و ترکیب تیماری از هر دوی آنها بود. محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک و جاسمونیک غلظت پراکسید هیدروژن را در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد؛ بیشترین غلظت پراکسید هیدروژن در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با غلظت ۵/۴۶ میکرومول در بافت تر مشاهده شد؛ گیاه در پاسخ به محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPX و GST را در اغلب تیمارها افزایش داد؛ بیشترین میزان فعالیت آنزیم GPX در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک و تیمار ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین۰/۱۴۴ و بیشترین میزان فعالیت آنزیمGST در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۵ /۰ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۰/۳۵ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد؛ به دنبال افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی میزان هدایت الکتریکی در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) کمتر از شاهد بود؛ کمترین میزان هدایت الکتریکی در تیمار ۲۰ میکرومولار اسیدجاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۴۰ درصد مشاهده شد. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک فعالیت آنزیم PAL را در تیمارهای ترکیبی بیشتر افزایش داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL در تیمار ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. بیشترین میزان غلظت فنل کل و فلاونویید در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک غلظت آنتوسیانین را در تمام تیمارهای ترکیبی افزایش داد. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک توانست غلظت ترکیبات فلاونوییدی را به عنوان یکی از ترکیبات مهم استویا افزایش دهد. نکته قابل توجه آن است که در بیشتر صفات، تیمارهای ترکیبی اسید جاسمونیک و سالیسیلیک تأثیر بیشتری در افزایش فعالیت آنزیم PAL، غلظت فنل کل، فلاونویید و آنتوسیانین داشتند.

واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن، فلاونویید، GPX، GST

مقدمه

Stevia rebaudiana bertoni گیاهی علفی، چند ساله از خانواده‌ی Asteraceae و بومی پاراگوئه می‌باشد. استویا یکی از گیاهانی است که در دهه‌های اخیر به دلیل وجود ترکیبات شیرین‌کننده‌ای که در این گیاه وجود دارد، از نظر دارویی و اقتصادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گلیکوزیدهای استویا ۳۵۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز هستند (۱۲). این ترکیبات طبیعی از شیرین‌کننده‌های طبیعی بدون کالری می‌باشند که با توجه به مشکلات روزافزون ناشی از دیابت، چاقی، سکته‌های قلبی و مغزی استویا می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند باشد (۱).

یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری اکولوژی گیاهان زراعی و دانشیاران گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
(*- نویسنده مسئول: Email: f.rasouli86@gmail.com)
۳- دانشیار گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i4.81571

استفاده از الیسیتورها است. الیسیتورها مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین‌ها (phytoalexin) را در گیاه القا کنند (۳۱). استفاده از اسید سالیسیلیک (۲۵، ۲۶ و ۳۱) و جاسمونات‌ها (الیسیتور شیمیایی) به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا، برانگیخته شدن پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه بسیار مورد توجه می‌باشند (۳۱ و ۳۲). این مولکول‌های پیام‌رسان در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القا کننده آنزیم‌های خاص کاتالیزکننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مثل پلی‌فنل‌ها، آلکالوییدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند (۳۱). مطالعات متعددی بر نقش این دو هورمون بر میزان متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است، در گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) تحت اثر متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده است که تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنلی و فلاونویید تحت تأثیر نسبت‌های مختلف متحرک قرار داشته و نسبت به هم همبستگی نشان دادند و بیان‌گر نقش PAL در تولید ترکیبات فنیل‌پروپانویدی بود (۲۸). تیمار با متیل‌جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت در گیاهچه‌های ۴ برگی برنج سبب افزایش ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL و تجمع اسیدهای فنولیک گردید (۳). متیل‌جاسمونات در میوه‌های گوا (*Psidium guajava*) باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL شد، اما مقدار فنل کل را تحت تأثیر قرار نداده بود (۳۱). افزایش در غلظت فلاونویدها از کالوس گیاه *Thevetia Peruviana* در پاسخ به ترکیبی از ۱۰ میکرومولار اسید جاسمونیک – ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک گزارش شده است (۲۱). تحریک فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنلی هشت ساعت بعد از اعمال با اسید سالیسیلیک بر بافت سلولی گیاه *Salvia miltiorrhiza* گزارش شده است، همچنین گزارش شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD ، POD و CAT بعد از اعمال تیمار با اسید سالیسیلیک به شدت بهبود یافت، اثر تحریک‌کنندگی اسید سالیسیلیک بر تجمع ترکیبات فنلی در غلظت 5 mg/L ۲۲-۶/۲۵ بود، همچنین بین فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنلی همبستگی وجود داشت (۱۰). در یک پژوهش به منظور بررسی اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر آنزیم‌های محرک تنش اکسیداتیو، دفاعی و برخی مواد موثره، عملکرد و اجزای عملکرد در سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای گزارش شده است که محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر صفات اندازه‌گیری شده با اطمینان ۹۹ درصد اثرگذار بوده است. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز را در بیشتر تیمارها افزایش داد. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از جمله SOD در بیشتر تیمارها افزایش یافت. میزان ترکیبات غیرآنزیمی از جمله فنل کل، فلانوییید، و آنتوسیانین نیز در اغلب تیمارهای سرخارگل افزایش یافت. این ترکیبات که ترکیباتی فنیل‌پروپانوییدی می‌باشند به موازات افزایش آنریم PAL افزایش یافتند (۲۷). بنابراین این پژوهش به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، PAL و تغییرات ترکیبات فنلی در استویا در شرایط بدون تنش، به صورت مزرعه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

