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

منصور افشارمحمدیان* و زهرا انصاری پیری

رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

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

چکیده

امروزه استفاده از شیرین کننده‌های 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 دی‌ترپن گلیکوزیدهایی از جمله Stevioside و Rebaudioside و Dudoside که بیش از ۳۰۰ بار از ساکارز شیرین تر هستند، از نظر اقتصادی و علمی بسیار مورد توجه است. این تحقیق، به منظور بررسی پروتئین کل، پرولین و برخی از آنتی اکسیدانهای 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 سانتی گراد) در سه تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده تفاوت معنی داری را در میزان پروتئین کل، پرولین و آنتی اکسیدانهای آنزیمی شامل سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و پلی فنل 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 تنش زا نبوده و این گیاه در دماهای مذکور، احتمالا از نظر فیزیولوژیکی متحمل می باشد.

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

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

مقدمه

استویا گیاهی بوته ای از تیره Asteraceae است که ارتفاع آن به یک متر نیز می‌رسد. برگهای آن دارای دی–ترپن گلیکوزید هایی از جمله Stevioside و (A, B, C, D, E) Rebaudiosideو Dudoside است، که برای اولین بار در پاراگوئه توسط گیاه شناسی به نام Bertoni شناسایی شد (۱۳). امروزه استفاده از شیرین کننده‌های طبیعی به ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها مصرف نمایند، اهمیت زیادی پیدا نموده اند. از ویژگیهای ترکیبات شیرین کننده این است که اولاً در سیستم گوارشی جذب نمی شود، لذا افراد دیابتی می‌توانند به راحتی از آن استفاده کنند. ثانیاً این شیرین کننده کالری زا نیست و مناسب افراد چاق و کسانی که مراقب کالری روزانه خود هستند، می باشد. 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

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 ۱۵درجه سانتی گراد 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 می شوند. 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 می شود 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 آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی شامل آنتی اکسیدانهای محلول در چربی (ویتامین E، بتاکاروتن، لیکوپن، زانتوفیل و...) و محلول در آب (اسید آسکوربیک، گلوتاتیون و...) است. سیستم آنتی اکسیدانی 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 از این گیاه موجود می‌باشد. لذا هدف این تحقیق، بررسی پروتئین کل، پرولین و برخی از آنتی اکسیدانهای 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 سانتی گراد 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 rpm ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، عصاره رویی با استفاده از سمپلر برداشته و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ،

عصاره رویی با استفاده از سمپلر به میکروتیوبهای با همان حجم منتقل شدند. میکروتیوبهای حاوی عصاره در زمان سایش برگها و سانتریفیوژ 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: اندازه گیری 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 پلاسمای 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 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 سانتی گراد، 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.

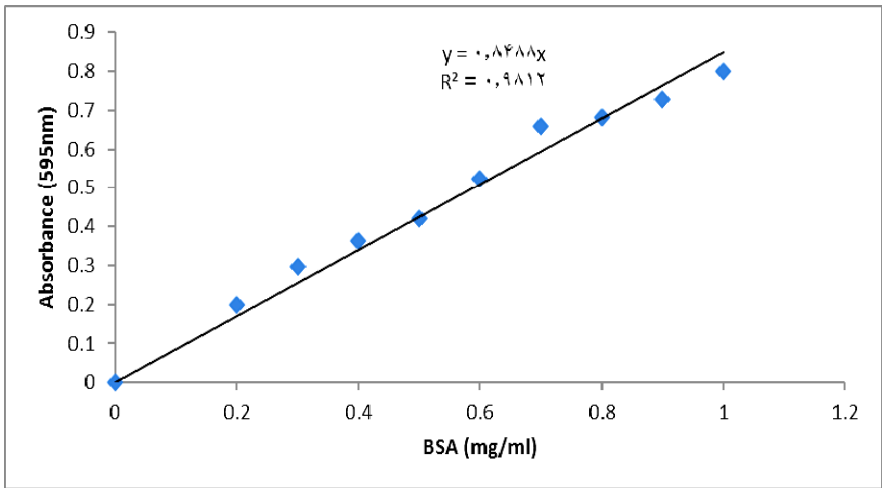
۵- آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز (SOD): برای استخراج SOD در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷ شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت SOD طبق روش جیانوپولیتز و رایز (۱۴) و از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد.

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 اندازه گیری شد.

مطالعات آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح تیمار سرمایی۱۵ 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 در۲۱ SPSS انجام و نمودارهای مربوط به تغییرات در برنامه Excel ۲۰۱۰ رسم شد.

