بررسی اثر مکمل پلی آمینی و سرما بر برخی پارامترهای فیتوشیمیایی گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni

کامران مرادی پینوندی، سیدمهدی رضوی*، صابر زهری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۱۰/۲۵

چکیده

استویا (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) گیاهی است چند ساله متعلق به تیره آفتابگردان که به‌دلیل سنتز گلوکوزیدهای استویول و خواص دارویی در سراسر دنیا کشت می‌گردد. در این پژوهش به منظور بررسی اثر تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد و مکمل پلی‌آمین بر برخی فاکتورهای فیتوشیمیایی گیاه، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. سنجش فلاوونوئیدها با روش کلرید آلومنیوم، تانن و فنول کل با روش فولین سیوکالتیو، میزان قند محلول با معرف آنترون، آنتوسیانین کل و گلیکوزیدهای استویول با اسپکتروفتومتر و فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH انجام گرفت. تیمارها شامل ۶ تیمار سرما و سرما توام با پلی‌آمین ۰ در دورهای زمانی ۰، ۴۸ و ۹۶ ساعت طرح ریزی شده و سنجش‌ها بر روی برگ‌های استویا در فاز رویشی در دانشکده علوم دانشگاه محقق اردبیلی در خرداد ۱۳۹۶ اجرا شد. نتایج بدست آمده نشان داد در سرمای ۹۶ ساعته توام با پلی آمین به‌ترتیب ۲۳۳ و ۳۵ درصد افزایش در میزان قند محلول و گلیکوزیدهای استویول را نسبت به شاهد می‌توان مشاهده کرد. در همین تیمار میزان افزایش فلاوونوئیدها آنتوسیانین‌ها، فنل کل و تانن به ترتیب ۴۰، ۱۰۰، ۲۰ و ۶۶ درصد بود. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه نیز تا حد ۲۰ درصد افزایش نشان داد. در مجموع میتوان گفتدر شرایط کشت این گیاه، تاثیر توام سرما و ترکیبات پلی‌آمینی می‌تواند با تحریک بیشتر روند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پتانسیل دارویی گیاه را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، استویا، سرما، فنل و فلاونویید کل، مکمل پلی‌آمینی.

*نویسنده مسئول: razavi694@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.) گیاهی از تیره‌ی آفتابگردان است که بومی جنگل‌های پاراگوئه می‌باشد. برگ‌های استویا به‌دلیل وجود گلیکوزیدهای استویول شیرین بوده و در صنایع غذایی از آن به عنوان قند رژیمی استفاده می‌شود. در دهه‌های اخیر، شیرین کننده‌های طبیعی در گیاه استویا به عنوان بهترین جایگزین، در صنایع وابسته به شکر و قند مطرح هستند (Lemus-Mondaca et al., 2012). به این دلایل امروزه در نقاط مختلف دنیا از جمله ایران کشت انبوه این گیاه مورد توجه می‌باشد. با این حال این گیاه بومی نواحی گرمسیری است و امکان کشت آن در مناطق سردسیر از جمله مناطق شمالغربی و غربی کشور که در دوره‌هایی از سال مخصوصا در اواخر فصل رویشی با سرما مواجه اند، باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. تنش سرما از جمله تنش‌های مهم غیرزیستی است که بر رشد و نمو گیاهان، به خصوص انواع مهم زراعی و دارویی اثرات محدود کننده دارد. سازوکارهایی که سبب می‌شود گیاه به تنش سرما و یخ زدگی مقاوم گردد شامل، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی، افزایش اسمولیت‌های سازگار، تغییر ترکیب چربی غشاء، تجمع آنتوسیانین‌ها و غیره است (Allen and Ort, 2001). پلی‌آمین‌ها در افزایش توان دفاعی سلول در مقابله با انواع تنش‌های غیرزیستی مثل شوری، سرما، خشکی، فلزات سنگین، دمای بالا و غرقابی نقش بسیار مهمی دارند (Gill and Tuteja, 2010). این ترکیبات که به عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به حساب می‌آیند، در سطوح مختلفی از مراحل رشد و تکوین سلولی، بیان ژن، متابولیسم، ایمنی گیاه، پیری و دیگر موارد با سایر هورمون‌های گیاهی در شبکه‌ای پیچیده همکاری تنگاتنگی دارند (Anwar et al., 2015). اهمیت پلی آمین‌ها در تنش سرما تا جایی است که به همراه سایر ترکیبات مثل قندها، قند الکل‌ها، اسید آمینه‌ها در جهت حفاظت سلول تولید می‌شوند. این ترکیبات در واقع می‌توانند هم نقش مستقیم محافظتی و هم نقش تنظیم کننده و شبه هورمونی در گیاه ایفا نمایند (Sanghera et al., 2011). بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از پلی آمین در محصولات سردخانه‌ای سبب افزایش ماندگاری، کاهش آسیب‌های ناشی از سرما و کاهش تولید اتیلن شده است (Champa et al., 2014; Mirdehghan and Rahimi, 2016; Opara et al., 2015).