مشخصات خاک محل اجرای آزمایش: این آزمایش در یک باغ در شهرستان آمل در سال ۱۳۹۶ اجرا شد. قبل از انجام آزمایش از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک مزرعه نمونه‌برداری شده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در آزمایشگاه تعیین گردید. بر این اساس خاک مزرعه دارای بافت خاک سیلتی‌رسی، کربن آلی خاک ۲/۱۶ درصد، فسفر قابل جذب ۱۳/۵۴ پی‌پی‌ام، پتاسیم قابل جذب ۲۰۰ پی‌پی‌ام، نیتروژن کل ۰/۱۲ درصد، pH= ۷ و EC= ۰/۷ دسی‌زیمنس بر متر بود.

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

تیمارهای آزمایشی شامل تیمار۱: شاهد، ۲: 5ja (۵ میکرومولار اسید جاسمونیک)، ۳: 20ja (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک)،۴: 50ja (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک)،۵: 0.5 sa (۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)،۶: 1sa (۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۷: 5ja-0.5sa (۵ میکرومولار اسید جاسمونیک – ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۸: 5ja-1sa (۵ میکرومولار اسید جاسمونیک–۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)،۹: 20ja-0.5 sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک–۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۱۰: 20ja-1sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک– ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، ۱۱: 50ja-0.5sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک–۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک) و ۱۲: 50ja-1sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک–۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک). تیمارهای آزمایشی در جدول یک نشان داده شده است.

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

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

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

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

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

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

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

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

که در این فرمول C_1 و C_2 به ترتیب هدایت الکتریکی محلول قبل و بعد از جوش می‌باشد.

گایاکول پراکسیداز (GPX): استخراج عصاره، به روش (۱۶) و سنجش فعالیت آنزیم از روش (۵) استفاده شد. مخلوط واکنش به حجم ۳ میلی‌لیتر شامل ۲/۷ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH = ۶/۸، گایاکول ۰/۶ مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر)، آب اکسیژنه ۱/۲ مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، بود. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. بلانک فاقد آب اکسیژنه بود. افزایش جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر در ۱ دقیقه‌ی اول بعد از افزودن آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میکرومول تتراگایاکول تشکیل شده ضریب خاموشی (ε) برابر با $26/6\ m\ M^{-1}Cm^{-1}$ در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

استخراج عصاره‌ی گلوتاتیون S – ترانسفراز (GST)**:** جهت استخراج عصاره آنزیم از روش (۴) همراه با تغییراتی استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GST**:** اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به روش (۶) صورت گرفت. مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۵ (۸۷۰ میکرولیتر)، گلوتاتیون احیا شده (GSH) ۳/۶ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر)، ۱-کلرو، ۲ و ۴- دی نیترو بنزن یک میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر) و عصاره بود (۳۰ میکرولیتر) بود. افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و ضریب خاموشی (ε) برابر $9/6\ m\ M^{-1}Cm^{-1}$ با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. از فعالیت آنزیم در ۱ دقیقه اول برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید.

