

تأثیر سطوح مختلف سرما روی پروتئین کل، پرولین و فعالیت برخی از آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)



منصور افشارمحمدیان* و زهرا انصاری پیری

رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۹

چکیده

امروزه استفاده از شیرین‌کننده‌های طبیعی به ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها مصرف نمایند، اهمیت زیادی پیدا کرده است. استویا (*Stevia rebaudiana*) گیاهی بوته‌ای از تیره Asteraceae، به دلیل دارابودن دی‌ترین گلیکوزیدهایی از جمله Stevioside و Rebaudioside و Dudoside که بیش از ۳۰۰ بار از ساکارز شیرین‌تر هستند، از نظر اقتصادی و علمی بسیار مورد توجه است. این تحقیق، به منظور بررسی پروتئین کل، پرولین و برخی از آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی گیاه استویا تحت تنش سرما در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح تیمار دمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه به کنترل (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در سه تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری را در میزان پروتئین کل، پرولین و آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی شامل سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) تحت تنش سرما نشان ندادند. همچنین از نظر ظاهری نیز گیاهان تحت تیمار نسبت به کنترل تفاوت محسوسی نداشتند. لذا می‌توان گفت که تیمارهای سرمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد در زمان کوتاه (۲ ساعت)، برای گیاه استویا تنش‌زا نبوده و این گیاه در دماهای مذکور، احتمالاً از نظر فیزیولوژیکی متحمل می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی، استرس سرما، پروتئین کل، پرولین، *Stevia rebaudiana*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۳۲۳۶۷۹، پست الکترونیکی: afshar@guilan.ac.ir

مقدمه

چاق و کسانی که مراقب کالری روزانه خود هستند، می‌باشد. بنابراین، این گیاه از لحاظ اقتصادی بسیار مورد توجه است. در حال حاضر حدود ۴۰۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت هستند. دیابت هر ساله سبب مرگ بیش از ۵ میلیون نفر می‌شود، یعنی هر ۶ ثانیه یک نفر به علت دیابت جان خود را از دست می‌دهد (۱۷). لذا نقش این گیاه در حفظ سلامتی و کنترل دیابت بسیار حائز اهمیت است.

یکی از عوامل اساسی در بیولوژی گیاهان، دمای بهینه رشد است. هرگونه گیاهی در یک دامنه دمایی ویژه حداکثر رشد و عملکرد مطلوب را دارد و هرگونه انحراف از آن، به ویژه کاهش دما از حد بحرانی، موجب بروز تنش و کاهش رشد

استویا گیاهی بوته‌ای از تیره Asteraceae است که ارتفاع آن به یک متر نیز می‌رسد. برگهای آن دارای دی‌ترین-ترین گلیکوزیدهایی از جمله Stevioside و (A, B, C, D, E) Rebaudioside و Dudoside است، که برای اولین بار در پاراگوئه توسط گیاه‌شناسی به نام Bertoni شناسایی شد (۱۳). امروزه استفاده از شیرین‌کننده‌های طبیعی به ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها مصرف نمایند، اهمیت زیادی پیدا نموده‌اند. از ویژگیهای ترکیبات شیرین‌کننده این است که اولاً در سیستم گوارشی جذب نمی‌شود، لذا افراد دیابتی می‌توانند به راحتی از آن استفاده کنند. ثانیاً این شیرین‌کننده کالری‌زا نیست و مناسب افراد

از این گیاه موجود می‌باشد. لذا هدف این تحقیق، بررسی پروتئین کل، پرولین و برخی از آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی گیاه استویا (آنزیمهای سوپر اکسید دیس موتاز، آسکوربات پر اکسیداز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز)، تحت تنش دماهای پایین بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی و تیمار سرما دهی: نمونه‌های گیاهی از گلخانه پژوهشی دانشگاه گیلان تهیه شد. نمونه برداری برگها پس از اعمال تنش سرما انجام شد. به منظور انجام تیمار سرمایی، همه نمونه‌ها به جز نمونه کنترل (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به دستگاه انکوباتور ویژه سرمادهی جهت اعمال تیمارهای دمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. دمای نمونه به تدریج و در مدت ۱۰ ساعت به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد رسید و حدود ۲ ساعت در این دما باقی ماند. سپس نمونه برداری انجام شد. برای اعمال تیمار سرمادهی دیگر نیز دما در طول مدت ۱۰ ساعت به ۵ درجه سانتی‌گراد رسید و حدود ۲ ساعت در این دما باقی ماند. بعد از تیمار سرمادهی، برگهای گیاه جدا شدند و بلافاصله با استفاده از نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و سنجش آنزیمی: به منظور استخراج و اندازه‌گیری آنزیمها، برگهای فریز شده را در هاون چینی ریخته و نیتروژن مایع به آن اضافه شد. سپس برگها به خوبی کوبیده شده تا کاملاً خرد شوند. ۰/۵ گرم از پودر برگ آسیاب شده به میکروتیوبهای ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و با افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، نخست ورتکس شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، عصاره رویی با استفاده از سمپلر برداشته و به میکروتیوبهای ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ،

