ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحه ۱۰۲ - ۹۱

تأثیر اسید سالیسیلیک و عصاره مخمری بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیان دو ژن مهم در استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Effect of salicylic acid and yeast extract on biochemical change and expression of two important genes in stevia

لیلا مهرآوران*[۱]، منصور امیدی[۲]، محمدرضا نقوی[۲]، براتعلی فاخری[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه تهران و عضو هیات علمی دانشگاه زابل

۲- استادان، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل

Mehravaran L*[1], Omidi M[2], Naghavi MR[2], Fakheri BA[3]

1- PhD Graduated of Plant Breeding, University of Tehran and Faculty member of University of Zabol
2- Professors, College of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran
3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Leila.mehravaran@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۲/۱۹)

چکیده

در این مطالعه، پاسخ‌های بیوشیمیایی استویا در سطوح مختلف اسید سالیسیلیک (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) و عصاره مخمری (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۵ گرم در لیتر) در شرایط کشت بافت و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. چهار هفته پس از کشت، صفات بیوشیمیایی شامل میزان H_2O_2، میزان کربوهیدرات‌های محلول، DPPH، فنل کل و پروتئین کل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده اثر معنی‌دار اسید سالیسیلیک و عصاره مخمری بر کلیه صفات مورد مطالعه بود. نتایج نشان داد که با افزایش میزان DPPH، میزان فنل کل نیز افزایش می‌یابد که نشان دهنده یک رابطه خطی بین آن‌هاست. به طوری‌که بیشترین مقدار آن‌ها در غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۵ گرم در لیتر عصاره مخمری بود. بیشترین مقدار پروتئین محلول در غلظت‌های ۷۵ میکرومولار و ۳ گرم در لیتر و بیشترین میزان کربوهیدرات محلول در غلظت‌های ۷۵ میکرومولار و ۲ گرم در لیتر عصاره مخمری مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که هر دو ژن تحت تاثیر الیسیتورها قرار گرفتند. بیشترین میزان بیان *DXS* و *CPPS* در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک و ۲ گرم در لیتر عصاره مخمری بود. بالا بودن میزان بیان این ژن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده بالا بودن میزان محصول نهایی مسیر بیوسنتزی باشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد اسید سالیسیلیک و عصاره مخمری روشی مناسب برای افزایش بیوسنتز ترکیبات زیست فعال در استویا است.

واژه‌های کلیدی

استویا
الیسیتور
بیان ژن
ترکیبات فنلی
قندهای محلول
کشت درون شیشه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی بومی آمریکای جنوبی، بوته‌ای، علفی و چند ساله از خانواده Asteraceae است. برگ‌ها، ساقه‌ها و گل‌های استویا حاوی ترکیب پیچیده‌ای از دی‌ترپن گلیکوزیدها می‌باشد (Rajasekaran et al. 2008; Goyal et al. 2010) که عمده‌ترین آن‌ها استویوزید و ریبودیوزید A است که حدوداً ۳۰۰-۲۵۰ برابر شیرین‌تر از شکر هستند (Debnath 2008). علاوه بر گلیکوزیدها، برگ‌های استویا حاوی ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها می‌باشد. به‌دلیل میزان بالای این مواد، عصاره‌های استویا دارای خواص ضد میکروبی، ضد حساسیت، ضد سرطان، ضد التهاب، محافظت از کبد و بهبود عملکرد سیستم ایمنی در شرایط *in vitro* است (Gupta et al. 2013). علی‌رغم بالا بودن این ترکیبات در گیاه، افزایش میزان آن‌ها یکی از اهداف اصلاحی این گیاه است. استراتژی‌های بیوتکنولوژیکی مختلف برای ایجاد یا بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در استویا به کار گرفته می‌شود. تکنیک کشت بافت و استفاده از الیسیتورها از جمله این روش‌هاست. الیسیتورهای خارجی معمولاً با یک گیرنده غشایی گیاه در تعامل‌اند و ژن‌های خاصی را فعال می‌کنند، در نتیجه باعث تحریک سنتز برخی ترکیب زیست فعال در گیاهان می‌شوند (Baque et al. 2012). اسید سالیسیلیک (SA) و عصاره مخمری (YE) از الیسیتورهایی هستند که معمولاً برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی استفاده می‌شود (Patel and Krishnamurthy 2013).

اسید سالیسیلیک (SA) یک مونوهیدروکسی بنزوئیک اسید است که به‌عنوان یک هورمون طبیعی گیاهی عملکردهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه را تنظیم می‌کند (Janda and Ruelland 2015). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که کاربرد خارجی SA مقدار استویول گلیکوزیدها را در استویا در شرایط *in vitro* به میزان زیادی افزایش می‌دهد (Bayraktar et al. 2016). SA در تحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده به‌عنوان یک مولکول سیگنالینگ نقش مهمی بازی می‌کند (Li et al. 2014) و در فعال‌سازی سیستم آنتی اکسیدانی ناشی از تنش درگیر است (Janda and Ruelland 2015). اثرات SA روی فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بسته به نوع گونه، مرحله نموی، نحوه کاربرد، غلظت SA و شرایط محیطی متفاوت است (Shraiy and Hegazi 2009). تیمار SA میزان فنل کل و فعالیت DPPH را در کشت‌های سوسپانسیون سلولی *Panax ginseng* (Ali et al. 2006)، *Momordica charantia* (Chung et al. 2016) و *Thymus membranaceus* (Pe´rez-Tortosa et al. 2012) افزایش داد. در بررسی اثر SA بر خصوصیات آنتی اکسیدانی استویا بیشترین میزان فنل کل و میزان DPPH در غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA مشاهده شد (Moharramnejad et al. 2019). در حالی‌که در تحقیق Lucho et al. (2019) روی گیاه استویا غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA افزایشی در ظرفیت آنتی اکسیدانی در ۲٤، ٤۸ و ۹٦ ساعت پس از تیمار ایجاد نکرد.