استخراج و اندازه‌گیری آنزیم PAL: سنجش آنزیم PAL بر طبق روش (۱۷) انجام شد. ۰/۰۵ گرم از بافت تر در۲ میلی لیتر بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۸ =pH) هموژن گردید. سپس هموژن در دمای ۴ °C ، سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر فنیل‌آلانین ۰/۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم با اسیدیته ۸ و ۶۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ °C که اوج فعالیت PAL است قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl ۶ مولار برای غیرفعال کردن PAL به مخلوط اضافه شد. شست‌و شوی نمونه با ۳ میلی‌لیتر اتیل استات انجام گردید. سپس نمونه در جریان هوا تبخیر و به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد اسید سینامیک تعیین شد. یک واحد از PAL برابر با یک میکروگرم از اسید سینامیک تولید شده در ساعت است .

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

سنجش فلاونوئیدها: سنجش فلاونوئیدها بر طبق روش (۱۸) انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ با ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی به نسبت حجمی ۹۹ میلی‌لیتر اتانول و ۱میلی‌لیتر اسید استیک گلایسال هموژن گردیده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، پس از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ °C قرار گرفت، سپس شدت جذب در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید.

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

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

نتایج و بحث

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

جدول ۲- تجزیه واریانس آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و ترکیبات فنلی در استویا تحت تاثیر محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و اسید جاسمونیک

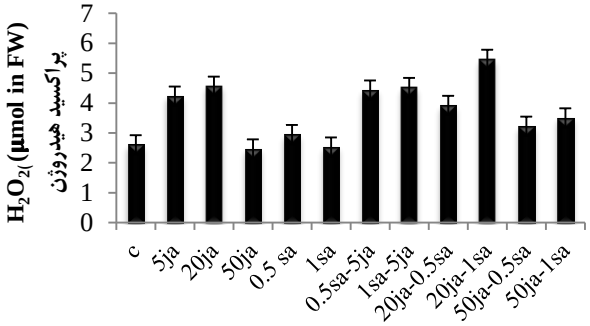
Table 2. Analysis of variance of antioxidant enzymes, PAL and phenolic compounds affected salicylic and jasmonic acid on stevia.

		Mean square							
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	پراکسید هیدروژن H2O2	هدایت الکتریکی EC	گایاکول پراکسیداز GPX	گلوتاتیون S- ترانسفراز GST	فنیل- آلانین- آمونیالیاز PAL	فنل کل Total phenol	فلاونویید Flavonoid	آنتوسیانین Anthocyanin
بلوک Block	2	0.0377 $^{n.s}$	12.5$^{n.s}$	0.00003 $^{n.s}$	0.00003 $^{n.s}$	7739 ^{ns}	72.17 $^{n.s}$	16.2 $^{n.s}$	0.0034$^{n.s}$
محلول‌پاشی Foliar application	11	2.581**	635.86**	0.003 **	0.004 **	87084.5**	3505.7**	1448**	0.89**
خطا Error	22	0.281	6.45	0.0003	0.001	2514	154.4	13.1	0.04
CV (%)		5.2	3.24	4.04	4.66	6.4	4.8	5	9.7

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

**معنی‌داری در سطح ۱ درصد و n.s عدم معنی‌داری

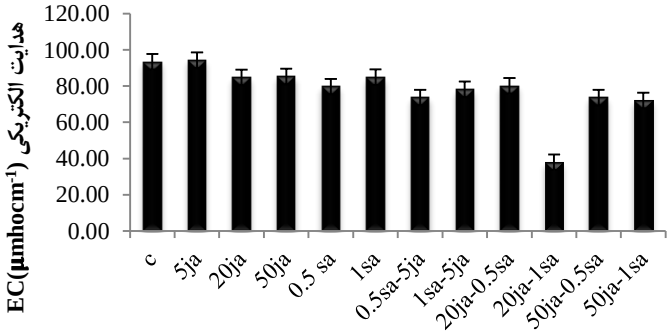
پراکسید هیدروژن: روند تغییرات پراکسید هیدروژن تحت اثر محلول‌پاشی در شکل ۱ ارائه شده است. محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در ۹ تیمار نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان غلظت پراکسید هیدروژن در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک – یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده گردید که غلظت آن ۵/۴۶ میکرومول در بافت تر بود. وقتی مولکول‌های پیام‌رسان اسید جاسمونیک و سالیسیلیک به صورت خارجی بکار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده، موجب القای تنش کاذب در گیاه، بیان و فعالیت یک سری از ژن‌های دفاعی می‌گردند (۸ و ۷). در این بررسی نیز محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در اغلب تیمارها (۹ تیمار) نسبت به شاهد شد.