رویشی و زایشی می‌شود. بسیاری از گیاهان به خصوص آنهایی که بومی آب و هوای گرم هستند، علائمی از خسارت را موقعی که با دماهای کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد مواجه می‌شوند، نشان می‌دهند (۱۰ و ۳۲). گیاهان از مولکول اکسیژن به عنوان گیرنده الکترونی استفاده می‌کنند. در نتیجه احیای O_2 ، حد واسطهای خیلی فعال و گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) نیز تولید می‌شوند. ROS شکلهای ویژه‌ای از اکسیژن اتمسفری شامل رادیکالهای سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل است که طی مراحل اکسیداتیو طبیعی در سلول مثل تنفس، فتوسنتز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو تولید می‌شود، اما غلظت آنها در طول پیری، پاسخ به پاتوژنها، گیاه خواری و قرار گرفتن گیاهان در معرض تنشهای غیر زیستی افزایش می‌یابد. دماهای پایین نیز باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود که تجمع ROS را به دنبال دارد (۱۹).

به منظور تعیین مقاومت گیاهان نسبت به تنشهای محیطی، توانایی جمع آوری اثرات موادی سمی مثل اکسیژن فعال، حائز اهمیت است. از آنجایی که تحت تنش مانند دمای پایین، توانایی گیاه برای حذف رادیکالهای اکسیژنی دچار نقص می‌شود، دو سیستم دفاعی در برابر تجمع وسیع ROS وجود دارد: آنزیمی و غیر آنزیمی. سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی شامل آنتی‌اکسیدانهای محلول در چربی (ویتامین E، بتاکاروتن، لیکوپن، زانتوفیل و...) و محلول در آب (اسید آسکوربیک، گلوکاتیون و...) است. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل آنزیمهای سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و... است که با افزایش سطح آنها برای مقابله با تنش اکسیداتیو، توازن احیایی سلول حفظ می‌شود (۱۱ و ۲۳).

از آنجایی که گیاه استویا بومی ایران نبوده و در چندین سال اخیر به کشور وارد شده است، لذا تحقیقات کمی بر روی این گیاه انجام شده است و در نتیجه اطلاعات کمی

تشکیل شد. سرانجام جذب لایه رنگی فوقانی (حاوی پرولین محلول در تولوئن) در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای سنجش غلظت پرولین، منحنی استاندارد با استفاده از محلولهای استاندارد تهیه شد.

۳- آنزیم سوپر اکسید (POD): برای بررسی فعالیت POD از طول موج ۴۷۰ نانومتر طبق روش هامر چیمیت (۱۸) استفاده شد. بافر استخراج برای این آنزیم در ۴ درجه سانتی‌گراد، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود.

۴- آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): به منظور تعیین فعالیت APX از روش ناکانو و آسادا (۲۷) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. برای استخراج APX از بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH ۷ شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار استفاده شد.

۵- آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز (SOD): برای استخراج SOD در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت SOD طبق روش جیانوپولیتز و رایز (۱۴) و از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۶- آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO): بافر استخراج برای این آنزیم در ۴ درجه سانتی‌گراد، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود. فعالیت PPO طبق روش گرگوری و بندال (۱۶) و از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

مطالعات آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح تیمار سرمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد و شاهد ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. مراحل مختلف آزمایش با ۳ تکرار صورت گرفت و سپس تجزیه آماری با استفاده از آزمون دانکن در SPSS ۲۱ انجام و نمودارهای مربوط به تغییرات در برنامه Excel ۲۰۱۰ رسم شد.

عصاره رویی با استفاده از سمپلر به میکروتیوبهای با همان حجم منتقل شدند. میکروتیوبهای حاوی عصاره در زمان سایش برگها و سانتی‌فیوژ نمونه‌های دیگر در داخل ظرف یخ نگهداری شده و در صورت عدم استفاده، به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد (۸). از این عصاره برای سنجش آنزیمهای سوپراکسید دیس موتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، پروتئین و پرولین استفاده شد.

