

## بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در برگ و ساقه گیاه استویا تحت تنش دمایی

### پایین

نسرین شیرزادی<sup>۱</sup>، مریم نصراصفهان‌نی<sup>۱\*</sup> و شکوفه حاجی هاشمی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، بهبهان، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۷ تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵

### چکیده

دمای پایین یکی از فاکتورهای مهم محدود کننده رشد، نمو و پراکنش گیاهان است. استویا (*Stevia rebaudiana*) یک گیاه علفی دارویی شیرین است که در بسیاری از مناطق جهان کشت می‌شود و ممکن است تنش دمایی پایین را در زمستان تجربه کند. در این مطالعه، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی که در گیاهان استویا تحت تنش دمایی پایین رخ می‌دهد و باعث بقاء آنها می‌شود مورد بررسی قرار گرفت. استویا برای یک ماه تحت تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در برگ و ساقه اندازه‌گیری شد. در دمای پایین محتوی کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در برگ کاهش پیدا کرد. به علاوه، تجمع افزایش یافته پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید در برگ و ساقه استویا در معرض تنش دمایی پایین مشاهده شد. تنش دمایی پایین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز را در برگ و ساقه استویا افزایش داد. تنش دمایی پایین به تجمع متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) و فعالیت افزایش یافته آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز شان (پلی‌فنیل آمونیل‌باز و تیروزین آمونیل‌باز) در برگ و ساقه استویا منجر شد. در پاسخ به تنش دمایی پایین، استویا تجمع قند محلول کل، قند احیاء آمینواسید کل و پرولین را در برگ و ساقه افزایش دادند. به طور کلی، برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از تنش دمایی پایین، مجموعه‌ای از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه استویا فعال شد که این مکانیسم‌ها می‌توانند برای شناسایی رقم‌های استویا مقاوم به دمای پایین استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: دمای پایین، استویا، تنش اکسیداتیو، سیستم آنتی‌اکسیدانت، گونه‌ها فعال اکسیژن

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۱۰۳۸۷۰، پست الکترونیکی: Esfahani.m@lu.ac.ir

### مقدمه

دمای پایین (سرمازدگی) که به دمای بین ۰ تا ۱۵ درجه سانتیگراد اطلاق می‌شود، یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که باعث کاهش رشد و تولید محصول در بسیاری از گیاهان مهم از نظر اقتصادی می‌شود (۱۸). گیاهان به عنوان موجودات بی‌حرکت تغییرات دمایی را در محیط اطرافشان تشخیص داده و سپس به آن تغییرات پاسخ می‌دهند و تعادل دمایی مناسب را در درون سلول-هایشان برقرار می‌کنند. این تعادل سلولی از طریق تنظیمات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ایجاد می‌شود (۱۸). دمای پایین تغییراتی را در ساختار غشاء سلولی و ترکیب لیپیدهای غشاء، نشت الکترولیت‌ها و آمینواسیدها، محتوی پروتئین‌ها و فعالیت‌های آنزیمی و همچنین تغییرات در یک طیف گسترده‌ای از اجزاء سلولی نظیر پلاستیدها، غشاءهای تیلاکوئیدی، فسفریلاسیون پروتئین-

جمله دمای پایین انباشته می‌کنند. محلول‌های سازگار ترکیبات آلی محلول با وزن مولکولی پایین هستند که معمولاً در غلظت‌های بالا در سلول‌های گیاهی سمیت ایجاد نمی‌کنند. این محلول‌ها از طریق تعدیل و تنظیم اسمتیک سلولی، پاکسازی ROS، محافظت از یکپارچگی غشاءها و ثبات آنزیم‌ها و پروتئین‌ها از گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی محافظت می‌کنند. از محلول‌های سازگار می‌توان به پرولین، سوکروز، پلی‌ال‌ها، ترهالوز، گلیسین بتائین و آلانین اشاره کرد (۲۱). به هر حال، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی که گیاهان برای مقابله با تنش دمای پایین استفاده می‌کند بسته به نوع گونه گیاهی، شدت تنش و دوره تنش متفاوت است و شناسایی این تغییرات برای هر گونه گیاهی می‌تواند به متخصصان بیوتکنولوژی کمک کند که بتوانند از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک گیاه مقاوم به تنش سرما ایجاد کنند.

استویا (*Stevia rebadiana* Bertoni) یک گیاه چندساله دارویی شیرین متعلق به خانواده آستراره و بومی مناطق پاراگوئه، برزیل و آرژانتین با آب و هوایی نیمه گرمسیری با زمستان‌های ملایم است. برگ‌های استویا دارای گلیکوزیدهای دی‌ترین یا گلیکوزیدهای استویول شیرین است که محلول در آب بوده و تقریباً ۱۵۰ تا ۳۰۰ مرتبه شیرین‌تر از شکر هستند. علاوه بر مزه شیرین برای این گیاه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (۲۰). امروزه استویا به دلیل ارزش دارویی‌اش در سراسر جهان کشت می‌شود و احتمالاً این گیاه در مناطقی با زمستان‌های سرد تنش سرما را تجربه می‌کند بنابراین در این مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا در مواجهه با دمای پایین مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی که توسط تنش سرما در گیاه استویا تحت تاثیر قرار می‌گیرد به محققان کمک می‌کند که رقم‌های استویای حساس و مقاوم به سرما را شناسایی کنند. به علاوه، شناسایی این شاخص‌ها مسیر را برای تولید رقم‌های استویای مقاوم به سرما توسط

های تیلوکوئیدی و میتوکندری‌ها ایجاد می‌کند (۳۷). به علاوه، دمای پایین باعث ایجاد اختلال در فعالیت‌های متابولیکی در گیاهان می‌گردد به عنوان مثال، میزان فتوسنتز در دماهای پایین کاهش می‌یابد که به تشکیل انرژی برانگیختگی اضافی در گیاهان منجر می‌شود (۳۲). تنش سرمزدگی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال‌های آنیون سوپراکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال‌های هیدروکسیل ( $OH^{\cdot}$ ) را در بخش‌های مختلف سلول نظیر کلروپلاست‌ها، پراکسی-زوم و میتوکندری افزایش می‌دهد (۱۱). اگرچه تولید پیوسته ROS در سطح غیرسمی به عنوان یک سیگنال برای ارتباطات سلول به سلول عمل می‌کند ولی تجمع مقادیر بالای ROS در محیط سلولی باعث تنش اکسیداتیو می‌شود که فعالیت‌های متابولیکی ضروری برای سلول و نتیجتاً بقاء سلول را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد (۱۱). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده به واسطه تنش دمای پایین مکانیسم‌های محافظتی گوناگون شامل سیستم آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی و غیرآنزیمی را فعال می‌کنند. از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو دخیل در حذف ROS می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی‌فنل اکسیداز (PPO)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) اشاره کرد. رادیکال‌های آزاد  $O_2^{\cdot-}$  ابتدا توسط SOD به  $H_2O_2$  که یک مولکول غیررادیکالی است تبدیل کرده و در نهایت  $H_2O_2$  تولید شده توسط آنزیم‌های CAT، APX، GPX و PPO به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود (۱۴). از سیستم‌های آنتی‌اکسیداتیو غیرآنزیمی می‌توان به متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها اشاره کرد که در نتیجه فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و یا تیروزین آمونیا لیاز (TAL) به وجود می‌آیند و نقش بسزایی در سیستم دفاعی سلول‌های گیاهی در مقابل ROS بازی می‌کنند (۱۱). گیاهان مقادیر زیادی از انواع مختلف محلول‌های سازگار را در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی از

اندازه‌گیری میزان پرولین از روش باتس و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد (۵). مقدار آمینواسیدهای آزاد براساس رنگ سنجی با نین هیدرین در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۱).

**اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، مالون‌دآلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل:** میزان  $H_2O_2$  و MDA در نمونه‌ها مطابق روش ولیکوا و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد (۳۹). برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی-اکسیدانت کل از معرف ferric reducing antioxidant power (FRAR) شامل بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار (pH=۳/۶)، ۱۰ میلی‌مولار ۲ و ۴ و ۶-تری‌پری‌دیل-S-تریازین (TPTZ)، ۴۰ میلی‌مولار هیدروکلرواستیک اسید و ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد (۳۵).

**اندازه‌گیری میزان فنل کل و فلاونوئیدها:** میزان فنل کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتو در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۳). میزان فلاونوئیدها توسط اسپکتوفتومتر در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰، ۳۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۳).

**اندازه‌گیری کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین:** کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها به وسیله اتانول ۹۶ درصد استخراج و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شدند (۲۶). میزان آنتوسیانین براساس روش واگنر (۱۹۷۹) در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۴۰).

**استخراج عصاره جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها:** بافت تازه (۰/۹ گرم) در یک هاون چینی سرد با ۱/۵ میلی لیتر بافر استخراجی سرد که شامل ۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم با (pH=۷)، ۱ میلی مولار اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA)، ۲-۱ درصد پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) ساییده شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ

روش‌های بیوتکنولوژی مدرن و یا دستکارهای ژنتیکی تسهیل می‌کند.

## مواد و روشها

به منظور بررسی تأثیر تنش دمای پایین روی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا (*S. rebaudiana*) رقم ۱ که از بانک ژن استویا، کشور بلژیک (EUSTAS Stevia Gene Bank) تهیه شد، این تحقیق به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. ابتدا بذرهاى استویا را چندین مرتبه با آب معمولی شسته و سپس با الکل ۷۰ درصد (برای مدت ۳۰ ثانیه) و محلول ۲۰ درصد حجمی وایتکس (هیپوکلریت سدیم) (برای مدت ۱۵ دقیقه) ضدعفونی کرده و مجدداً در زیر دستگاه لامینار ایرفلو سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهاى ضدعفونی شده در ظرف‌های حاوی محیط کشت پایه MS (۳۰) کشت شدند و در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتیگراد و نور  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  نگهداری شدند. برای ریزازدیادی و تولید انبوه گیاه استویا در شرایط استریل از گیاهان کامل ایجاد شده از کشت بذر استفاده شد. گیاهان دو ماهه حاصل از مرحله ریز ازدیادی به مدت یک ماه در اتاقک‌های رشد با شرایط دمایی یکسان شب و روز تحت تأثیر تیمارهای دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و گیاهان رشد یافته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به عنوان شاهد استفاده شدند (۲۱). برگ و ساقه گیاهان نگهداری شده به مدت یک ماه تحت تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد جدا شده و در فریزر  $80^\circ \text{C}$  - برای اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نگهداری شدند.

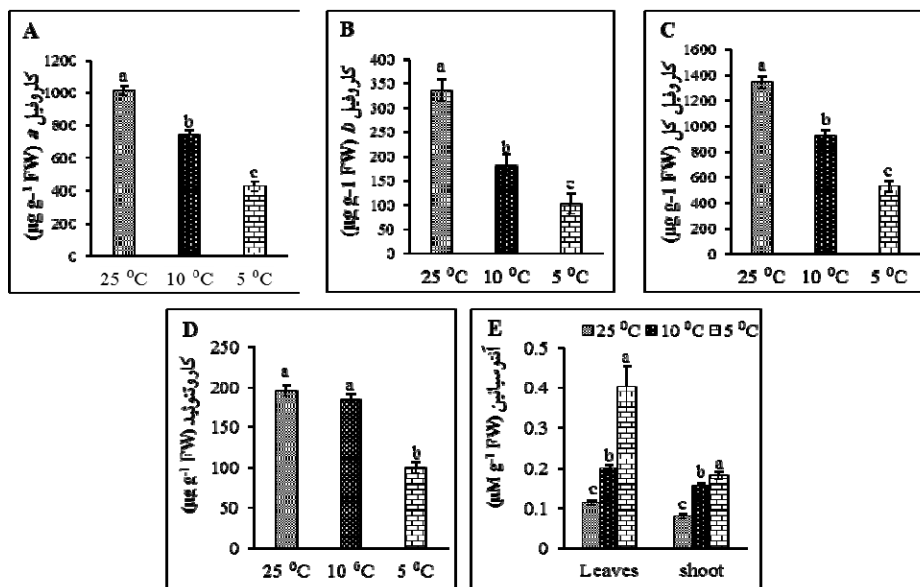
**اندازه‌گیری میزان قند کل، قند احیاء و پرولین و آمینواسیدهای آزاد:** میزان قند کل و احیاء در نمونه‌ها به ترتیب مطابق روش‌های البالاسمه و همکاران (۲۰۱۳) و داببوس و همکاران (۱۹۵۶) اندازه‌گیری شد (۴ و ۱۳). برای

**تحلیل داده‌ها:** برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد ( $P \leq 0.05$ ) و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

## نتایج

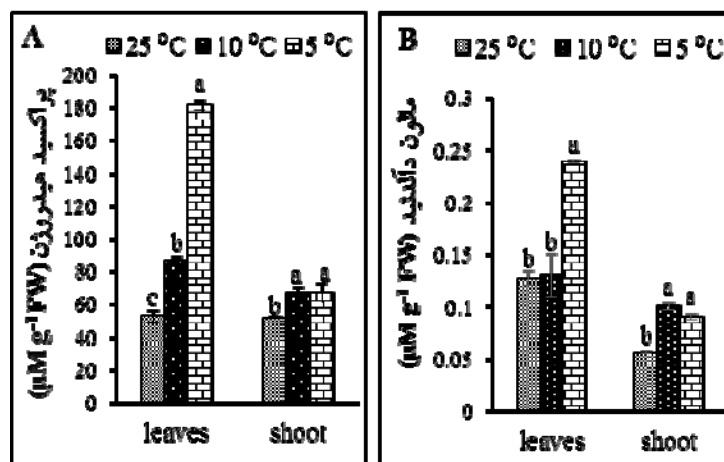
**تأثیرات دمای پایین روی میزان کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها در برگ و ساقه گیاه استویا:** نتایج نشان داد که در تنش‌های دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد، میزان کلروفیل *a* برگ به ترتیب ۴۲، ۲۷ درصد، میزان کلروفیل *b* برگ به ترتیب ۶۹ و ۴۶ درصد و میزان کلروفیل کل برگ به ترتیب ۶۱ و ۳۲ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان دادند (شکل A-C). میزان کاروتنوئیدهای برگ در دمای ۵ درجه سانتیگراد ۴۹ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل D-۱). میزان آنتوسیانین‌ها در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۲۶۴ و ۸۲ درصد افزایش را در برگ و به ترتیب ۱۲۵ و ۸۷ درصد افزایش را در ساقه در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل E-۱).

