بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

پایان نامهٔ دورهٔ کارشناسی ارشد

رشتهٔ علوم گیاهی گرایش فیزیولوژی

عنوان:

اثر متیل ژاسمونات، کلومازون، پراواستاتین و کلرومکوئات بر میزان استویوزید و ربادیوزید A و بیان ژن *ent*-Kaurenoic acid hydroxylase درگیاه *Stevia rebaudiana* Bert. در شیشه.

نگارش:

کامران مرادی پینوندی

استاد راهنما:

دکتر مظفر شریفی

استاد مشاور:

دکتر مهرداد بهمنش

زمستان 90

تقدیم به محی الدین :

اباعبدالله الحسین

تشکر و قدردانی

حمد وسپاس مخصوص یزدان پاک پروردگار جهانیان است.

حال که به لطف لایزال الهی، مراحل انجام این پژوهش به پایان رسیده است بر خود لازم می‌دانم که از زحمات استاد گرامی، جناب آقای **دکتر مظفر شریفی** که هدایت این پایان نامه را بر عهده داشتند و راهنمایی‌های ارزنده‌ای برای حل مشکلات علمی و عملی اینجانب ارائه دادند تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از جناب آقای **دکتر مهرداد بهمنش** در مدت انجام این تحقیق زحمت مشاوره این پایان نامه را داشتند و با راهنمایی‌های بی دریغ‌شان مرا یاری دادند کمال تشکر و تقدیر را دارم.

از اعضای هیات داوران، سرکار خانم **دکتر فائزه قناتی** و جناب آقای **دکتر نیکنام** که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را برعهده داشتند صمیمانه تشکر می‌کنم.

همچنین از اساتید گروه علوم گیاهی **سرکار خانم دکتر زرین‌کمر**، جناب آقای **دکتر کاظم‌پور** و جناب آقای **دکتر زارع مایوان** که در مدت تحصیل افتخار شاگردی این عزیزان را داشتم سپاسگزاری می‌کنم.

از سرکار **خانم خرمی‌شاد**، مسئول آزمایشگاه علوم گیاهی نیز کمال تشکر را دارم.

از سرکار خانم **احمدیان**، که همواره در حل مشکلات اینجانب کوشیدند و در تمامی مراحل جزئی و کلی این تحقیق مرا یاری دادند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

از سایر دوستان خوبم در آزمایشگاه دکتر شریفی، **خانم‌ها فخاری، درخشانی، بشامگان، تحصیلی، خانپور، رئوف‌فرد، ، افکار و آقای دکتر یوسف‌زادی** و همچنین سایر دوستان در گروه علوم گیاهی خانم‌ها **رامک، ناهیدیان، عبدالله‌زاده و آقای دکتر رضایی** که همیشه در طی مراحل مختلف انجام این پروژه از کمک‌ها و راهنمایی‌های ایشان بهره گرفتم تشکر می‌کنم.

از **خانوادهٔ صبور و خوبم** که در تمامی مراحل مرا یاری دادند و در حل مشکلاتم کوشیدند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌کنم.

از **همسر عزیزم** که دلگرمی‌های ایشان همواره پشتوانه کار در طی انجام این پژوهش بود صمیمانه تشکر می‌کنم.

و از دوست خوبم **آقای محمد سجاد امامی آل آقا** که از راهنمایی‌ها و اطلاعات ایشان در طی اجرای این تحقیق و سایر مسائل پژوهشی بهره گرفتم نیز تشکر ویژه دارم.