تاکنون پژوهش‌های زیادی بر روی گیاه استویا از جهت بررسی پاسخ آن به تیمارها و تنش‌های مختلف انجام شده است. از جمله اثر پاسخ این گیاه به تیمارهای خشکی، شوری (Zeng et al., 2013)، سالیسیلیک اسید (Liopa-Tsakalidi et al., 2012)، متیل ژاسمونات (Moradi Peynevandi et al., 2014) بررسی گردیده است. با این وجود مطالعات کمی در مورد پاسخ این گیاه به تیمار سرما وجود دارد (Soufi et al.,2016; Emamian Tabarestani et al., 2016). در مورد اثر پلی آمین‌ها بر استویا گزارش‌های معدودی (در شیشه) در مورد اثر هم افزایی پلی‌آمین‌ها با هورمون‌های گیاهی در افزایش ترکیبات فنلی، قدرت احیایی و قندهای استویول و همچنین اثر ترمیمی در کاهش اثرات تنش فلزات سنگین وجود دارد (Prasann et al., 2012; Khalil et al., 2016). هدف این پژوهش سنجش‌های فیتوشیمیایی تحت تنش سرما همزمان با تیمار مکمل پلی آمینی بود تا میزان مقاومت این گیاه دارویی مهم و پاسخ آن به سرما، و امکان کاشت آن در مناطق مرتفع و سردسیر بررسی شود.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تیمار: این پژوهش در دانشکده‌ی علوم دانشگاه محقق اردبیلی و در خرداد ۱۳۹۶ انجام شد. ابتدا گیاهان تکثیر شده از طریق کشت بافت (در

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت MS) با محیط بیرون سازگار شدند و گیاهان گلدانی طی ۶ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۵۰۰ لوکس با دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد کردند. گیاهان در اتاقک رشد که قابلیت تنظیم دما از ۱ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد را داشت قرار گرفتند. خاک مورد استفاده کوکوپیت و پرلیت با نسبت ۱:۲ بود و از محلول غذایی هوگلند رقیق شده برای آبیاری استفاده گردید.

سپس گیاهان به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در ۶ گروه شاهد، شاهد پس از ۴۸ ساعت سرمادهی، شاهد پس از ۹۶ ساعت سرمادهی، گروه تیمار شده با مکمل پلی آمینی مایع (ساخت شرکت بسپار دانش سبز- DUPINIX GALAXY A4) در ۳ تیمار ۰، ۴۸ و ۹۶ ساعت، در ۳ تکرار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شدند. گیاهان در شدت نور ۴۵۰۰ لوکس با دوره شبانه روزی ۸/۱۶ ساعت روشنایی/ تاریکی قرار گرفتند. تیمار گیاهان با پلی‌آمین در دو نوبت به فواصل ۳ روز با نسبت ۴ میلی‌لیتر پلی آمین در ۱ لیتر آب مقطر به همراه ۱۰۰ میکرولیتر توئین ۲۰ قبل از سرمادهی صورت گرفت. سنجش‌های فیتوشیمیایی بر روی برگ گیاهان تیمار شده در مرحله رویشی انجام گرفت.

سنجش قند محلول: ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تر برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانل ۸۰ درصد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت قرار گرفت. پس از عبور از کاغذ صافی، الکل آن تبخیر و در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. به ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه گردید. پس از مخلوط شدن به‌مدت ۱۷ دقیقه در بن ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز استفاده شد (Yemm and Willis, 1954).

سنجش گلیکوزیدهای استویول: ۱۰۰ میلی‌گرم برگ خشک شده در ۵ میلی‌لیتر آب جوشانده شد و پس از فیلتر کردن و عبور از زغال فعال برای رنگ زدایی، در طول موج ۲۱۰ نانومتر جذب نمونه‌ها اندازه گیری شد. جهت رسم منحنی استاندارد از استاندارد ربادیوزید A (سیگما) استفاده شد. میزان گلوکوزیدهای استویول در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در وزن تر نمونه محاسبه شد (Rajab et al., 2009).

