University of Birjand

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 16, No. 4, pp. 1043-1058 (Winter 2024)

https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.5273.2131

Original article

Effect of drought stress and nitrogen fertilizer on the growth and yield of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in the second year of growth

R. Beheshtizadeh[1], M.E. Ghobadi[2*], H. Ghamarnia[3]

1. M.Sc. in Agronomy, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Sciences and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Author, Associate Prof., Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Sciences and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Professor, Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

Received 21 April 2022; Accepted 8 July 2022

Extended abstract

Introduction

Stevia is a perennial herb with sweet leaves, about 300 times sweeter than sucrose and today cultivated in many parts of the world. Drought stress and nitrogen deficiency are the most important environmental stresses that limit the production of this plant and have adverse effects on plant growth and development and other metabolic processes. The effect of drought stress on the plant depends on the type of plant, species, intensity, duration and growth stage of the plant. With the onset of drought decrease leaf water and stomatal conduction, and as it intensifies, loses permeability of the leaf cell membrane and damages. On the other hand, with the closure of the stomata due to lack of water is difficult and the entry of carbon dioxide into the leaves and in general, photosynthesis is reducing. Plant nutrition in drought conditions is also of special importance and proper nutrition in this situation can increase growth and stress tolerance. This element is the most important component of photosynthetic pigment proteins and has a great effect on leaf size and area.

Materials and methods

Therefore, in order to investigate the effect of drought stress and nitrogen fertilizer on the growth and yield of stevia, an experiment was conducted in greenhouse of Campus of Agricultural and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, during 2016. Factorial experiment was conducted in a Completely Randomized Design (CRD) with three replications. Treatments included drought stress at three levels (no stress, mild stress and severe stress) and nitrogen fertilizer at five levels (0, 50, 100, 150 and 200 kg.ha^{-1}) from urea source. Irrigation time for non-stress, mid and severe stress were 50, 65 and 80%, respectively, respectively from drainage of usable moisture in the soil. The size of the Cultivation space was 50 × 50 × 50 cm (length, width and height) and they were made of cement. The irrigation system was drip irrigation. the first and second harvest were on the May 23 and September 6, 2016, respectively. Traits were examined including yield and yield components, photosynthetic pigments, relative water content (RWC), water use efficiency (WUE), soluble sugars, proline, superoxide dismutase

* Corresponding author: Mohammad Eghbal Ghobadi; E-Mail: eghbalghobadi@yahoo.com

© 2024, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

(SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT). Data were analyzed using SAS and MSTAT-C software and the means were compared using the LSD test at a probability level of 5%.

Results and discussion

The results showed that the drought stress and nitrogen had a significant effect on biomass, leaf dry matter, shoot dry matter, chlorophyll a and b, carotenoids, relative water content, water use efficiency, soluble sugars, proline and enzyme Superoxide dismutase, peroxidase and catalase. The highest amount of leaf dry matter in non-stressed treatments and applying 400 $kg.ha^{-1}$ N in the first and second cutting were 20.4 and 17.1 $g.pl^{-1}$, respectively, and the lowest amount of leaf dry matter in severe stress treatments and applying 400 kg N ha^{-1} the first and second cutting were 6.81 and 5.85 $g.pl^{-1}$, respectively. With increasing amounts of nitrogen increased chlorophyll a, b, a + b and carotenoids in the first and second cutting. The amount of chlorophyll a, b, a + b and carotenoids was higher in the second cutting, but in carotenoids the values were equal in both cutting. Also, with increasing drought stress decreased the RWC in the first and second cutting and in the non-drought stress in the first and second cutting were 68.4% and 70.4%, and in the severe stress were 55.0% and 58.3%, respectively. Mean comparison of the interactions (stress × nitrogen) on WUE and proline showed that in conditions non-stress and using 200 kg ha^{-1} nitrogen had the highest WUE. WUE in the first and second cutting were 1.94 and 0.65 $g.kg^{-1}$, respectively. In this experiment, the amount of superoxide dismutase in the first and second cutting increased with increasing drought stress, but on the contrary, the amount of peroxidase in the second cutting decreased with increasing drought stress. In addition, with the increase of N, the superoxide dismutase in the first and second cutting and also the amount of peroxidase increased in the second cutting.

Conclusion

In general, it can be concluded that stevia production in the second year has a good yield under non-drought stress. In addition, the use of nitrogen in conditions non-stress increased leaf yield. Leaf yield under mid stress with nitrogen application was not very significant. Under drought stress reduced leaf yield and was more severely with nitrogen utilization. Stevia is a summer plant with high water uses. It is recommended to pay attention to the amount of water available in summer and usually have a shorter irrigation cycle than other summer crops in the region, which is economically viable.

***Keywords*:** Antioxidants, Photosynthetic pigments, RWC, Water use efficiency

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد شانزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۲

https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.5273.2131

مقاله پژوهشی

اثر تنش خشکی و کود نیتروژن بر رشد و عملکرد استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در سال دوم رشد

رقیه بهشتی‌زاده[۱]، محمداقبال قبادی[۲*]، هوشنگ قمرنیا[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زراعت، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳. استاد، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدان‌ها
رنگیزه‌های فتوسنتزی
کارایی مصرف آب
محتوای نسبی آب برگ

تاریخ دریافت:
۱۴۰۱/۰۲/۰۱

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۱/۰۴/۱۷

تاریخ انتشار:
زمستان ۱۴۰۲

۱۰۵۸-۱۰۴۳ :۱۶(۴)

چکیده

استویا گیاهی چندساله با برگ‌های شیرین که حدود ۳۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز (شکر) بوده و امروزه در نقاط زیادی در دنیا کشت می‌گردد. تنش خشکی و کمبود نیتروژن از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محدودکننده تولید این گیاه بوده و اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو گیاه و سایر فرآیندهای متابولیکی دارد. ازاین‌رو، به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی و کود نیتروژن بر رشد و عملکرد استویا، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، در سال ۱۳۹۵ اجرا گردید. فاکتورها شامل تنش خشکی (بدون تنش، تنش ملایم و تنش شدید) و کود نیتروژن (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار) بودند. زمان آبیاری برای بدون تنش، تنش ملایم و شدید به ترتیب ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد تخلیه رطوبت قابل‌استفاده در خاک بودند. نتایج نشان داد که تنش خشکی و میزان نیتروژن بر صفات زیست‌توده، ماده خشک برگ، ماده خشک ساقه، کلروفیل‌های a، b و کارتنوئیدها، محتوای نسبی آب برگ، کارایی مصرف آب، قندهای محلول، پرولین و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز اثر معنی‌داری داشتند. بیشترین ماده خشک برگ در تیمار بدون تنش خشکی و مصرف ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در چین اول و چین دوم به ترتیب ۲۰/۴ و ۱۷/۱ گرم در بوته و کمترین مقدار ماده خشک برگ در تیمار تنش شدید و مصرف ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در چین اول و دوم به ترتیب ۶/۸۱ و ۵/۸۶ گرم در بوته به دست آمد. به‌طورکلی نتایج نشان داد که تولید برگ استویا در شرایط آب و هوایی کرمانشاه با مصرف آب زیاد امکان‌پذیر بوده و در شرایط تنش خشکی در چین اول و چین دوم به ترتیب ۶۶/۶ و ۶۶/۳ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان دادند.

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni از خانواده آستراسه، گیاهی بوته‌ای علفی و چندساله است. این گیاه دارای برگ‌های شیرین بوده و علت آن وجود ترکیبات گلیکوزیدی دی‌ترپنی است و میزان شیرینی آن را حدود ۳۰۰ برابر شکر تخمین زده‌اند (Chaturvedula et al., 2011; Durán et al., 2013). گونه ربادیانا (rebaudiana) دارای شیرین‌ترین برگ و بیشترین سطح زیر کشت در دنیا را به خود اختصاص داده است. این گونه دارای استویوساید و ربادیوساید به ترتیب ۱۰-۵ و ۴-۲ درصد است که عوامل مهم شیرینی برگ هستند. در کل، غلظت گلیکوزیدها تحت تأثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد و در دامنه ۲۰-۴ درصد وزن خشک متغیر است (Abou-Arab et al., 2010; Yadav et al., 2011; Kumar et al., 2013).