چکیده

گلیکوزیدها شکلی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای تنوع ساختاری وسیعی می‌باشند و در مواردی در متابولیسم اولیه گیاهان نیز ایفای نقش می‌کنند. گلیکوزیدهای استویول که تنها در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) تولید می‌شود، به عنوان شیرین کننده طبیعی در صنایع غذایی و دارویی اهمیت ویژه‌ای دارند. سنتز انحصاری استویول از مسیر ترپنوئیدی کلروپلاست شروع شده و با تولید آن از کائورنوئیک اسید توسط کائورنوئیک اسید هیدروکسیلاز (*KA13H*) منجر به سنتز گلیکوزیدهایی چون استویوزید و ربادیوزید A می‌شود که گروهی از دی ترپن‌ها به حساب می‌آیند. تحقیق حاضر به منظور بررسی دقیق‌تر مسیر سنتز گلیکوزیدها، میزان بیان ژن *KA13H* تحت تیمارهای متیل ژاسمونات، کلومازون، پراواستاتین و کلرومکوئات کلراید و بررسی نقش مسیر موالونات در تولید گلیکوزیدها *S.rebaudiana* در گیاهچه‌های استویا طراحی شد. در تیمار متیل ژاسمونات نتایج نشان دهنده‌ی افزایش گلیکوزیدها در غلظت 20 میکرومولار بود و بیشترین میزان این ترکیبات 3 روز پس از تیمار مشاهده شد. در حضور کلومازون بعنوان بازدارنده میزان تولید گلیکوزیدهای استویا کاهش یافت و نشان داد که مسیر اصلی تولید آن‌ها مسیر متیل اریتریتول کلروپلاستی می‌باشد. جلوگیری از ورود واحدهای ایزوپنتنیل پیروفسفات به کلروپلاست توسط بازدارنده‌ی سدیم پیروفسفات سبب کاهش شدید گلیکوزیدهای سنتز شده در کلروپلاست شد. پراواستاتین که بعنوان بازدارنده آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوا ردوکتاز(HMGR) عمل می‌کند سبب کاهش میزان استویوزید و ربادیوزید A شد و نشان داد که مسیر موالونات در تولید گلیکوزیدهای استویا نقش دارد ولی سهم کمتری از مسیر متیل اریتریتول دارد. تیمار سیکوسل که بازدارنده کائورن اکسیداز است نیز سبب کاهش معنی‌دار گلیکوزیدهای استویا شد. کشت گیاه در محیط طبیعی نشان داد غالب گلیکوزیدهای سنتز شده استویوزید و ربادیوزید A می‌باشد. تیمار متیل ژاسمونات سبب افزایش بیان ژن KA13H پس از 6 ساعت تا 24 ساعت می‌شود. تیمارهای کلومازون و پراواستاتین به طور مشابه سبب افزایش بیان در 6 ساعت پس از تیمار شدند و در ساعات 12، 24 و 48 ساعت پس از تیمار میزان بیان کمتر از 6 ساعت پس از تیمار بود. اثر سیکوسل بر بیان ژن مذکور در 6 ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری بیشتر از کنترل بود و در 12 و 24 پس از تیمار ثابت ماند. در 48 ساعت پس از تیمار بیان ژن نسبت به زمان‌های قبل و شرایط کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافت.

کلمات کلیدی: استویوزید، پراواستاتین، ربادیوزید A، کائورنوئیک اسید هیدروکسیلاز (KA13H)، کلومازون، کلرومکوئات، متیل ژاسمونات.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول : کلیات

1-1 مقدمه 2

2-1 مشخصات گیاهشناسی گیاه *Stevia rebaudiana* 3

3-1 اهمیت دارویی و غذایی *Stevia rebaudiana* 5

4-1 مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدها در گیاه استویا 7

1-4-1 بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا 7

2-4-1 سیتوکروم P450 (CYP450s) در گیاهان 11

3-4-1 گلیکوزیل‌ترانسفرازها 13

4-4-1 گلیکوزیدها 13

5-4-1 استویوزید و ربادیوزید A 17

5-1 عملکرد ژاسمونات‌ها در گیاهان 18

1-5-1 نقش ژاسمونات‌ها در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی 18

2-5-1 ساز و کار عمل متیل ژاسمونات در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی 19