سنجش آنتوسیانین کل: ۱۰۰ میلی‌گرم برگتر در هاون با ۱۰ میلی‌لیتر متانل اسیدی (متانل و اسید کلریدریک به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) ساییده شد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفت. سپس در ۴۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ شد. جذب محلول بالایی در ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰ cm^{-1}mol^{-1}$ استفاده شد (Wanger, 1979).

سنجش فلاوونوئید کل: به ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ تازه استویا ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شده و با روش خیساندن عصاره گیری انجام شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره متانلی با ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانلی) و ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و پس از ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. از فلاونوئید کاتچین با غلظت‌های ۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر برای رسم منحنی استاندارد و کمی سازی استفاده شد. میزان فلاونوئید در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در وزن تر نمونه محاسبه شد (Chang et al., 2002).

سنجش فنل و تانن کل: ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر متانل عصاره گیری شد. به عصاره حاصل ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد. جذب محلول

Archive of SID

www.SID.ir

حاصل در طول موج ۷۲۵اندازه گیری شد. برای اندازه گیری تانن پودر PVPP(Polyvinylpolypyrrolidone) در عصاره متانلی ریخته شد (به نسبت ۱ درصد). این ترکیب تانن را رسوب داده و محلول رویی دوباره از طریق معرف فولین برای سنجش فنل استفاده شد. مقدار تانن از کسر جذب فنل کل و فنل بعد از رسوب تانن اندازه گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتراستفاده شد میزان فنول و تانن در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در وزن تر نمونه محاسبه شد (Slinkard and Singleton, 1977).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در این روش از رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. بعد از عصاره گیری با متانل و خشک کردن عصاره‌ها، غلظت‌های ۶۰ تا ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس محلولی با نسبت مساوی از عصاره‌ها و DPPH (۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانل) تهیه گردید و جذب نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه اندازه گیری شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه $\%R=A_D-A_S/A_D*100$ به‌دست آمد که در این رابطه A_D جذب DPPH و A_S جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر بود. برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از پارامتر IC_{50} استفاده شد. IC_{50} غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH را مهار می‌کند (Blois, 1958).

آنالیز آماری: تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و معنی دار بودن آن‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصدانجام شد.

نتایج

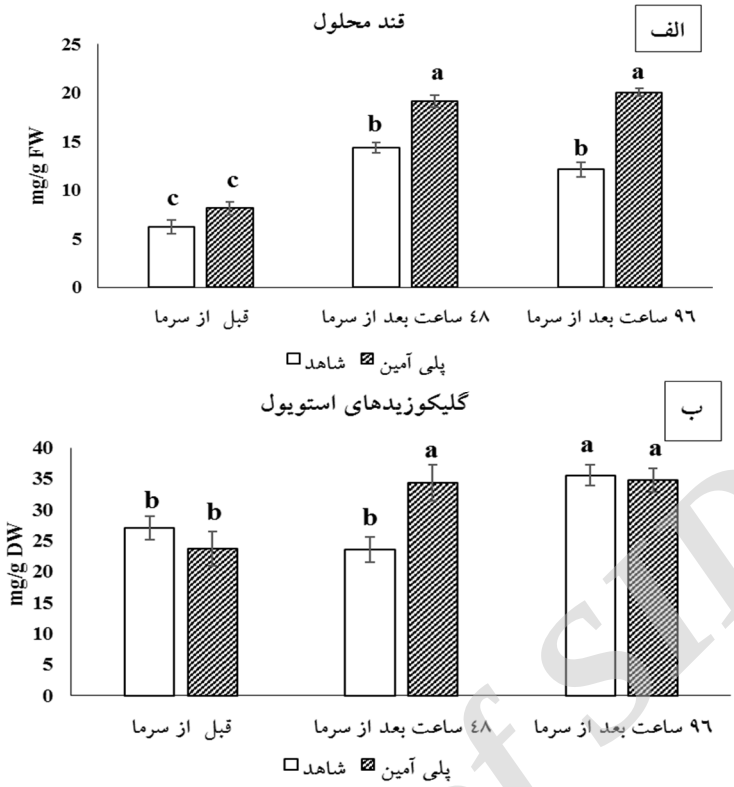
نتایج بدست آمده نشان داد که تیمار سرمایی سبب افزایش قند محلول پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت از سرما شد که از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود. این افزایش در گیاهان تیمار شده با پلی آمین بیشتر بود به طوری که با تیمار توام سرمای ۹۶ ساعته و پلی آمین میزان قند محلول تا ۲۳۳ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل ۱-الف). همچنین تیمار سرمایی سبب افزایش گلیکوزیدهای استویا پس از ۹۶ ساعت در شاهد و پلی آمین پس از ۴۸ ساعت شد. بیشترین افزایش در تیمار ۹۶ ساعت سرما توام با پلی آمین بود که در حد ۳۵ درصد نسبت به شاهد ارزیابی شد (شکل ۱-ب).