شد. محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و میزان پروتئین‌های محلول استفاده گردید. میزان پروتئین محلول با استفاده از روش برادفورد (۱۹۷۶) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۸). فعالیت CAT توسط کاهش غلظت  $H_2O_2$  در طول موج ۲۴۰ نانومتر بر انجام گرفت (۲). فعالیت APX توسط میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر براساس اکسیداسیون آسکوربات و کاهش غلظت آسکوربات انجام گرفت (۳۱). فعالیت PPO توسط افزایش در میزان جذب به واسطه اکسیداسیون وابسته به  $H_2O_2$  پیروگال در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۹). فعالیت GPX براساس افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به واسطه اکسیداسیون گایاکول انجام گرفت (۳۹). فعالیت آنزیم SOD براساس بازدارندگی نوری نیتروبلو تترازولیم در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵). فعالیت آنزیم PAL در طول موج ۲۹۰ نانومتر براساس میزان تولید سینامیک اسید اندازه‌گیری شد (۶). فعالیت آنزیم TAL در طول موج ۳۳۳ نانومتر واکنش براساس تبدیل تیروزین به کوماریک اسید اندازه‌گیری شد (۶).



شکل ۱- تأثیر تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد روی میزان (A) کلروفیل *a*، (B) کلروفیل *b*، (C) کلروفیل کل و (D) کاروتنوئید برگ و (E) میزان آنتوسیانین برگ و ساقه گیاه استویا. مقادیر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SE. مقایسه میانگین‌ها در برگ و ساقه به طور مجزا انجام گرفت. حروف غیرمشابه در برگ و ساقه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن بین تیمارها است. FW: وزن تازه بافت

درجه سانتیگراد ۸۷ درصد افزایش را در مقایسه با شاهد نشان داد و میزان آن در ساقه در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد به ترتیب ۶۲ و ۸۲ درصد افزایش نشان داد (شکل B-۲).

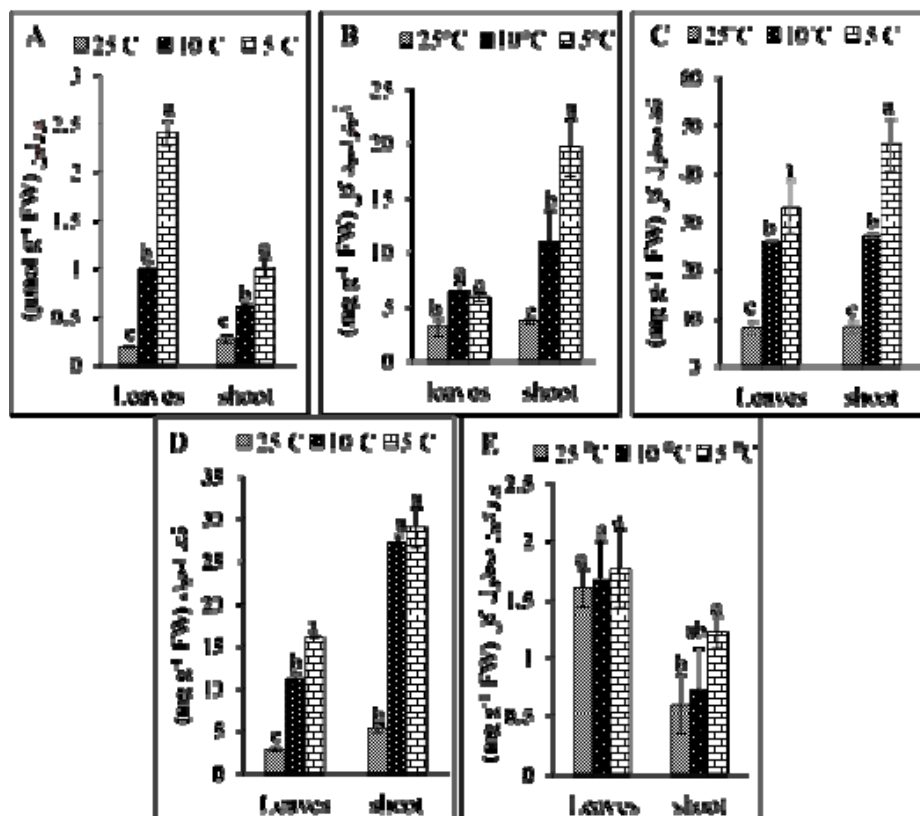


شکل ۲- تأثیر تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد روی میزان (A) پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و (B) مالون‌دآلدئید (MDA) برگ و ساقه گیاه استویا. مقادیر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SE. مقایسه میانگین‌ها در برگ و ساقه به طور مجزا انجام گرفت. حروف غیر مشابه در برگ و ساقه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن بین تیمارها است. FW: وزن تازه بافت

درجه سانتیگراد به ترتیب ۳۲۶ و ۲۳۳ درصد و در ساقه به ترتیب ۴۸۰ و ۲۴۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (شکل C-۳). همچنین، در تیمارهای دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد، میزان قند احیا در برگ به ترتیب ۴۸۲ و ۳۰۷ درصد و در ساقه به ترتیب ۴۵۶ و ۴۲۱ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل D-۳). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان پروتئین محلول برگ در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد تفاوت معنی‌داری را با میزان آن در شاهد نشان نداد ولی میزان آن در ساقه در دمای ۵ درجه سانتیگراد ۱۰۲ درصد در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (شکل E-۳).