شکل ۱- اثرمحلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان پراکسید هیدروژن برگ استویا، LSD= ۰/۳۲

Figure 1- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on hydrogen peroxide concentration in stevia leaf, LSD=0.32.

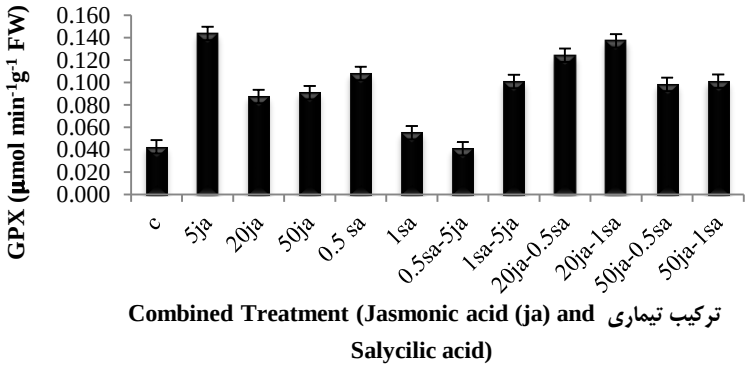
هدایت الکتریکی: هدایت الکتریکی شاخصی از پایداری غشاها می‌باشد؛ همان‌طور که نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان می‌دهد بیشتر تیمارهای محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک (۱۰ تیمار) میزان هدایت الکتریکی کمتری نسبت به شاهد داشته‌اند یا به عبارت دیگر از پایداری غشای بیشتری نسبت به شاهد برخوردار بوده‌اند (شکل ۲). افزایش میزان پراکسیدهیدروژن در اغلب تیمارها نسبت به شاهد سبب افزایش میزان هدایت الکتریکی نگردید که می‌توان به افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی (شکل‌های ۳، ۴، ۶، ۷ و ۸) که پالاینده گونه‌های فعال اکسیژن هستند نسبت داد ؛ فعالیت آنها مانع از تولید و انباشتگی رادیکال‌های آزاد و خسارت به اسیدهای چرب غیراشباع غشاهای سلولی گردید. در نهایت این تغییرات مانع از اختلال در عملکرد غشاء، کاهش ویسکوزیته، نفوذپذیری و نشت مواد از غشاء سلول گردید.



شکل ۲- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر هدایت الکتریکی برگ استویا، LSD=٤/٣

Figure 2- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on electrical leakage in stevia leaf, LSD=4.3.

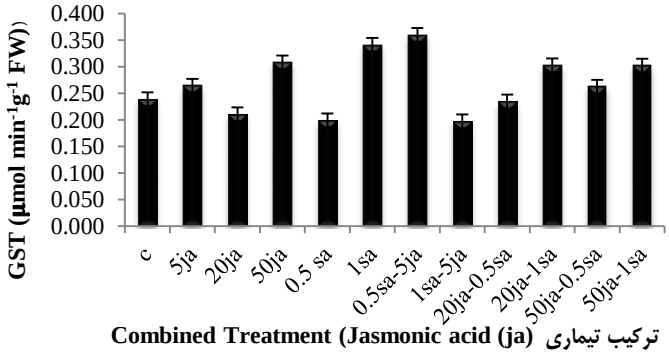
فعالیت آنزیم GPX: گیاه در جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی خود از جمله فعالیت آنزیم GPX را در اغلب تیمارها (۱۰ تیمار) افزایش داد (شکل ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک، ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین۰/۱۴۴ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. گزارش شده است که متیل‌جاسمونات باعث افزایش فعالیت آنزیم GPX در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) گردیده است (۲۲). تیمار با متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار در گیاه جنسینگ (*Saponins Tti pterpenoid*) فعالیت آنزیم GPX را در روز سوم، پنجم و هفتم افزایش داد و در روز نهم به اوج فعالیت رسید (۳۲).