6-1 بازدارنده‌های آنزیم‌ها 21

1-6-1 کلومازون 21

2-6-1 پراواستاتین 22

3-6-1 کلرومکوئات کلراید (سیکوسل) 25

4-6-1 نمک سدیم پیروفسفات (NaPP) 26

7-1 مروری بر مطالعات انجام شده 26

8-1 اهداف 28

فصل دوم : مواد و روش‌ها

2-1 کشت بافت و تیمار..... 30
2-1-1 تیمار متیل ژاسمونات..... 31
2-1-2 تیمار کلومازون..... 33
2-1-3 تیمار پراواستاتین..... 34
2-1-4 تیمار کلرومکوئات کلراید (سیکوسل)..... 35
2-2 اندازه گیری بیوشیمیایی..... 36
2-2-1 استخراج استویوزید وربادیوزیدA..... 36
2-2-2 سنجش استویوزید و ربادیوزید A با دستگاه HPLC..... 37
2-2-3 ساخت استانداردهای استویوزید و ربادیوزید A برای تزریق به دستگاه HPLC..... 37
2-3 کشت گیاه در محیط طبیعی..... 39
2-4 بررسی‌های مولکولی..... 40
2-4-1 محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز..... 40
2-4-1-1 آب بدون یون شده تیمار شده با DEPC (Diethylpyrocarbonate)..... 40
2-4-1-2 تهیه محلول EDTA(pH و 0/5M)..... 40
2-4-1-3 تهیه بافر تریس-کلریک اسید 1 مولار به حجم 100 میلی‌لیتر..... 41
2-4-2 محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز..... 41
2-4-2-1 تهیه بافر الکتروفورز TBE(5 x)..... 41
2-4-2-2 تهیه محلول اتیدیوم برماید (یک درصد)..... 42
2-4-2-3 تهیه بافر سنگین کننده..... 42
2-4-3 استخراج Total RNA از *Stevia rebaudiana* Bert..... 42
2-4-4 الکتروفورز ژل آگارز..... 45

2-4-5 واکنش رونویسی معکوس 47
2-4-6 طراحی آغازگر 49
2-4-7 آماده سازی آغازگرهای PCR 50
2- 4-7-1 واکنش PCR 50
2-4-7-1-1 طراحی واکنش PCR 50
2-4-7-1-2 عکس برداری از ژل آگارز 51
2-4-7-1-3 آنالیزهای آماری 51
فصل سوم : نتایج
3-1 نتایج بررسی پارامترهای رشد 53
3-1-1 گیاهان تیمار شده در شیشه 53
3-1-2 گیاهان کشت شده در محیط طبیعی 54
3-2 نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی 55
3-2-1 نتایج اثر متیل ژاسمونات میزان گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A در تیمار متیل ژاسمونات در اندام هوایی استویا 55
3-2-1-1 نتایج میزان گلیکوزیدهای استویا، حاصل از غلظتهای مختلف تیمار MJ 55
3-2-1-2 نتایج میزان گلیکوزیدهای استویا، حاصل از زمانهای مختلف پس از تیمار MJ 57
3-2-2 نتایج بررسی میزان گلیکوزید های استویوزید و ربادیوزید A در تیمار کلومازون در اندام هوایی استویا 59
3-2-3 نتایج بررسی میزان گلیکوزید های استویوزید و ربادیوزید A در تیمار پراواستاتین در اندام هوایی استویا 61
3-2-4 نتایج بررسی میزان گلیکوزید های استویوزید و ربادیوزید A در تیمار کلرومکوئات کلراید (سیکوسل) در اندام هوایی استویا 62
3-2-5 گیاهان کشت شده در محیط طبیعی 64
3-3 نتایج بررسی‌های مولکولی 66
3-3-1 نتایج بهینه سازی استخراج RNA و سنتز cDND از اندام هوایی کشت شده *S.rebaudiana* 66

