مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال دوم، شماره چهارم، پاییز و زمستان ۱۳۹۵

مطالعه برخی متابولیت‌های گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و طبیعی با استفاده از گاز کروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی (GC-MS)

مهرک ملکی‌راد[۱*]، نسرین نصر[۲]، سیّد کمال کاظمی تبار[۳]

چکیده

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی چندساله است که به دلیل وجود شیرین کننده‌های طبیعی دی‌ترپن‌ها که حدود ۲۰-۴ درصد ماده خشک برگ‌های این گیاه را تشکیل می‌دهد، شهرت و اهمیت زیادی پیدا کرده است. از آنجا که تولید استویا ازطریق بذر، نشاکاری، قلمه،کشت بافت انجام می‌شود، بنابراین در پژوهش حاضر به طور خاص به مقایسه ترکیبات این گیاه در شرایط مختلف رشدی شامل شرایط طبیعی و کشت بافت با استفاده از عصاره و اسانس گیاه پرداخته شد. نتایج نشان داد که از بین ۵۵ ترکیب شناسایی شده در عصاره حاصل از کشت بافت، علاوه بر ۱۶ ترکیب مشترک، ۳۹ ترکیب آن صرفا در شرایط کشت بافت مشاهده شد که در عصاره حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی وجود نداشت. همچنین از بین ۷۰ ترکیب شناسایی شده در عصاره گیاه حاصل از کشت طبیعی، تعداد ۵۴ ترکیب شیمیایی از آن در شرایط کشت بافت مشاهده نشد و مختص عصاره حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی بود. نتایج آزمایش ترکیبات شیمیایی اسانس نشان داد که تعداد هشت ترکیب مشترک در بین نمونه‌های استویای کشت بافتی و طبیعی وجود داشت. بنابراین از بین ۴۱ ترکیب شیمیایی شناسایی شده در اسانس استویای حاصل از کشت بافت، تعداد ۳۳ ترکیب آن فقط در شرایط کشت بافت مشاهده شد و در اسانس حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی وجود نداشت. همچنین از بین ۱۶۴ ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاه استویای رشد یافته در محیط کشت طبیعی، تعداد ۱۵۶ ترکیب شیمیایی از آن در شرایط کشت بافت مشاهده نشد و مختص عصاره حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی بود. نتایج این تحقیق می تواند در برنامه ریزی تولید متابولیت های ثانویه در شرایط مختلف رشد بکار رود.

واژه‌های کلیدی: استویا، کشت درون شیشه‌ای، گاز کروماتوگرافی

۱*- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز ساری، ایران. mehromizan58@yahoo.com
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

مقدمه

با توجه به روند صعودی رشد جمعیت به ویژه در جوامع در حال توسعه، کاهش سرانه بهداشت و افزایش مبتلایان به بیماری‌هایی نظیر دیابت و چاقی به عللی همچون زندگی کم تحرک شهرنشینی و تغییر الگوهای تغذیه‌ای، انتظار می‌رود که در سال‌های آتی تقاضا جهت شیرین کننده‌های قوی، به خصوص شیرین کننده‌های طبیعی همانند استویا در سراسر جهان افزایش قابل توجهی پیدا کند. با این حال، گنجاندن این گونه‌ها در سیستم‌های تولید کشاورزی، بستگی به شناخت کامل خصوصیات گیاه و پتانسیل زراعی آن دارد (آذرپور و همکاران، ۱۳۹۲).

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی چندساله است که به دلیل وجود شیرین کننده‌های طبیعی دی‌ترپن‌ها که حدود ۲۰-۴ درصد ماده خشک برگ‌های این گیاه را تشکیل می‌دهد، شهرت جهانی پیدا کرده است. عصاره حاصل از برگ‌های استویا، که حاوی گلیکوزیدهای عمده استویوزید، ربادیوزید A و ایزواستویول می‌باشد، علاوه بر خاصیت شیرین کنندگی، دارای خواص درمانی بسیاری مانند کاهش دهنده قند خون، کاهش‌دهنده فشار خون، ضد التهاب، ضد تومور، ضد اسهال، ادرارآور و تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن می‌باشد (Lemus-Mondaca et al., 2012).

علی‌رغم اینکه استویا بذر تولید می‌کند، اما قوه نامیه بذرها بسیار پایین بوده و تنها درصد خیلی کمی از آن‌ها سبز می‌شوند. به همین دلیل روش‌های تکثیر غیر جنسی، کارایی بیشتری نسبت به ازدیاد از طریق بذر دارند و در کشور ما نیز روش کشت بافت موفق‌تر از سایر روش‌های تکثیر بوده است (آذرپور و همکاران، ۱۳۹۲).