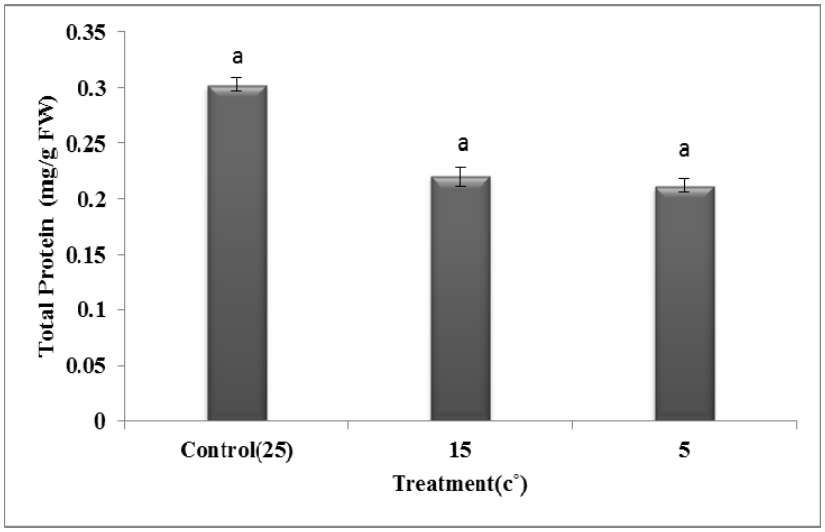
نتایج

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 جذبهای خوانده شده برای نمونه‌های استاندارد رسم و توسط شیب خط منحنی، غلظت پروتئین کل نمونه‌ها محاسبه شد (شکل ۱).



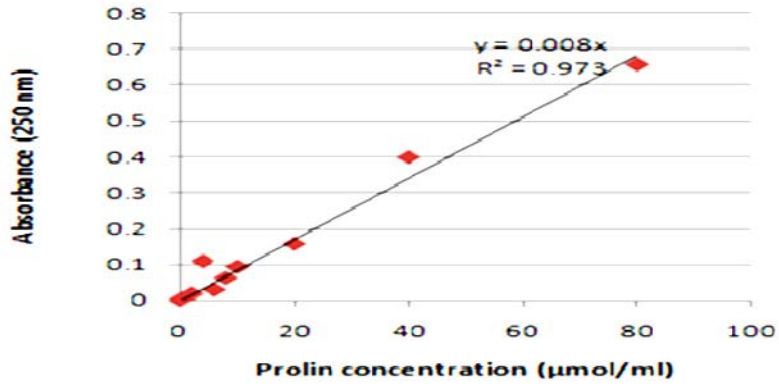
شکل ۱- منحنی استاندارد به روش برادفورد

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



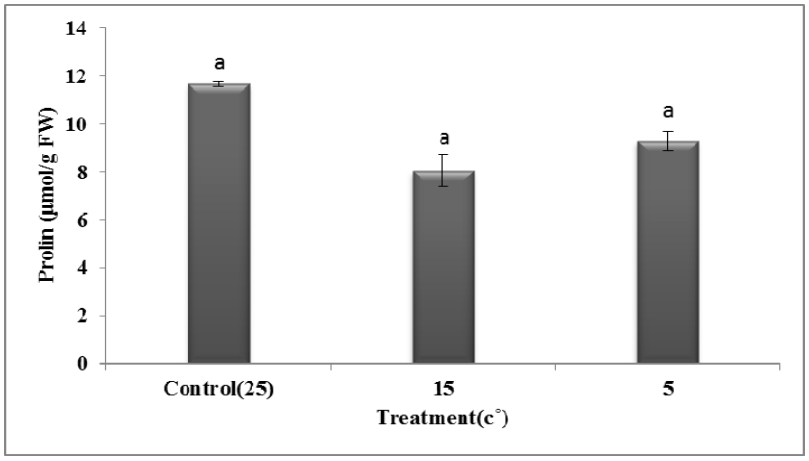
شکل ۲- تغییرات غلظت پروتئین کل در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگرعدم اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ ≥P است).

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 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.