2-3-3 تعیین کنترل داخلی برای ژن KA13H.....68
3-3-3 تعیین دمای مناسب Annealing (اتصال) برای ژن‌های اکتین و Kaurenoic acid 13-hydroxylase (KA13H).....68
4-3-3 نتایج بررسی میزان بیان ژن KA13H به روش Semi quantitative-RT PCR در اندام هوایی کشت شده‌ی *S.rebaudiana*.....69
1-4-3-3 تیمار متیل ژاسمونات.....69
2-4-3-3 تیمار کلومازون.....70
3-4-3-3 تیمار پراواستاتین.....71
4-4-3-3 تیمار کلرومکوئات کلراید (سیکوسل).....72

فصل چهارم : بحث و نتیجه‌گیری و پیشنهادات

1-4 میزان تولید گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A در تیمار متیل ژاسمونات.....75
2-4 بررسی تاثیر ممانعت کننده‌ها بر گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A.....78
3-4 تاثیر ممانعت کننده‌ها بر بیان ژن KA13H.....79
پیشنهادات.....80
فهرست منابع.....81

فهرست شکل‌ها

شکل 1-1: تصویر گیاه .*Stevia rebaudiana*.....4
شکل 1-2 : تصویر طبیعی از گیاه *Stevia rebaudiana*.....4
شکل 1-3: تصویر نقاشی شده از گیاه *Stevia rebaudiana* به همراه بزرگنمایی از گل، برگ و بذر.....5
شکل 1-4 : مسیر سنتز استویول(پیش‌ساز گلیکوزیدهای گیاه *Stevia rebaudiana*) و اشتراک آن با مسیر بیوسنتزی جیبرلین‌ها.....8

شکل 1-5 : طرح کلی سنتز گلیکوزید های استویول در گیاه *Stevia rebaudiana* از IPP منشا گرفته از کلروپلاست..... 10

شکل 1-6 : مولکول‌های مهم سنتز شده در گیاهان که به عنوان اسکلت مرکزی گلیکوزیلاسیون هستند و بر روی گروههای OH آنها قند متصل میشود..... 15

شکل 1-7 : ساختار مولکولی استویوزید و ربادیوزید A همراه با وزن مولکولی آن..... 17

شکل 1-8 : ساختار گلیکوزیدهای سنتز شده در *Stevia rebaudiana*..... 18

شکل 1-9 : مکانیسم اثر متیل ژاسمونات بر روی بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش‌های محیطی..... 20

شکل 1-10 : ساختار مولکول کلومازون..... 21

شکل 1-11 : محل اثر بازدارنده کلومازون در مسیر متیل اریتریتول کلروپلاستی..... 21

شکل 1-12 : ساختار مولکول پراواستاتین و HMG-CoA..... 23

شکل 1-13 : ممانعت از تولید آلکالوئیدها در گیاه *Catharanthus roseus* توسط پراواستاتین..... 23

شکل 1-14 : موقعیت آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوا ردوکتاز (HMGR) بر روی غشای شبکه اندوپلاسمی..... 24

شکل 1-15 : ساختار مولکول سیکوسل..... 25

شکل 1-16 : مهار انتقال IPP در دو سوی غشای کلروپلاست توسط نمک پیروفسفات..... 26

شکل 1-2 : نمودار استانداردهای تزریق شده به دستگاه HPLC..... 38

شکل 2-2 : منحنی استانداردهای استویوزید و ربادیوزید A..... 39

شکل 3-1: گیاه استویا که در اثر تیمار کلومازون برگهای جدید آن به رنگ سفید در آمده‌اند..... 54

شکل 3-2 : گیاهان کاملا سفید در اثر واکشت منظم در محیط حاوی کلومازون بعد از یک ماه..... 54

شکل 3-3: تاثیر غلظت‌های مختلف سیکوسل بر رشد استویا بعد از 7 روز..... 54

شکل 3-4 : تاثیر غلظت‌های مختلف تیمار متیل ژاسمونات بر روی استویوزید و ربادیوزید A در اندام هوایی..... 56

شکل 3-5 : مجموع میزان بیوسنتز گلیکوزیدهای استویوزید وربادیوزید A درغلظتهای مختلف تیمار متیل ژاسمونات..... 56