همچنین در سال‌های اخیر استفاده از عصاره‌های گیاهی برای مقابله با عفونت‌های میکروبی و انگلی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است. عصاره‌های استخراجی گیاهان و ترکیبات فیتوشیمیایی حاصل از آن‌ها دارای خواص ضد میکروبی و توانایی درمان بیماری‌ها را دارد. تحقیقات نشان داده که عصاره استخراج شده از استویا توانایی جلوگیری از رشد و نمو بسیاری از باکتری‌ها و ارگانیسم‌ها را دارد (Tadhani and Subhash, 2007).

عصاره استویا دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد قارچی، ضدالتهابی و ضدویروسی می‌باشد. استویا توانایی ممانعت از رشد و تکثیر باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را داراست. این امر حداقل از دو جهت دارای اهمیت است. یکی اینکه مصرف کنندگان این محصول کمتر به سرماخوردگی دچار می‌شوند و دیگری این که از این گیاه می‌توان در تولید دهان شویه‌ها و خمیر دندان‌ها استفاده نمود. استویا می‌تواند تعداد باکتری‌های بیماری‌زایی هم چون باسیلوس سرئوس *(Bacillus cereus)*، کلبسیا پنومنیا*(Klebsiella pneumonia)*و سودوموناس آنروژینوزا *(Pseudomonas aeruginosa)*، که از عوامل مهم بیماری‌های قابل انتقال از غذا هستند را کاهش دهد (Puri and Shrma,2011et al,2003;Kedik).

کروماتوگرافی گازی یکی از روش‌های فیزیکی برای جدا کردن و خالص سازی مخلوط‌های پیچیده است. جداسازی در گاز کروماتوگرافی بر اساس پخش انتخابی اجزای مختلف نمونه در بین دو فاز انجام می‌شود. یکی از این فازها، فاز ساکن و دیگری فاز متحرک است. روش مذکور اولین بار توسط دانشمند روسی Mikhail Tswett برای جداسازی کلروفیل به کار برده شد. این روش بر اساس جذب سطحی (Adsorption) و یا تقسیم (Partition) نمونه بین دو فاز ساکن و متحرک می‌باشد (کوچک پور، ۱۳۹۱).

پژوهشگران در مطالعه‌ای به ریز ازدیادی گیاه استویا از طریق قطعات گره برگ‌دار ساقه در محیط کشت موراشی و اسکوگ (۱۹۶۲) تحت تیمار غلظت‌های مختلف هورمون‌های ۶ – بنزیل آمینو پورین، کینتین، ایندول استیک اسید، نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید پرداختند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیب تقریبی محتوای کربوهیدرات‌ها و پروتئین در عصاره برگ‌های گیاهان مادری به دست آمده از مزرعه و گیاهان تکثیر شده از طریق ریز ازدیادی درون شیشه‌ای نشان داد که تفاوت چندانی بین آنها وجود ندارد و تقریباً از این لحاظ مشابه

یکدیگر بودند (Rafiq*et al.*, 2007). در پژوهشی دیگر گیاهان به دست آمده از روش‌های مختلف تکثیر همچون بذر، قلمه و کشت بافت نوک ساقه را با یکدیگر مقایسه شدند و محققان به این نتیجه رسیدند که عملکرد ترکیبات شیرین کننده موجود در بافت برگ‌های گیاه با توجه به روش تکثیر می‌تواند متفاوت باشد (Tamura et al., 1984). در صورتی که برخی محققین در نتایج حاصل از تحقیقات خود با رد این مطلب، تاکید کردند که محتوای استیوزید به نوع روش تکثیر وابسته نمی‌باشد (Nepovim et al., 1998). از آنجا که تولید استویا ازطریق بذر، نشاکاری، قلمه،کشت بافت انجام می‌شود، بنابراین مقایسه ترکیبات این گیاه ارزشمند در شرایط مختلف رشدی از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان در سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ انجام شد. در این پژوهش به منظور مقایسه ترکیبات شیمیایی گیاه استویا رشد یافته در شرایط کشت بافت و مزرعه، نمونه گیاهی حاصل از کشت بافت را از اتاق سازگاری بخش کشت بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان و گیاه رشد یافته در شرایط مزرعه را نیز از مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که در شرایط طبیعی رشد نموده بود، تهیه شد (شکل‌های ۱ و ۲).