شکل ۳- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم GPX برگ استویا، LSD= ۰/۰۰۶

Figure 3- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on GPX enzyme activity in stevia leaf, LSD=0.006

فعالیت آنزیم GST: شکل ۴ مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم GST را تحت اثر محلول‌پاشی نشان می‌دهد. محلول‌پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم GST در ۷ تیمار بیشتر از شاهد شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک – ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۰/۳۵ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر و در تیمار شاهد ۰/۲۴ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بود. GSTگیاهی نقش مهمی را در سنتز متابولیت‌های ثانویه نظیر آنتوسیانین و سینامیک اسید ایفا می‌کند. رنگدانه‌های آنتوسیانین در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند و در واکوئول جای می‌گیرد. فعالیت B Z 2- سبب انتقال Cianidin -3-glucoside به واکوئل می‌گردند، جایی که آنتوسیانین به رنگ قرمز یا بنفش دیده می‌شود. B Z 2- (Bronze 2) نوعی از GST می‌باشد که سبب تشکیل ترکیبات GSH–آنتوسیانین می‌گردند که به این فرم اجازه‌ی انتقال به واکوئل با پمپ گلوتاتیون را می‌گیرد، افزایش فعالیت آنزیم GST می‌تواند سبب افزایش برخی از متابولیت‌های ثانویه گردند (۲۰ و ۲۴).

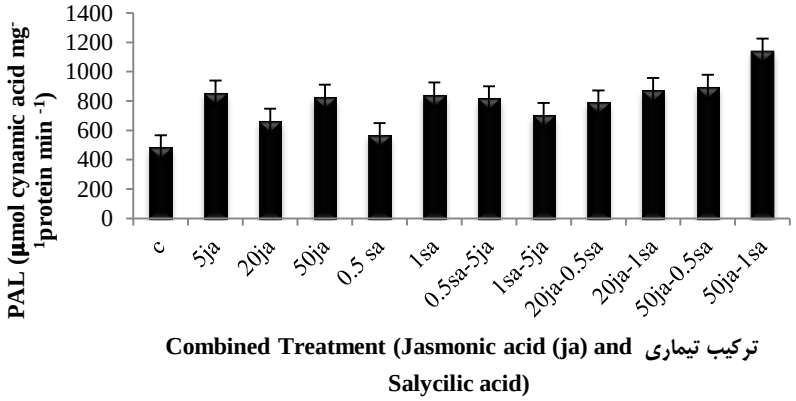


شکل ٤- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم G-S-T برگ استویا، LSD= ۰/۰۱۳

Figure 4- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on G-S-T enzyme activity in stevia leaf, LSD=0.013

فعالیت آنزیم PAL: محلول‌پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) نسبت به شاهد گردید (شکل ۵)، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ترکیبی ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۱۱۴۰ میکرومول سینامیک اسید بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه حاصل گردید. فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان پراکسیدهیدروژن و فعالیت آنزیم GST داشت (داده‌ها نشان داده نشد)؛ آنزیم PAL آغازگر مسیر فنیل‌پروپانوییدی می‌باشد که L – فنیل‌آلانین را با دآمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (۲ و ۹). افزایش فعالیت آنزیم PAL که اولین آنزیم مسیر

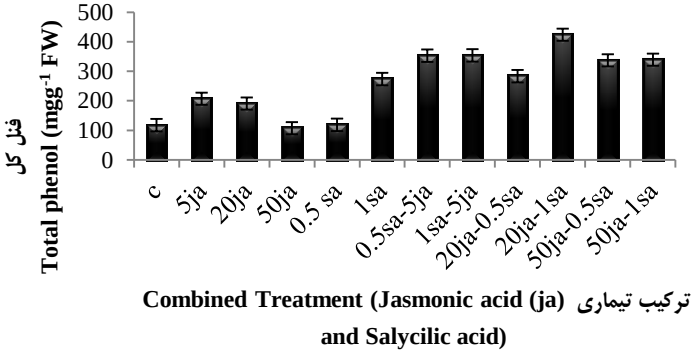
بیوسنتزی ترکیبات فنلی است در واکنش به الیسیتورها در بررسی‌های (۲، ۹، ۲۸ و ۳۲) گزارش شده است. فعالیت آنزیم PAL حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است. آنزیم PAL می‌تواند به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان نیز در نظر گرفته شود، زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (۲۸).