* نگارنده پاسخگو: محمداقبال قبادی. پست الکترونیک: eghbalghobadi@yahoo.com

علاوه بر شیرینی برگ در استویا (با میزان کالری صفر)، این گیاه دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، متعادل‌کننده انسولین، ضد سرطان، کاهنده بیماری‌های قلبی (به دلیل داشتن فنل بالا)، ضدالتهاب، ضدپوسیدگی دندان و تقویت‌کننده حافظه و ضد اسهال است (Woelwer-Rieck et al., 2010; Muanda et al., 2011). چین، بیشترین تولید استویا در جهان را داراست و تولید آن در سایر کشورها ازجمله ژاپن، کره، هند، برزیل، مکزیک، آمریکا، کانادا و سایر کشورها نیز بالاست (Pal et al., 2015).

عملکرد گیاهان تحت تأثیر تنش خشکی دچار تغییر می‌شود. تأثیر تنش خشکی بر گیاه به نوع گیاه، گونه، شدت، مدت و مرحله رشدی گیاه بستگی دارد. با شروع خشکی، آب برگ و هدایت روزنه‌ای کاهش‌یافته و با تشدید آن غشای سلولی برگ، تراوایی خود را ازدست‌داده و آسیب می‌بینند. از طرفی، با بسته شدن روزنه‌ها در اثر کمبود آب، ورود دی‌اکسید کربن به برگ، با مشکل مواجه و در کل، فتوسنتز کاهش می‌یابد. همه این اتفاقات باعث محدودیت در کارکرد فتوسیستم II می‌شود (Yousfi et al., 2016; Chrysargyris et al., 2016). همچنین با افزایش تنش خشکی، محتوای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در اثر تنش اکسیداتیو کاهش می‌یابد (Armand et al., 2011) که باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و افزایش نفوذپذیری می‌شود. در این وضعیت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد تا بتوانند آسیب‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کم کنند (Anjum et al., 2012).

یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر خشکی، افزایش قندهای محلول و پرولین است که باعث حفظ غشای سلولی، تورژسانس سلولی و پتانسیل اسمزی، ممانعت از تخریب پروتئین‌ها و درنهایت تنظیم اسمزی می‌شوند. پرولین تجمع یافته باعث می‌شود که گیاه به مدت کوتاهی بعد از کمبود رطوبت زنده بماند و گیاه بتواند بعد از اتمام تنش، رشد خود را از سر بگیرد (Wu et al., 2008).

تغذیه گیاه در شرایط خشکی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و تغذیه مناسب در این وضعیت می‌تواند باعث افزایش رشد و تحمل به تنش شود. در میان عناصر پرمصرف در گیاهان، نیتروژن در حدود دو درصد وزن خشک گیاهان را تشکیل می‌دهد و کمبود این عنصر بیش از سایر عناصر بر رشد و عملکرد گیاهان تأثیر دارد. این عنصر جزء اصلی بسیاری از اجزای سلول گیاهی ازجمله کلروفیل، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک بوده و تأثیر زیادی در اندازه و سطح برگ دارد (Odlare et al., 2008).

منشأ استویا پاراگوئه است این گیاه روزکوتاه، با دمای مطلوب رشد ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد (Vasilakoglou et al., 2016)، چند سالی است که وارد چرخه زراعت و تولید در ایران شده است. پاراگوئه دارای اقلیمی نیمه گرمسیری و مرطوب اما کشور ما خشک و نیمه‌خشک است، پس طبیعی است که در معرض خشکی قرار می‌گیرد. از طرفی، زمانی که گیاه از آب کافی برخوردار نباشد مدیریت نیتروژن برای رشد مطلوب تغییر خواهد کرد و در خیلی از موارد باعث کاهش کارایی مصرف آب و نیتروژن می‌شود (Reis et al., 2015; Ramesh et al., 2006). با توجه به آنچه ذکر شد، عملکرد استویا بشدت تحت تأثیر تنش خشکی و میزان مصرف نیتروژن تغییر می‌کند. بر این اساس، این آزمایش به‌منظور بررسی اثرات تنش خشکی و مصرف نیتروژن بر عملکرد و برخی صفات فیزیولوژیک طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی و نیتروژن بر خصوصیات رشد و عملکرد گیاه دارویی استویا در سال دوم رشد استویا، آزمایشی در فضاهای کشت اختصاصی یا گلدانی و در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه در سال ۱۳۹۵ انجام شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل تنش خشکی (بدون تنش خشکی، تنش ملایم و تنش شدید (به ترتیب در زمان ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد تخلیه رطوبت قابل‌استفاده گیاه) و مقدار کود نیتروژن (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار) از منبع اوره بودند. بافت خاک از نوع سیلتی‌رسی (جدول ۱) بود. میزان رطوبت خاک در این بافت بر اساس بررسی‌های ساکستون و رالز (Saxton and Rawls, 2006) در زمان ظرفیت زراعی ۴۱ درصد و در زمان نقطه پژمردگی ۲۷ درصد است. پس زمان آبیاری بر اساس میزان کاهش رطوبت خاک بین ظرفیت زراعی (۱۰۰ درصد) و نقطه پژمردگی (صفر درصد) صورت گرفت.

اندازه فضاهای کشت (گلدان) یا هر کرت ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر (طول، عرض و ارتفاع) و از نوع بتونی (ویبره شده و بدون هرگونه نشتی) بودند. سیستم آبیاری به‌صورت کنترل‌شده و میزان آب ورودی و خروجی (آب زهکش) در هر

محیط کشت برای اندازه‌گیری کارایی مصرف آب (به‌صورت مینی لایسیمتر)، اندازه‌گیری شد. مشخصات خاک در جدول ۱ آمده است. خاک ازنظر فسفر و پتاسیم با توجه به پیش‌بینی عملکرد ماده خشک کل، در حد کفایت (تقریباً فسفر و پتاسیم به ترتیب ۰/۲ و ۱/۰ درصد ماده خشک تولیدی را تشکیل می‌دهند) و برای نیتروژن در کمترین مقدار ممکنه بود (Taiz et al., 2015).

وضعیت دمای فضای گلخانه در طول فصل رشد این گیاه در سال دوم در جدول ۲ آمده است. میزان رطوبت داخل گلخانه در طول شب بین ۶۵ تا ۷۵ و در طول روز بین ۷۰ تا ۸۵ درصد بود.

جدول ۱. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1. Physical and chemical characteristics of soil

عمق خاک Soil depth	نیتروژن Nitrogen	پتاسیم K	فسفر P	هدایت الکتریکی EC	اسیدیته pH	کربن آلی OC	بافت خاک Soil texture
cm	%	--------mg kg^{-1}---------		ds m^{-1}		%	
0-50	0.008	312	10.7	0.66	7.02	0.09	Silt-Clay

جدول ۲. متوسط دما در گلخانه در طول دوره رشد استویا در سال دوم در محل اجرای آزمایش در سال ۱۳۹۵

Table 2. Average temperature in the greenhouse during the growth period of stevia at the examination site in 2016

پارامترها Parameters		ماه (month) فروردین March	اردیبهشت April	خرداد May	تیر June	مرداد July	شهریور August
حداقل دما	T min (ºC)	3.3	6.7	11.1	19.2	19.4	13.4
حداکثردما	T max (ºC)	26.3	36.7	40.8	47.3	47.2	45.0
متوسط دما	T ave (ºC)	15.2	21.5	26.9	34.1	34.2	30.4

نهال‌های یک‌ماهه گیاه استویا، از شمال کشور خریداری گردید. این نهال‌ها از طریق کشت بافت تکثیر و تولیدشده بودند و یکی از بهترین روش‌های تکثیر استویا به دلیل تولید زیاد گیاهچه یکنواخت بدون در نظر گرفتن فصل است (Anbazhagan et al., 2010; Akbar Khalil et al., 14). در سال اول چون نهال‌ها کوچک و ضعیف بودند دو بار در زمان اوایل گلدهی عمل چین‌برداری صورت گرفت. دلیل آن این است که زمان شروع گلدهی، مقدار کل گلیکوزیدهای برگ (ماده شیرین در برگ)، کاهش می‌یابد (Abdullateef and Osman, 2012). اعمال تیمارها و بررسی صفات در سال دوم، صورت گرفت. در سال دوم رشد از اواسط اسفند ریشه‌های درون خاک کم‌کم شروع به تولید جوانه کردند و در سوم خرداد سال ۱۳۹۵ چین اول برداشت و چین برداری دوم در ۱۶ شهریورماه ۱۳۹۵ صورت گرفت. تولید جوانه‌های طوقه‌ای استویا بعد از برداشت اول به‌کندی صورت می‌گیرد، به همین دلیل در اوایل چین دوم آب زیادی مصرف شد تا رشد مجدد صورت گیرد.