نتایج تیمار پلی آمین توام با سرما افزایش معنی‌داری را در میزان آنتوسیانین تیمارهای مختلف نشان داد. این افزایش در پلی آمین توام با ۹۶ ساعت سرما میزان قابل توجه را در حد ۱۰۰ درصد در مقایسه با شاهد نشان داد. حتی در تیمار پلی آمین بدون سرما نیز افزایش مقدار آنتوسیانین در مقایسه با شاهد در حدود۴۲ درصدقابل مشاهده است (شکل ۲-الف). همچنین در مقدار فلاوونوئیدها، فنول کل و تانن، سرمادهی توام با پلی آمین افزایش و اختلاف معنی‌داری در مقایسه با شاهد در سطح احتمال ۵ درصد دیده شد (شکل ۲-ب). در اینجا نیز بیشترین افزایش در سرمادهی ۹۶ ساعت توام با پلی آمین مشاهده شد که به ترتیب ۴۰، ۲۰ و ۶۶ درصد برای ترکیبات فوق الذکر بود (شکل ۳).

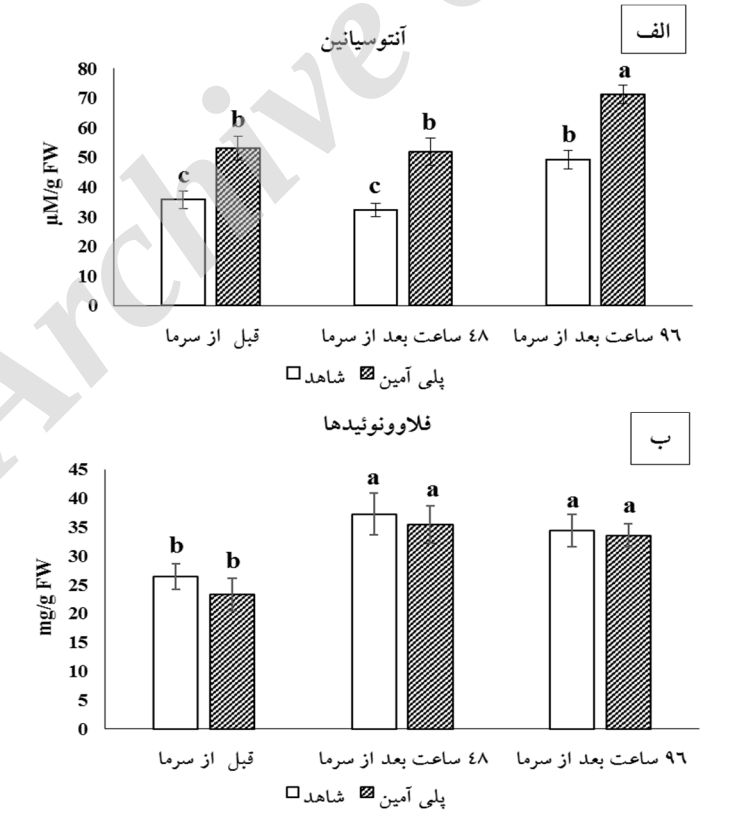
نتایج نشان داد که غلظت موثر عصاره متانلی استویا در اثر تیمار توام سرما و پلی آمین برای احیای رادیکال DPPH کاهش می‌یابد. موثرترین غلظت برای احیای ۵۰ درصد رادیکال DPPH در تیمار با پلی آمین پس از ۹۶ ساعت سرمادهی، دیده شد که در مقایسه با شاهد ۲۰ درصد کاهش و در نتیجه افزایش قدرت آنتی اکسیدانی گیاه را نشان می‌دهد (شکل ۴).

Archive of SID

www.SID.ir



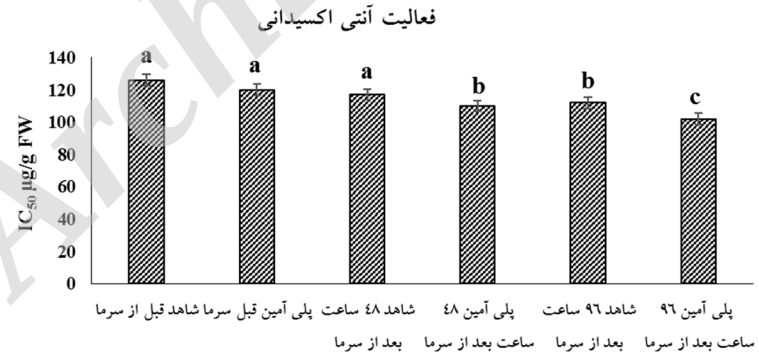
شکل ۱: اثر تیمارها بر افزایش قند محلول (الف) و گلیکوزیدهای استویا (ب).
حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود تفاوت با شاهد در سطح (p≤ ۰/۰۵) است.