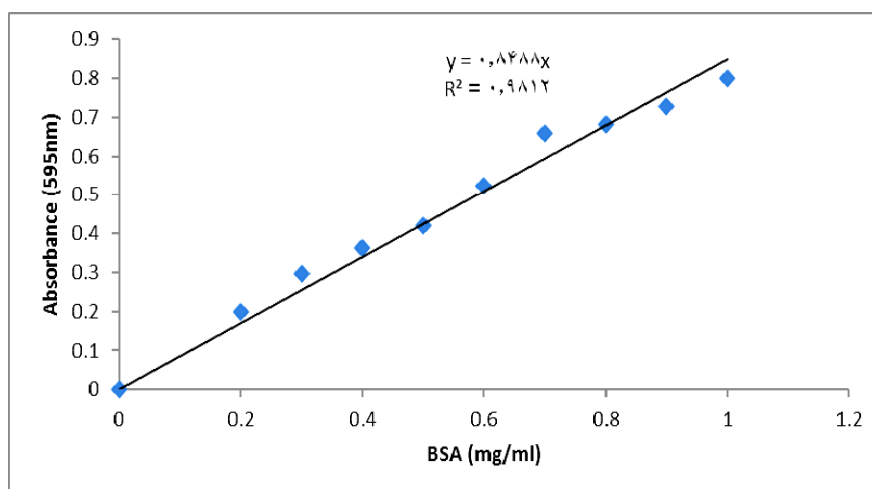
۱- پروتئین کل: اندازه‌گیری میزان پروتئین کل با استفاده از عصاره تهیه شده، معرف رنگی کوماسی برلیانت بلو G-250 در اتانول ۹۵ درصد و ارتوفسفریک اسید ۸۵ درصد انجام شد (۹). از پروتئین گاما گلوبولین پلاسماهای گاوی (BSA)، به عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. بدین منظور مایع رویی آنزیمی استخراج شده، به ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد اضافه و محتویات لوله‌ها پس از مخلوط شدن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت تام پروتئینی بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده، محاسبه شد.

۲- پرولین: برای اندازه‌گیری غلظت پرولین از روش بیتس (۷) استفاده شد. بدین منظور ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی که در نیتروژن مایع منجمد شده بود، پس از توزین با استفاده از هاون به صورت پودر درآمد. به پودر حاصل ۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد اضافه شد. مخلوط با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف شد. یک میلی‌لیتر از مواد فیلتر شده با حجم مساوی از اسید استیک گلاسیال و معرف نین‌هیدرین مخلوط شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش با قرار گرفتن لوله‌های آزمایش در حمام یخ آغاز شد. به محلول دو میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه با ورتکس به خوبی مخلوط شد. بعد از قرار گرفتن نمونه‌ها در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دو لایه مجزا

نتایج

بررسی تنش سرما بر غلظت پروتئین کل: تغییرات غلظت پروتئین کل در برگ گیاه استویا، در تیمارهای سرمایی (۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ سانتی‌گراد)

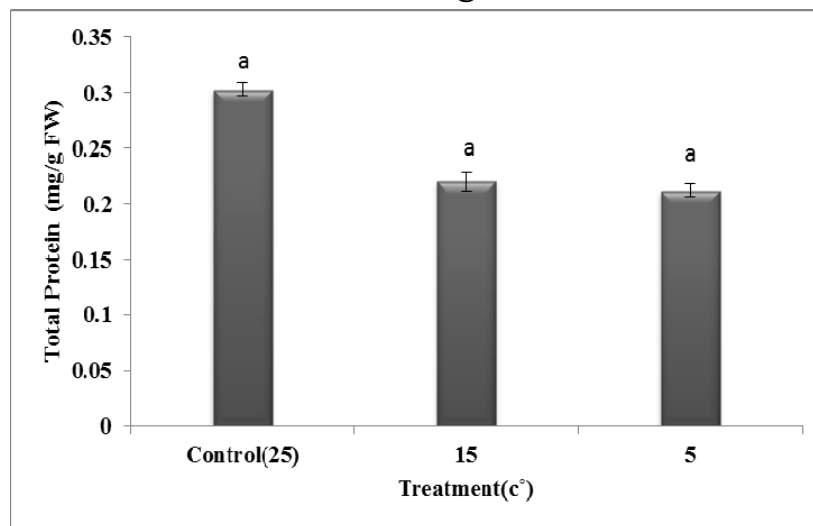
مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا منحنی استاندارد جذب (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) BSA بر اساس جذبه‌های خوانده شده برای نمونه‌های استاندارد رسم و توسط شیب خط منحنی، غلظت پروتئین کل نمونه‌ها محاسبه شد (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی استاندارد به روش برادفورد

حاصله، با کاهش میزان دما، تغییرات معنی داری در غلظت پروتئین کل در برگ این گیاه مشاهده نشد.

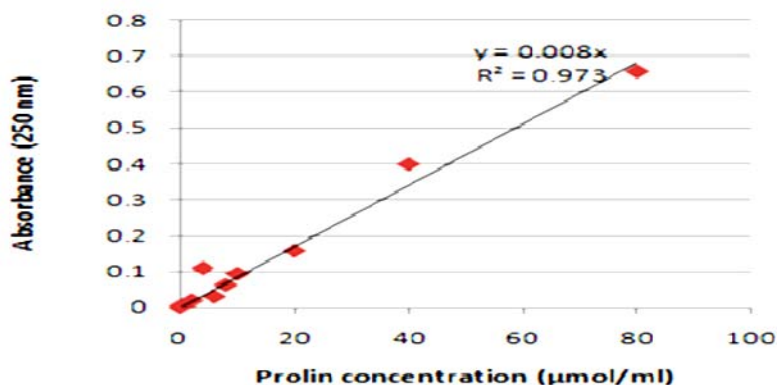
تغییرات غلظت پروتئین کل: نتایج مربوط به تأثیر تنش سرما بر غلظت پروتئین کل در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی در شکل ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج



شکل ۲- تغییرات غلظت پروتئین کل در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین \pm SE تکرار ۳ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است).