عصاره مخمری (YE) یک ترکیب بیولوژیکی پیچیده است که اگرچه ساختار مولکولی عناصر فعال آن ناشناخته است می‌تواند پاسخ‌های دفاعی گیاه را تحریک کند (Bayractar et al. 2016). طبق گزارش Mossera et al. (2012)، YE به‌عنوان الیسیتور تولید پروتئین‌ها را در کشت‌های سلولی افزایش می‌دهد. از اثرات شناخته شده YE ایجاد تنش در گیاه و تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (Savitha 2006). پلی‌ساکاریدهای مخمری تولید فلاونوئیدها را در ریشه موئی *Fagopyrum tataricum* تحریک کردند (Zhao et al. 2014). نتایج Arastefar et al. (2013) نشان داد که تیمار YE باعث افزایش میزان فلاونوئیدها و پروتئین کل در گیاهچه‌های سویا (*Glycin max*) شده است. کاربرد SA در محیط کشت گیاه *Curcuma mangga* تا غلظت ۳/۵ mg/l میزان فنل کل را افزایش داد. در حالی‌که مقادیر بالاتر YE (۵ mg/l)، به‌عنوان محرک تولید ترکیبات فنلی عمل نکرد (Abraham et al. 2011).

سنتز استویول گلیکوزیدها از مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) انجام می‌شود. از آنجا که یکی از اهداف مهم اصلاحی استویا افزایش میزان استویول گلیکوزیدهای آن است در اینجا اثر الیسیتورها بر بیان دو ژن مهم مسیر بیوسنتزی بررسی شده است. بیشتر مطالعات صورت گرفته در زمینه بیان ژن‌های انتهایی مسیر MEP است و اطلاعات در زمینه تأثیر الیسیتورها بر ژن‌های ابتدایی مسیر اندک است. مرحله اول در مسیر MEP، شامل تراکم

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

پیرووات و گلیسرآلدئید ۳-فسفات به ۱-داکسی دی گلوکز ۵ فسفات (DXP) توسط آنزیم DXP سنتتاز (*DXS*) است. در ادامه مسیر GGDP تولید شده با عمل آنزیم *CPPS* تبدیل به کوپالیل دی فسفات می‌شود که با فعالیت چند آنزیم دیگر در نهایت استویول گلیکوزیدها را تولید می‌کنند (Kuzuyama et al. 2000; Brandle and Telmer 2007). از آنجا که *DXS* در ابتدای مسیر و *CPPS* در میانه مسیر تولید SGها قرار دارند بررسی بیان آن‌ها تحت تأثیر الیسیتورها از اهمیت خاصی برخوردار است. مطالعات مرتبط اهمیت *DXS* و *CPPS* را در تنظیم میزان SGها نشان می‌دهد (Kumar et al. 2012). معمولاً افزایش در سطح بیان ژن‌های یک مسیر بیوسنتزی باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه آن مسیر خاص می‌شود (Modi et al. 2014).

Yan et al.(2009) افزایش در میزان بیان *DXS* را در گیاه *Salvia miltiorrhiza* تحت تیمار سالیسیلک اسید گزارش کردند. طبق مطالعه Lucho et al. (2018) بر روی گیاه استویا در شرایط هیدروپونیک، SA دارای اثر بزرگی بر بیان ژن‌های *DXS* و *CPPS* است و باعث افزایش میزان بیان این ژن‌ها شده است. افزایش بیان *DXS* همبستگی مثبت با افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در برخی گیاهان داشته است (Gong et al. 2006; Munoz-Bertomeu et al. 2006). طبق تحقیق Singh et al. (2017) تنظیم بیان ژن *DXS* می‌تواند به‌عنوان کاندیدای احتمالی برای تغییر میزان SGها در استویا باشد. تاکنون گزارشی در زمینه تأثیر عصاره مخمری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه ارائه نشده است و این مطالعه اولین تحقیق در این زمینه می‌تواند باشد.

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر دوزهای مختلف SA (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) و YE (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۵ گرم در لیتر) روی صفات بیوشیمیایی و نیز بیان دو ژن مهم مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدهای استویا در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است و می‌تواند نخستین گزارش در زمینه تأثیر YE بر بیان ژن‌های *DXS* و *CPPS* باشد.

مواد و روش‌ها

پس از تهیه گیاهچه‌های استویا از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج، جهت تهیه گیاهچه‌های استوک، یک پایه گیاهی سالم انتخاب و پس از ضدعفونی، ساقه در قطعات کوچک در محیط MS (Murashige and Skoog 1962) فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد کشت و در اتاقک رشد در شرایط مناسب نگهداری و هر چهار هفته یکبار واکشت شدند. پس از چندین مرحله واکشت، قطعات یک سانتی‌متری به همراه جوانه جانبی تهیه و در محیط‌های کشت فاقد تنظیم کننده رشد، حاوی سطوح متفاوت SA (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) و YE (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۵ گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. چهار هفته پس از کشت، نمونه‌برداری انجام شد. این آزمایش در سه تکرار و ده ریزنمونه در هر تکرار صورت گرفت.

سنجش میزان H_2O_2 با استفاده از روش Velikova et al. (2000) انجام شد. ۰/۰۷ گرم بافت برگ تازه توزین شد و با ۱ سی‌سی تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱٪ کاملاً هموژن شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ºC سانتریفیوژ شد. سپس به ۷۵۰ ماکرولیتر از محلول روئی، ۷۵۰ ماکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH 7) و ۱/۵ سی‌سی پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها با استفاده از پلیت ریدر (Biotek=EON) در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu molg^{-1}$ FW) بیان شد.