شکل 3-6 : میزان قند ربادیوزید A در تیمار MJ در طی 5 روز. 57
شکل 3-7 : میزان قند استویوزید در تیمارMJ 58
شکل 3-8 : میزان گلیکوزید کل (گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A) در اثر تیمار متیل ژاسمونات در طی 5 روز. 58
شکل 3-9 : میزان استویوزید و ربادیوزید A در اثر تیمار کلومازون. 60
شکل 3-10 : میزان گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A در تیمار کلومازون. 61
شکل 3-11 : میزان گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A در تیمار پراواستاتین. 62
شکل 3-12 : میزان گلیکوزیدهای استویوزید وربادیوزید A در تیمار سیکوسل. 63
شکل 3-13 : میزان گلیکوزیدهای استویوزید وربادیوزید A در تیمار سیکوسل. 64
شکل 3-14 : تفاوت گلیکوزیدهای سنتز شده در محیط کشت MS و محیط طبیعی. 65
شکل 3-15 : نمودار HPLC از نمونه تیمار شده با MJ. 65
شکل 3-16 : نمودار HPLC از نمونه گیاه کشت شده در محیط طبیعی در منطقه رامسر 66
شکل 3-17 : طرح الکتروفورز برای آزمودن کیفیت RNA استخراج شده از برگ *Stevia rebaudiana* 67
شکل 3-18: تعیین کنترل داخلی بین اکتین و توبولین 68
شکل 3-19: الف: تعیین دمای مناسب برای اکتین 69
شکل 3-20 : تغییرات بیان ژن KA13H در اثر تیمار متیل ژاسمونات در طی 48 ساعت 70
شکل3-21 : تغییرات بیان ژن KA13H در اثر تیمار کلومازون در طی 48 ساعت. 71
شکل 3-22 : تغییرات بیان ژن KA13H در اثر تیمار پراواستاتین در طی 48 ساعت. 72
شکل 3-23 : تغییرات بیان ژن KA13H در اثر تیمار سیکوسل در طی 48 ساعت. 73
شکل 4-1 : بیوسنتز گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A از استویول. 77

فهرست جدول‌ها

جدول 1-1 : نقش سیتوکروم‌های مختلف در بیوسنتز هرمون‌ها 12

جدول 2-1 : غلظت نمک‌ها و ویتامین‌های موجود در محیط کشت پایه MS 31
جدول 2-2: آب بدون یون شده و تیمار شده با DEPC 40
جدول 2-3: روش تهیه محلول EDTA 41
جدول 2-4: روش تهیه محلول Tris 41
جدول 2-5: مواد مورد نیاز برای تهیه TBE 42
جدول 2-6: تهیه بافر سنگین کننده 42
جدول 2-7 : خلاصه مراحل استخراج RNA بر اساس کیت RNX Plus 45
جدول2-8: مواد مورد نیاز برای ساخت cDNA 48
جدول 2-9: توالی آغازگرهای مورد استفاده 49

فصل اول

کلیات

1-1 مقدمه

تاثیر زیانبار مواد شیمیایی موجود در مواد غذایی و تاثیر آن‌ها بر سلامتی انسان و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، توجه جهانی را به داروهای گیاهی و گیاهان داوریی در سطح وسیعی معطوف نموده است. رویکرد روز افزون استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهانی، اهمیت تولید و پرورش این گیاهان را روشن‌تر می‌سازد. درمان با داروهایی با منبع گیاهی موثرتر و مقرون به صرفه است. علاوه بر این داروهای گیاهی عوارض جانبی پایینی دارند که اهمیت آنان را دوچندان می‌کند.

گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.) هم به عنوان یک گیاه دارویی و هم یک گیاه اقتصادی از لحاظ صنعتی (به عنوان یک شیرین کننده طبیعی) مطرح است. گلیکوزیدهای استویا تا 350 برابر شیرین‌تر از سوکروز هستند (Sardesai and Waldshan, 1991). با توجه به بروز روزافزون مشکلاتی چون دیابت، چاقی، سکته‌های قلبی و مغزی استویا می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند باشد.