رسم شد و معادله منحنی استاندارد به دست آمد (شکل ۳). جذب به دست آمده از هر سه تیمار دمایی در معادله منحنی استاندارد قرار داده شد و غلظت هر نمونه بر حسب میکرومول پرولین بر یک گرم وزن تر گیاه به دست آمد.

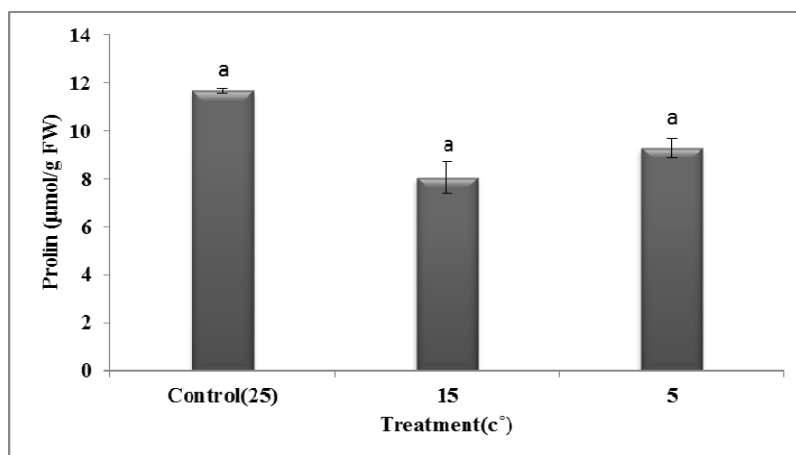
بررسی تنش سرما بر میزان پرولین: در این مرحله جذب غلظت‌های مختلف پرولین به ترتیب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با در دست داشتن غلظت‌های مختلف پرولین و جذب هر کدام از غلظت‌ها



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون غلظت‌های استاندارد پرولین

شود، با کاهش میزان دما، تغییرات معنی داری در میزان پرولین در برگ این گیاه دیده نشد.

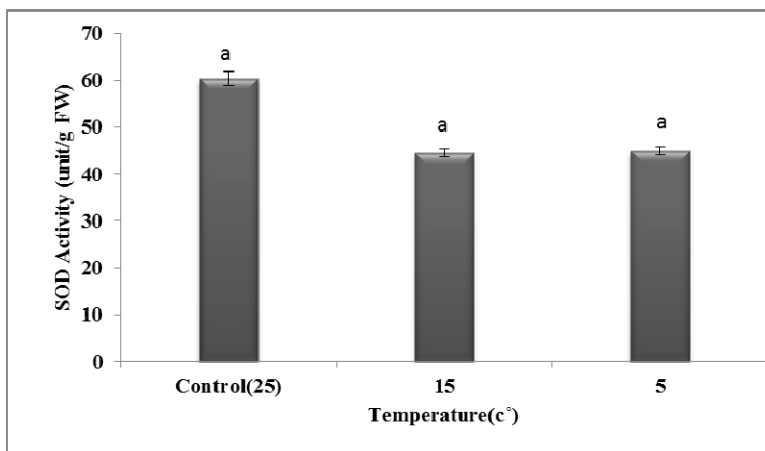
تغییرات میزان پرولین: نتایج مربوط به تأثیر تنش سرما بر تغییرات میزان پرولین در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی در شکل ۴ ارائه شده است، به طوری که مشاهده می



شکل ۴- تغییرات محتوای پرولین در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است).

تحقیق، میزان SOD در دماهای بررسی شده ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد تغییر معنی داری نداشت.

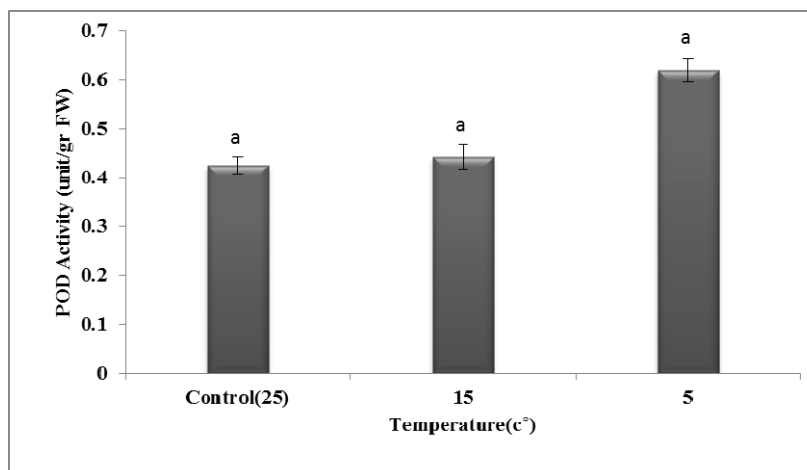
فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز (SOD): نتایج مربوط به تأثیر تنش سرما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی در شکل ۵ ارائه شده است. بر اساس نتایج این



شکل ۵- میزان فعالیت آنزیم SOD در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است).