جهت استخراج عصاره پروتئینی کل از روش Guy et al. (1992) استفاده شد. به ازای هر گرم برگ، یک میلی‌لیتر بافر استخراج پروتئین اضافه و در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی محلول به تیوب جدید منتقل و مجددا به مدت ۱۵ دقیقه با همان شرایط سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و تا زمان استفاده در ۲۰ºC- نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین کل طبق روش Bradford (1976) و با استفاده از عصاره پروتئینی انجام شد. ۲۰۰ ماکرولیتر محلول بردفورد و ۱۰ ماکرولیتر عصاره داخل چاهک‌های پلیت ریخته شد و پس از گذشت ۲۰ دقیقه جذب نمونه‌ها با استفاده از پلیت ریدر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین غلظت پروتئین نمونه‌های مختلف، از منحنی استاندارد رسم شده با غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول از روش فنل- اسید سولفوریک استفاده شد. به این صورت که به ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی، ۵۰ ماکرولیتر فنل ۸۰٪ وزنی و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در محیط و ۲۰-۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۰-۲۵°C، میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه پلیت ریدر در طول موج ٤٩٠ نانومتر خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوطه میزان کربوهیدرات‌های محلول محاسبه شد (Dubios et al. 1956). جهت تهیه عصاره متانولی، مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت برگ خشک شده توزین و در دو میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ حجمی حل و ترکیب به مدت ٢٤ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰ درجه سانتی‌گراد در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در تاریکی جهت آنالیزهای بعدی نگهداری شد. اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال آزاد DPPH طبق روش Brand-Williams et al.(1995) انجام شد. محلول DPPH با غلظت ٦×١٠^{-٥} مول در لیتر با استفاده از حلال متانول تهیه شد. به ۱۰۰ ماکرولیتر از عصاره متانولی هر نمونه، مقدار ۳/۹ سی‌سی از محلول DPPH اضافه شد. میزان جذب در دقیقه صفر و ۳۰ با استفاده از پلیت ریدر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. با استفاده از فرمول، درصد مهار رادیکال‌های آزاد برای هر نمونه طبق معادله (۱) محاسبه شد.

معادله (۱): $100\times((AS/AD)-1)$ = درصد مهار رادیکال‌های آزاد

که در این معادله As بیانگر جذب نمونه و AD جذب کنترل است. میزان فنل کل طبق روش Slinkerd and Singleton (1977) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. به ۱۰۰ ماکرولیتر از عصاره متانولی یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰٪ اضافه شد. پس از پنج دقیقه ۱۰۰ ماکرولیتر واکنش‌گر فولین سیوکالتیو ۰/۲N به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و پس از آن در هر چاهک پلیت مقدار ۳۰۰ ماکرولیتر از آن ریخته و میزان جذب با استفاده از پلیت ریدر در طول موج ٧٦٥ نانومتر قرائت شد. داده‌ها با مقایسه بین منحنی استاندارد (گالیک اسید) و میزان جذب هر نمونه محاسبه شد. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از روش کلموگروف- اسمیرنوف با کمک نرم‌افزار SPSS، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver. 9.0 در سطح احتمال پنج و یک درصد انجام شد و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 رسم شدند.

استخراج RNA کل با استفاده از محلول استخراج RNX-Plus (سینا کلون) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ و دستگاه Spectrophotometer NanoDrop 1000 (ساخت شرکت Thermo Scientific آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از RNAهای استخراج شده، جهت سنتز cDNA استفاده شد. سنتز cDNA بر روی یک میکروگرم از RNA کل، با استفاده از کیت تاکارا (Takara cDNA Synthesis Kit) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. cDNA سنتز شده با استفاده از نانودراپ تعیین غلظت و غلظت‌ها یکسان سازی شدند. از cDNAهای حاصل برای آنالیز نسخه‌برداری ژن استفاده شد. با استفاده از مستر میکس سایبرگرین (Takara) طبق دستورالعمل شرکت سازنده برای حجم واکنش ۱۵ میکرولیتر و تحت شرایط تکثیر زیر واکنش Real time PCR انجام شد.

مرحله اول: ٤ دقیقه در ۹۵°C، مرحله دوم: ۲۰ ثانیه ۹۵°C، ۲۰ ثانیه ۵۸°C و ۲۰ ثانیه ۷۲°C در چهل سیکل. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن رفرنس استفاده و میزان بیان نسبی برای هر ژن با استفاده از روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. کلیه محاسبات و رسم نمودارها با نرم‌افزار Microsoft EXCEL 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار SA بر صفات H_2O_2، DPPH، فنل کل، پروتئین کل و کربوهیدرات‌های محلول در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر YE نیز بر کلیه صفات به‌جز میزان فنل کل در سطح احتمال یک درصد و بر میزان فنل کل در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). میزان H_2O_2 به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر هر دو الیسیتور قرار گرفت. بیشترین و کمترین مقدار H_2O_2 در غلظت ۵۰ میکرومولار و صفر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

SA و ۱ و ۳ گرم در لیتر YE مشاهده شد با افزایش غلظت الیسیتورها، میزان H_2O_2 کاهش پیدا کرد (شکل ۱ و ۲، الف). پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، یکی از انواع ROS است که به‌عنوان یک مولکول سیگنالینگ بسیار مهم شناخته می‌شود (Bestwick et al. 1997). معمولاً در گیاهان در هنگام مواجهه با تنش، H_2O_2 برای فعال کردن مقاومت سیستمیک به سرعت تولید می‌شود (Janda et al. 2003). SA و YE با ایجاد تنش منجر به تجمع ROS، به‌ویژه H_2O_2 در کلروپلاست‌ها، میتوکندری و پراکسیزوم‌ها می‌شوند. به‌منظور غلبه بر تنش، گیاه استراتژی القاء فعالیت‌های آنتی اکسیدان را به‌کار می‌گیرد (Foyer and Noctor 2003) و باعث تحریک سنتز ترکیبات محافظتی می‌شود و در نهایت منجر به افزایش تحمل به تنش غیر زنده می‌گردد (Fayez and Bazaid 2014). در *Salvia miltiorrhiza* میزان H_2O_2 در سلول‌های تحریک‌شده با SA، ۸/۵۱ برابر بیشتر از کنترل آبی بود (Hao et al. 2014). در بررسی اثر SA بر روی کشت ریشه موئی جنسینگ افزایش سه برابری در میزان H_2O_2 در مقایسه با کنترل مشاهده شد (Rahimi et al. 2014). نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت دو الیسیتور، میزان درصد مهار DPPH افزایش پیدا می‌کند. به طوری‌که بیشترین مقدار آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA و ۵ گرم در لیتر YE بود (شکل ۱ و ۲، ب). از میزان مهار DPPH برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده می‌شود (Kim et al. 2007). هرچه میزان درصد مهار DPPH بیشتر باشد به معنی افزایش در ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده است. ترکیبات فنلی اصلی‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند. با این حال، بر اساس نظر Bohnert and Jensen (1996) کربوهیدرات‌ها نیز ممکن است به‌عنوان مهارکننده‌های ROS عمل و به تثبیت تنش اکسیداتیو کمک کنند.