شکل ۵- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم PAL برگ استویا، LSD= ۸٤/۹

Figure 5- The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application on PAL enzyme activity in stevia leaf, LSD=84.9.

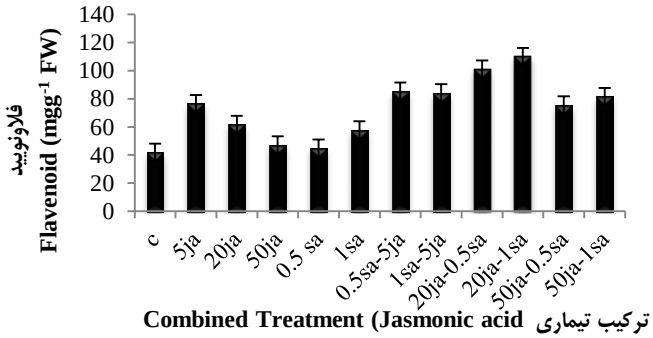
فنل کل: محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت فنل کل در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد شد، نکته حائز اهمیت آن است که میزان افزایش فنل کل بیشتر در تیمارهای ترکیبی نسبت به استفاده‌ی جداگانه آنها مشاهده گردید (شکل ۶)؛ بیشترین میزان فنل کل نیز در تیمار ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک +۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین ۴۲۳/۷ میلی‌گرم بر گرم بافت تر مشاهده گردید. بین تغییرات PAL و فنل کل همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح پنج درصد مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشد). کاربرد متیل‌جاسمونات مقدار ترکیبات فنلی را در سیب‌زمینی، مارچوبه و لوبیا سبز افزایش داده است (۳۲ و ۱۹). محققین علت افزایش ترکیبات فنلی در تیمار با متیل‌جاسمونات را اثر این ماده بر فعالیت آنزیم PAL و افزایش فعالیت این آنزیم نسبت داده اند از آن‌جا که این آنزیم یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌باشد (۷، ۲۸ و ۳۲)، به نظر می‌رسد که در تحقیق حاضر نیز افزایش فعالیت این آنزیم یکی از دلایل افزایش مقدار ترکیبات فنلی در گیاه استویا باشد. استویا دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد قند خون و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد. گزارش شده است که این خواص به سبب حضور ترکیبات فنلی در استویا می‌باشد که دارای خاصیت ربایش و پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۴). محققین وجود یک رابطه مثبت بین کاربرد خارجی متیل جاسمونات و سنتز ترکیب‌های فنلی، را به عنوان بخشی از واکنش دفاعی گیاه گزارش نمودند (۱۴).



شکل ٦- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل برگ استویا، LSD= ۲۱

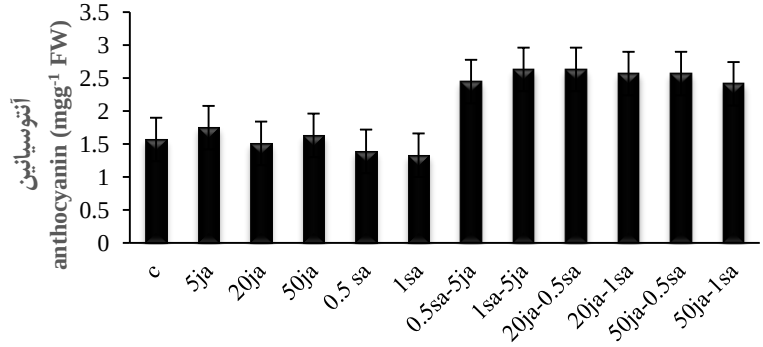
Figure 6. The effect of jasmonic acid and salicylic acid foliar application effect on total phenol content in stevia leaf, LSD=21.