شکل ۲: اثر تیمارها بر افزایش مقدار آنتوسیانین (الف) و فلاوونوئیدها (ب) در گیاه استویا.
حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود تفاوت با شاهد در سطح (p≤ ۰/۰۵) است.

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۳: اثر تیمارها بر افزایش مقدار فنل (الف) و تانن (ب) در گیاه استویا.
حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت با شاهد در سطح (p≤ ۰/۰۵) است.



شکل ۴: اثر تیمارها بر خواص آنتی اکسیدانی استویا.

حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت با شاهد در سطح (p≤ ۰/۰۵) است.

بحث

در این تحقیق مشخص شد که گیاه دارویی استویا پس از گذشت ۴ روز از اعمال تنش سرما آثار پژمردگی یا بافت مردگی (نکروز شدن) از خود نشان نداد. این می‌تواند به‌دلیل تحمل سرما حداقل در دوره‌های کوتاه مدت باشد. با اینکه سرما به تنهایی سبب افزایش پارامترهای فیتوشیمیایی شد، ولی این افزایش در گروه‌های تیمار شده با سرما توام با پلی آمین شدیدتر مشاهده شد. در حقیقت سرما توام با

Archive of SID

www.SID.ir

پلی آمین منجر به تشدید خواص دارویی استویا گردید.

امروزه کاملاً آشکار شده است که تنش سرما جنبه های مختلف فعالیت‌های سلولی را در گیاهان در جهت سازگاری و افزایش مقاومت تغییر می‌دهد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که تمامی پارامترهای فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی سنجش شده در گیاه استویا در شرایط تنش سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش قابل ملاحضه‌ای نشان می‌دهند که این افزایش در تیمارهای سرما توام با مکمل پلی آمینی شدیدتر نیز می‌باشد. این افزایش در واقع تلاشی است از طرف گیاه برای مقابله با شرایط تنش سرما. افزایش قند محلول و نیز افزایش استویول گلوکوزید کل می‌تواند مکانیسمی برای بالا بردن فشار اسمزی گیاه در شرایط تنش سرما باشد. قبلا این چنین افزایشی در گیاه استویا در سایر تنش‌های محیطی مثل تنش خشکی مشاهده شده است (Karimi et al., 2013). قند محلول اعم از سوکروز، گلوکز، فروکتوز و الیگوساکاریدها علاوه بر نقش تنظیمی در پتانسیل اسمزی، به دلیل برهم کنش با غشاء سلول نقش حفاظتی در برابر کم آبی و یخ زدگی را نیز دارند. پایداری غشاء پیش شرط لازم برای مقاومت به سرما است (Yuanyuan et al., 2009). علاوه بر این، قندهای محلول نقش تغذیه‌ای در تنش سرما برای زنده ماندن و گذر از سرما را نیز دارند. چون افزایش قند محلول بازخورد منفی برای فتوسنتز (کاهش بیان ژن‌ها) داشته و همچنین از فعالیت دستگاه فتوسنتزی و غذاسازی جلوگیری می-کند. قندهای محلول همچنین سبب افزایش پرولین، اسمولیت دیگر موثر در سرما می‌گردند. مطرح بودن به عنوان مولکول پیام رسان نیز از دیگر دلایل افزایش قندها در تنش سرما می‌تواند باشد (Sami et al., 2016). در پاسخ به تنش سرما حدود ۷۵ درصد متابولیتهای آرابیدوپسیس از ۲ تا ۲۵ برابر تغییر کرد که ۲۲ درصد این متابولیت‌ها را قندها تشکیل می‌دادند (Cook et al., 2004).

افزایش فلاوونوئید کل، آنتوسیانین کل و فنول کل نیز مکانیسم دیگری است که به نظر می‌رسد گیاه استویا برای حذف رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر تنش سرما و جلوگیری از آسیب رساندن آنها به گیاه در پیش گرفته است. در واقع افزایش مشاهده شده در قابلیت آنتی اکسیدانی استویا در آزمون DPPH نیز نتیجه افزایش میزان کلی متابولیت‌های ثانویه گیاه از جمله فلاونوئیدها، آنتوسیانین ها و... می‌باشد.