جدول ۱- توالی جفت آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش (Singh et al. 2017)

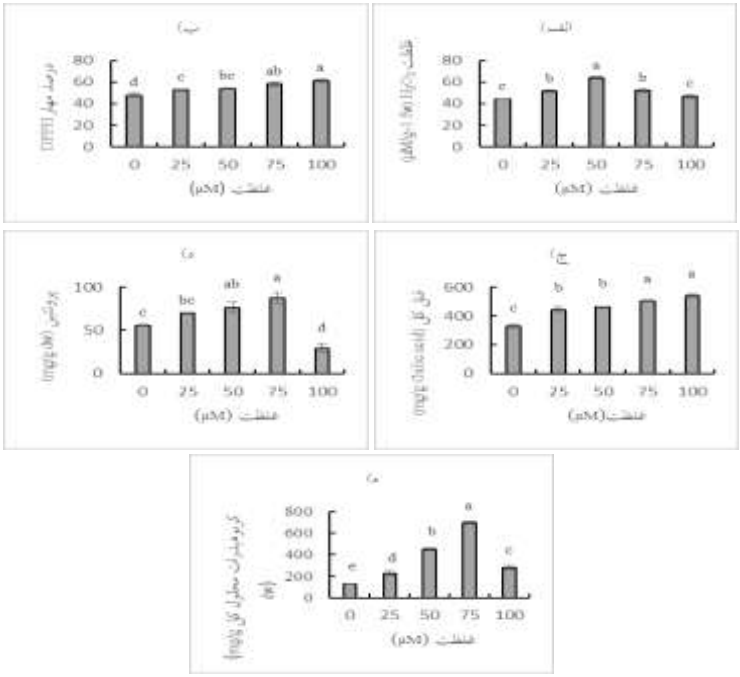
ژن هدف	طول قطعه تکثیری (bp)	Gene bank Accession number	توالی آغازگرها
GAPDH	۹۷	KC508619.1	Fwd 5'-CCAGCCTTAGCATCAAAGAT-3' Rev 5'-GCCATTAAGGAGGAATCAGA-3'
DXS	۱۲۱	FJ214107.1	Fwd 5'-CAAATTGGACCTCAAGCACA-3' Rev 5'-CGACGGGACCGATGTAGTAT-3'
CPPS	۱۲۲	JN675707.1	Fwd 5'-AGGCGTTGGTATTGAGGATG-3' Rev 5'-TGGTTGACGAAATTGCAAGA-3'

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد اندازه‌گیری تحت تیمار SA

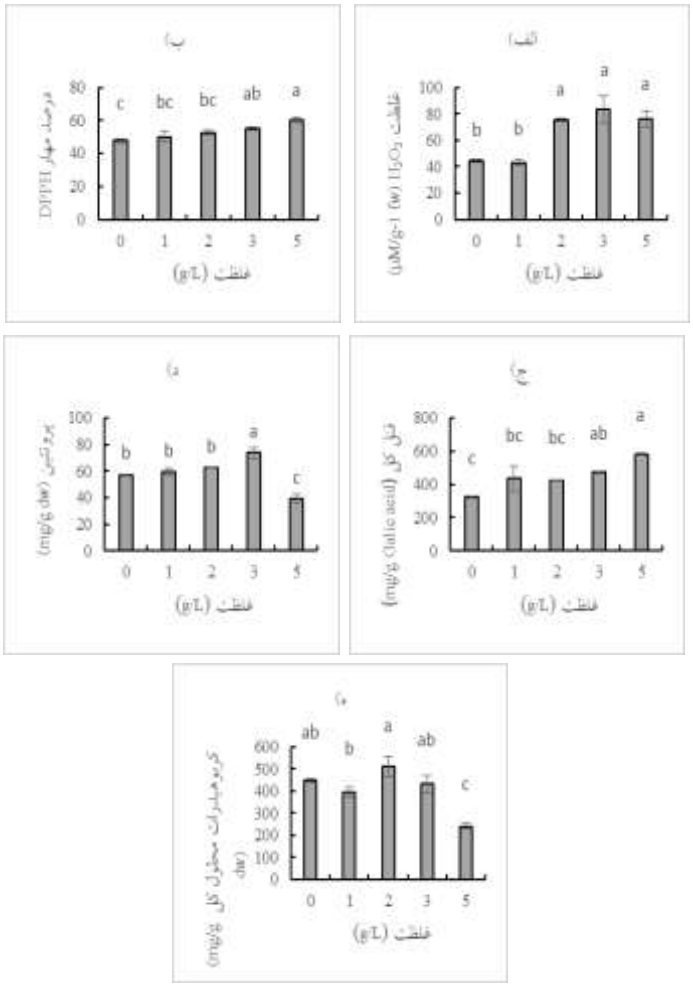
		میانگین مربعات (MS)				
منابع تغییرات	درجه آزادی	H_2O_2	DPPH	فنل کل	پروتئین کل	کربوهیدرات‌های محلول
SA	٤	۱۷۰/۷۳**	۸۷/٥٤**	۱۹۸۹۰/٦٤**	۱٥۲۱/٥٦**	۱۹۸۹۰/٦٤**
خطا	۱۰	٤/۳۷	٦/۹۷	٤٥۰/۱۸۳	٦۰/٦۸	٤٥۰/۱۸
ضریب تغییرات (٪)	–	٤/۰٤	٤/۸۳	٤/٦٥۷	۱۲/۲۱	٤/٦٥
YE	٤	۱۱۰۲/٥**	٦۸/۸**	۲٥۸۷۸/۲*	٥۰۱/٤۲**	۹۰٦۳/٤٦**
خطا	۱۰	۹۱/٤	۱۰/۲٤	۳٥۲٥/۸۷	۲۳/۱۸	٤۰۰۲/۷۸
ضریب تغییرات (٪)	–	۱٤/۸٤	٦/۱۷	۱۳/۲٥	۸/۲٦	۱٥/۲٤