تأثیرات دمای پایین روی میزان  $H_2O_2$  و MDA در برگ و ساقه گیاه استویا: میزان  $H_2O_2$  در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۲۴۴ و ۶۵ درصد در برگ و به ترتیب ۲۹ و ۳۰ درصد در ساقه در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (شکل A-۲). میزان MDA برگ در تیمار دمایی ۵

تأثیرات دمای پایین روی میزان پرولین، آمینواسید کل، قند محلول کل، قند احیاء و پروتئین محلول کل در برگ و ساقه گیاه استویا: میزان پرولین برگ در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد به ترتیب ۱۲۶۵ و ۴۶۴ درصد و در ساقه به ترتیب ۲۸۹ و ۱۳۵ درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل A-۳). نتایج حاصل از سنجش اسیدهای آمینه کل در برگ و ساقه گیاه استویا نشان داد که میزان اسید آمینه کل برگ در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۹۱ و ۱۰۹ درصد و در ساقه به ترتیب ۴۵۱ و ۲۰۷ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل B-۳). میزان قند محلول کل برگ در دمای ۵ و ۱۰

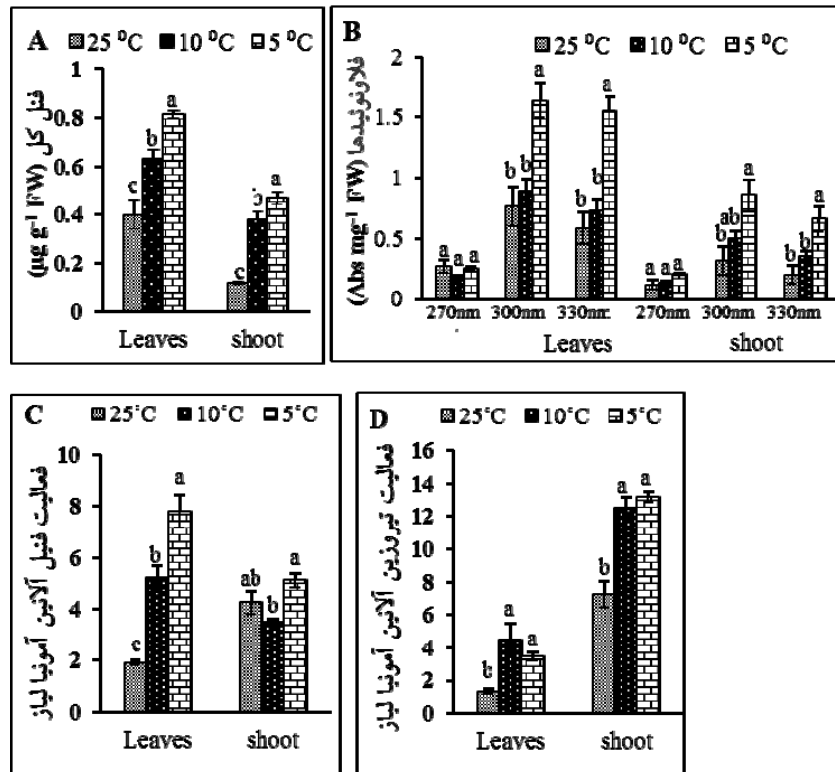


شکل ۳- تأثیر تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد روی میزان (A) پرولین، (B) آمینواسید کل، (C) قند محلول کل، (D) قند احیاء و (E) پروتئین محلول کل برگ و ساقه گیاه استویا. مقادیر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SE. مقایسه میانگین‌ها در برگ و ساقه به طور مجزا انجام گرفت. حروف غیرمشابه در برگ و ساقه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن بین تیمارها است. FW: وزن تازه بافت

نسبت به شاهد به ترتیب ۱۷۰ و ۲۳۰ درصد افزایش نشان داده است (شکل B-۴).

نتایج نشان داده که میزان آنزیم PAL برگ در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد به ترتیب ۳۰۸ و ۱۷۳ درصد افزایش یافته و فعالیتش در ساقه در دمای ۵ درجه سانتیگراد ۲۱ درصد در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (شکل C-۴). میزان فعالیت آنزیم TAL برگ در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۱۶۱ و ۲۳۷ درصد و در ساقه به ترتیب ۸۲ و ۷۳ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل D-۴).

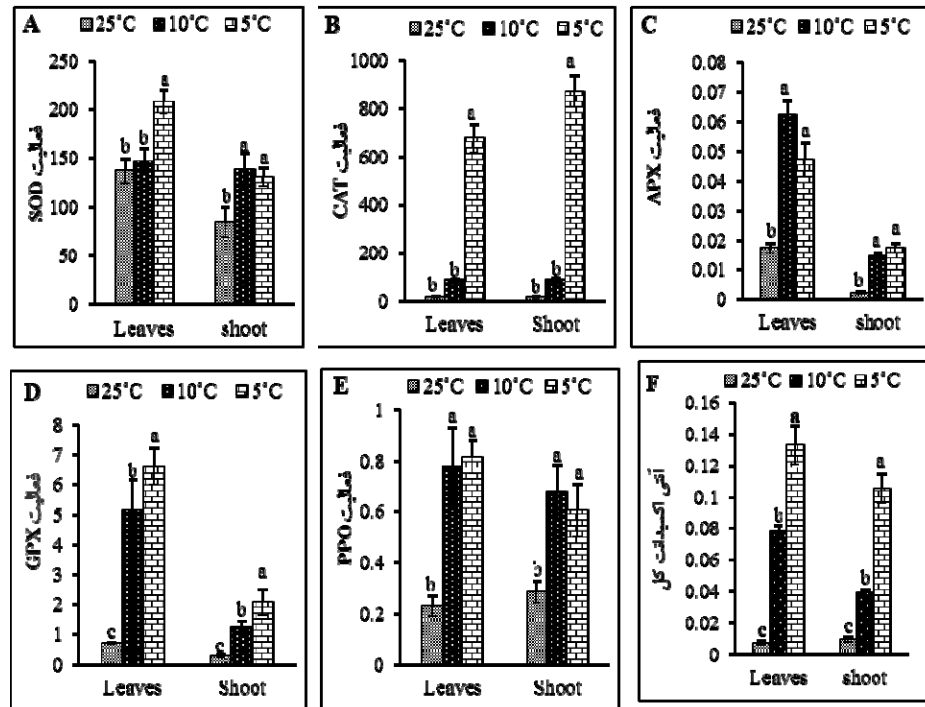
تأثیرات دمای پایین روی میزان فنل کل و فلاونوئیدها و فعالیت آنزیم های PAL و TAL در برگ و ساقه گیاه استویا: نتایج آزمایشات این تحقیق نشان داد که میزان فنل کل برگ در دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۱۰۸ و ۶۱ درصد و در ساقه به ترتیب ۳۱۸ و ۲۴۶ درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل A-۴). میزان فلاونوئیدهای برگ در طول موج ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر در دمای ۵ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد به ترتیب ۱۱۴ و ۱۶۵ درصد افزایش یافته و میزان فلاونوئیدهای ساقه در طول موج ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر در دمای ۵ درجه سانتیگراد



شکل ۴- تأثیر تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد روی میزان (A) فنل کل (میکروگرم/گرم بافت تازه)، (B) فلاونوئید، (C) فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) (میکرومول ترانس سینامیک اسید/گرم بافت تازه/ساعت) و (D) تیروزین آلانین آمونیا لیاز (میکرومول p-کوماریک اسید/گرم بافت تازه/ساعت) (TAL) برگ و ساقه گیاه استویا. مقادیر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SE. مقایسه میانگین‌ها در برگ و ساقه به طور مجزا انجام گرفت. حروف غیرمشابه در برگ و ساقه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن بین تیمارها است. FW: وزن تازه بافت