کاهش میزان دما، تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در برگ این گیاه مشاهده نشد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید (POD): نتایج مربوط به تأثیر تنش سرما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی در شکل ۶ ارائه شده است. با

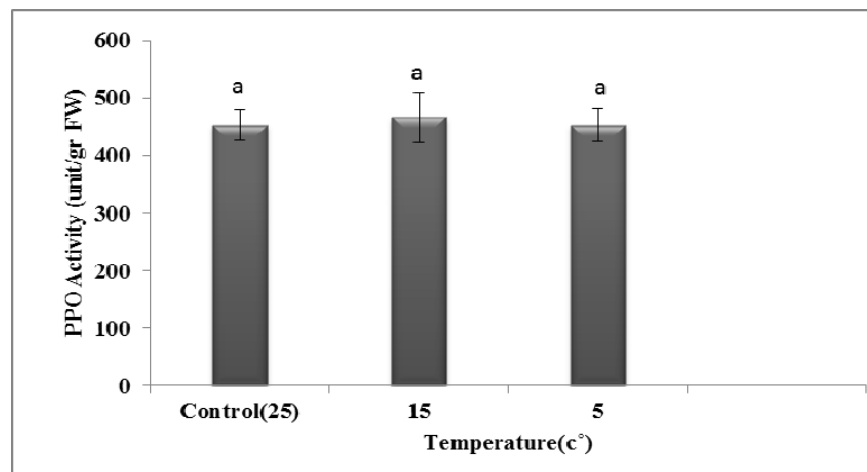


شکل ۶- میزان فعالیت آنزیم POD در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است).

پراکسیداز را در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی نشان می‌دهد. در این تحقیق، نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم APX در برگ‌های گیاهان استویا، اختلاف معنی‌داری را در ۲ تیمار دمایی بررسی شده در مقایسه با کنترل نشان ندادند (نتایج آورده نشد).

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO): نتایج مربوط به تأثیر تنش سرما بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی در شکل ۷ ارائه شده است. بر اساس نتایج این تحقیق، میزان PPO در دماهای بررسی شده بدون تغییر باقی ماند.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): شکل ۷ تأثیر تنش سرما بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات



شکل ۷- میزان فعالیت آنزیم PPO در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین \pm SE تکرار ۳ است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است).

بحث

اساساً تنش سرما باعث افزایش تنش اکسیداتیو در بافت‌های گیاهی می‌شود و گیاهان غالباً برای مقابله با اثرات تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی خود را افزایش می‌دهند. میزان افزایش فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی همبستگی دارد (۲۰).

طی تنش، پروتئین‌های جدیدی ساخته می‌شود یا پروتئین‌های موجود افزایش بیان می‌یابند. چندین فرآیند سلولی و متابولیکی طی دمای پایین تغییر می‌یابند و این تغییرات به تجمع پروتئین‌هایی چون پروتئین محلول و پروتئین آپوپلاستی که سنتزشان طی دمای پایین افزایش می‌یابد، نیاز دارد. در این مورد می‌توان به سنتز پروتئین‌های شوک سرمایی و افزایش فعالیت و ساخت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپر اکسید دیس موتاز و کالاتاز در پاسخ به تنش سرمایی و تجمع پروتئین‌های مورد نیاز در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، تنظیم‌کننده‌های کینازها اشاره نمود (۲۲)، (۲۱، ۱۲، ۳۱). کوزاکیوسکا و همکاران (۲۴) تنش ۴ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۳ روز بر روی گیاه فلفل (*Capsicum annuum L.*) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که تنش سرما موجب افزایش پروتئین محلول کل در برگ گیاه می‌

شود. براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق تیمارهای دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت در مقایسه با کنترل (۲۵ درجه سانتی‌گراد) تغییر معنی‌داری را در غلظت پروتئین کل برگ گیاه استویا ایجاد نکرد، که احتمالاً به تفاوت نوع گیاه (ویژگی‌های آناتومیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی)، سطح و طول مدت زمان تیمار دمایی در مقایسه با نتایج محققین فوق‌الذکر مربوط می‌شود.