**، * و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح یک درصد، معنی‌دار در سطح پنج درصد و عدم معنی‌داری

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۱- الف) میزان H_2O_2، ب) درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، ج) میزان فنل کل، د) میزان پروتئین کل و ه) میزان کربوهیدرات محلول کل تحت تیمار SA



شکل ۲- الف) میزان H_2O_2، ب) درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، ج) میزان فنل کل، د) میزان پروتئین کل و ه) میزان کربوهیدرات محلول کل تحت تیمار

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

الیسیتورها با القاء پاسخ‌های فیزیولوژیکی در گیاهان باعث فعال‌سازی متابولیسم ثانویه و سنتز ترکیبات فنلی از طریق آزاد سازی گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) می‌شوند. ROSها مسیر متابولیسم ثانویه را تحریک و مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی را فعال می‌کند (Pastore et al. 2019). اکثر آزمایشات انجام شده، همبستگی مثبت بین محتوای ترکیبات فنلی محلول کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استویا را نشان می‌دهند (Chun et al. 2005). در مطالعه Lee et al. (2015) روی ریشه‌های نابه‌جای گیاه *Eleutherococcus koreanum* با افزایش غلظت SA به تدریج میزان H_2O_2 افزایش پیدا کرد. فعالیت DPPH در ریشه‌ها الگوی مشابهی با میزان H_2O_2 نشان داد. در پژوهشی دیگر، غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA افزایشی در ظرفیت آنتی اکسیدانی ایجاد نکرد (Lucho et al. 2019). با این حال با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر به‌نظر می‌رسد در سطوح نسبتاً بالا، SA ممکن است به‌طور مستقیم در مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد به‌عنوان یک آنتی اکسیدان درگیر باشد و/یا به‌طور غیر مستقیم تعادل بازخوانی را از طریق فعال‌سازی پاسخ‌های آنتی اکسیدانی تغییر دهد (López-Orenes et al. 2013).

بررسی اثر الیسیتورها بر میزان فنل کل نشان دهنده روند افزایشی میزان فنل تحت تأثیر هر دو الیسیتور می‌باشد. بالاترین مقدار فنل کل در تیمار ۱۰۰ میکرومولار SA و ۵ گرم در لیتر YE مشاهده شد (شکل ۱ و ۲، ج). نتایج نشان‌دهنده وجود رابطه مثبت بین میزان فنل کل و میزان DPPH است، به‌طوری‌که با افزایش میزان DPPH میزان فنل کل نیز افزایش یافته است.

SA یک تنظیم‌کننده رشد درون‌زاد با طبیعت فنلی است، که در تنظیم برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی شرکت می‌کند (Khan et al. 2003). اثر مثبت SA ممکن است مربوط باشد به: ۱) SA ممکن است مسیرهایی را ایجاد کند که منجر به جلوگیری از آسیب اکسیداتیو یا ترمیم آن آسیب می‌شود (Larkindale and Knight 2002) ۲) مولکول SA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی بالقوه عمل می‌کند همچنین یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی است، که برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی را تنظیم می‌کند (Hayat et al. 2010) از جمله، تنظیم برخی مواد شیمیایی مانند پروتئین محلول کل، فنل کل، پرولین، کربوهیدرات محلول کل و قندها (AL-Shraiy and Hegazi 2009). در تحقیقی ثابت شده است که SA نقش مهمی در تولید ترکیبات فنلی، کربوهیدرات‌ها و آمینو اسیدها در گیاه نعناع بازی می‌کند، که این عوامل بازتابی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن است (Pérez et al. 2012). در کشت سوسپانسیون ریشه *Panax ginseng*، SA تنش اکسیداتیو را القاء و باعث تجمع ترکیبات فنلی شد (Ali et al. 2006). SA (۱۰ میلی‌مول در لیتر) میزان فنل کل را در گیاه جعفری ۲۴ ساعت پس از تیمار افزایش داد (Divya et al. 2014). در مطالعه‌ای بر روی سرخارگل کاربرد محلول‌پاشی SA باعث افزایش ده برابری ترکیبات فنلی نسبت به شاهد شد (Kuzel et al. 2009). SA بیان برخی از ژن‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه مثل آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید را القاء می‌کند و بنابراین می‌تواند برخی متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی را افزایش دهد. این افزایش در غلظت‌های بهینه SA اتفاق می‌افتد و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد. بنابراین افزایش در میزان آنتی اکسیدان و ترکیبات فنلی را می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز این ترکیبات از جمله فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمین ترانسفراز نسبت داد. در واقع SA با جلوگیری از فعالیت کاتالاز منجر به افزایش H_2O_2 و فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی گیاه از طریق فعال سازی برخی ژن‌های مرتبط با دفاع می‌شود (Buitelaar et al. 1992).

نتایج نشان می‌دهد که YE در غلظت مناسب برای افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌تواند استفاده شود. ثابت شده است که YE بر مسیر بیوسنتزی گیاهان تأثیری ندارد. با این حال، تولید جاسمونیک اسید و/یا متیل جاسمونات درونی را که بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد تحریک می‌کند (Sanchez-Sampedro et al. 2005). بالا بودن میزان ترکیبات فنلی و فعالیت مهاری رادیکال آزاد گیاهچه‌های استویا نشان می‌دهد که YE احتمالاً تولید جاسمونیک اسید و/یا متیل جاسمونات را راه‌اندازی کرده و از این طریق باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی در استویا شده است.