روند تغییرات فلاونویید: محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت فلاونویید در بیشتر تیمارها (۹ تیمار) نسبت به شاهد گردید (شکل ۷). بیشترین میزان فلاونویید در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک – ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک با میانگین‌های ۱۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید. فلاونویدها به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی خود به طور مستقیم با وارد شدن به واکنش‌های احیایی و به طور غیرمستقیم به وسیله کی لیت کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند و مانند بسیاری از پلی‌فنل‌های دیگر جمع‌کننده‌ی رادیکال-های آزاد هستند، زیرا به عنوان گروه‌های قوی دهنده‌ی الکترون و پروتون‌دهنده فعالیت می‌کنند (۲۹ و ۳۰). خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونویدها به اثر بازدارندگی آنها در تنفس میتوکندریایی بر می‌گردد (۲۹). ایزوفلاونویدها (ایزوفلاون‌ها) فعالیت ضد میکروبی دارند. ایزوفلاونویدها به خاطر نقش فیتوالکسینی‌شان به خوبی شناخته شده‌اند، فیتوآلکسین‌ها ترکیبات ضدمیکروبی هستند که در پاسخ به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی ایجاد می‌شوند، این ترکیبات گسترش عوامل بیماری‌زای مهاجم را محدود می‌کنند. ازاین رو دارای ارزش دارویی نیز می‌باشند (۱۳).



شکل ۷- اثر محلول‌پاشی اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونویید برگ استویا، LSD= ٦/١٢

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



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

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

روند تغییرات آنتوسیانین: شکل ۸ روند تغییرات آنتوسیانین را تحت اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت آنتوسیانین در همه‌ی تیمارهای ترکیبی گردید. آنتوسیانین‌ها (فلاونویدهای رنگی)، گلیکوزیدهایی هستند که در موقعیت کربن شماره‌ی ۳ خود و در برخی مواقع سایر موقعیت‌ها واجد قند هستند (۳۱). آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین گروه از

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

نتیجه‌گیری کلی

بیشترین میزان فنل کل و فلاونویید در تیمار ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک – ۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و آنتوسیانین در همه‌ی تیمارهای ترکیبی مشاهده گردید و با افزایش فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت ومعنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان دادند (داده‌ها نشان داده نشد). استویا دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد قند خون و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد. گزارش شده است که این خواص به سبب حضور ترکیبات فنلی در استویا می‌باشد که دارای خاصیت ربایش و پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد. بنابراین افزایش ترکیبات فنلی تحت تأثیر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در گیاه استویا مفید می‌باشد.

منابع

1-Ashok Kumar F., Yadav S., Singh D., Dhyani P., and Ahuja S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana (Bertoni)*]. Plant Science Journal, 91: 1-27.

2-Bagal U.R., Leebens mack J.H., Walter Lorenz W., and Dean J.F.D. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. BMC Genoms, 13: (3) 1471-2164.

3-Bi H.H., Zeng R.S., Su L.M., An M., and Luo S.M., 2007. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. Journal of Chemical Ecology – Springer, 33(5): 1089-1103 -

4- Carlberg I., and Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. Methode Enzymol, 113: 484-490.

5- Chance B., and Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol, 11: 764-755.

6-Carmanol F., Sinet P.M., Rapin J., and Jerome H. 1981. Glutathione S-transferase of humen red blood cells assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: iperbillirubinemia and impaired renal function. Clinica chimica Acta Journal, 117 (3): 209-217.

7- Chan Z., and Tian S. 2006. Induction of H_2O_2 metabolizing enzyme and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry. Postharvest Biology, Technology, 39: 314-320.

8-Chen J., Cheng Z., and Zhong S. 2007. Effect of exogenous salicylic acid on growth and H_2O_2- metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress. Journal of Environment Science, 19: 44-49.

9-Divya P., Puthusseri B., and Neelwarne B. 2013. The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compound in foliage of Coriander. Food ScienceTechnology, 56: 101-110

10 -Dong J., Wan G., and Liang Z. 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. Journal of Biotechnology, 148: 99-104

11-Goyal R., Samsher K., and Goyal S.K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 61 (1): 1-10.