پرویلین تجمع یافته در گیاهان در پاسخ به تنش سرمادگی، نقش مهمی در سمیت زدایی ROS و حفظ انسجام غشای سلولی ایفا می‌کند (۳). در چندین بررسی مشاهده شد که افزایش پرویلین در تطابق سرمایی، به منظور جلوگیری از ایجاد تغییر در میزان آب گیاه است، این مسئله نشان می‌دهد که تجمع پرویلین در ابتدای استرس سرمایی غیروابسته به تغییرات ایجاد شده در تعادل آب می‌باشد (۲۵). گیل‌مور و همکاران (۱۵) گزارش کردند که مقادیر پرویلین در آرابیدوپسیس و طی تنش سرما افزایش می‌یابد. تاجور و همکاران (۱) تنش سرما را به مدت ۲۴ ساعت در دماهای ۹، ۶، ۳، صفر، ۶، ۳- درجه سانتی‌گراد بر روی نارنگی پیچ اعمال کردند. نتایج نشان داد که از تیمار ۶ تا ۳- درجه سانتی‌گراد افزایش در محتوای

پروکلین ایجاد شد. عظیمی و همکاران (۶) بر روی گونه ای از پنبه، تنش دمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲۴ ساعت اعمال کردند. نتایج افزایش غلظت پروتئین محلول و پروکلین را نشان دادند. کوزاکبوسکا و همکاران (۲۴) نیز تنش ۴ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۳ روز بر روی گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) بررسی کردند. نتایج نشان داد که تنش سرما موجب افزایش فعالیت پروکلین در برگ گیاه می‌شود. با توجه به شکل ۴، مقدار پروکلین در ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت در گیاه استویا در مقایسه با کنترل تغییر معنی داری نداشت که این تفاوت در نتایج، احتمالاً به تفاوت در طول مدت تیمار و نوع گیاه مربوط می‌شود.

SOD تنها آنزیم گیاهی است که قادر به جمع‌آوری رادیکال‌های اکسیژن فعال می‌باشد. رادیکال سوپراکسید نیمه عمر کوتاه در حدود ۲ تا ۴ میکروثانیه دارد. این آنزیم در همه ارگانیسم‌های هوازی و اغلب بخش‌های سلولی که اکسیژن فعال تولید می‌کنند، وجود دارد. تاجور و همکاران (۱) تنش سرما را به مدت ۲۴ ساعت در دماهای ۹، ۶، ۳، صفر، -۳، -۶ درجه سانتی‌گراد را بر روی نارنگی پیچ بررسی کردند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در ۳ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار بوده است و با افزایش تنش، فعالیت این آنزیم رو به کاهش نهاد، به طوری که کمترین فعالیت در -۶ درجه سانتی‌گراد گزارش شد. همچنین پوپو و همکاران (۲۶) تنش سرمای ۲ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲ ساعت و به فواصل ۰/۵ ساعته در گیاه تنباکو بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که با آغاز تنش، میزان فعالیت آنزیم SOD کاهش می‌یابد که نتایج آزمایش‌های تحقیق حاضر با این مشاهدات، شاید به علت تفاوت در نوع گیاه تحت تیمار، مطابقت نداشت.

پراکسیدازها به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان عالی شناسایی شده‌اند. اغلب پراکسیدازها، گلیکو پروتئین‌های حاوی هم می‌باشند که

اکسیداسیون بین H_2O_2 و احیاکننده‌ها را کاتالیز می‌کنند. آنها معمولاً از سوپراکسیدازهای فنولی مختلف برای حذف H_2O_2 استفاده می‌کنند، به همین دلیل جزء شناساگرهای بسیار مفید تنش‌های اکسیداتیو محسوب می‌شوند. سلطانی دلربا و همکاران (۲) تأثیر تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ ساعت در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) بررسی نمودند. نتایج آزمایش، کاهش فعالیت گاباکول پراکسیداز (POD) را نشان داد. شنگ چانگ و همکاران (۲۸) در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ و ۴ روز، دو رقم حساس و مقاوم به سرمای توتون را بررسی کردند. این تحقیقات نشان داد که میزان فعالیت آنزیم POD در شاخه‌های گونه مقاوم افزایش پیدا کرده است. همچنین در ریشه‌های گونه مقاوم میزان POD تغییر کمی داشت. در این تحقیق در مقایسه مقدار POD در برگ‌های گیاهان استویا، اختلاف معنی داری در ۲ سطح تیمار دمایی بررسی شده در مقایسه با کنترل، احتمالاً به دلایل فوق‌الذکر، مشاهده نشد.

APX آنزیم کلیدی برای تجزیه پراکسید هیدروژن است. براساس گزارشها، جمع‌آوری H_2O_2 از کلروپلاست یا سیتوزول، می‌تواند سطح تنش‌های اکسیداتیو را کاهش دهد. در مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های حساس به سرمای ذرت و گونه‌های مقاوم آن، فعالیت APX و SOD در گونه‌های مقاوم، دو برابر گزارش شده است. اهمیت نقش آنزیم APX در ارتباط با افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو در بسیاری از گیاهان دیگر نیز گزارش شده است. تاجور و همکاران (۱) تأثیر تنش سرما در دماهای ۹، ۶، ۳، صفر، -۳، -۶ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲۴ ساعت بر روی نارنگی پیچ، بررسی کردند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم APX در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار بود. نظری و همکاران (۵) تنش سرمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۴۸ ساعت بر روی ژنوتیپ‌های ایرانی نخود بررسی کردند. نتایج نشان داد که تنش سرما موجب افزایش فعالیت آنزیم APX شد. این

اکسیدان آنزیمی PPO برگ‌های گیاهان استویا اختلاف معنی داری ایجاد نکرد که این تفاوت در نتایج نیز احتمالاً به علت تفاوت در سطح تیمار و نوع گیاه تحت تیمار مربوط می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعات نشان داده است که دریافت تنش در سطح مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به عواملی نظیر ژنوتیپ، سطح تنش (شدت و مدت تنش) و همچنین مرحله رشد و نمود گیاه بستگی دارد. بنابراین انتخاب ژنوتیپهای مقاوم به دمای پایین برای تداوم پذیری کشت و تولید بهینه محصولات با اهمیت است.