شکل ۱- تصویری از گیاه استویای حاصل از کشت بافت (اتاق سازگاری)

شکل ۲- تصویری از گیاه استویا در شرایط طبیعی (مزرعه)

اندام‌های هوایی گیاه استویای رشد یافته در هر دو شرایط به طور جداگانه جمع‌آوری شد و در زمان مناسب و در تاریکی در محیط خشک با دمای مناسب خشک گردید. اسانس نمونه‌های گیاهی توسط دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب استخراج شد. سپس ترکیبات تشکیل دهنده اسانس این گیاهان توسط گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنجی جرمی (GC-MS) مورد شناسایی و مقایسه قرار گرفت. به همین منظور، ۲۵ گرم از نمونه‌های خشک شده آسیاب شد (آسیاب کردن به دلیل فرار بودن برخی ترکیبات با فاصله کمی از زمان اسانس‌گیری صورت گرفت). سپس اسانس گیاهان توسط دستگاه کلونجر با حرارت ۱۰۰ درجه به مدت ۴ ساعت و به روش تقطیر با آب استخراج شد و اسانس حاصله با سولفات سدیم رطوبت‌زدایی شد. برای تهیه عصاره نیز ۱۰ گرم از نمونه‌های گیاهی پودر شده را با ۵۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط نموده به طوری که روی گیاه را بپوشاند و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار داده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی محلول جدا شد و در یخچال با دمای ۴ درجه نگهداری شد و پودر باقی مانده از صاف کردن دوباره با متانول شسته شد. مجدداً به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار داده شد و پس از صاف کردن درون شیشه ریخته و با فویل پوشانده و در یخچال نگهداری شد. سپس ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و عصاره این گیاه توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC-Mass) مورد شناسایی و مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی عصاره استویا

در پژوهش حاضر ترکیبات شیمیایی عصاره استویا در شرایط کشت بافت و محیط طبیعی به طور جداگانه جهت مقایسه آن، مورد بررسی قرار گرفته است. مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی شناسایی شده توسط دستگاه GC-MS برای عصاره حاصل از گیاه استویای رشد یافته در شرایط کشت بافت، در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که در این جدول نشان داده شده است، مجموعاً ۵۵ ترکیب شیمیایی مختلف شناسایی شد که مجموعا ۹۹/۹۸ درصد از کل ترکیبات را شامل شد. بیشترین درصد مربوط به ترکیبی به اسم 2-(1,4,4-Trimethylcyclohex-2- en-1-yl)ethyl p-toluenesulfonate با فرمول مولکولی $C_{18}H_{26}O_3S$ بود که ۲۷/۹۱ درصد از کل ترکیب را شامل می‌شد (جدول ۱).

جدول ۱- مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه استویا در شرایط کشت بافت

۱	1,6-Anhydro-.beta.-D-glucopyrano...	2.25
۲	(1R,3R,4R,5R)-(-)-Quinic acid $$...	3.03
۳	NEOPHYTADIENE $$ 2,6,10-TRIMETHY…(96)	1.58
۴	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-etheny...	2.73
۵	4'-(Trifluoromethyl)acetophenone...	1.46
۶	9,10-Dihydro-9-(3'-methylaminopr...	4.84
۷	salvial-4(14)-en-1-one	2.28
۸	4,5,6,7-tetrahydro-1-N-(para-tol...	17.20
۹	1H-Benzocyclohepten-7-ol, 2,3,4,...	3.60
۱۰	2-(1,4,4-Trimethylcyclohex-2-en-1-yl)ethyl p-toluenesulfonate	27.91
۱۱	steviol $$ ent-13-hydroxykaur-16...	2.87
۱۲	2.beta.-hydroxy-9-oxoverrucosane	2.63
۱۳	Alloaromadendrene oxide-(1)	3.88
۱۴	gamma.-Sitosterol	1.39
۱۵	1,5-Methano-1H-indene, octahydro...	1.79
۱۶	Lup-20(29)-en-3-ol, acetate, (3....	2.18

مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در عصاره گیاه استویای رشد یافته در شرایط طبیعی در جدول ۲ نشان داده شده است. مجموعا ۷۰ ترکیب شناسایی گردید که در کل ۹۹/۹۷ درصد از ترکیبات موجود را شامل شد. شاخص ترین ترکیب موجود در این بخش از آزمایش، ترکیبی با نام (1,5,5,8-Tetramethyl-bicyclo[4.2.1]non-9-yl)-acetic acid بود که ۱۵/۲۲ درصد از کل ترکیبات موجود در عصاره را به خود اختصاص داد.