تأثیرات دمایی پایین روی فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل در برگ و ساقه گیاه استویا: نتایج مقایسه داده‌ها در مورد تأثیر تیمار دمایی پائین نشان داد که میزان آنزیم سوپر SOD برگ در دمایی ۵ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد به ترتیب ۵۲ درصد افزایش نشان داد و میزان فعالیت این آنزیم در ساقه در دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۵۵ و ۶۴ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل A-۵). فعالیت آنزیم CAT برگ در دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۴۴۷۳ و ۴۹۱ درصد و در ساقه به ترتیب ۶۰۲۸ و ۵۲۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل B-۵). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم APX برگ در دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۱۷۶ و ۲۶۴ درصد و در ساقه به ترتیب ۷۵۰ و ۶۰۰ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل C-۵). تحت تیمارهای دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد، فعالیت GPX در برگ به ترتیب ۸۴۴ و ۶۳۵ درصد و در ساقه به ترتیب ۶۶۳ و ۳۵۲ درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل D-۵). به علاوه، فعالیت PPO در برگ تحت تیمارهای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۲۵۵ و ۲۳۸ درصد و در ساقه به ترتیب ۱۱۳ و ۱۳۸ درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل E-۵). اندازه‌گیری ظرفیت آنتی-اکسیدانت کل در پاسخ به تیمارهای ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد نشان داد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل در برگ به ترتیب ۱۷۸۵ و ۱۰۱۴ درصد و در ساقه به ترتیب ۱۰۶۶ و ۳۳۳ درصد در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (شکل F-۵).

تأثیرات دمایی پایین روی فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل در برگ و ساقه گیاه استویا: نتایج مقایسه داده‌ها در مورد تأثیر تیمار دمایی پائین نشان داد که میزان آنزیم سوپر SOD برگ در دمایی ۵ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد به ترتیب ۵۲ درصد افزایش نشان داد و میزان فعالیت این آنزیم در ساقه در دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۵۵ و ۶۴ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل A-۵). فعالیت آنزیم CAT برگ در دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب ۴۴۷۳ و ۴۹۱ درصد و در ساقه به ترتیب ۶۰۲۸ و ۵۲۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد (شکل B-۵). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم APX برگ در دمایی ۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب



شکل ۵- تأثیر تیمارهای دمایی ۵، ۱۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد روی فعالیت (A) سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (واحد/گرم بافت تازه)، (B) کاتالاز (CAT) (میکرومول H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/دقیقه/گرم بافت تازه)، (C) آسکوربات پراکسیداز (APX) (میکرومول آسکوربات/دقیقه/گرم بافت تازه)، (D) گایاکول پراکسیداز (GPX) (میکرومول تتراگایاکول/دقیقه/گرم بافت تازه)، (E) پلی فنل اکسیداز (PPO) (میکرومول purpurogallin/دقیقه/گرم بافت تازه) و (F) آنتی اکسیدانت کل (میلی‌گرم/گرم بافت تازه) برگ و ساقه گیاه استویا. مقادیر میانگین چهار تکرار  $\pm$  SE. مقایسه میانگین‌ها در برگ و ساقه به طور مجزا انجام گرفت. حروف غیرمشابه در برگ و ساقه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن بین تیمارهاست

## بحث

تنش‌های محیطی می‌شوند می‌توان به تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل-ها، تخریب و ویرانی پیش ماده‌های تولید کننده کلروفیل و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده کلروفیل از جمله کلروفیلاز اشاره نمود (۲۹). به هر حال، در پاسخ به تنش دمایی پایین، محتوی کاهش یافته کارتنوئیدهای برگ استویا در مقایسه با سطح کاهش یافته کلروفیل کل برگ کمتر بود که می‌توان به نقش کارتنوئیدهای چرخه گزانتوفیل در آزاد کردن انرژی گرمایی و محافظت کردن از مراکز واکنش فتوسیستم II می‌شود اشاره کرد (۱۳).

در این مطالعه، تنش دمایی پایین تجمع افزایش یافته H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را در برگ و ساقه گیاه استویا را تحریک کرد از سوی دیگر میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در برگ نسبت به ساقه با شدت گرفتن میزان تنش افزایش قابل توجهی نشان داد که با گزارش مشابهی

نتایج ما در این مطالعه نشان داد که محتوی کلروفیل *a* کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کارتنوئیدها در برگ گیاه استویا رشد یافته در دمای پایین به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با میزان این رنگیزه‌ها در برگ گیاه شاهد کاهش پیدا کرد. در یک مطالعه اخیراً نشان داده شده است که سرعت فتوسنتز در ارقام مختلف گیاه استویا در دمای ۵ درجه سانتیگراد به شدت کاهش پیدا می‌کند که البته میزان کاهش سرعت فتوسنتز بسته به رقم استویا متفاوت گزارش شده است (۲۰). کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش انتقال الکترون در تیلاکوئیدها و تثبیت کربن می‌تواند یکی از دلایل مهم کاهش سرعت فتوسنتز در گیاهان تحت تنش دمایی پایین است (۳۰ و ۳۷). از جمله عواملی که باعث کاهش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ در



روند تولید MDA با افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشاء ادامه می‌یابد و تداوم این وضعیت موجب از هم گسیختگی ساختار غشاء و خروج آب و یون‌ها از سلول می‌شود و تداوم این شرایط تنش در نهایت به مرگ سلول منجر می‌شود (۲۵). پاسخ گیاه به تنش اکسیداتیو القاء شده توسط دمای پایین شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتهی مانند SOD، CAT، APX و GPX می‌باشد که با جاوب کردن ROS از تجمع‌شان جلوگیری می‌کند (۴۴). نتایج پژوهش اخیراً نشان داد که دمای پایین فعالیت آنزیم SOD را در برگ و ساقه گیاه استویا افزایش داد و میزان فعالیت آن در ساقه نسبت به برگ با شدید شدن تنش سرما افزایش بیشتری نشان داد در توافق با این نتایج، مطالعات انجام شده روی تنباکو نیز تأیید کرده است که فعالیت SOD در پاسخ به دمای پایین افزایش می‌یابد (۴۳). سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیم پاکسازی کننده ترکیبات ROS به شمار می‌رود که باعث تبدیل  $O_2^-$  به  $H_2O_2$  می‌شود، میزان  $H_2O_2$  تولید شده به وسیله آنزیم‌های زیادی کنترل می‌شود که CAT و APX از جمله مهم‌ترین آن‌ها هستند (۹). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های CAT، APX، GPX و PPO که در مهار و پاکسازی کردن  $H_2O_2$  دخالت دارند (۱۱) در پاسخ به تنش دمای پایین در برگ و ساقه گیاه استویا در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. میزان فعالیت آنزیم GPX و PPO در برگ‌ها نسبت به ساقه‌های تحت تنش سرما افزایش بیشتری نشان داد در حالیکه آنزیم‌های APX و CAT در ساقه نسبت به برگ افزایش بیشتری را نشان دادند. به هر حال، اگرچه دمای پایین باعث شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی (SOD، CAT، APX، GPX و PPO) در برگ و ساقه استویا افزایش پیدا کند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتهی در برگ و ساقه گیاه استویا در شرایط تنش دمای پایین بالاتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانتهی در گیاه شاهد بود، ولی میزان تجمع  $H_2O_2$  و MDA در برگ و ساقه استویا تحت تنش دمای پایین هنوز در مقایسه با میزان آنها در گیاه شاهد بالاتر بود