تحریک تجمع ترکیبات فنلی با YE در کشت‌های *in vitro* گونه‌های دیگر گیاهی مانند *S. miltiorrhiza* گزارش شده است (Chen and Chen 2000). همچنین Beerhues and Berger

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

(1995) تولید اسیدهای فنلی جدید و فلاونوئیدها را در کشت‌های سلولی *Centarium erythraea* و *C. littorale* تیمار شده با YE گزارش کردند. در کشت‌های سوسپانسیون سلولی *H. triquetrifolium* به محض تیمار با YE به‌عنوان یک الیسیتور زنده برخی متابولیت‌های ثانویه افزایش یافت، و منجر به افزایش در ترکیبات فنلی، تجمع فلاونوئیدها و تولید مواد جدید شد (Azeez and Ibrahim 2013). افزودن ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر YE به محیط کشت *Curcuma mangga* میزان فنل کل را افزایش داد، در حالی‌که مقدار بالاتر آن (پنج میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان الیسیتور برای تولید ترکیبات فنلی عمل نکرد. همچنین نشان داده شد که نمونه‌های تیمار شده با YE حاوی عوامل آنتی اکسیدانی بیشتری هستند. به‌طوری‌که محیط تهیه شده با ۳/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر YE بالاترین فعالیت مهاری رادیکال (DPPH) را نشان می‌دهد (Abraham et al. 2011).

بر طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها، میزان پروتئین کل با افزایش سطح الیسیتوری تا سطح ۷۵ میکرومولار SA و ۳ گرم در لیتر YE افزایش پیدا کرد و پس از آن کاهش یافت (شکل ۱ و ۲، د).

اعتقاد بر این است که SA بر پروتئین‌های آپوپلاستی تأثیر می‌گذارد (Tasgin et al. 2006)، و احتمالاً از این طریق باعث تحریک سنتز پروتئین می‌شود. در مطالعه برگ انگور، محلول‌پاشی SA باعث افزایش محتوای پروتئین کل و میزان کربوهیدرات‌های محلول نسبت به شاهد شد هر چند این افزایش در مورد کربوهیدرات‌های محلول معنی‌دار نبود (Nezamdoost et al. 2016). کاربرد SA در گیاه ریحان افزایش معنی‌داری را در محتوای پروتئین بسته به غلظت SA به‌کار برده شده القاء کرد (Kabiri et al. 2014). گزارش شده است که SA با افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز باعث افزایش ازت و پروتئین در گیاه می‌شود (Singh and Usha 2003). SA باعث افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود (Hayat and Ahmad 2007). بنابراین تأثیر SA در افزایش میزان پروتئین‌ها را می‌توان به تغییر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نیز نسبت داد.

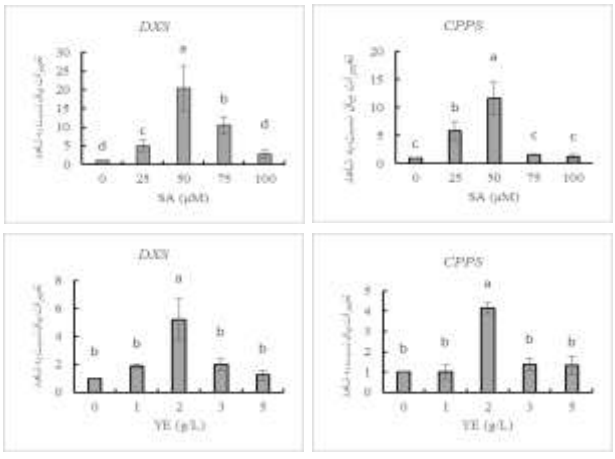
میزان پروتئین کل در مواجهه با YE نیز افزایش یافت. معمولاً در هنگام مواجهه با انواع تنش‌ها غلظت پروتئین کل در گیاهان دچار تغییراتی می‌شود، که این تغییرات مربوط به تجزیه و یا مهار سنتز برخی از پروتئین‌ها و به‌کارگیری انرژی سلول در ساخت دسته کوچکی از پروتئین‌های مخصوص مقابله با تنش می‌باشد (Ghorbanli et al. 2013). افزایش میزان پروتئین کل ممکن است به‌دلیل افزایش بیوسنتز پروتئین برای سازگاری با شرایط جدید و تحمل به تنش باشد. در شدت‌های بالاتر الیسیتوری کاهش در میزان پروتئین احتمالاً به‌دلیل کاهش سنتز پروتئین، کاهش دسترسی به آمینواسیدها و تغییر شکل ساختمان آنزیم‌ها طی سنتز پروتئین‌ها باشد (Rollins et al. 2013).

میزان کربوهیدرات‌های محلول تحت تأثیر هر دو الیسیتور قرار گرفت. میزان کربوهیدرات محلول تحت تیمار SA با افزایش غلظت به تدریج افزایش پیدا کرد تا این‌که در غلظت ۷۵ میکرومولار بالاترین مقدار بود. اما تحت تیمار YE با افزایش غلظت روند مشخصی مشاهده نشد. بیشترین مقدار آن در تیمار ۲ گرم در لیتر YE بود (شکل ۱ و ۲، ه). افزایش قندها یکی دیگر از مکانیسم‌های دفاعی است که گیاهان به هنگام مواجهه با تنش برای زنده ماندن به‌کار می‌گیرند (Yamada et al. 2005). کربوهیدرات‌ها از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل قندها و زنجیره‌های قطبی پروتئین‌ها و بالاخره پایدارسازی پروتئین‌ها، باعث تنظیم اسمزی، پایداری غشاها و پروتئین‌های موجود در سلول می‌شوند. برای مثال تجمع ساکارز موجب حفظ فسفولیپیدهای غشاء می‌شود و از تغییرات ساختاری پروتئین‌های محلول سلول نیز جلوگیری می‌کند (Kerepesi and Galiba 2000). اگر تجمع قندها در برگ ملاکی برای تحمل به تنش در نظر گرفته شود، SA و YE تا غلظت‌های ۷۵ میکرومولار و ۲ گرم در لیتر باعث افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول شده‌اند بنابراین گیاه تا این غلظت‌ها در مقابل تنش ایجاد شده تحمل می‌کند. ولی در غلظت‌های بالاتر میزان مقاومت کم می‌شود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گیاه استویا در غلظت‌های بالای SA و YE، فاقد پتانسیل بالا جهت افزایش غلظت ترکیباتی مانند ساکارز، گلوکز و فروکتوز به‌عنوان عوامل سازگار کننده هستند که این می‌تواند به‌دلیل کاهش کارآیی فتوسنتز و در نتیجه کاهش عرضه قندهای محلول در بافت برگ باشد. با این حال، تغییر غلظت قندهای محلول در ارتباط با شرایط محیطی از الگوی یکسانی تبعیت نمی‌کند و بسته به

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

ژنوتیپ و شرایط محیطی تغییرات خاصی را نشان می‌دهد (Rosa et al. 2009; Sami et al. 2016). در تحقیقی بر روی ویژگی‌های بیوشیمیایی به لیمو بیشترین میزان کربوهیدرات محلول در تیمار محلول‌پاشی ۳/۲ میلی‌مولار SA به‌دست آمد (Farsari et al. 2019).