جدول ۲- مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه استویا در شرایط طبیعی

ردیف	نام ترکیب	سطح (Area)
۱	3,4-Altrosan	1.18
۲	(1R,3R,4R,5R)-(-)-Quinic acid $$...	7.61
۳	1,4-Benzenediol (CAS) $$ Hydroqu...	1.34
۴	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetr...	1.24
۵	Hexadecanoic acid (CAS) $$ Palmi...	6.41
۶	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-etheny...	4.92
۷	PHYTOL ISOMER	1.83
۸	9,12,15-Octadecatrienoic acid, m...	9.79
۹	Octadecanoic acid	1.54
۱۰	N-acetyl-14,15,16-trinorlabd-8(1...	5.43
۱۱	2-Cyclohexen-1-one, 4-ethyl-3,4-...	2.87
۱۲	4,5,6,7-tetrahydro-1-N-(para-tol...	8.64
۱۳	2-(4a,8-Dimethyl-6-oxo-1,2,3,4,4...	7.24
۱۴	7-(1,3-Dimethylbuta-1,3-dienyl)-...	1.27
۱۵	Uvidin A	3.56
۱۶	(1,5,5,8-Tetramethyl-bicyclo[4.2.1]non-9-yl)-acetic acid	15.22
۱۷	DIHYDRO-NEOCLOVENE-(II)	1.29
۱۸	Alloaromadendrene oxide-(1)	2.18

در جدول ۳ ترکیبات شیمیایی حاصل از عصاره گیاه استویا که در هر دو شرایط کشت بافت و طبیعی وجود داشتند، نشان داده شده است. همان طوری که در جدول نیز نمایان است، در مجموع از بین ترکیبات شناسایی شده در شرایط کشت بافت و محیط طبیعی، ۱۶ ترکیب مشترک شناسایی شد. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، گرچه این ترکیبات در عصاره موجود در استویا در هر دو شرایط رشدی موجود بودند اما مقادیر آن‌ها به طور قابل توجهی با هم تفاوت داشت.

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه استویا مشترک در شرایط کشت بافت و طبیعی

ردیف	نام ترکیب	کشت بافت	طبیعی
۱	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-...	0.15	0.43
۲	trans-Caryophyllene $$ Bicyclo[7...	0.81	0.53
۳	trans-.beta.-Farnesene $$ (E)-.b...	0.85	0.17
۴	(1R,3R,4R,5R)-(-)-Quinic acid $$...	3.03	7.61
۵	NEOPHYTADIENE $$ 2,6,10-TRIMETHY…(96)	1.58	0.28
۶	NEOPHYTADIENE $$ 2,6,10-TRIMETHY…(91)	0.27	0.47
۷	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetr...	0.58	1.24
۸	Hexadecanoic acid (CAS) $$ Palmi...	0.99	6.41
۹	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-etheny...	2.73	4.92
۱۰	1H-Indene, 5-butyl-6-hexyloctahy...	0.14	0.43
۱۱	7-Amino-1,4-dimethylpyrimido[4,5...	0.09	0.18
۱۲	(7S,12Z)-12,14-Labdadiene-7,8-di...	0.30	0.55
۱۳	CAPNELLANE-5.ALPHA.-OL $$ 1H-Cyc...	0.14	0.51
۱۴	4,5,6,7-tetrahydro-1-N-(para-tol...	17.20	8.64
۱۵	steviol ent-13-hydroxykaur-16...	2.87	0.79
۱۶	Alloaromadendrene oxide-(1)	3.88	2.18

ترکیبات شیمیایی اسانس استویا

در این آزمایش، علاوه بر مطالعه ترکیبات شیمیایی حاصل از عصاره، اسانس استویای رشد یافته در شرایط کشت بافت و محیط طبیعی به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن به تفکیک در ادامه آورده شده است. مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی شناسایی شده توسط دستگاه GC-MS برای اسانس حاصل از گیاه استویای رشد یافته در شرایط کشت بافت، در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده، در کل ۴۱ ترکیب شیمیایی مختلف شناسایی شد که مجموعا ۱۰۰ درصد ترکیبات موجود در اسانس را شامل شد.

از بین این ۴۱ ترکیب شیمیایی، 1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b دارای بیشترین میزان (۲۰/۶۵ درصد) بود.