مبنی بر افزایش میزان  $H_2O_2$  تحت دمای پایین در گیاهانی مانند گندم مطابقت داشت (۲۳). تنش دمای پایین تولید و تجمع ROS مانند  $H_2O_2$  را در گیاهان تحت تنش از طریق به هم خوردن تعادل بین جذب نور و استفاده از نور به واسطه بازداشته شدن فعالیت سیکل کالوین، افزایش یافتن جریان انتقال الکترون فتوسنتزی به  $O_2$  و احیاء بیش از اندازه زنجیره انتقال الکترون تنفسی افزایش می‌دهد و در نتیجه منجر به تنش اکسیداتیو از طریق اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود که به ساختارها و ماکرومولکول‌های سلولی آسیب وارد کرده و باعث مرگ سلولها می‌شود (۳۴). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان MDA در برگ و ساقه گیاه استویا تحت تنش دمای پایین به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد که تأیید کننده لیپید پراکسیداسیون غشاءهای سلولی در گیاه استویا در پاسخ به تنش دمای پایین است. به علاوه، میزان MDA در برگ نسبت به ساقه با تشدید تنش سرما افزایش نشان داد. در توافق با این نتایج، مطالعات انجام شده روی گیاهچه‌های ماش (*Vigna radiate*) به افزایش میزان MDA تحت تنش دمای پایین اشاره شده است (۳۳).  $H_2O_2$  و سایر رادیکال‌های فعال اکسیژن ترکیبات سمی برای سلول‌ها هستند که باید در کمترین زمان و به سرعت توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتهی جاروب شوند. در صورتی که توان دفاع آنتی‌اکسیدانتهی سلول‌ها اعم از آنزیمی یا غیرآنزیمی برای از بین بردن رادیکال‌های فعال اکسیژن کافی نباشد، این رادیکال‌ها که بسیار واکنش‌گردد با خارج کردن  $H^+$  از فسفولیپیدها موجب تشکیل رادیکال فعال اسید چرب شوند و رادیکال اسید چرب در حضور اکسیژن با سنتز پراکسید اسید چرب می‌تواند ضمن تخریب چربی‌ها و پروتئین‌ها رادیکال‌های بیش‌تری تولید نماید. آلدئیدهایی مانند مالون‌دی‌آلدئید از جمله محصولات واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدها هستند که به عنوان شاخصی برای ارزیابی این واکنش‌ها در نظر گرفته می‌شوند. در گیاهانی که قادر به سازگاری نباشند

کاهش سریع کارایی کوانتومی فتوسیستم II و تولید مقادیر زیادی ROS و نتیجتاً اکسیداسیون نوری می‌شود. نتایج مطالعه اخیراً نیز نشان داد که میزان آنتوسیانین در برگ و ساقه گیاه استویا در پاسخ به تنش دمایی پایین به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با میزان آن در گیاه شاهد افزایش نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که آنتوسیانین در برگ در مقایسه با ساقه در پاسخ به تنش سرما به میزان بیشتری تجمع پیدا کرد آنتوسیانین‌ها که به گروه متابولیت‌های ثانویه فلاونوئیدی تعلق دارند، با از بین بردن بخشی از فوتون‌های اضافی وارد شده به درون برگ قادرند کلروپلاست‌ها را آسیب‌های ناشی از فوتون اضافی محافظت کنند (۲۵). به علاوه، یک ارتباط قوی بین تنش دمایی پایین و تجمع آنتوسیانین‌ها در گیاهان وجود دارد (۳۹). آنتوسیانین‌ها از مسیر فنیل پروپانویید سنتز می‌شوند و سنتزشان توسط آنزیم‌های کلیدی این مسیر مانند آنزیم PAL کنترل می‌شود (۳). به این ترتیب، افزایش در تجمع آنتوسیانین در گیاه استویا رشد یافته تحت تنش دمایی پایین به فعالیت افزایش یافته آنزیم PAL در این گیاه مرتبط می‌باشد.

یکی دیگر از تنش‌هایی که به دنبال تنش دمایی پایین در گیاهان تحت تنش ایجاد می‌شود تنش اسمتیک است که استراتژی مهم گیاهان در مقابل تنش اسمتیک تجمع محلول‌های سازگار یا اسمولیت‌ها مانند قندها، آمینواسیدها و مشتقات دیگر مانند بتاین است که از تشدید تنش اسمتیک جلوگیری می‌کند (۳۷). در این مطالعه، تجمع قابل ملاحظه قندهای محلول و احیاء در برگ و ساقه گیاه استویا در پاسخ به تنش دمایی پایین مشاهده شد که با گزارشی مبنی بر تجمع افزایش یافته قندهای محلول در برگ گونه‌های گیاهی مختلف در پاسخ با دمایی پایین مطابقت داشت (۱). تجمع قندها در برگ ممکن است به دلیل بهم خوردن تعادل بین بافت‌های منبع و مخزن باشد و سرعت تولید قند از سرعت صادرات قند به برگ‌های مخزن تجاوز کند (۱). به علاوه، نتایج این تحقیق نشان داد

که نشان می‌دهد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به اندازه کافی بالا نبوده که بتواند  $H_2O_2$  تولید شده تحت تنش دمایی پایین را به طور کارآمد پاکسازی کند و از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاءهای سلولی جلوگیری کند.

آنزیم‌های PAL و TAL اولین مرحله مسیر فنیل پروپانویید را کاتالیز می‌کنند که برای سنتز چندین متابولیت ثانویه مرتبط با سیستم دفاعی مانند فلاونوئیدها و فنل‌ها دخالت دارند و سلول‌های گیاهی را در مقابل لیپید پراکسیداسیون توسط ROS محافظت می‌کنند (۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد که به موازات افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در گیاه استویا تحت تنش دمایی پایین، میزان تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها نیز در گیاه استویا در پاسخ به دمایی پایین در مقایسه با میزان این ترکیبات در گیاه شاهد افزایش پیدا کرد که احتمالاً با تجمع بیشتر ROS در این گیاه در دمایی پایین مرتبط می‌باشد. میزان ترکیبات فنل کل و فلاونوئیدها در ساقه نسبت به برگ با شدت گرفتن میزان تنش، افزایش بیشتری نشان دادند و میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در برگ نسبت به ساقه در تنش شدیدتر سرما افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان دادند. در یک مطالعه انجام شده روی گیاه استویا تحت تنش خشکی مشخص شد که میزان تجمع ترکیبات فنلی در گیاه استویا در پاسخ به تنش خشکی افزایش نشان داد (۱۹). به علاوه، در گزارشی بیان شده است که میزان تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها که از مشتقات مسیر فنیل پروپانویید سلول‌ها هستند در پاسخ به تنش‌های محیطی نظیر خشکی (۳۸) و کمبود عناصر غذایی (۱۶) افزایش می‌یابد به طوری که افزایش غلظت این ترکیبات سبب جاروب کردن ROS و مهار پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (۷). در شرایطی محیطی مانند دمایی پایین که فعالیت فتوسنتزی گیاه کاهش پیدا می‌کند، جریان فوتونی وارد شده به درون برگ بیش از توانایی گیاه برای مصرف فوتون می‌باشد و بنابراین انرژی برانگیختگی اضافی در درون دستگاه فتوسنتزی ممکن است به عملکرد کلروپلاست آسیب وارد کرده و باعث