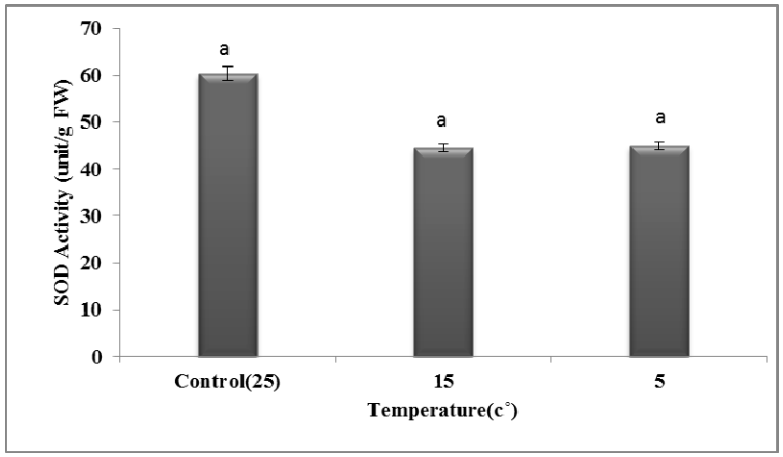
شکل ۳- منحنی کالیبراسیون غلظت‌های استاندارد پرولین

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



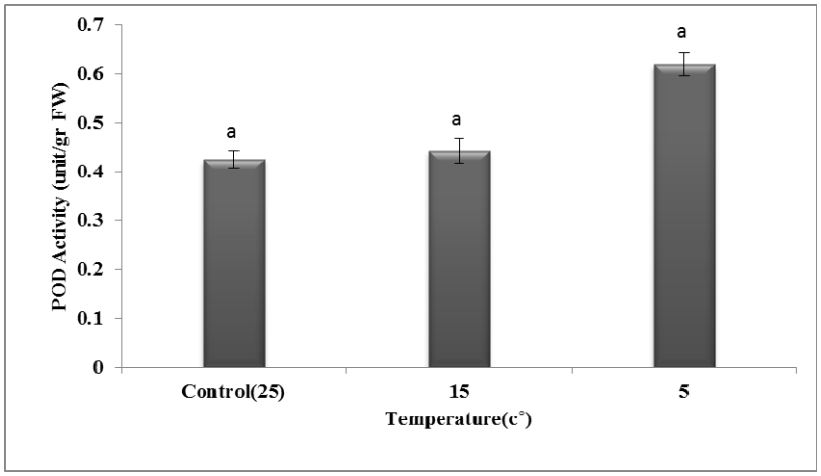
شکل۴- تغییرات محتوای پرولین در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگرعدم اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ ≥P است).

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



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 ± SE است. حروف یکسان بیانگرعدم اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ ≥P است).

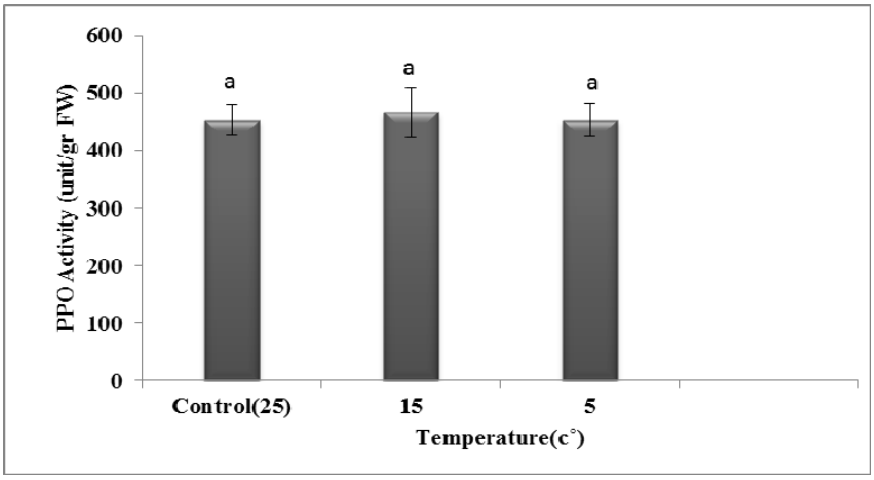
فعالیت آنزیم سوپراکسید (POD): نتایج مربوط به تأثیر تنش سرما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی در شکل ۶ ارائه شده است. با کاهش میزان دما، تغییرات معنی داری در میزان فعالیت این آنزیم در برگ این گیاه مشاهده نشد.



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 ± SE است. حروف یکسان بیانگرعدم اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ ≥P است).

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 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 معنی داری را در ۲ تیمار دمایی بررسی شده در مقایسه با کنترل نشان ندادند (نتایج آورده نشد).



شکل ۷- میزان فعالیت آنزیم PPO در برگ گیاه استویا تحت ۲ تیمار دمایی ۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل۲۵ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگرعدم اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ ≥P 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 می دهند. 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 آنتی اکسیدانی نظیر سوپر اکسید دیس موتاز و کالاتاز در پاسخ به تنش سرمایی و تجمع پروتئینهای مورد نیاز در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، تنظیم کننده‌های 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 معنی داری 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 فوق الذکر مربوط می‌شود.