جدول ۴- مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه استویا در شرایط کشت بافت

ردیف	نام ترکیب	سطح
۱	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cycl	3.15
۲	Trans-Caryophyllene$$Bicyclo[7…	13.31
۳	Bicycolo[3.1.1]hept-2-ene,2,6-di…	1.77
۴	Alpha.-Humulene$$1,4,8-Cyclou…	6.44
۵	Beta.-Cubebene$$1H-Cyclopenta…	2.80
۶	bicyclogermacrene$$Bicyclo[8.1…	4.75
۷	Delta.-Cadinene$$Naphtalene,…	1.32
۸	nerolidol$$1,6,10-Dodecatrien	2.05
۹	(+)spathulenol	2.20
۱۰	(-)-Caryophyllene oxide$$(-)-5…	2.62
۱۱	Hexadecane	1.16
۱۲	delta.-Cadinene $$ Naphthalene,...	3.06
۱۳	alpha.-Cadino	2.04
۱۴	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b	20.65
۱۵	1PHYTOL ISOMER	3.62
۱۶	3-cyano-12-methoxy-6,11-methanoc	2.44
۱۷	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	1.25
۱۸	Cholest-5-en-3-ol(3.beta.)-(ca…	10.99
۱۹	Cholestadiene	1.27
۲۰	Cholest-5-en-3-ol(3.beta.)-,ca…	1.26

مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی شناسایی شده توسط دستگاه GC-MS برای اسانس حاصل از گیاه استویای رشد یافته در شرایط طبیعی، در جدول ۵ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول نمایان است، در کل ۱۶۴ ترکیب شیمیایی مختلف شناسایی شد که در مجموع، ۱۰۰ درصد ترکیبات موجود در اسانس را شامل شد. در این بین، ترکیبی با نام 1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b با ۸/۳۷ درصد دارای بیشترین مقدار بود.

جدول ۵- مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه استویا در شرایط طبیعی

ردیف	نام ترکیب	سطح
۱	TRANS(.BETA.)-Caryophyllene	1.28
۲	Tetradecane (CAS) $$ n-Tetradeca...	1.69
۳	TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE	1.28
۴	1,6,10-Dodecatriene,7,11-dimeth…	1.37
۵	Pentadecane	1.44
۶	bicyclogermacrene$$Bicyclo[8.1…	1.17
۷	Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethy…	1.97
۸	(+)spathulenol	3.12
۹	(-)-Caryophyllene oxide$$(-)-5…	2.68
۱۰	Hexadecane(CAS)$$ n-Hexadecane…	2.75
۱۱	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene	1.20
۱۲	2-Naphthalenemethanol,1,2,3,4,4…	1.29
۱۳	Alpha.-Cadinol$$1-Naphthaleno…	1.17
۱۴	Caryophyllenol-ll$$Bicyclo[7.2…	1.7
۱۵	5,6-dihydro-5,6-dimethylbenzo[c]…	1.20
۱۶	4,11-Dioxa-3,5-dimethyl-3-methox	1.47
۱۷	Pentadecane(CAS)$$n-pentadeca…	1.39
۱۸	Heneicosane(CAS)$$n-Heneicosane	2.07
۱۹	Docosane $$ n-Docosane $$ normal	1.28
۲۰	Octadecane $$ n-octadecane$$ Oc	1.14
۲۱	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-	1.72
۲۲	Tricosane(CAS)$$ n-Tricosane	2.02
۲۳	Tetradecane (CAS) $$ n-Tetradeca…	1.6
۲۴	Dibutyl phthalate	1.69
۲۵	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b	8.37
۲۶	Octadecane(CAS) $$ n-octadecane…	1.83
۲۷	3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane,2,2,…	1.05
۲۸	Bis(2-ethylhexyl) phthalate $$ 1...	1.09

در جدول ۶ ترکیبات شیمیایی حاصل از اسانس گیاه استویا که به طور مشترک در هر دو شرایط کشت بافت و طبیعی وجود داشتند، نشان داده شده است. همان طوری که در جدول نیز به خوبی دیده می‌شود، در مجموع از بین ترکیبات شناسایی شده در شرایط کشت بافت و محیط طبیعی، هشت ترکیب مشترک شناسایی شد.

جدول ۶- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه استویا مشترک در شرایط کشت بافت و طبیعی

ردیف	نام ترکیب	کشت‌بافت	طبیعی
۱	BETA. ELEMENE	0.77	0.27
۲	Tetradecane	0.51	0.17
۳	bicyclogermacrene$$Bicyclo[8.1…	4.75	1.17
۴	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-o...	0.44	0.26
۵	delta.-Cadinene $$ Naphthalene,...	1.32	0.37
۶	alpha.-Cadino	2.04	0.98
۷	Octadecane	0.24	0.27
۸	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b	20.65	8.37