بیان ژن‌های مورد مطالعه تحت تأثیر تیمار SA و YE قرار گرفتند. بیشترین میزان بیان ژن‌های *DXS* و *CPPS* در غلظت ۵۰ میکرومولار SA و ۲ گرم در لیتر YE بود. با افزایش غلظت SA و YE تا غلظت ۵۰ میکرومولار و ۲ گرم در لیتر میزان بیان این دو ژن افزایش یافته و بعد از آن با افزایش غلظت میزان بیان هر دو ژن کاهش یافت. این ژن‌ها در تیمار ۵۰ میکرومولار SA، به‌ترتیب به میزان ۲۰ و ۱۱ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان داشتند. همچنین در تیمار ۲ گرم در لیتر YE، به‌ترتیب به میزان ۵ و ٤ برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان دادند. همبستگی مثبت بین میزان بیان این دو ژن در سایر غلظت‌های تیماری نیز مشهود است. کمترین میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در تیمار شاهد بود این نتایج نشان‌دهنده این است که افزودن SA و YE حتی در غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر از ۵۰ میکرومولار SA و ۲ گرم در لیتر YE در هر صورت بر بیان ژن‌های مورد بررسی تأثیر مثبت داشته است (شکل ۳).



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن‌های *DXS* و *CPPS* تحت تأثیر تیمارهای SA و YE

DXS چون سرچشمه مسیر MEP جهت تولید استویول گلیکوزیدها است بالا بودن میزان بیان آن نشان‌دهنده احتمالاً افزایش در بیان سایر ژن‌های مسیر است. چرا که ماده اولیه برای ادامه مسیر به میزان زیادی فراهم می‌شود. در مطالعات قبلی ثابت شده است که بیان ژن *DXS* در برگ‌ها، محتوای استویول گلیکوزیدها را بدون تأثیر بر روی نسبت آن‌ها افزایش می‌دهد (Zheng et al. 2019) و مطالعات دیگر نیز همبستگی مثبت بین افزایش بیان ژن *DXS* و افزایش میزان محصول نهایی مسیر را گزارش کرده‌اند (Gong et al. 2006; Jadaun et al. 2017). طبق تحقیق Singh et al. (2017) تنظیم بیان ژن *DXS* می‌تواند به‌عنوان کاندیدای احتمالی برای تغییر میزان SGها در استویا باشد. ژن *CPPS* در میانه مسیر قرار دارد و بالا بودن بیان آن نشان‌دهنده احتمالا افزایش میزان محصول نهایی مسیر است. البته لازم است ژن‌های بعدی مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها نیز بررسی شوند زیرا مسیر MEP پس از بیان ژن *CPPS*، منشعب می‌شود و بخشی از محصول بیان این ژن به سمت تولید استویول گلیکوزیدها می‌رود و بخشی دیگر در یک مسیر انحرافی با فعالیت مجموعه‌ای از آنزیم‌ها، جیبرلیک اسید را تولید می‌کند. تحقیقاتی که در این زمینه صورت گرفته است نشان می‌دهد که افزودن عصاره مخمری باعث افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های بعدی مسیر MEP می‌شود که این نشان دهنده تأثیر مثبت این الیسیتور بر ژن‌های مسیر و محصول نهایی آن است (Rasouli et al. 2018). گزارشات متفاوتی در مورد بیان ژن‌های ادامه مسیر تحت تأثیر SA وجود دارد. در حالی‌که Vazquez-Hernandez et al. (2019) تأثیر مثبت SA را بر ژن‌های انتهایی مسیر نشان می‌دهد در مطالعه‌ای دیگر عدم تأثیر SA بر ژن‌های انتهایی مسیر گزارش شده است (Lucho et al. 2018). از آنجا که بخشی از محصولات بیان ژن *CPPS* به سمت تولید جیبرلین‌ها می‌رود، بررسی بیان ژن‌های مسیر تولید جیبرلین‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بررسی صفات بیوشیمیایی نشان داد که هر دو الیسیتور باعث ایجاد تنش در گیاه و افزایش میزان درصد مهار رادیکال آزاد، فنل کل، H_2O_2، میزان کربوهیدرات محلول و پروتئین کل شده‌اند. بیشترین میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، متناسب با بیشترین میزان ترکیبات فنلی بود به طوری‌که بیشترین میزان این

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

دو در غلظت‌های بالای الیسیتوری مشاهد شد. همچنین نتایج بیان ژن نشان‌دهنده این است که ژن‌های مورد بررسی تحت تأثیر الیسیتورها قرار گرفته‌اند و از این طریق احتمالاً باعث افزایش میزان تولید استویول گلیکوزیدها یا میزان جیبرلین‌ها می‌شوند. بررسی دقیق‌تر میزان تأثیر بر تولید استویول گلیکوزیدها، نیاز به مطالعه سایر ژن‌های مسیر بیوسنتزی و اندازه‌گیری میزان تولید این متابولیت‌ها تحت تأثیر الیسیتورهای SA و YE دارد.

منابع

Abraham F, Bhatt A, Keng CL, Indrayanto G, Sulaiman, SF (2011) Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga* in vitro plantlets. African Journal of Biotechnology 10:7787-7795.

Ali M, Hahn EJ, Paek KY (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules 12:607-621.

AL-Shraiy AM, Hegazi AM (2009) Effect of Acetyl salicylic acid, Indole-3-butyric acid and Salicylic acid on growth, yield and chemical constituents of onion plants. Journal of Applied Sciences Research 3:1554-1563.

Arastefar A, Riahi-Madvar A, Tohid Far M, Yousefi K (2013) Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in *Glycine max* seedlings. Agricultural Biotechnology Journal 5:1-18 (In Farsi).