در این آزمایش صفات زیر بررسی شدند. برای اندازه‌گیری محتوی کلروفیل و کاروتنوئید از روش تغییریافته آرنون (Arnon, 1975) و با دستگاه الایزا (مدل Bio-Tek Power wave XS2) در طول‌موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل a+b و کارتنوئیدها و برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ به‌صورت روابط زیر محاسبه شد (Barr and Weatherley, 1962). کارایی مصرف آب عبارت است از تقسیم یک واحد ماده خشک (یک کیلوگرم) به گرم (۱۰۰۰ گرم) بر نیاز آبی گیاه که طبق روابط زیر محاسبه شد. تبخیر و تعرق شامل کل آب مصرف‌شده در طول دوره رشد بود (Gardner et al., 1984).

$$Chlorophyll\ a\ (mg\ g^{-1}\ FW) = 12.21(A663) - 2.81(A646) \quad [1]$$

$$Chlorophyll\ b\ (mg\ g^{-1}\ FW) = 20.13(A646) - 5.1(A663) \quad [2]$$

$$Chlorophyll\ a+b\ (mg\ g^{-1}\ FW) = Chl.\ a + Chl.\ b \quad [3]$$

$$Carotenoids\ (mg\ g^{-1}\ FW) = (1000A470 - 3.27[Chl.\ a] - 104[Chl.\ b] / 227) \quad [4]$$

$$\text{محتوی نسبی آب برگ (درصد)} = \{(\text{وزن برگ تازه} - \text{وزن برگ خشک‌شده}) / (\text{وزن برگ اشباع‌شده} - \text{وزن برگ خشک‌شده})\} \times 100 \quad [5]$$

نیاز آبی گیاه =
تبخیر و تعرق (کیلوگرم) / ماده خشک تولیدشده (کیلوگرم) [۶]

کارایی مصرف آب (گرم ماده خشک به کیلوگرم آب مصرفی) =
۱۰۰۰ (گرم) / نیاز آبی گیاه (کیلوگرم) [۷]

برای اندازه‌گیری قندهای محلول کل از روش فنل-اسیدسولفوریک با کمی تغییر و با دستگاه الایزا استفاده شد (Daniels et al., 1994) و سپس میزان جذب نوری آن در طول‌موج ۴۸۸ نانومتر توسط دستگاه الایزا قرائت شد. برای اندازه‌گیری پرولین نیز از نمونه‌های برگ و در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر (Bates et al., 1973) با دستگاه الایزا برآورد گردید.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر (Beauchamp and Fridovich, 1971)، پراکسیداز در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر (Chance and Maehly, 1995) و آنزیم کاتالاز در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر (Sinha, 1972) با دستگاه الایزا انجام شد.

جهت اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی (برگ‌ها و ساقه‌ها) پس از قطع کامل بوته‌ها از ۱۰ سانتی‌متری سطح خاک، بوته‌ها در داخل آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک و توزین گردید. شاخص برداشت نیز از تقسیم وزن خشک برگ در بوته بر وزن زیست‌توده بوته محاسبه شدند.

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسات میانگین اثرات ساده با استفاده از نرم‌افزار SAS، مقایسات میانگین اثرات متقابل با نرم‌افزار MSTAT-C و با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد و نمودارها با نرم‌افزار Sigmaplot ترسیم شدند.

نتایج و بحث

عملکرد و اجزای عملکرد

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی، نیتروژن و اثرات متقابل آن‌ها بر صفات زیست‌توده، وزن خشک برگ و ساقه (به‌استثنای وزن خشک ساقه در چین اول) و شاخص برداشت بسیار معنی‌دار شدند (جدول ۳). در شرایط بدون تنش و مصرف ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بیشترین زیست‌توده، وزن خشک برگ و ساقه به دست آمد. این مقادیر برای زیست‌توده در چین‌های اول و دوم به ترتیب با ۳۲/۱۵ و ۲۹/۲۷ گرم در بوته، برای وزن خشک برگ به ترتیب ۲۰/۴۰ و ۱۷/۱۱ گرم در بوته و برای وزن خشک ساقه به ترتیب ۱۱/۷۵ و ۱۲/۱۵ گرم در بوته بودند (شکل ۱).

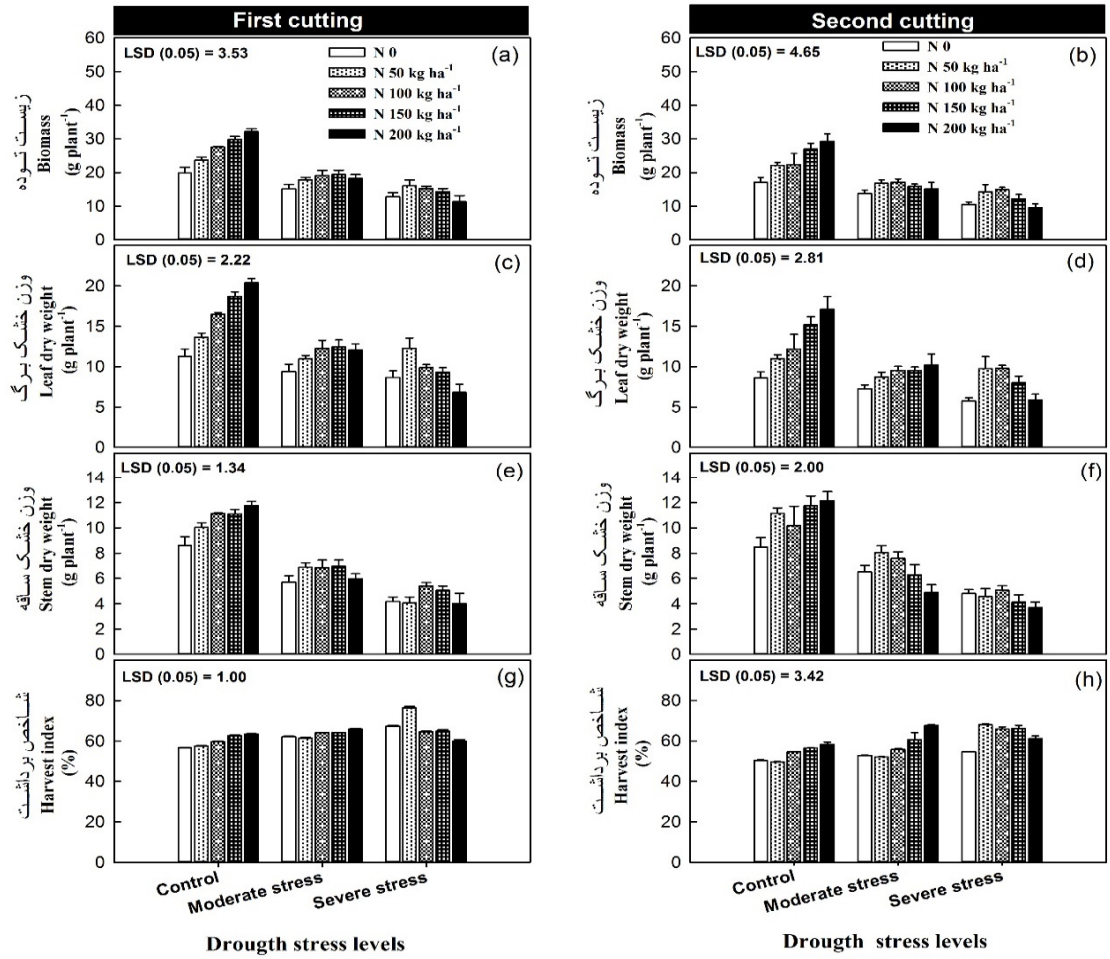
کمترین وزن زیست‌توده، وزن خشک برگ و ساقه در تیمار تنش شدید و در ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به دست آمد. در این تیمار وزن زیست‌توده در چین اول و دوم به ترتیب ۱۱/۳۳ و ۹/۵۰ گرم در بوته، برای وزن خشک برگ به ترتیب ۶/۸۱ و ۵/۸۶ گرم در بوته و وزن خشک ساقه به ترتیب ۴۰/۰۱ و ۳/۷۰ گرم در بوته به دست آمد.