با معرفی گیاه استویا و مسیرهای منجر به تولید گلیکوزیدهای شیرین آن به کاربردهای گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A اشاره خواهد شد. پیشینه تحقیقات انجام شده و همچنین لزوم بررسی‌های مولکولی در رابطه با مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا مطرح می‌گردد.

2-1 مشخصات گیاهشناسی گیاه *Stevia rebaudiana*

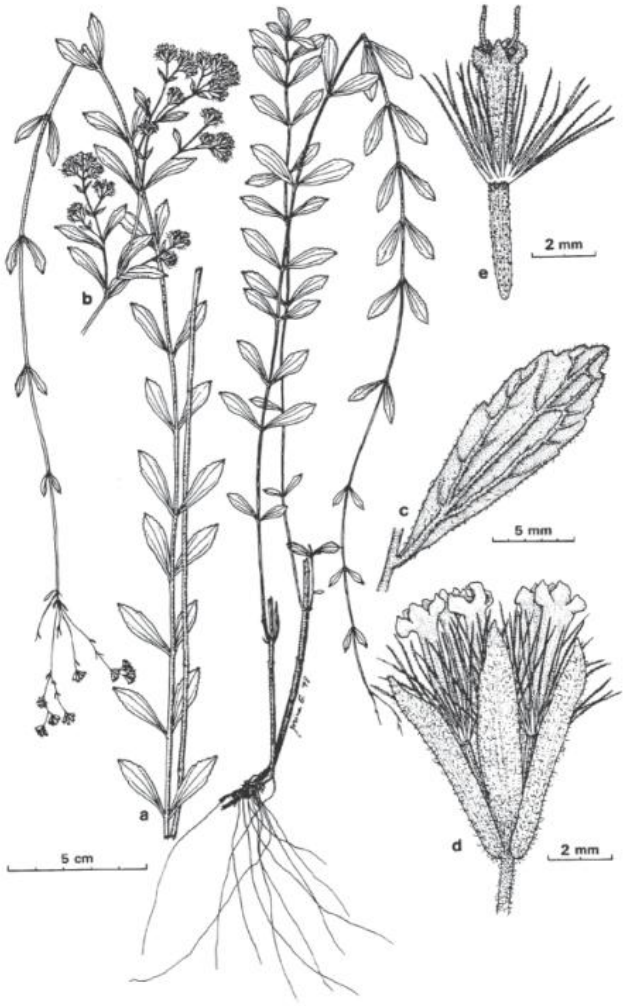
استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.) گیاهی از تیره گل مینائیان *Asteraceae* و از قبیله *Eupatorieae* است که بومی جنگل‌های پاراگوئه، مکزیک و برزیل می‌باشد. گیاهی است علفی چند ساله با ریشه‌های افشان، و ساقه ای که در قسمت تحتانی چوبی می‌شود. دارای برگ‌های ساده، متقابل می‌باشد (شکل 1-1 الف و 1-2). گل‌های این گیاه کوچک، سفید رنگ و همگی زبانه‌ای هستند و توسط براکته‌های کشیده و تخم مرغی شکل احاطه شده‌اند (شکل 1-1 ب). سطح گیاه پوشیده از کرک‌های چند سلولی است که سبب زبری اندام‌های مختلف آن می‌شود. در اواخر بهار وارد مرحله گل‌دهی می‌شود. ارتفاع گیاه به حدود 120 سانتی‌متر نیز می‌رسد. بذرها فندقه، 5 گوشه 3 میلی‌متر و همراه تقریبا 20 پاپوس کوتاه‌اند (شکل 1-3). هرچند از بذرهای *S.rebaudiana* برای کشت آن استفاده می‌شود ولی این بذرها به سختی جوانه می‌زنند و بسیاری از این بذرها در هنگام شکل گیری به دلیل پدیده خود ناسازگاری[1] غالبا پوچ و عقیم بوده و قابلیت کشت را ندارند. به همین دلیل در اکثر موارد از قلمه زنی و کشت بافت برای تکثیر آن استفاده می‌شود. *S.rebaudiana* در عرض‌های جغرافیایی با روزهای بلند رشد و بازدهی بیشتری دارد و در دمای زیر 9 درجه مقاومت ندارد (Lemus-Mondaca et al., 2012).