در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های گیاه استویا تحت ۲ تیمار سرمایی ۵ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ ساعت، در میزان میزان غلظت پروتئین کل، پرولین و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیس موتاز و پراکسیداز تغییر معنی داری ایجاد نکرد. لذا می‌توان گفت که تیمارهای سرمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد برای گیاه استویا تنش‌زا نبوده و این گیاه در دماهای مذکور به شرط کوتاه بودن زمان تیمار (۲ ساعت)، احتمالاً از نظر فیزیولوژیکی متحمل می‌باشد. از نظر ظاهری نیز گیاهان تحت تیمار نسبت به کنترل، پس از اعمال تیمار، تفاوت محسوسی نداشتند.

تحقیق، نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم APX در برگ‌های گیاه استویا، اختلاف معنی داری را در ۲ تیمار دمایی بررسی شده در مقایسه با کنترل نشان ندادند.

در پاسخ به شرایط استرس زای زیستی (۲۶ و ۲۹) و غیر زیستی (۳۰) مختلف، افزایش بیان پلی‌فنل اکسیداز با مقاومت گیاه بر علیه شرایط استرس‌زا در ارتباط است. سطح بالای فعالیت پلی‌فنل اکسیداز، سطح اکسیژن آزاد در دسترس را برای تولید ROS کاهش می‌دهد. پلی‌فنل اکسیداز (PPO)، یک اکسیدکننده فنل می‌باشد و در شرایط تنش، افزایش فعالیت آن به عنوان شاخصی برای سنجش میزان مقاومت گیاهان نسبت به تنش می‌باشد. به نحوی که، فعالیت PPO در ارقام مقاوم بیشتر شده و دلیل آن هم افزایش تولید لیگنین و فنول‌های دیواره است که اندام‌های گیاهی را در مقابل یخ زدگی سخت‌تر و مقاوم‌تر می‌کند (۴). نظری و همکاران (۵) تنش سرمایی ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۴۸ ساعت بر روی ژنوتیپ‌های نخود ایرانی بررسی کردند و مشاهده نمودند که میزان فعالیت PPO بر روی چند رقم از گیاه کتان افزایش یافت. نظری و همکاران (۵) تأثیر تنش سرمایی ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۴۸ ساعت بر روی برخی ژنوتیپ‌های نخود ایرانی بررسی کردند و مشاهده نمودند که میزان فعالیت PPO در چند ژنوتیپ گیاه نخود تحت تأثیر سرما افزایش یافت. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، تیمار دمایی ۵ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد (در مدت دو ساعت) در مقایسه با کنترل (۲۵ درجه سانتی‌گراد)، در میزان فعالیت آنتی

منابع

۱. تاجور، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، حمیداوغلی، ی. و حسن ساجدی، ر. (۱۳۹۰). پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی پیچ تحت تنش دمای پایین، زیست‌شناسی گیاهی، ۹: ۱-۱۲.
۲. سلطانی دلربا، ن.، کریمیان، ر. و رنجبر، م. (۱۳۹۰). اثر برهم‌کنش سالیسیلیک اسید و تنش سرما بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی
۳. سلیمانی اقدم، م.، اصغری، م. ر.، خرسندی، ا.ع.، مراد بیگی، ه.، محمدخانی، ن.، مهیجی، م. و حسن پور اقدم، م. ب. (۱۳۹۳). سازوکارهای احتمالی تأثیر اسید سالیسیلیک بر کاهش سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه‌فرنگی، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، (۲) ۲۷: ۲۱۶-۲۲۷.

در گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhizaglabra* L.)، فصل نامه داروهای گیاهی، ۱: ۷-۱۳.