در پژوهش حاضر، ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره و اسانس استویای حاصل از کشت بافت با گیاه استویای رشد یافته در شرایط مزرعه متفاوت بود. همچنین گرچه برخی از ترکیبات در بین ترکیبات شناسایی شده در عصاره و اسانس استویا در هر دو شرایط رشدی مشترک بودند اما مقادیر آن‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت از همدیگر بودند. بنابراین علاوه بر تعداد و نوع ترکیبات، مقادیر آن‌ها نیز در روش های مختلف تکثیر متفاوت می باشد که این دلیل علاوه بر روش تکثیر به احتمال زیاد می‌تواند ناشی از شرایط محیطی گیاه نیز باشد. در این رابطه، کاوور در سال ۲۰۱۱ برای اولین بار میزان گلیکوزید موجود در برگ استویای حاصل از کشت بافت با گیاه مادری را با استفاده از دستگاه HPLC مورد مطالعه قرار داد و گزارش کرد که در شرایط کشت بافت میزان این ترکیب نسبت به گیاه مادری افزایش یافته است.

نتایج نشان داد که از بین ۵۵ ترکیب شناسایی شده در عصاره حاصل از کشت بافت، علاوه بر ۱۶ ترکیب مشترک، ۳۹ ترکیب آن اختصاصا در شرایط کشت بافت مشاهده شد و در عصاره حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی وجود نداشت. همچنین از بین مجموع ۷۰ ترکیب شناسایی شده در عصاره گیاه حاصل از محیط کشت طبیعی، تعداد ۵۴ ترکیب شیمیایی از آن در شرایط کشت بافت مشاهده نشد و مختص عصاره حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی بود. نتایج آزمایش ترکیبات شیمیایی اسانس نشان داد که تعداد هشت ترکیب مشترک در بین نمونه‌های استویای کشت بافتی و طبیعی وجود داشت. بنابراین از بین ۴۱ ترکیب شیمیایی شناسایی شده در اسانس استویای حاصل از کشت بافت، تعداد ۳۳ ترکیب آن فقط در شرایط کشت بافت مشاهده شد و در اسانس حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی وجود نداشت. همچنین از بین ۱۶۴ ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاه استویای رشد یافته در محیط کشت طبیعی، تعداد ۱۵۶ ترکیب شیمیایی از آن در شرایط کشت بافت مشاهده نشد و مختص عصاره حاصل از گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی بود.

یکی از روش‌های تکثیر سریع و مقرون به صرفه گیاه استویا، استفاده از تکنیک‌های کشت بافت است. اما مسئله‌ای که وجود دارد اینست که آیا ترکیبات شیمیایی گیاه استویا در گیاهان حاصل از کشت بافت ثابت است و یا تغییر می‌کند؟ در راستای پاسخ به این سوال، آزمایش حاضر طراحی شد و نتایج آن نشان داد که پاسخ مثبت است و ترکیبات گیاه می تواند تحت تاثیر شرایط تکثیر و کشت قرار گیرد. اجزای تشکیل دهنده ترکیبات گیاهان تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از جمله شرایط جغرافیایی، شرایط کشت، زمان برداشت، ارتفاع، آب و هوا و شرایط تغذیه‌ای قرار می‌گیرد (Kapoor et al., 2009;Ozkan et al., 2010). همچنین تفاوت در محتوای ترکیبات ممکن است به علت

تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت و حلال‌های مورد استفاده در استخراج عصاره باشد (Khalil*et al.*, 2014).

در پژوهشی در مطالعه اسانس، عصاره آبی و متانولی تهیه شده از استویا بیش از ۳۳ ترکیب از جمله carvacrol (۶۷/۸۰ درصد)، caryophyllene oxide (۲۳/۵۰ درصد)، spathulenol (۱۵/۴۱ درصد)، cardinol، a-pinene (۳/۷۵ درصد)، ibuprofen (۱/۷۹ درصد)، isopinocarveol (۱/۲۶ درصد)، caryophylle (۱/۱۵ درصد)، pinene - 3 one (۰/۴۸ درصد)، dispers yellow (۰/۴۷ درصد) و لیمونین (۰/۴۶ درصد) شناسایی کردند که بسیاری از این ترکیبات به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها (پینن، کارواکرول و کاریوفیلن) شناخته شده هستند (Muanda et al., 2011).