برگ‌های این گیاه به دلیل حضور گلیکوزیدهای استویول شیرین بوده ودر صنعت از آن به عنوان قند رژیمی استفاده می‌شود (Lyakhovkin et al., 1993). استویا از لحاظ نیاز به مواد غذایی گیاه قانعی بوده و در بسیاری از خاکهای نواحی مختلف جهان و ایران (خصوصا مناطق جلگه‌ای شمال کشور) بدون کوددهی قابلیت کشت دارد (Ibrahim et al., 2008).

[1] Self incompatibility

شکل 1-1: تصویر گیاه *Stevia rebaudiana* الف) نمایش گیاه کاشته شده ب) گل *Stevia rebaudiana*.

شـــکل 1-2 : تصـویر طبیعـی از گیـاه *Stevia rebaudiana* (برگرفتـه از Lemus-Mondaca et al., 2012).



شکل 1-3: تصویر نقاشی شده از گیاه *Stevia rebaudiana* به همراه بزرگنمایی از گل، برگ و بذر (برگرفته از Douglas, 2002)

3-1 اهمیت دارویی و غذایی *Stevia rebaudiana*

استفاده اصلی از این گیاه در مواد غذایی و به عنوان شیرین کننده و قند رژیمی است. در انواع نوشیدنی‌ها، شیرینی‌ها و تمامی محصولاتی که با قند شیرین می‌شوند استویا جایگزین بسیار مناسبی است. قندهای استویا به دلیل اینکه طبیعی‌اند همانند سایر شیرین کننده‌های مصنوعی (مثل

سوربیتول،آسپارتام، نئوتام، ساخارین و غیره) عوارض جانبی را ندارند. به دلیل تولید بالای این مواد بسیار شیرین در گیاه استخراج گلیکوزیدهای استویوزید وربادیوزید A مقرون به صرفه بوده و بازده بالایی خواهد داشت(Lemus-Mondaca et al., 2012) .

این گیاه برای بیماران دیابتی از دو لحاظ اهمیت دارد. اول آنکه قندهای آن رژیمی و هضم و جذب بسیار پایینی دارد و چون نوعی شیرین کننده است (350 تا 400 برابر شکر یا قند شیرین تر است) به تبع از مصرف زیاد قند جلوگیری می‌کند و دوم اینکه مشاهده شده است که مصرف این گیاه سبب افزایش انسولین در این بیماران می‌شود (Abudula et al., 2004). خواص آنتی اکسیداتیو و ضد ویروسی نیز از عصاره این گیاه گزارش شده است (Tadhani et al., 2007, Takahashi et al., 2001) .

قندهای گلیکوزیله استویا را می‌توان جهت بالا بردن حلالیت داروها و پوشاندن مزه تلخ آنها نیز به کار برد (Uchiyama et al., 2010). تحقیقات نشان می‌دهد که استویا با کاهش میزان چربی‌های مضر در بدن اثرات ضد چاقی و ضد پوسیدگی دندان دارد (Lemus-Mondaca et al., 2012).

در کشور پاراگوئه که خاستگاه *S.rebaudiana* است مردم محلی به منظور درمان اسهال از دم-کرده استویا استفاده می‌کنند. در پاراگوئه و سایر کشورهای آمریکای لاتین موارد مصرفی چون شیرین کننده‌ی غذاها و نوشیدنی‌ها، ضدتب (عرق آور)، داروی ضد مالاریا، ادرارآور، درمان ضخم‌ها و مشکلات رماتیسمی (مصرف خارجی)، درمان سرفه و بسیاری از موارد دیگر نیز دارد (Douglas, 2002).