۴. کشاورز، ح.، مدرس ثانوی، س ع م. و زرین کمر، ف. (۱۳۹۳). تفاوت در پاسخ آنتی‌اکسیدانی دو رقم کلزا بهاره و پاییزه *Brassica (napus L.)* در شرایط مزرعه‌ای تحت تأثیر اسید سالیسیلیک، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، (۲): ۲۷: ۲۸۸-۲۹۸.
۵. نظری، م.، معالی امیری، ر. و رمضانپور، س س. (۱۳۹۰). بررسی پاسخ آنزیمی و بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز به تنش سرما به ژنوتیپ‌های ایرانی نخود، ژنتیک در هزاره سوم، ۱: ۲۲۹۹-۲۲۹۰.
6. Azymi S, Sofalian O, Jahanbakhsh G, S. Khomari S. (2012) Effect of chilling stress on Soluble Protein, sugar and Proline accumulation in cotton (*GossypiumhirsutumL.*) genotypes. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4 (12): 825-830.
7. Bates LS, Waldren RP, and Tear ID. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant and Soil*, 39: 205-208.
8. Beauchamp C, and Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44: 276-282.
9. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
10. Bowler C, Van Montagu M, and Inze D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 43: 83-116.
11. C. N. Giannoplitis SK. (1977) Ries, "Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants", *Plant Physiol*, 59: 309-314.
12. Close TJ. (1997) Dehydrins: a commonality in response of plants to dehydrations and low temperature. *Physiologia Plantarum*, 100: 291-296.
13. Elikins Rita MH. (1997) *Stevia* nature's sweetener. Woodland publishing, Inc, 160: 1-29.
14. Giannoplitis CN, and Ries SK. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants, *Plant Physiol*, 59: 309-314.
15. Gilmour SJ, Hajera RK, and Thomashow MF. (1988) Cold acclimation in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Physiol*, 87:745-750.
16. Gregory RPF, and Bendali DS. (1966) The Purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis L.*), *Biochem. J*, 101(3): 569-581.
17. Gupta E, Purwar S, Sundaram S, and Rai GK. (2013) Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*. A review, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3344-3345.
18. Hammerschmidt R, Nuckler EM, and Kuc J. (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant*, 20: 73-82.
19. Hoyle C, and Santos J. (2010) Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia, *International Food Research Journal*, 17: 937-946.
20. Habibi G, and Hajiboland R. (2011) Comparison of water stress and UV radiation effects on the induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae). *Acta Biol Cracov Bot*, 53 (1): 7-15.
21. Hughes MA. and Dunn MA. (1996) The molecular biology of plant acclimation to temperature. *J. Exp. Bot*, 47: 291-305.
22. Jarillo JA, Capel J, Leyva A, Martinez-Zapater JM, and Salinas J. (1994) Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology*, 25: 693-704.
23. Knight H, and Knight MR. (2001) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk, *Trends in Plant Sci*, 6: 262-267.
24. Kosakivska Klymchuk D, Negretzky V, Bluma D, and Ustinova A. (2008) Stress proteins and ultrastructural characteristics of leaf cells of plants with different types of ecological strategies. *Plant physiology*, 34: 405-418.
25. Manivannan P, Jaleel CA, and Sankar B. (2007) Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus L.* as induced by drought stress Colloids and Surfaces, *Biointer faces*, 59: 141-149.
26. Mayer AM, and Harel E. (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.

27. Nakano Y, and Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol*, 22: 867-880.
28. Sheng-chun XU, Yong-ping LI, Jin HU, Ya-jing GUAN, Wen-guang MA, Yun-ye ZHENG and Shuijin ZHU. (2010) Responses of Antioxidant Enzymes to Chilling Stress in Tobacco Seedlings, *Agricultural Sciences in China*, 9(11): 1594-1601.
29. Thipyapong P, Hunt MD, and Steffens JC. (2004) Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, 220: 105-117.
30. Thipyapong P, Melkonian J, Wolfe DW, and Steffens JC. (2004) Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci*, 164: 693-703.
31. Wisniewski M, Webb R., Balsamo R., Close TJ, Yu XM, and Griffith M. (1999) Purification, immunolocalization, cryoprotective and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*, 105: 600-608.
32. Yang HH, Li Rao L, Long G, Shi G, and Peng G. (2011) Effects of exogenous ABA on antioxidant enzymes in detached citrus leaves treated by rapid freezing, *African J of Biotechnology*, 10: 9779-9785.

Effect of low temperatures on the total protein, proline and the activity of some antioxidant enzymes of *Stevia rebaudiana* Bertoni

Afshar Mohammadian M. and Ansari Piri Z.

Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays, natural sweeteners, especially for people with diabetes have attracted great attention. *Stevia rebaudiana*, Asteraceae, because of having diterpene glycosides such as Stevioside, Dudoside and Rebaudioside which are 300 times sweeter than sucrose is very important, economically and scientifically. To investigate the impact of low temperatures on the total protein, proline and the activities of some enzymatic antioxidants of stevia, a completely random factorial design experiment with two levels of temperatures 15 and 5°C compared with the control (25°C) in three replications was conducted. According to the results, stevia leaves showed no significant differences in the total protein, proline content and the activity of the examined antioxidant enzymes including SOD, APX, POD, PPO, under low temperatures of 15 and 5°C. Also, apparently the treated plants were not significantly different compared to controls. Therefore, it can be concluded that the temperatures of 15 and 5°C cannot create stress for stevia plants, and so probably this plant is physiologically tolerant at this cold levels under short treatment time (2 hours).

Key words: antioxidant enzymes, low temperatures, proline, *Stevia rebaudiana*, total protein.