12-Gupta P., Sharma S., and Saxena S. 2015. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. Applied Biochemistry and Biotechnology- Springer; 176(3): 863-74.

13- Haji_Mehdipour H., Khanavi M., Shkrchy M., Abadi Z., and Pirali-Hamadani M. 2008. The investigation of best method for phenolic compound extraction in *Echinacea purpurea*. Journal of Medicinal Plant, 8: 145-152.

14. Heredia J.B., and Cisneros-Zevallos L. 2009. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on PAL activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. Post Biology Technology, 51(2): 242-249.

15- Jana S., and Choudhuri M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Botany, 12: 342-354.

16- Kar M., and Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.

17-Kovacik J., and Bklejdus B. 2012. Tissue and method specificities of phenylalanine ammonia-lyase assay. Plant Physiology Journal, 169: 1317-1320

18-Krizek D.T., Britz S.J., and Mirecki R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiology Plantarum, 103: 1-7.

19-Kumari G. J., Reddy A.M., Naik S. T., Kumar S.G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P.C., and Sudhakar C. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase enzymes in peanut seedlings. Biologia Plantarum, 50: 219-226

20- Marrs K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferase in plants. Plant Physiol*ogy*, Plant Molecular Biology, 47:127–58

21-Mendoza D., Cuaspud O., Ariasa J.P., Ruiz O., and Arias M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of Thevetia peruviana. Biotechnology Reports, (19): 1-19

20-Mikkelsen M. D., Petersen B. L., Glawischnig E., Jensen A. B., Andreasson E., and Halkier B. A. 2003. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. Plant Physiology Journal, 131(1): 298-308.

23- Mita S., Murano N., Akaike M., and Nakamura K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin those are inducible by sugars. Plant Journal, 11:841-851.

24- Moons A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). Plant Hormones; 72: 155-202.

25- Popova L., Ananieva E., Hristova V., Christov K., Georgieva K., Alexieva V., and Stoinova Z.H. 2003. Salicylic acid and methyl jasmonte induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress *Bulg*. Journal of Plant Physiology, 13: 133-152.

26- Rao M.V., Paliyath G., Ormord D.P., and Watkins C.B. 1997. Influence of salicylic acid on H2O2 production, oxidative stress and H2O2 metabolizing enzymes Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H_2O_2. Plant Physiology, 115: 137-149.

27-Rasouli F., Gholipuor M., Jahanbin K., and Asghari H.R. 2018. Effect of salicylic acid and jasmonic acid on induction of oxidative stress, increasing resistance and yield of *Echinacea purpurea* L. Crop Plant Production, 11(2): 109-122. (In Persian)

28-Samadi S., Ghasemnezhad A., and Alizadeh M. 2014. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. Journal of Plant Production Research, 21: 135-148.

29- Sangtarash M.H., Qaderi M.M., Chinnappa C.C., and Reid D.M. 2009b. Carotenoid differential sensitivity of canola (*Brassica napus)* seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. Environmental and Experimental Botany, 66 (2): 212-219

30- Suzuki A., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., and Mittler R. 2011. Respiratory burs toxi dases: theeng in esof ROS signaling. *Curr* Opin. Plant Biology, 14, 691–699

31-Taiz L., and Ziger A. 2006. Plant Physiology. 13, pp: 619-6230

32-Wasternack C., and Hause B. 2013. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. Annals of Botany, 2013; 111: 1021±1058

33- Yan B., Dai Q., Liu X., Huang S.h., and Wang Z. 1996. Flooding induce membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in Corn leaves. Plant and Soil Journal, 179:261-268.

34- Zhao J.L., Davis C., and Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances Journal – Elsevier, 23: 283–333.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.4, Winter 2020, P. 769-780
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، ص. ۷۸۰-۷۶۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

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

F. Rasouli [1*]-M. Gholipoor [2]-K. Jahanbin[3]- H.R. Asghari[4]

Received: 28-08-2019
Accepted: 04-12-2019

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

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

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

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

1-PhD Educated and Associate Professors, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood
(*-Corresponding Author Email: f.rasouli86@gmail.com)
3-Associate Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood

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

Keywords: Flavenoid, GPX, GST, H_2O_2.