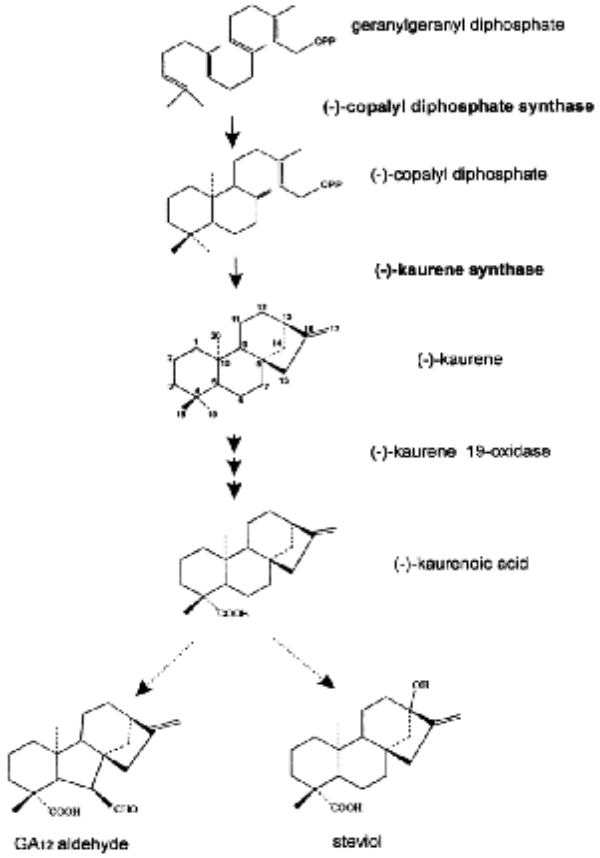
بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی گلیکوزیدهای استویا مشاهده شده است که دستگاه گوارش برای این قندها سیستم جذب ندارد ولی باکتری‌های روده می‌توانند قندهای استویوزید و ربادیوزید A را از روی اسکلت استویول بردارند و استویول را باقی بگذارند. استویول باقی مانده برای باکتری‌ها قابل استفاده نیست (Koyama et al., 2003).

از لحاظ غذایی و وجود ویتامین‌ها، گیاه استویا به عنوان نه تنها یک دارو بلکه به عنوان یک مکمل غذایی نیز مطرح است (Lemus-Mondaca et al., 2012).

1-4 مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدها در گیاه استویا

1-4-1 بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا

بر اساس شواهد بدست آمده تاکنون ثابت شده است که بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا از پلاستید شروع شده و در سیتوزول به اتمام می‌رسد. اسکلت اصلی که گلوکز روی آن سوار می‌شود مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت-کائورن برای سنتز جیبرلین است. بنابراین ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها صورت می‌پذیرد و یک دی ترپن است. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای شیرین در این گیاه با مسیر سنتز جیبرلین‌ها تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است (شکل 1-4). دو آنزیم سرنوشت کائورنوئیک اسید را به سوی سنتز جیبرلین‌ها یا به سوی تولید گلیکوزیدهای شیرین می‌برند. کائورنوئیک اسید اکسیداز (KAO) با هیدروکسیله کردن در موقعیت 7، اسکلت کائورنی را به سمت مسیر بیوسنتزی جیبرلین‌ها و کائورنوئیک اسید 13-هیدروکسیلاز با هیدروکسیله کردن در موقعیت 13، اسکلت کائورنی را به سمت تولید استویول ودر ادامه گلیکوزیدها هدایت می‌کند (Richman et al., 1999).



شکل 1-4 : مسیر سنتز استویول(پیش‌ساز گلیکوزیدهای گیاه *Stevia rebaudiana*) و اشتراک آن با مسیر بیوسنتزی جیبرلین‌ها (برگرفته از Richman et al., 1999)