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و نیتروژن بر صفات زیست‌توده، ماده خشک برگ و ساقه و شاخص برداشت استویا در سال دوم
Table 3. Analysis of variance of the effect of drought stress and nitrogen on biomass, leaf and stem dry weight, and harvest index of stevia in the second year

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن زیست‌توده Biomass		وزن خشک برگ Leaf dry weight		وزن خشک ساقه Stem dry weight		شاخص برداشت Harvest index	
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
تنش خشکی Drought stress (D)	2	626.9**	501.1**	177.5**	101.4**	139.8**	152.5**	169.4**	326.7**
نیتروژن Nitrogen (N)	4	40.8**	32.6**	19.3**	22.6**	3.86**	2.54ns	12.43**	137.1**
تنش خشکی × نیتروژن D × N	8	25.4**	27.9**	19.11**	13.63**	1.49*	4.70**	66.2**	59.6**
اشتباه Error	30	4.49	7.79	1.78	2.85	0.64	1.44	0.39	4.20
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	*10.86*	*16.23*	*10.85*	*17.04*	*11.19*	*16.49*	*4.99*	*3.52*

ns، *، ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌داربودن درسطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, ** are non-significant and significant at the 5 and 1% levels, respectively



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر تنش خشکی و مصرف نیتروژن بر زیست‌توده، ماده خشک برگ و ساقه و شاخص برداشت استویا در سال دوم

Fig. 1. Mean comparison of the effects of drought stress and nitrogen on biomass, leaf and stem dry weight, and harvest index of stevia in the second year

در شاخص برداشت، تیمار بدون تنش و بدون مصرف نیتروژن در پایین‌ترین مقدار بود. در چین اول و دوم به ترتیب ۵۶/۶ و ۵۰/۲ درصد و در تیمار تنش شدید و مصرف نیتروژن ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار به ترتیب ۷۶/۵ و ۶۷/۹ درصد نسبت به شاهد بودند (شکل ۱).

درمجموع نتایج بررسی اثر تنش خشکی بر صفات عملکرد و اجزای استویا در سال دوم رشد نشان داد که وزن خشک برگ به‌عنوان مهم‌ترین جزء عملکرد یا همان عملکرد اقتصادی در چین اول بیشتر از چین دوم بود. این افزایش عملکرد برگ در چین اول احتمالاً به دلیل طولانی‌تر بودن طول دوره رشد تا شروع گلدهی ناشی از دمای پایین‌تر و مناسب‌تر برای رشد گیاه استویا باشد. مصرف بیشتر نیتروژن در شرایط بدون تنش، اثر زیادتری بر عملکرد برگ داشت؛ اما با افزایش مصرف نیتروژن در شرایط تنش شدید، عملکرد برگ بشدت کاهش داشت. در شرایط بدون تنش با مصرف ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، عملکرد برگ در چین اول و دوم به ترتیب ۸۱ و ۹۹ درصد افزایش و در شرایط تنش شدید در چین اول و دوم به ترتیب ۱۴ و ۳۲ درصد نسبت به شاهد کاهش داشتند. در اکثر گیاهان، جذب نیتروژن در شرایط تنش خشکی کاهش می‌یابد. این کاهش در صورت وجود نیتروژن کافی در اثر کاهش رطوبت و کاهش در بارگیری اسیمیلات‌ها بوده است (Porporato et al., 2003; Pierret et al., 2005). در شرایط تنش خشکی تعرق کاهش‌یافته و روابط آبی درون گیاه با مشکل مواجه شده و کاهش رشد و عملکرد را به دنبال دارد (Gonzalez-Dugo et al., 2010). نیتروژن با افزایش سرعت رشد ریشه و

اسیمیلاسیون در برگ، باعث افزایش سطح برگ و درنتیجه افزایش وزن خشک برگ گردیده است (El-Wahab and Mohamed, 2007). در آزمایشی، با افزایش مصرف نیتروژن تا ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار در شرایط بدون تنش، بیشترین تولید در گل همیشه‌بهار حاصل شده است (Sairkar et al., 2009) که تأثیر نیتروژن بر تولید در شرایط بدون تنش خشکی را نشان می‌دهد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و نیتروژن بر رنگیزه‌ها بسیار معنی‌دار ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۴). با افزایش مقادیر نیتروژن، کلروفیل a، b، a+b و کاروتنوئیدها در چین اول و دوم افزایش یافتند (جدول ۵). مقدار کلروفیل a، b و a+b در چین دوم بیشتر ولی مقدار کاروتنوئیدها در دو چین تقریباً برابر بودند. همچنین مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی با افزایش شدت تنش خشکی، بیشتر شدند و این مقادیر در چین دوم بیشتر از چین اول بودند (جدول ۵). این افزایش جزئی را می‌توان به علت اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌ها به وزن تر، نسبت داد. این در حالی است که اگر بر اساس وزن خشک محاسبه می‌شد میزان آن کاهش نشان می‌داد. معمولاً در اکثر آزمایش‌هایی که بر اساس وزن خشک اندازه‌گیری صورت می‌گیرد، در شرایط تنش خشکی مقدار رنگیزه‌ها کاهش می‌یابد (Hajihashemi and Ehsanpour, 2013). افزایش رنگیزه‌ها در شرایط تنش خشکی می‌تواند دلایل احتمالی متفاوتی داشته باشد. کاهش سطح برگ، پاسخ دفاعی در برابر اثرات زیان‌بار و مضر تنش آبی (Farooq et al., 2009)، افزایش کلروپلاست برگ (برای حفظ فتوسنتز گیاه)، کوچک شدن سلول‌ها و افزایش غلظت کلروپلاست در واحد سطح برگ (Rivelli et al., 2010)، از مهم‌ترین دلایل احتمالی این افزایش می‌باشند. در آزمایشی دیگر نیز با کمبود آب غلظت کاروتنوئیدها در دو رقم گوجه‌فرنگی افزایش داشته است (Ghorbanli et al., 2013) که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

با افزایش نیتروژن، کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در دو چین نیز به ترتیب بین ۱۸/۱-۱۱/۵، ۲۷/۵-۱۲/۵ و ۲۰/۰-۱۶/۶ درصد افزایش داشتند. نیتروژن مهم‌ترین عنصر غذایی پرمصرف و به‌عنوان جزء لازم مولکول کلروفیل است. ازاین‌رو، افزایش آن باعث افزایش رنگیزه‌ها خواهد شد (Hassegawa et al., 2008; Bindi et al., 2002).