پرولین تجمع یافته در گیاهان در پاسخ به تنش سرمازدگی، نقش مهمی در سمیت زدایی ROS و حفظ انسجام غشای سلولی ایفا می کند (۳). در چندین بررسی مشاهده شد که افزایش پرولین در تطابق سرمایی، به منظور جلوگیری از ایجاد تغییر در میزان آب گیاه است، این مسئله نشان می‌دهد که تجمع پرولین در ابتدای استرس سرمایی غیروابسته به تغییرات ایجاد شده در تعادل آب می‌باشد(۲۵). گیلمور و همکاران(۱۵) گزارش کردند که مقادیر پرولین 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 سانتی گراد بر روی نارنگی پیج اعمال کردند. نتایج نشان داد که از تیمار ۶ تا ۳- درجه سانتی‌گراد افزایش در محتوای

پرولین 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. تنایج افزایش غلظت پروتئین محلول و پرولین را نشان دادند. کوزاکیوسکا 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 پرولین در برگ گیاه می شود. با توجه به شکل ۴، مقدار پرولین 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 جمع آوری 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 پیج 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، به‌طوری 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 مهم ترین آنزیمهای آنتی اکسیدانی موجود در گیاهان عالی شناسایی شده اند. اغلب پراکسیدازها، گلیکو پروتئینهای حاوی هم می‌باشند که اکسیداسیون بین H_2O_2 و احیاکننده‌ها را کاتالیز می‌کنند. آنها معمولاً از سوبستراهای 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 سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ ساعت در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) بررسی نمودند. نتایج آزمایش، کاهش فعالیت گایاکول‌پراکسیداز(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 فوق الذکر، مشاهده نشد.

APX آنزیم کلیدی برای تجزیه پراکسید هیدروژن است. براساس گزارشها، جمع آوری H_2O_2 از کلروپلاست یا سیتوزول، می‌تواند سطح تنشهای اکسیداتیو را کاهش دهد. در مقایسه ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 ، ۶-، ۳- درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲۴ ساعت بر روی نارنگی پیج، بررسی کردند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم APX در دمای صفر درجه سانتی گراد 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

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 پلی فنل اکسیداز با مقاومت گیاه بر علیه شرایط استرس زا در ارتباط است. سطح بالای فعالیت پلی فنل اکسیداز، سطح اکسیژن آزاد در دسترس را برای تولید ROS کاهش می‌دهد. پلی فنل اکسیداز (PPO)، یک اکسید کننده فنل می‌باشد و در شرایط تنش، افزایش فعالیت آن به عنوان شاخصی برای سنجش میزان مقاومت گیاهان نسبت به تنش می باشد. 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 سخت تر و مقاومتر می‌کند (۴). نظری و همکاران (۵) تنش سرمای 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 ژنوتیپ های 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 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.

نتیجه گیری 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 نموی گیاه بستگی دارد. بنابراین انتخاب ژنوتیپهای مقاوم به دمای پایین برای تداوم پذیری کشت و تولید بهینه محصولات با اهمیت است.

در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی 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 پلی فنل 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 تنش زا نبوده و این گیاه در دماهای مذکور به شرط کوتاه بودن زمان تیمار (۲ ساعت)، احتمالا از نظر فیزیولوژیکی متحمل می‌باشد. از نظر ظاهری نیز گیاهان تحت تیمار نسبت به کنترل، پس از اعمال تیمار، تفاوت محسوسی نداشتند.

منابع

۱. تاجور، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، حمیداوغلی، ی. و حسن ساجدی، ر. (۱۳۹۰). پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی پیج تحت تنش دمای پایین، زیست شناسی گیاهی، ۹: ۱-۱۲.

۲. سلطانی دلربا، ن.، کرمیان، ر. و رنجبر، م. (۱۳۹۰). اثر برهم کنش سالیسیلیک اسید و تنش سرما بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی در گیاه شیرین بیان(*GlyCyrrhizaglabra* L.)، فصل نامه داروهای گیاهی، ۱: ۷-۱۳.

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 گوجه فرنگی، مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران)، (۲) ۲۷: ۲۲۷-۲۱۶.

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 مزرعه ای تحت تأثیر اسید سالیسیلیک، مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران)، (۲) ۲۷: ۲۹۸-۲۸۸.

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 Prolin 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. Oc- currence 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 lagenaricum. 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, Martnez-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 is 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, Melkoninan 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 (Prunuspersica). 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.