در پژوهش‌های قبلی به قابلیت بالای آنتی اکسیدانی در برگ‌های استویا تاکید شده است که این قابلیت جنبه دارو و درمانی به گیاه می‌بخشد (Zeng et al., 2013). نتایج پژوهش اخیر نشان داد با تاثیر سرما توام با مکمل پلی آمینی، این قابلیت به میزان قابل توجهی تشدید می‌گردد. قبلا به طور دقیقی مشخص شده است که افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی از مهمترین نقش‌های پلی آمین‌ها در گیاهان است. این ترکیبات شبه هورمونی به دلیل اتصال مستقیم به اجزای سلولی و همچنین آنیون‌ها و کاتیون‌ها از واکنش‌های اکسیداتیو توسط فلزات، اکسیداتیو نوری و پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کرده و به عنوان یک آنتی اکسیدان مطرح هستند (Groppa and Benavides, 2008). در واقع بخشی از افزایش قدرت آنتی اکسیدانی گیاه استویا در این تحقیق، علاوه برفلاوونوئیدها، آنتوسیانین ها و فنل ها می‌تواند به پلی آمین‌ها مربوط باشد. حتی در بررسی اثر پوتریسین و اسپرمیدین روی انگور در دمای پایین نشان داده شده است که این دو ترکیب پلی آمینی توام با سرما سبب افزایش آنتوسیانین و فنل کل شده و در نتیجه به طریقه غیر مستقیم نیز افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در سلول را باعث می‌شوند (Mirdehghan and Rahimi, 2016). در پژوهشی که روی گندم

Archive of SID

www.SID.ir

صورت گرفته است تیمار پلی آمین همراه با سرما سبب افزایش فلاوونوئیدها و قند محلول شده است که این گزارش با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد (Sheteiwy et al., 2017). همچنین تیمار گیاهان با پلی آمین‌ها علاوه بر اثرات مستقیم و غیر مستقیم اشاره شده، موجب افزایش بیوسنتز پلی آمین‌های داخلی گیاه می‌گردد. تیمارهای سرما، خشکی و شوری بر روی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی پلی آمین‌ها اثر مستقیم دارد (Alcázar et al., 2010). توام شدن تیمار پلی آمین با سرما نیز نقش افزایشی در تولید پلی آمین‌های داخلی و افزایش مقاومت گیاهان دارد (Groppa and Benavides, 2008). از طرف دیگر، اثر تجمعی پلی آمین و سرما نیز در پلی مریزه کردن اسکلت سلولی (اکتین و میوزین) نیز به اثبات رسیده است (Hamon et al., 2011). انسجام اسکلت سلولی در تنش‌هایی مثل سرما که پتانسیل اسمزی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و سبب پلاسمولیز و روی هم افتادن اجزای سلول می‌گردند، اهمیت پلی آمین‌ها را در این تنش دوچندان می‌کند.

افزایش فلاوونوئیدها تحت تنش سرما در این پژوهش در توافق با سایر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه است. افزایش ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی از گیاه کراتاگوس و افزایش بیان ژن‌های مسیر فلاوونوئیدها در آرابیدوپسیس در شرایط تنش سرما گزارش گردیده است (Kirakosyan et al., 2003; Leyva et al., 1995). افزایش فلاوونوئیدها و فنل و نیز کونجوگه شدن این ترکیبات با پلی آمین‌های داخلی نیز در گندم بعد از تنش سرما مشاهده شده است که نقش پلی آمین‌ها را در افزایش مقاومت گیاه و پایداری متابولیت‌های آن نشان می‌دهد (Moheb et al., 2011). همچنین افزایش میزان ترکیبات فنلی در گیاهان رشد یافته در ارتفاعات سردسیر منطقه تبت نسبت به انواع رشد یافته در مناطق گرمسیری گزارش شده است (Bao et al., 2015). در پژوهش حاضر همچنین افزایش فلاوونوئیدها همراه با افزایش آنتوسیانین‌ها بود که این افزایش می‌تواند به‌دلیل مسیر مشترک و ارتباط آن با هم باشد (Ferreyra et al., 2012).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به اثرات دارویی قابل توجه گیاه استویا که از یک طرف به دلیل داشتن گلوکوزیدهای استویول قابلیت ضد دیابتی داشته و از طرف دیگر با قابلیت آنتی اکسیدانی بالا اثرات پیشگیری و درمانی بر روی برخی دیگر از بیماری‌ها نشان می‌دهد، و با در نظر داشتن نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گیری نمود که در شرایط کشت این گیاه، تاثیر توام سرما و ترکیبات پلی آمینی می‌تواند با تحریک بیشتر روند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله گلیکوزیدهای استویول، فلاونوئیدها، فنول‌ها و... پتانسیل دارویی این گیاه را به طور قابل توجهی افزایش دهد.