صفات کارایی مصرف آب، محتوای نسبی آب برگ، قندهای محلول و پرولین

نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و اثر نیتروژن بر صفات محتوای نسبی آب برگ و قندهای محلول همچنین اثرات متقابل آن‌ها بر صفات کارایی مصرف آب و مقدار پرولین معنی‌دار شدند (جدول ۶).

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و مصرف نیتروژن بر صفات کلروفیل a، b، a+b و کاروتنوئیدهای استویا

Table 4. Analysis of variance of the effect of drought stress and nitrogen on chlorophyll a, b, a + b and carotenoids of stevia

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a		کلروفیل b Chlorophyll b		کلروفیل a+b Chlorophyll a+b		کاروتنوئیدها Carotenoids	
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
تنش خشکی Drought stress (D)	2	0.062**	0.078**	0.030**	0.108**	0.178**	0.365**	0.025*	0.019*
نیتروژن Nitrogen (N)	4	0.005**	0.010**	0.011**	0.062**	0.030**	0.123**	0.026**	0.016*
تنش خشکی× نیتروژن D × N	8	0.001ns	0.001ns	0.0001ns	0.002ns	0.002ns	0.004ns	0.001ns	0.003ns
اشتباه Error	30	0.001	0.001	0.002	0.004	0.004	0.007	0.006	0.006
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	*6.63*	*6.24*	*5.13*	*7.16*	*4.61*	*5.40*	*10.25*	*9.64*

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, ** are non-significant and significant at the 5 and 1% levels, respectively

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر میزان تنش خشکی و نیتروژن بر صفات کلروفیل a، b، a+b و کارتنوئیدهای استویا

Table 5. Mean comparison of the effect of drought stress and nitrogen on chlorophyll a, b, a + b and carotenoids of stevia

تیمارها Treatments		کلروفیل a Chlorophyll a mg.g^{-1} FW		کلروفیل b Chlorophyll b mg.g^{-1} FW		کلروفیل a+b Chlorophyll a+b mg.g^{-1} FW		کاروتنوئیدها Carotenoids mg.g^{-1} FW	
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
تنش خشکی (Drought stress)									
(Control)	شاهد	0.48^{c}	0.52^{c}	0.72^{c}	0.81^{c}	1.21^{c}	1.33^{c}	0.72^{b}	0.74^{b}
(Moderate)	متوسط	0.56^{b}	0.59^{b}	0.77^{b}	0.92^{b}	1.33^{b}	1.52^{b}	0.77^{ab}	0.78^{ab}
(Severe)	شدید	0.61^{a}	0.67^{a}	0.81^{a}	0.97^{a}	1.43^{a}	1.64^{a}	0.81^{a}	0.81^{a}
نیتروژن (Nitrogen kg ha^{-1})									
0		0.52^{c}	0.55^{c}	0.72^{c}	0.80^{d}	1.25^{c}	1.36^{d}	0.70^{c}	0.72^{b}
50		0.54^{bc}	0.58^{bc}	0.74^{bc}	0.86^{cd}	1.28^{bc}	1.44^{cd}	0.73^{bc}	0.77^{ab}
100		0.55^{ab}	0.60^{b}	0.77^{ab}	0.90^{bc}	1.33^{ab}	1.50^{bc}	0.76^{abc}	0.77^{ab}
150		0.56^{ab}	0.59^{b}	0.79^{a}	0.92^{b}	1.36^{a}	1.52^{b}	0.80^{ab}	0.79^{ab}
200		0.58^{a}	0.65^{a}	0.81^{a}	1.02^{a}	1.39^{a}	1.67^{a}	0.84^{a}	0.84^{a}

در هر ستون (بین دو خط افقی) اعداد با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد با هم تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون LSD)

In each column (between two horizontal lines), numbers with similar letters are not significantly different at the 5% probability level (LSD test)

جدول ۶. تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و نیتروژن بر محتوای نسبی آب برگ، کارایی مصرف آب، قندهای محلول و پرولین در استویا

Table 6. Analysis of variance of the effect of drought stress and nitrogen on the relative water content, water use efficiency, soluble sugars and proline in stevia

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	محتوای نسبی آب برگ RWC		کارایی مصرف آب WUE		قندهای محلول Soluble glucose		پرولین Proline	
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
تنش خشکی Drought stress (D)	2	692**	551**	0.052^{ns}	0.053**	20947**	25781**	832**	320**
نیتروژن Nitrogen (N)	4	78.9*	69.9*	0.205**	0.021*	12737**	16096**	3551*	637**
تنش خشکی×نیتروژن D × N	8	19.63^{ns}	8.63^{ns}	0.127**	0.017*	697^{ns}	1419^{ns}	56.6*	20.3**
اشتباه Error	30	24.91	9.78	0.038	0.005	494	661	9.01	5.13
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	*8.01*	*4.83*	*12.48*	*16.02*	*12.91*	*14.37*	*17.96*	*15.90*

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, ** are non-significant and significant at the 5 and 1% levels, respectively

با افزایش تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ در چین‌های اول و دوم کاهش داشتند و در شرایط بدون تنش در چین اول و دوم به ترتیب ۶۸/۴ و ۷۰/۴ درصد و در شرایط تنش شدید به ترتیب ۵۵/۰ و ۵۸/۳ درصد بودند. برعکس، میزان قندهای محلول با افزایش تنش خشکی افزایش داشتند (جدول ۷). محتوای نسبی آب برگ و میزان قندهای محلول در هر دو چین در این آزمایش با افزایش میزان نیتروژن کاهش داشتند (جدول ۷).

در شرایط بدون تنش و مصرف ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، بالاترین کارایی مصرف آب در دو چین به دست آمد (جدول ۸). کارایی مصرف آب در چین اول و دوم به ترتیب در این تیمار ۱/۹۴ و ۰/۶۵ گرم ماده خشک به ازای یک

کیلوگرم آب مصرفی بود. اثرات متقابل بر میزان پرولین نیز نشان داد که کمترین میزان پرولین در تیمار بدون تنش و بدون مصرف نیتروژن و بیشترین مقدار در تیمار تنش شدید و با مصرف نیتروژن ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار به دست آمد (جدول ۸).

جدول ۷. مقایسه میانگین اثرات تنش خشکی و نیتروژن بر صفت محتوای نسبی آب برگ و قندهای محلول

Table 7. Mean comparison of the effects of drought stress and nitrogen on the relative water content and soluble sugars

تیمارها Treatments		محتوای نسبی آب برگ Relative water content %		قند های محلول Soluble glucose mg.g^{-1} FW	
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
تنش خشکی (Drought stress)					
شاهد (Control)		68.4^{a} ± 1.60	70.4^{a} ± 1.17	135^{c} ± 6.1	134^{c} ± 16.4
ملایم (Moderate)		63.6^{b} ± 1.57	65.8^{b} ± 1.03	171^{b} ± 11.5	185^{b} ± 9.1
شدید (Severe)		55.0^{c} ± 0.89	58.3^{c} ± 0.81	210^{a} ± 12.9	117^{a} ± 10.1
نیتروژن (Nitrogen (kg ha^{-1}))					
0		66.27^{a} ± 2.74	67.48^{a} ± 2.01	227^{a} ± 19.18	228^{a} ± 11.15
50		64.61^{ab} ± 2.69	66.36^{ab} ± 1.77	186^{b} ± 14.20	206^{ab} ± 9.60
100		60.03^{bc} ± 2.23	66.05^{ab} ± 2.04	167^{bc} ± 11.13	183^{b} ± 13.13
150		61.23^{bc} ± 1.93	64.03^{b} ± 2.44	149^{cd} ± 10.29	153^{c} ± 17.16
200		59.53^{c} ± 2.90	60.41^{c} ± 1.76	129^{d} ± 8.00	122^{d} ± 21.05

در هرستون (بین دو خط افقی) اعداد با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد با هم تفاوت معنی دار ندارند (آزمون LSD)، ±: خطای استاندارد