همچنین در مطالعه‌ای دیگر، محتوای استویوزید برگ‌های استویا رشد یافته در شرایط طبیعی و شرایط رشد یافته در این ویترو تحت شرایط هورمون‌های مختلف بررسی شد و افزایش قابل مشاهده‌ای در محتوای استویوزید در گیاهان به دست آمده از کشت این ویترو نسبت به گیاهان رشد یافته در شرایط طبیعی مشاهده گردید. و ادعا شد که تولید استویوزید به بافت و سن گیاه بستگی دارد (Singh and Dwivedi, 2014). پژوهشگران گزارش کردند که گل، بذر و ساقه حاوی مقدار کمتری استویوزید نسبت به برگ‌ها در گیاه رشد یافته شرایط طبیعی می‌باشند (Bondarev et al., 2003). نتایج مشابهی همچنین توسط محققان دیگر گزارش شده است که برگ‌ها حاوی محتوای استویوزید بالاتری نسبت به قسمت‌های دیگر هستند (Bondarev et al., 2003; Ladygin et al., 2008; Hwang, 2006; Woelwer-Rieck et al., 2010). محققان گزارش کردند که که برگ‌ها بیشترین نوع و مقدار متابولیت‌های ثانویه را دارند (Kumariand Chandra, 2015).

پژوهشگران در مطالعه‌ای به ریز ازدیادی گیاه استویا پرداختند. نتایج حاصل از اندازه گیری ترکیب تقریبی محتوای کربوهیدرات‌ها و پروتئین در عصاره برگ‌های گیاهان مادری به دست آمده از مزرعه و گیاهان تکثیر شده از طریق ریز ازدیادی درون شیشه‌ای نشان داد که تفاوت چندانی بین آنها وجود ندارد و تقریباً از این لحاظ مشابه یکدیگر بودند (Rafiq et al., 2007). محققان در نتایج حاصل از تحقیقات خود، گزارش کردند که محتوای استیوزید به نوع تکثیر وابسته نمی‌باشد (Nepovim et al., 1998). در مطالعه‌ای به وسیله روش‌های کروماتوگرافی گازی و طیف سنجی جرمی بر روی اسانس به دست آمده از گل‌های گونه استویا پرفیرا که از کشور مکزیک و تحت دو تاریخ مختلف آغاز و انتهای گلدهی به ترتیب در ماه‌های سپتامبر و نوامبر جمع آوری شده بود، ادعا شد که ترکیبات موجود در اسانس گل‌های مورد بررسی در ماه سپتامبر و نوامبر به طور قابل توجهی با یکدیگر متفاوت بود (Perez et al., 1995).

پژوهشگران گیاهان به دست آمده از روش‌های مختلف تکثیر همچون بذر، قلمه و کشت بافت نوک ساقه را با یکدیگر مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که عملکرد ترکیبات شیرین کننده موجود در بافت برگ‌های گیاه با توجه به روش تکثیر می‌تواند متفاوت باشد (Tamura et al., 1984). قبلا در پژوهشی که به روش گاز کروماتوگرافی گازی بر روی اسانس حاصل از گونه استویا ساچریا فولیا صورت پذیرفت، ترکیبات مختلفی از جمله بورنئول، سینئول، پولگون، ژرانیول، نرول، لینالول استات، لیمونن و مشتق فنیل پروپانوئیداوژنولبه عنوان ترکیبات اصلی استخراج شده از این گیاه گزارش شده است (Montes, 1969).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش به طور کلی نشان داد که ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره و اسانس استویای حاصل از کشت بافت با گیاه استویای رشد یافته در شرایط مزرعه متفاوت می‌باشد.

منابع

آذرپور، ا.، معتمد، م.ک.، و بزرگی، ح. (۱۳۹۲). زراعت و ترویج استویا (گیاه شناسی، کاشت، داشت، برداشت، شیمی، صنعت و فراوری). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. لاهیجان.

کوچک پور، ح.،(۱۳۹۱). استفاده از روش‌های آماری طراحی آزمایش در بهینه سازی شرایط آنالیز ترکیبات آلی فرار موجود در نمونه‌های آب رودخانه بابلرود با روش فضای فوقانی ایستا-کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته شیمی تجزیه. دانشکده شیمی. دانشگاه مازندران.

Bondarev, N., O. Reshetnyak and Nosov, A. (2003). Effects of nutrient medium composition on development of Stevia rebaudiana shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. Plant Sci. 165:845-850.

Hwang, S.J. (2006). Rapid in vitro propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert. J. Plant Biol. 49: 267–270.

Kapoor, I. P. S., Bandana, S., Gurdip, S., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Cesard, A. N. C. (2009). Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and Oleoresins of Black Pepper (Pipernigrum). Journal of Agricultural and Biochemistry, 57, 5358e5364.