همچنین مشخص شد با اینکه گیاه استویا به عنوان یک گونه گرمسیری چند ساله شناخته شده است ولی در دمای پایین با سازوکارهایی مثل تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و تجمع اسمولیت‌هایی همچون قند محلول سعی در تحمل سرما دارد. عدم پژمردگی یا نکروزه شدن در برگ‌ها در شرایط تنش سرما حداقل به مدت چند روز، مصادیقی از این روند تحمل می‌باشد. بنابراین کشت این گیاه دارویی در مناطق شمالغرب و یا مناطق مرتفع و کوهستانی کشور که احتمال وجود چنین دماهای پائینی وجود دارد، می‌تواند با بررسی‌های بیشتر مد نظر قرار گیرد. کشت این گیاه در چنین شرایطی منجر به بالا رفتن قابلیت دارویی استویا نیز می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. and Tiburcio, A.F. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta, 231(6): 1237-1249.
2. Allen, D.J. and Ort, D.R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science, 6(1): 36-42.
3. Anwar, R., Mattoo, A.K. and Handa, A.K. 2015. Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. 267-302. In: Tomonobu Kusano and Hideyuki Suzuki (eds.). Polyamines. Springer, Japan, 335 p.
4. Bao, Y.F., Li, J.Y., Zheng, L.F. and Li, H.Y. 2015. Antioxidant activities of cold-nature Tibetan herbs are significantly greater than hot-nature ones and are associated with their levels of total phenolic components. Chinese Journal of Natural Medicines, 13(8): 609-617.
5. Blois, M.S. 1958. Antioxidant Determination by the Use of Stable Free Radical. Nature, 181(4617): 1199-1200.
6. Champa, W.H., Gill, M.I.S., Mahajan, B.V.C. and Arora, N.K. 2014. Postharvest treatment of polyamines maintains quality and extends shelf-life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Flame Seedless. Postharvest Biology and Technology, 91(1): 57-63.
7. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182.
8. Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O. and Thomashow, M.F. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(42): 15243-15248.
9. Emamian Tabarestani, M., Farahmandfar, E., Pirdashti, H. and Yaghoubian, Y. 2016. Effect of light intensity on trend of chlorophyll fluorescence parameters changes in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) medicinal plant under cold stress. Journal of Plant Ecophysiology, 8(24): 100–111. (In Persian)
10. Ferreyra, M.L.F., Rius, S.P. and Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science, 3(1):1-15.
11. Gill, S.S. and Tuteja, N. 2010. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling & Behavior, 5(1): 26-33.
12. Groppa, M. D., and M. P. Benavides. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino acids, 34(1): 35-45.
13. Hamon, L., Savarin, P., Curmi, P.A. and Pastré, D. 2011. Rapid assembly and collective behavior of microtubule bundles in the presence of polyamines. Biophysical Journal, 101(1): 205-216.
14. Karimi, M., Hashemi, J., Ahmadi, A. and Abasi, A. 2013. Effects of drought on growth and steviol glycosides content in *Stevia rebaudiana*. Iranian Journal of Crop Sciences, 44(4): 693-702.
15. Khalil, S.A., Kamal, N., Sajid, M., Ahmad, N., Zamir, R., Ahmad, N. and Ali, S. 2016. Synergism of polyamines and plant growth regulators enhanced morphogenesis, stevioside content, and production of commercially important natural antioxidants in *Stevia rebaudiana* Bert. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 52(2): 174.
16. Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P.B., Warber, S., Bolling, S. and Chang, S.C. 2003. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(14): 3973-3976.
17. Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. and Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, 132 (2012): 1121-1132.
18. Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J.M. 1995. Low temperature induces the accumulation of