که میزان تجمع قندهای محلول و احیاء در ساقه نسبت به برگ در پاسخ به تنش سرما افزایش بیشتری نشان داد که می‌تواند با نقش ساقه به عنوان جایگاهی برای ذخیره کوتاه مدت کربوهیدرات‌ها در حین تنش مطابقت داشته باشد (۱۲). همچنین، تجمع قندهای محلول در گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی در تنظیم اسمزی و نیز در ثبات و استحکام غشاءها و ذخیره کربن نقش بازی می‌کنند (۳۶).

تنش دمای پایین تجمع آمینواسیدها را در برگ و ساقه گیاه استویا افزایش داد که احتمالاً یک پاسخ به تنش اسمتیک است که به دنبال در معرض قرار گرفتن گیاه استویا در تنش سرما ایجاد می‌شود آمینواسیدها یکی دیگر از محلولهای سازگار است که به عنوان اسمولیت در گیاهان تحت تنش‌های غیرزیستی نظیر تنش سرما تجمع می‌یابد (۳۱). از میان آمینواسیدها، پرولین مهمترین آمینواسیدی است که به عنوان یک محافظت‌کننده اسمزی نقش مهمی در حفظ تعادل اسمتیک و ثبات ساختارهای سلولی در گیاهان بازی می‌کند و گیاهان را از آسیب‌های ناشی از تنش اسمتیک محافظت می‌کند (۱۰) و با عملکردش برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و عمل آنتی‌اکسیدانتی برای محافظت از گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو عمل می‌کند (۲۲). نتایج ما در این مطالعه نشان داد که دمای پایین باعث شد که پرولین در برگ و ساقه استویا به میزان قابل ملاحظه‌ای تجمع پیدا کند که با گزارش ارائه شده برای گیاه Zoysiagrass تحت تنش دمای پایین مطابقت دارد (۲۶). از آنجایی که برگ‌ها همواره به عنوان جایگاه اصلی فرایندهای متابولیسمی هستند روند افزایشی در تجمع پرولین در برگ نسبت به ساقه با تشدید تنش سرما مشاهده شد.

### نتیجه‌گیری

محتوای رنگیزه‌های (کلروفیل  $a$ ، کلروفیل  $b$ ، کلروفیل کل

و کاروتنوئید) در گیاه استویا تحت شرایط تنش سرما (۵ و ۱۰ درجه سانتیگراد) کاهش پیدا کرد که احتمالاً به کاهش در سرعت فتوسنتز منجر می‌گردد. تنش سرما باعث شد که گیاه استویا با تنش اکسیداتیو هم‌روبرو گردد به طوری که افزایش تجمع  $H_2O_2$  و نیز تجمع MDA در برگ و ساقه مشاهده شد. بنابراین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (SOD، CAT، APX، GPX و PPO)، متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل در برگ و ساقه گیاه استویا در معرض تنش سرما افزایش پیدا کرد. به علاوه، تجمع قند محلول کل، قند احیاء، آمینواسید کل و پرولین در برگ و ساقه گیاه استویا در معرض تنش دمای پایین افزایش پیدا کرد که احتمالاً یک پاسخ گیاه به تنش اسمتیک است که به واسطه تنش سرما به وجود آمده است. این تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی که در گیاه استویا در پاسخ به تنش سرما به وجود می‌آید یک استراتژی مهم برای به حداقل رساندن آسیب‌های حاصل از دمای پایین است به طوری که گیاه بتواند در شرایط تنش زنده باقی بماند و با برطرف شدن شرایط تنش مجدداً رشد اولیه خود را به دست آورد. نتایج این تحقیق اطلاعاتی را فراهم کرد که می‌تواند برای شناسایی رقم‌های استویای حساس و مقاوم به تنش دمای پایین استفاده شود ضمناً متخصصان بیوتکنولوژی می‌توانند از نتایج این تحقیق برای ایجاد رقم‌های استویای مقاوم به تنش دمای پایین از طریق دستکاری‌های ژنتیکی استفاده کنند.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه لرستان به دلیل حمایت مالی از انجام این پژوهش تشکر می‌کنند.

## منابع

- 1- Adams, W. W., Muller, O., Cohu, C. M., and Demmig-Adams, B., 2013. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynthesis research*, 117, PP: 31-44.
- 2- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, PP: 121-126.
- 3- Ahmed, N. U., Park, J. I., Jung, H. J., Hur, Y., and Nou, I. S., 2015. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*, *Functional & integrative genomics*, 15, PP: 383-394.
- 4- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., and Ghezzehei, T. A., 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97, PP: 253-261.
- 5- Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, PP: 205-207.
- 6- Beaudoin-Eagan, L. D., and Thorpe, T. A., 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures, *Plant Physiology*, 78, PP: 438-441.
- 7- Blasco, B., Leyva, R., Romero, L., and Ruiz, J. M., 2013. Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, PP: 2591-2596.
- 8- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, PP: 248-254.
- 9- 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, PP: 15243-15248.
- 10- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., and Khan, F. A., 2016. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment : Emerging Omics Technologies* (Iqbal, N., Nazar, R. and A. Khan, N., eds), New Delhi: Springer India, PP: 155-166.
- 11- Das, K., and Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, PP: 1-13.
- 12- Davidson, D., and Chevalier, P., 1992. Storage and remobilization of water-soluble carbohydrates in stems of spring wheat. *Crop Science* 32, PP: 186-190.
- 13- Demmig-Adams, B., and Adams, W. W., 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation, *The New phytologist*, 172, PP: 11-21.
- 14- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances, *Recent research developments in analytical chemistry*, 28, PP: 350-356.
- 15- Erdal, S., Genisel, M., Turk, H., Dumlupinar, R., and Demir, Y., 2015. Modulation of alternative oxidase to enhance tolerance against cold stress of chickpea by chemical treatments, *Journal of plant physiology*, 175, PP: 95-101.
- 16- Giorgi, A., Mingozzi, M., Madeo, M., Speranza, G., and Cocucci, M., 2009. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.), *Food Chemistry*, 114, PP: 204-211.
- 17- Golan, K., Sempruch, C., Górska-Drabik, E., Czerniewicz, P., Łagowska, B., Kot, I., Kmieć, K., Magierowicz, K., and Leszczyński, B., 2017. Accumulation of amino acids and phenolic compounds in biochemical plant responses to feeding of two different herbivorous arthropod pests. *Arthropod-Plant Interactions*, 11, PP: 675-682.
- 18- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J., and Hinch, D. K., 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132, PP: 220-235.
- 19- Hajihashemi, S., and Ehsanpour, A. A., 2014. Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* B. to polyethylene glycol and paclobutrazol