Kaur, H. (2011). Chromatographic determination of stevioside in leaf parts of in vitro and in vivo regenerated plants of *Stevia rebaudiana*. International Journal of Natural Products Research. 1 (4):44-48.

Kedik, S. A., Fedorov, S. V., Yanul, N. A., Prokhorova, L. V., Smirnova, E. V. and Panov, A. V. (2003). Chromatographic determination of stevioside in raw plant material. Pharmaceutical Chemistry Journal, 37(10): 19–22/

Khalil, S. A., Zamir, R., & Ahmad, N. 2014. Effect of different propogation technology and gamma irradiation on major steviol glycosides cntent in Stevia Rebaudiana. JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences, 24(6), 1743-1751.

Kumari, M., and Chandra, S. (2015). Phytochemical studies and estimation of major steviol glycosides in varied parts of Stevia rebaudiana. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

Ladygin V.G., N.I. Bondarev, G.A. Semenova, A.A. Smolov, O.V. Reshetnyak and A.M. Nosov. (2008). Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in Stevia rebaudiana in vivo and in vitro. Biol. Plant. 52:9-16.

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, 132:1121 – 1132.

Montes, A.L. (1969). Gas chromatography of essential oils of plants native to Central and Northern Argentina. Anales de la Sociedad Cientifica Argentina 187, 21-48.

Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. LWT-Food Science and Technology, 44(9), 1865-1872.

Nepovim, A., Drahosova,H., Valicek, P., and Vanek, T.(1998). The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in Stevia rebaudiana Bertoni plants cultivated in Czech Republic. Pharma.Pharmacol.Lett.8, 19-21.

Ozkan, G., Sagdic, O., Gokturk, R. S., Unal, O., & Albayrak, S. (2010). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from

Perez, G.R.M., Perez, G.S. and Perez, G.C. (1995). Chemical composition of the essential oil of Stevia porphyrea flowers.Thecnologia de Alimentos 30, 5-7[Chemical Abstracts 124,21146w].

Puri, M. and Sharma, D. (2011). Antimicrobial activity of stevioside against food borne pathogenic bacteria. Engineering in Life Sciences, 11(3):326-329.

Rafiq, M., Muhamamd, M.U., Mangrio, S., Naqvi, H. A., and Qarshi, I. A. (2007). In vitro clonal propagation and biochemical analysis of filed established Stevia rebaudiana Bertoni.Pak. J. Bot., 39(7):2467-2474.

Singh, P., & Dwivedi, P. (2014). Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of Stevia rebaudiana, an anti-diabetic medicinal herb. 3 Biotech, 4(4), 431-437.

Tadhani MB, Subhash R. (2007). In vitro antimicrobial activity of Stevia rebaudiana Bertoni leaves. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 5(1):557-60.

Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui,H., and Tabata, M.(1984).Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides.Plant Cell Rep.3, 180-182.

Woelwer-Rieck U., C. Lankes, A. Wawrzun and M. Wu¨st. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major Steviol glycosides in leaves of Stevia rebaudiana. Eurasian J. Food Res. Technol. 231: 581–588.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 2, No 4, Autumn & Winter 2016

Study on some Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) metabolites in the invitro and invivo conditions using GC- MS

Mehrak Malekirad[1*], Nasrin Nasr[2], Seyed Kamal Kazemitabar[3]

Abstract

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a perennial plant that well known due to natural sweeteners Diterpenes that contributes 4-20 percent of dry matter of the plant's leaves. Since stevia multiplication is performed by seed, transplanting, cuttings and tissue culture, this study specifically compare the chemical compounds of the plant in different growth conditions, including natural and tissue culture conditions using plant extracts and essential oil. The results showed that among 55 identified chemical compounds in the extract of tissue culture, 16 compounds were common and 39 others were exclusively in tissue culture condition. Also, among total of 70 chemical compounds in the extract of natural condition, 54 compounds were exclusively observed in extract of stevia grown in natural condition. The results of GC-MS of essential oil showed that there were eight similar compounds among natural and tissue culture samples. Therefore, among 41 identified chemical compounds in the stevia essence obtained from tissue culture, there were only 33 of composition exclusively observed in tissue culture conditions. Also, among 164 compounds identified in a plant essential oil grown in a natural conditions, 156 of them were exclusively observed in natural conditions.

Keywords: Stevia, In vitro, GC-MS, Chemical compounds.

1.MSc. student of biology department, Payame Noor University, Iran, PO Box: 19395-3697.

2.Assistant professor of biology department, Payame Noor University, Iran,PO Box: 19395-3697.

3.Associate professor of plant breeding and biotechnology department, Sari Agricultural sciences and Natural Resources University, Iran.