Archive of SID

www.SID.ir

phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. Plant Physiology, 108(1): 39-46.
19. Liopa-Tsakalidi, A., Kaspiris, G., Salahas, G. and Barouchas, P. 2012. Effect of salicylic acid (SA) and gibberellic acid (GA3) pre-soaking on seed germination of stevia (*Stevia rebaudiana*) under salt stress. Journal of Medicinal Plants Research, 6(3): 416-423.
20. Mirdehghan, S. H., and S. Rahimi., 2016. Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period. Food Chemistry, 196:1040-1047.
21. Moheb, A., Ibrahim, R.K., Roy, R. and Sarhan, F. 2011. Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. Phytochemistry, 72(18): 2294-2307.
22. Moradi Peynevandi, K., Sharifi, M. and Behmanesh, M. 2014. Effects of methyl jasmonate, on stevioside and rebaudioside A content and expression of the *ent*-Kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Steviarebaudiana* Bert. in vitro. Iranian Journal of Plant Biology, 6(21): 99-110. (In Persian)
23. Opara, U.L., Atukuri, J. and Fawole, O.A. 2015. Application of physical and chemical postharvest treatments to enhance storage and shelf life of pomegranate fruit-A review. Scientia Horticulturae, 197(1): 41-49.
24. Prasann, K., Padmanabh, D. and Pallavi, S. 2012. Role of polyamine in combating heavy metal stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni. under in vitro conditions. International Journal of Agriculture Environment & Biotechnology, 5(3): 193-198.
25. Rajab, R., Mohankumar, C., Murugan, K., Harish, M. and Mohanan, P. 2009. Purification and toxicity studies of stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Toxicology International, 16(1): 49.
26. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., and Hayat, S. 2016. Role of sugars under abiotic stress. Plant Physiology and Biochemistry, 109(1): 54-61.
27. Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W. and Singh, N.B. 2011. Engineering cold stress tolerance in crop plants. Current Genomics, 12(1): 30-43.
28. Sheteiwy, M., Shen, H., Xu, J., Guan, Y., Song, W. and Hu, J. 2017. Seed polyamines metabolism induced by seed priming with spermidine and 5-aminolevulinic acid for chilling tolerance improvement in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Environmental and Experimental Botany, 137(1): 58-72.
29. Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28(1): 49-55.
30. Soufi, S., D'Urso, G., Pizza, C., Rezgui, S., Bettaieb, T. and Montoro, P. 2016. Steviol glycosides targeted analysis in leaves of *Steviarebaudiana* (Bertoni) from plants cultivated under chilling stress conditions. Food Chemistry, 190(2016): 572-580.
31. Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology, 64(1): 88-93.
32. Yemm, E.W. and Willis, A.J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical journal, 57(3): 508.
33. Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L. and Hongbo, S. 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. African Journal of Biotechnology, 8(10): 2004-2010.
34. Zeng, J., Cai, W., Yang, W. and Wu, W. 2013. Antioxidant ability, phenolics and flavnoids content in the ethanolic extracts of the stems and leaves of different *Stevia rebaudiana* Bert lines. Sugar Technology, 15(2): 209-213.
35. Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B. and Wu, W. 2013. Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(24): 5720-5726.

Archive of SID

www.SID.ir

The combined effect of cold stress and polyamine supplement on some phytochemical parameters of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni.

Moradi Peynevandi K., Razavi S.M.*, Zahri S.
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received Time: 2017/08/01 Accepted Time: 2018/01/15

Abstract

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoniis a perennial herb belongs to Asteraceae family. The plant has been cultivated in all over of the world for its sweetener compounds such as: steviol glycosides. In this study to evaluate the effects of cold stress (4ºC) combined with polyamine supplement on some phytochemical parameters an experiment was carried out in a randomized design with three replications. The phytochemical measurement were obtained by spectrophotometery methods consisted of Folinciocalteu method for tanins-phenols, aluminium chloride method for flavonoids, Anthon reagent for soluble sugars and spectrophotometer for anthocyanins and steviol glycosides. The treatments were conducted in six groups contained of cold and cold-polyamine treatments in 0, 48 and 96-hours of cold courses. The measurements were performed on the plant leaves at vegetative stage at Mohaghegh Ardabili University in May 2017. The results showed that the cold stress tends to a significant increase in all of measured parameters at $p\leq0.05$. This increase was higher in the cold-polyamine treated plants than cold only treated groups of the plant. The results indicated that total soluble sugar and steviol glycosides were increased 233 and 35 percent, respectively, than control at 96-h cold combined with polyamine treatment. At same treatment, total flavonoid, anthocyanin, total phenol and tannin contents were increased up to 40, 100, 20 and 66 percentage than control, as well as. At the same plant group, the plant antioxidant potential was also elevated 20 percentage than control ones. It can be concluded thatcombined treatment of *Stevia rebaudiana* with cold and polyamine supplement can induced the secondary metabolite biosynthesis in the plant and hence might be tend to a considerably increasing in the plant pharmaceutical potential.

Keywords: Antioxidant activity, Cold, Polyamine supplement, *Stevia rebaudiana*

Archive of SID

*Corresponding author; razavi694@gmail.com

www.SID.ir