In each column (between two horizontal lines), numbers with similar letters are not significantly different at the 5% probability level (LSD test), ±: standard error

جدول ۸. مقایسه میانگین اثرات تنش خشکی و مصرف نیتروژن بر صفات کارایی مصرف آب و پرولین استویا

Table 8. Mean ccomparison of the effects of drought stress and nitrogen on water use efficiency and proline of stevia

تیمارها Treatments		کارایی مصرف آب Water use efficiency g Dry Matter.kg^{-1}Water		پرولین Proline Unit.g^{-1} FW	
تنش خشکی Drought stress	نیتروژن Nitrogen (kg ha^{-1})	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
شاهد control	0	1.20^{d} ±0.10	0.38^{cde} ±0.03	2.80^{j} ±0.66	3.22^{h} ±0.24
	50	1.43^{cd} ±0.05	0.49^{bc} ±0.02	8.72^{ghi} ±1.13	4.18^{h} ±0.69
	100	1.67^{abc} ±0.01	0.49^{bc} ±0.08	11.51^{fgh} ±1.44	9.70^{ef} ±2.57
	150	1.80^{ab} ±0.06	0.59^{ab} ±0.04	12.64^{fg} ±0.72	14.73^{cd} ±1.13
	200	1.94^{a} ±0.06	0.65^{a} ±0.05	13.99^{ef} ±0.30	17.53^{c} ±0.69
ملایم Moderate	0	1.26^{d} ±0.11	0.38^{cde} ±0.03	3.75^{ij} ±1.07	5.30^{gh} ±0.66
	50	1.48^{bcd} ±0.06	0.46^{cd} ±0.3	14.35^{def} ±1.21	6.70^{fgh} ±0.57
	100	1.59^{bc} ±0.13	0.47^{c} ±0.03	19.30^{cd} ±2.06	14.01^{cd} ±0.92
	150	1.61^{bc} ±0.11	0.44^{cd} ±0.02	19.97^{c} ±1.79	17.14^{c} ±2.22
	200	1.52^{bcd} ±0.10	0.42^{cde} ±0.06	20.26^{c} ±1.65	25.84^{b} ±2.17
شدید Severe	0	1.42^{cd} ±0.13	0.35^{de} ±0.02	7.28^{hij} ±2.00	8.33^{efg} ±0.33
	50	1.78^{ab} ±0.19	0.47^{c} ±0.07	17.80^{cde} ±1.03	11.64^{de} ±1.74
	100	1.69^{abc} ±0.07	0.49^{bc} ±0.02	26.54^{b} ±2.46	16.22^{c} ±0.61
	150	1.59^{bc} ±0.10	0.40^{cde} ±0.05	34.29^{a} ±3.04	23.88^{b} ±1.05
	200	1.25^{d} ±0.20	0.31^{e} ±0.04	37.53^{a} ±2.74	35.33^{a} ±0.97

در هر ستون اعداد با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد با هم تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون LSD)، ±: خطای استاندارد

In each column, numbers with similar letters are not significantly different at the 5% level(LSD test),±: standard error

در آزمایش حاضر، محتوای نسبی آب برگ در چین اول در شرایط بدون تنش تا تنش شدید بین ۶۸ تا ۵۵ درصد و در چین دوم بین ۷۰ تا ۵۸ درصد در نوسان بودند و با مصرف نیتروژن محتوای نسبی آب برگ کاهش داشتند. با کاهش این مقدار روزنه‌ها بسته‌شده و هدایت روزنه‌ای کاهش می‌یابد و در کل راندمان فتوسنتزی گیاه کاهش نشان می‌دهد (Lawlor and Cornic, 2002; Yadav and Bhushan, 2001). با افزایش تنش خشکی، محتوای نسبی آب برگ در اکثر گیاهان ازجمله در ذرت (Atteya, 2003) و کلزا (Ghaffari et al., 2011) کاهش نشان داده است. با افزایش شدت تنش خشکی، قندهای محلول افزایش یافت درحالی‌که کاربرد نیتروژن منجر به کاهش این صفت گردید. با افزایش شدت خشکی، تنش القاء شده و تثبیت کربن صرف تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Turtola et al., 2003). همچنین به نظر می‌رسد در اثر القای خشکی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز افزایش، به دلیل افزایش هیدرولیز نشاسته، غلظت قندهای کل افزایش می‌یابد (Setter et al., 2001). در این شرایط تنظیم اسمزی در وضعیت بهتری انجام می‌گیرد (Naureen and Naqvi, 2010; Parida et al., 2008).

در این آزمایش، میزان پرولین در تنش شدید و با مصرف نیتروژن افزایش داشت (جدول ۸). در خیلی موارد در شرایط تنش خشکی میزان پرولین افزایش می‌یابد که احتمالاً به دلیل این است که در این شرایط پرولین می‌تواند به‌عنوان منبع نیتروژن و کربن عمل کرده و تحمل گیاه را در برابر تنش افزایش دهد و از این طریق فشار تورژسانس سلول حفظ می‌شود (Amini et al., 2015; Aranjuelo et al., 2011) و یا افزایش پرولین می‌تواند از تجزیه پروتئین‌ها جلوگیری کند (Ceunen and Geuns, 2013).

آنتی‌اکسیدان‌ها

نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و نیتروژن بر صفات آنتی‌اکسیدان‌های موردبررسی نشان داد که اثر متقابل این عوامل بر صفات کاتالاز و چین اول پراکسیداز بسیار معنی‌دار، همچنین اثر تنش خشکی و میزان نیتروژن بر میزان پراکسیداز در چین دوم و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار شدند (جدول ۹).

جدول ۹. تجزیه واریانس اثرات تنش خشکی و نیتروژن بر آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز استویا

Table 9. Analysis of variance of the effects of drought stress and nitrogen on the catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes of stevia

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کاتالاز Catalase		پراکسیداز Peroxidase		سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2
تنش خشکی Drought stress (D)	2	1.05**	0.52**	129298**	70618**	0.01**	0.02**
نیتروژن Nitrogen (N)	4	1.14**	0.33**	11989**	17154**	0.01**	0.02**
تنش خشکی × نیتروژن D × N	8	0.42**	0.11**	2428**	766ns	0.001ns	0.001ns
اشتباه Error	30	0.01	0.01	111.9	463	0.001	0.001
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	*5.13*	*5.38*	*6.77*	*13.53*	*9.11*	*9.01*

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, ** are non-significant and significant at the 5 and 1% levels, respectively

با افزایش تنش خشکی میزان سوپراکسید دیسموتاز در چین اول و دوم افزایش داشت اما میزان پراکسیداز در چین دوم، با افزایش تنش خشکی کاهش نشان داد (جدول ۱۰). با افزایش نیتروژن نیز مقادیر سوپراکسید دیسموتاز در چین اول و دوم و همچنین میزان پراکسیداز در چین دوم افزایش یافت (جدول ۱۰). مقایسه میانگین اثرات متقابل عوامل آزمایشی بر کاتالاز و چین دوم پراکسیداز نشان داد که میزان کاتالاز در چین اول در شرایط بدون تنش و بدون مصرف نیتروژن در کمترین مقدار و در تیمار تنش شدید و میزان مصرف ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در بیشترین مقدار

بود (جدول ۱۱). در چین دوم مقدار کاتالاز، متفاوت از چین اول بود و در تیمار تنش شدید و مقادیر نیتروژن ۰، ۵۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در کمترین مقدار و در همان تیمار تنش شدید در مصرف ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار در بالاترین مقدار بودند. ازنظر میزان پراکسیداز در چین اول در تیمار بدون تنش و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن در بالاترین مقدار و در تیمار تنش شدید و بدون مصرف نیتروژن در کمترین مقدار بود (جدول ۱۱).