- treatments under in vitro culture, Applied biochemistry and biotechnology, 172, PP: 4038-4052.
- 20- Hajhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M. C., Djalovic, I., and Siddique, K. H. M., 2018. Effect of Cold Stress on Photosynthetic Traits, Carbohydrates, Morphology, and Anatomy in Nine Cultivars of *Stevia rebaudiana*, *Frontiers in Plant Science*, 9 p.
- 21- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., and Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, 7, PP: 1456-1466.
- 22- Hossain, M. A., Hoque, M. A., Burritt, D. J., and Fujita, M., 2014. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms, In *Oxidative damage to plants*: Elsevier, PP: 477-522.
- 23- Kader, D. Z. A., Saleh, A. A. H., Elmeleigy, S. A., and Dosoky, N. S., 2011. Chilling-induced oxidative stress and polyamines regulatory role in two wheat varieties, *Journal of Taibah University for Science*, 5, PP: 14-24.
- 24- Landi, M., Tattini, M., and Gould, K. S., 2015. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions, *Environmental and experimental botany*. 119, PP: 4-17.
- 25- Li, Q. Y., Niu, H. B., Yin, J., Wang, M. B., Shao, H. B., Deng, D. Z., Chen, X. X., Ren, J. P., and Li, Y. C., 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*), *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*. 65, PP: 220-225.
- 26- Li, S., Yang, Y., Zhang, Q., Liu, N., Xu, Q., and Hu, L., 2018. Differential physiological and metabolic response to low temperature in two zoysiagrass genotypes native to high and low latitude, *PloS one*, 13, PP: e0198885-e0198885.
- 27- Lichenthaler, H. K., and Wellburn, A. R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society transactions*, 11, PP: 591-592.
- 28- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15, PP: 473-497.
- 29- Neocleous, D., and Vasilakakis, M., 2007. Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. 'Autumn Bliss'), *Scientia horticulturae*, 112, PP: 282-289.
- 30- Nievola, C. C., Carvalho, C. P., Carvalho, V., and Rodrigues, E., 2017. Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature (Austin, Tex.)*, 4, PP: 371-405.
- 31- Ruelland, E., Vaultier, M. N., Zachowski, A., and Hurry, V., 2009. Chapter 2 cold signalling and cold acclimation in plants. In *Advances in Botanical Research*: Academic Press, PP: 35-150.
- 32- Ruelland, E., and Zachowski, A., 2010. How plants sense temperature. *Environmental and experimental botany*, 69, PP: 225-23.
- 33- Saleh, A. A., 2007. Amelioration of chilling injuries in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings by paclobutrazol, abscisic acid and hydrogen peroxide. *Am., Journal of Plant Physiology*, 2, PP: 318-332
- 34- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of experimental botany*, PP: 1-12.
- 35- Singleton, V. L., and Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, PP: 144-153.
- 36- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., and Savoure, A., 2015. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany*, 115, PP: 433-447.
- 37- Theocharis, A., Clement, C., and Barka, E. A., 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures, *Planta*, 235, PP: 1091-1105.
- 38- Tomar, N. S., and Agarwal, R., 2013. Influence of treatment of *Jatropha curcas* L., leachates and potassium on growth and phytochemical constituents of wheat (*Triticum aestivum* L.). *American Journal of Plant Sciences*, 4, PP: 1134-1150.
- 39- Ubi, B. E., Honda, C., Bessho, H., Kondo, S., Wada, M., Kobayashi, S., and Moriguchi, T., 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. *Plant science : an international*

- journal of experimental plant biology, 170, PP: 571-578.
- 40- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain- Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 151, PP: 59-66.
- 41- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., and Foyer, C. H., 2001. Low Ascorbic Acid in the vtc-1 Mutant of Arabidopsis Is Associated with Decreased Growth and Intracellular Redistribution of the Antioxidant System. *Plant Physiology*, 127, PP: 426-435.
- 42- Wagner, G. J., 1979. The subcellular site and nature of intracellular cadmium in plants. *Trace Substances in Environmental Health*, 12, PP: 115-123.
- 43- Xu, S. C., Li, Y. P., Hu, J., Guan, Y. J., Ma, W. G., Zheng, Y. Y., and Zhu, S. J., 2010. Responses of antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings. *Agricultural Sciences in China*, 9, PP: 1594-1601.
- 44- Yang, Q., Rao, J., Yi, S., Meng, K., Wu, J., and Hou, Y., 2012. Antioxidant enzyme activity and chilling injury during low-temperature storage of Kiwifruit cv., Hongyang exposed to gradual postharvest cooling. *Horticulture, environment and biotechnology*, 53, PP: 505-512.

## The identification of physiological and biochemical changes in leave and shoot of *Stevia* plants under low temperature stress

Shirzadi N.,<sup>1</sup> Nasr esfahani M.<sup>1</sup> and Hagihashemi sh.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Plant Biology, Faculty of Science, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, I.R. of Iran.

### Abstract

Low temperature is one of the important limiting factors of growth, development and distribution of plants. *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) is a sweet medicinal herb that is cultivated in many parts of world and may experiences low temperature in winter. In this study, we aimed to identify physiological and biochemical changes that occur in *Stevia* exposed to low temperature and enable the plants to survive at low temperature. *Stevia* grown *in vitro* and incubated under controlled conditions at 5, 10 and 25 °C for one month and then physiological and biochemical indicators in leave and shoot were measured. Low temperature decreased the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids in the leaves. In addition, we observed increased accumulation of hydrogen peroxide and malondialdehyde in leaves and shoot of *Stevia* exposed to low temperature. Low temperature increased the activities of Superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase in leaves and shoot of *Stevia*. Low temperature lead to increased accumulation of secondary metabolites (phenolic compounds, flavonoids and anthocyanin) and also increased activities of the enzymes of their biosynthesis pathway (phenylalanine ammonia lyase and Tyrosine ammonia lyase) in leaves and shot of *Stevia* plants. In response to low temperature, *Stevia* plant increased the accumulation of total soluble sugar, reducing sugar, total amino acids and proline in their leaves and shoot. In general, to cope with low temperature, *Stevia* evolved a variety of physiological and biochemical mechanisms that can be suggested to use for identifying cold-tolerant *stevia* cultivars.

**Key words:** Low temperature, *Stevia rebaudiana*, Oxidative stress, Antioxidant system, Reactive oxygen species