جدول ۱۰. مقایسه میانگین اثرات تنش خشکی و نیتروژن بر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم پراکسیداز استویا

Table 10. Mean comparison of the effects of drought stress and nitrogen on superoxide dismutase and peroxidase enzymes of stevia

تیمارها Treatments		سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase Unit.g^{-1} FW		پراکسیداز Peroxidase Unit.g^{-1} FW
		چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۲ cut 2
تنش خشکی (Drought stress)				
شاهد (Control)		$0.25^{c} \pm 0.01$	$0.25^{b} \pm 0.01$	$235.6^{a} \pm 14.2$
ملایم (Moderate)		$0.28^{b} \pm 0.01$	$0.31^{a} \pm 0.02$	$139.1^{b} \pm 11.8$
شدید (Severe)		$0.31^{a} \pm 0.01$	$0.32^{a} \pm 0.01$	$102.8^{c} \pm 8.8$
نیتروژن (Nitrogen (kg ha^{-1}))				
0		$0.22^{d} \pm 0.01$	$0.23^{c} \pm 0.01$	$111.7^{d} \pm 19.21$
50		$0.26^{cd} \pm 0.01$	$0.25^{bc} \pm 0.01$	$124.8^{d} \pm 16.95$
100		$0.28^{bc} \pm 0.01$	$0.28^{b} \pm 0.01$	$155.8^{c} \pm 23.86$
150		$0.30^{ab} \pm 0.01$	$0.34^{a} \pm 0.02$	$185.0^{b} \pm 23.86$
200		$0.33^{a} \pm 0.20$	$0.36^{a} \pm 0.01$	$218.0^{a} \pm 24.95$

در هر ستون (بین دو خط افقی) اعداد با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد با هم تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون LSD)، ±: خطای استاندارد

In each column (between two horizontal lines), numbers with similar letters are not significantly different at the 5% probability level (LSD test), ±: standard error

در آزمایش حاضر، با افزایش تنش خشکی و میزان نیتروژن بر استویا در دو چین مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش داشتند هرچند که میزان پراکسیداز نیز با افزایش نیتروژن افزایش و با افزایش تنش خشکی کاهش نشان داد. در کل، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به نوع گیاه، رقم، مرحله رشدی گیاه، نوع بافت گیاهی، شدت تنش و سایر عوامل بستگی دارد (Huseynova, 2012). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به افزایش سطح خودتنظیمی این آنزیم‌ها و پایداری بیشتر غشای سلولی بستگی دارد و میزان آنزیم در چین‌های مختلف، متفاوت می‌باشند. در آزمایشی بر روی گندم با افزایش تنش خشکی، افزایش در میزان کاتالاز گزارش شده است (Hasheminasab et al., 2012).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج بررسی اثر سطوح تنش خشکی و مقادیر مصرف نیتروژن بر گیاه استویا در سال دوم رشد، عملکرد (وزن خشک برگ) مناسبی را در شرایط بدون تنش خشکی نشان داد. علاوه بر این، با افزایش مصرف نیتروژن نیز در شرایط بدون تنش رطوبتی، عملکرد برگ افزایش یافت. عملکرد برگ در شرایط تنش ملایم با افزایش مصرف نیتروژن چندان تغییری نکرد. در شرایط تنش خشکی شدید علاوه بر اینکه عملکرد برگ کاهش داشت با مصرف نیتروژن، کاهش عملکرد برگ استویا، شدیدتر شد. استویا گیاهی تابستانه و با مصرف آب بالاست. توصیه می‌شود که قبل از اقدام به کشت، به میزان آب در دسترس در تابستان توجه شود و دور آبیاری، کوتاه‌تر از سایر محصولات تابستانه در منطقه در نظر گرفته شود که تولید آن ازنظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد.

جدول ۱۱. مقایسه میانگین اثرات تنش خشکی و نیتروژن بر آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در استویا

Table 11. Mean comparison of the effects of drought stress and nitrogen on catalase and peroxidase enzymes of stevia

تیمارها Treatments		کاتالاز Catalase Unit.g^{-1} FW		پراکسیداز Peroxidase Unit.g^{-1} FW
تنش خشکی Drought stress	نیتروژن Nitrogen (kg ha^{-1})	چین ۱ cut 1	چین ۲ cut 2	چین ۱ cut 1
شاهد Control	0	1.70^{h} ± 0.03	1.94^{d} ± 0.05	206^{d} ± 4.93
	50	2.10^{fg} ± 0.06	1.96^{d} ±0.03	212^{d} ±6.56
	100	2.14^{efg} ± 0.13	1.96^{d} ± 0.06	234^{c} ± 7.88
	150	2.18^{defg} ± 0.03	2.02^{d} ± 0.04	285^{b} ±12.39
	200	2.55^{c} ± 0.12	2.09^{cd} ±0.07	369^{a} ± 9.53
ملایم Moderate	0	2.23^{defg}± 0.11	2.03^{d} ± 0.08	91^{gh} ± 3.28
	50	2.26^{def} ±0.07	2.04^{d} ± 0.03	96^{fg} ±4.51
	100	2.33^{de} ± 0.03	2.25^{bc} ±0.14	111^{f} ±4.67
	150	2.98^{b} ±0.05	2.34^{b} ±0.02	144^{e} ±3.38
	200	2.82^{b} ±0.05	2.36^{ab} ±0.05	152^{e} ±7.00
شدید Severe	0	2.04^{g} ± 0.02	1.60^{e}± 0.01	72^{i} ±3.51
	50	2.07^{fg} ± 0.08	1.61^{e} ±0.06	77^{hi} ±2.08
	100	3.30^{a} ±0.04	1.68^{e} ±0.06	86^{ghi} ±2.67
	150	3.41^{a} ±0.03	1.72^{e} ±0.08	88^{ghi} ±4.58
	200	2.39^{cd} ± 0.09	2.54^{a} ± 0.01	113^{f} ±5.20

در هر ستون اعداد با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد با هم تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون LSD)، ±: خطای استاندارد

In each column, numbers with similar letters are not significantly different at the 5% probability level (LSD test), ±: standard error

منابع

Abdullateef, R.A., Osman, M., 2012. Studies on effects of pruning on vegetative traits in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae). International Journal of Biology. 4, 146-153. https://dx.doi.org/10.5539/ijb.v4n1p146

Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A., Abu-Salem, M.F., 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science. 4, 269-281. https://dx.doi.org/10.5897/AJFS.9000226

Akbar Khalil, S., Zamir, R., Ahmad, N., 2014. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi Journal of Biological Sciences. 21, 566-573. https://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.02.005

Amini, S., Ghobadi, C., Yamchi, A., 2015. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. Journal of Plant Molecular Breeding. 3, 44-55. https://dx.doi.org/10.22058/jpmb.2015.17022

Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V., Dhanavel, D., 2010. In vitro production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emirates Journal of Food and Agriculture. 216-222. https://dx.doi.org/10.9755/ejfa.v22i3.4891

Anjum, S.A., Farooq, M., Xie, X.Y., Liu, X.J., Ijaz, M.F., 2012. Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. Scientia Horticulturae. 140, 66-73. https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.03.028

Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Christophe Avice, J., Nogues, S., 2011. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). The Journal of Experimental Botany. 62, 111-123. https://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq249

Armand, N., Amiri, H., Ismaili, A., 2016. Interaction of methanol spray and water deficit stress on photosynthesis and

biochemical characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadry. Photochemistry and Photobiology. 92, 102-110. https://dx.doi.org/10.1111/php.12548

Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal. 23, 112-121.

Atteya, A.M., 2003. Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. Bulgarian Journal of Plant Physiology. 29, 63-76.

Barr, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. Australian Journal of Biological Sciences. 15, 413-428. https://dx.doi.org/10.1071/BI9620413

Bates, L.S., Waldern, R.P., Tear, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207. https://dx.doi.org/10.1007/BF00018060

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry. 44, 276-287. https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8

Bindi, M., Hacour, A., Vandermeiren, K., Craigon, J., Ojanperä, K., Selldén, G., Hogy, P., Fibbi, L., 2002. Chlorophyll concentration of potatoes grown under elevated carbon dioxide and/or ozone concentrations. European Journal of Agronomy. 17, 319-335. https://dx.doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00069-2

Ceunen, S., Geuns, J.M., 2013. Steviol glycosides: Chemical diversity, metabolism, and function. Journal of Natural Products. 76, 1201-1228. https://dx.doi.org/10.1021/np400203b

Chaturvedula, V.S., Rhea, J., Milanowski, D., Mocek, U., Prakash, I., 2011. Two minor diterpene glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. Natural Product Communications. 6, 175-178. https://dx.doi.org/10.1177/1934578X1100600205

Chrysargyris, A., Laoutari, S., Litskas, V.D., Stavrinides, M.C., Tzortzakis, N., 2016. Effects of water stress on lavender and sage biomass production, essential oil composition and biocidal properties against *Tetranychus urticae* (Koch). Scietia Horticulture. 213, 96-103. https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.024

Daniels, L., Hanson, R., Philips, J., Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W., Krieg, N.R., 1994. Chemical Analysis Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington, DC: American Society of Microbiology. Chap. 22.

Durán, A.S., Rodríguez, N.M.P., Cordón, A.K., Record, C.J., 2013. Stevia (*Stevia rebaudiana*), non-caloric natural sweetener. Revista Chilena de Nutrición. 39, 203–206. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000400015

El-Wahab, A., Mohamed, A., 2007. Effect of nitrogen and magnesium fertilization on the production of *Trachyspermum ammi* L. (Ajowan) plants under Sinai conditions. Journal of Applied Sciences Research. 3, 781-786.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development. 29, 185–212. https://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_12

Gardner, F.P., Pearce R.B., Mitchell, R.L., 1984. Physiology of Crop Plants. 1st Edition. Iowa State Press. 327p.

Ghaffari, G., Toorchi, M., Aharizad, S., Shakiba, M. R., 2011. Evaluation of traits related to water deficit stress in winter Rapeseed cultivars. Universal Journal of Environmental Research and Technology. 1, 338-350.

Ghorbanli, M., Gafarabad, M., Amirkian, T., Allahverdi Mamaghani, B., 2013. Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars. Iranian Journal of Plant Physiology. 3, 651-658. [In Persian]

Gonzalez-Dugo, V., Durand, J. L., Gastal, F., 2010. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. Agronomy for Sustainable Development. 30, 529-544. https://dx.doi.org/10.1051/agro/2009059

Hajihashemi, S., Ehsanpour, A., 2013. Influence of exogenously applied paclobutrazol on some physiological traits and growth of Stevia rebaudiana under in vitro drought stress. Biologia. 68, 414-420. https://dx.doi.org/10.2478/s11756-013-0165-7

Hasheminasab, H., Assad, M.T., Aliakbari, A., Sahhafi, S.R., 2012. Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. Journal of Agricultural Science. 4, 20-30. [In Persian]

Hassegawa, R.H., Fonseca, H., Fancelli, A.L., da Silva, V.N., Schammass, E.A., Reis, T.A., Corrêa, B., 2008. Influence of macro-and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. Food Control. 19, 36-43. https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.01.006

Huseynova, I.M., 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 1817, 1516-1523. https://dx.doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.02.037

Kumar, R., Sharma, S., Ramesh, K., Singh, B., 2013. Effects of shade regimes and planting geometry on growth, yield and quality of the natural sweetener plant stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in north-western Himalaya. Archives of Agronomy and Soil Science. 59, 963-979. https://dx.doi.org/10.1080/03650340.2012.699676

Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant, Cell and Environment. 25, 275-294. https://dx.doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x

Muanda, F.N., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A., 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. LWT - Food Science and Technology. 44, 1865– 1872. https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.002

Naureen, G., Naqvi, F.N., 2010. Salt tolerance classification in wheat genotypes using reducing sugar accumulation and growth characteristics. Emirates Journal of Food and Agriculture. 22, 308-317. https://dx.doi.org/10.9755/ejfa.v22i4.4878

Odlare, M., Pell, M., Svensson, K., 2008. Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. Waste Management. 28, 1246-1253. https://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2007.06.005

Pal, P.K., Kumar, R., Guleria, V., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., Singh, R.D., 2015. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. BMC Plant Biology. 15, 1-16. https://dx.doi.org/10.1186/s12870-015-0457-x

Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S., Aurangabadkar, L.P., 2008. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. Acta Physiologiae Plantarum. 30, 619-627. https://dx.doi.org/10.1007/s11738-008-0157-3

Pierret, A., Moran, C.J., Doussan, C., 2005. Conventional detection methodology is limiting our ability to understand the roles and functions of fine roots. New Phytologist. 166, 967-980. https://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01389.x

Porporato, A., D'odorico, P., Laio, F., Rodriguez-Iturbe, I., 2003. Hydrologic controls on soil carbon and nitrogen cycles. I. Modeling scheme. Advances in Water Resources. 26, 45-58. https://dx.doi.org/10.1016/S0309-1708(02)00094-5

Ramesh, K., Singh, V., Megeji, N.W., 2006. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. Advances in Agronomy. 89, 137-177. https://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(05)89003-0

Reis, M., Coelho, L., Santos, G., Kienle, U., Beltrão, J., 2015. Yield response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to the salinity of irrigation water. Agricultural Water Management. 152, 217-221. https://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2015.01.017

Rivelli, A.R., De Maria, S., Pizza, S., Gherbin, P., 2010. Growth and physiological response of hydroponically-grown sunflower as affected by salinity and magnesium levels. Journal of Plant Nutrition. 33, 1307-1323. https://dx.doi.org/10.1080/01904167.2010.484092

Sairkar, P., Shukla, N.P., Mehrotra, N.N., 2009. Mass production of an economically important medicinal plant Stevia rebaudiana using in vitro propagation techniques. Journal of Medicinal

Plants Research. 3, 266-270. https://dx.doi.org/10.5897/JMPR.9000862

Saxton, K.E., Rawls, W.J., 2006. Soil water characteristic estimates by texture and organic matter for hydrologic solutions. Soil Science Society of America Journal. 70, 1569–1578. https://dx.doi.org/10.2136/sssaj2005.0117

Setter, T.L., Flannigan, B.A., Melkonian, J., 2001. Loss of kernel set due to water deficit and shade in maize. Crop Science. 41, 1530-1540. https://dx.doi.org/10.2135/cropsci2001.4151530x

Sinha, A.K., 1972. Colorimetric assay of catalase. Analytical biochemistry. 47, 389-394. https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132-7

Taiz, L. Zeiger, E., Moller, I.M., Murphy, A. 2015. Plant Physiology and Development. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT. p: 761.

Turtola, S., Manninen, A.M., Rikala, R., Kainulainen, P., 2003. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. Journal of Chemical Ecology. 29, 1981-1995. https://dx.doi.org/10.1023/A:1025674116183

Vasilakoglou, I., Kalfountzos, D., Gougoulias, N., Reppas, C., 2016. Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. Archives of Agronomy and Soil Science. 62, 457-472. https://dx.doi.org/10.1080/03650340.2015.1060554

Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., Wüst, M., 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of Stevia rebaudiana. European Food Research and Technology. 231, 581-588. https://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1309-4

Wu, F., Bao, W., Li, F., Wu, N., 2008. Effects of drought stress and N supply on the growth, biomass partitioning and water-use efficiency of Sophora davidii seedlings. Environmental and Experimental Botany. 63, 248-255. https://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.002

Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Canadian Journal of Plant Science. 91, 1-27. https://dx.doi.org/10.4141/cjps10086

Yadav, R.S., Bhushan, C., 2001. Effect of moisture stress on growth and yield in rice genotypes. Indian Journal of Agricultural Research. 35, 104-107.

Yousfi, S., Márquez, A.J., Betti, M., Araus, J.L., Serret, M.D., 2016. Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. Journal of Integrative Plant Biology. 58, 48-66. https://dx.doi.org/10.1111/jipb.12359