Azeez H, Ibrahim K (2013) Effect of biotic elicitors on secondary metabolite production in cell suspensions of *Hypericum triquetrifolium* Turra. bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine cluj-napoca. Horticulture 70:26-33.

Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, ... Gurel A (2016) Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 127:289-300.

Baque MA, Moh SH, Lee EJ, Zhong JJ, Paek KY (2012) Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. Biotechnology Advances 30:1255-1267.

Beerhues L, Berger U (1995) Differential accumulation of xanthones in methyl-jasmonate-and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaurium erythraea* and *Centaurium littorale*. Planta 197: 608-612.

Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. The Plant Cell 9:209-221.

Bohnert HJ, Jensen RG (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology 14:89-97.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 28:25-30.

Brandle JE, Telmer PG (2007) Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry 68:1855-1863.

Chen H, Chen F (2000) Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. Plant Cell Reports 19:710-717.

Buitelaar RM, Casário MT, Tramper J (1992) Elicitation of thiophene production by hairy roots of *Tagetes patula*. Enzyme and Microbial Technology 14:2-7.

Chun OK, Kim DO, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY (2005) Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. Journal of the Science of Food and Agriculture 85:1715-1724.

Chung IM, Thiruvengadam M, Rekha K, Rajakumar G (2016) Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology 59.

Debnath M (2008) Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana. Journal of Medicinal Plants Research 2:45–51.

Divya P, Puthusseri B, Neelwarne B (2014) The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. LWT-Food Science and Technology 56:101-110.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.

Farsari S, Moghadam M, Mehdizadeh L (2019) Effect of Salicylic Acid on Growth and Biochemical Characteristics and Essential Oil Percentage of *Lemon Verbena* at Different Irrigation Water Salinity. Journal of Water Research in Agriculture 33:95-107 (In Farsi).

Fayez KA, Bazaid SA (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 13:45-55.

Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiologia Plantarum 119:355-364.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Ghorbanli M, Gafarabad M, Amirkian T, Mamaghani BA (2013) Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars. Iranian Journal of Plant Physiology 3:651-658 (In Farsi).

Gong YF, Liao ZH, Guo BH, Sun XF, Tang KX (2006) Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Planta Medica 72:329-335.

Goyal S, Samsher S, Goyal R (2010) Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: A review. International Journal of Food Sciences and Nutrition 61:1–10.

Gupta E, Purwar S, Sandaram S, Gai GK (2013) Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana:* A review. Journal of Medicinal Plants Research 7:3343–3353.

Hao W, Guo H, Zhang J, Hu G, Yao Y, Dong J (2014) Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in Salvia miltiorrhiza cell cultures. The Scientific World Journal 2014: 1-7.

Hayat S, Ahmad A (Eds.) (2007) Salicylic acid-a plant hormone. Springer Science & Business Media, Berlin, Germany 1-401.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environmental and Experimental Botany 68:14-25.

Jadaun JS, Sangwan NS, Narnoliya LK, Singh N, Bansal S, Mishra B, Sangwan RS (2017) Over-expression of *DXS* gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in rose-scented geranium and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis. Physiologia Plantarum 159:381-400.

Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, Veisz O, Páldi E (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. Plant Science 164:301-306.

Janda M, Ruelland E (2015) Magical mystery tour: salicylic acid signalling. Environmental and Experimental Botany 114:117-128.

Kabiri S, Tran DN, Altalhi T, Losic D (2014) Outstanding adsorption performance of graphene–carbon nanotube aerogels for continuous oil removal. Carbon 80:523-533.

Kerepesi I, Galiba G (2000) Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science 40:482-487.

Kim HJ, Chen F, Wang X, Choi JH (2006) Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:7263-7269.

Kim H, Bang C, Choi Y, Lee J (2007) Antioxidant and antiproliferative activities of methanol extracts from leafy vegetables consumed in Korea. Food Science and Biotechnology 16:802-806.

Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. Plant Molecular Biology 26:1439-1458.

Kumar H, Kaul K, Bajpai-Gupta S, Kaul VK, Kumar S (2012) A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Gene 492:276-284.

Kuzel S, Vydra JAN, Triska JAN, Vrchotova N, Hruby M, Cigler P (2009) Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:7907-7911.

Kuzuyama T, Takagi M, Takahashi S, Seto H (2000) Cloning and Characterization of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Synthase fromStreptomyces sp. Strain CL190, Which Uses both the Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis. Journal of Bacteriology 182:891-897.

Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. Plant Physiology 128:682-695.

Lee EJ, Park SY, Paek KY (2015) Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 120:1-10.

Li T, Hu Y, Du X, Tang H, Shen C, Wu J (2014) Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in Torreya grandis cv. Merrillii seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. PLOS One 9:e109492.

Lucho SR, do Amaral MN, Milech C, Ferrer MÁ, Calderón AA, Bianchi VJ, Braga EJB (2018) Elicitor-induced transcriptional changes of genes of the steviol glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Plant Growth Regulation 37:971-985.

Lucho SR, do Amaral MN, López-Orenes A, Kleinowski AM, do Amarante L, Ferrer MÁ, ... Braga EJB (2019) Plant growth regulators as potential elicitors to increase the contents of phenolic compounds and antioxidant capacity in stevia plants. Sugar Technology 21:696-702.

Modi A, Litoriya N, Prajapati V, Rafalia R, Narayanan S (2014) Transcriptional profiling of genes involved in steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* bertoni during plant hardening. Developmental Dynamics 243:1067-1073.

Moharramnejad S, Azam AT, Panahandeh J, Dehghanian Z, Ashraf M (2019) Effect of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on In Vitro Growth, Stevioside Production, and Oxidative Defense System in *Stevia rebaudiana*. Sugar Technology 1-8.

Mossera M, Kapela R, Aymesa A, Bonannob LM, Olmosa E, Chevalota I, Marca I, Marc A (2012) Chromatographic fractionation of yeast extract: A strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture. Process Biochemistry 47:1178-1185.

Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006) Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. Plant Physiology 142:890-900.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Nezamdoost S, Farokhzad A, Rasouli Sadaghiani MH (2016) Effect of foliar application of salicylic acid on physiological and biochemical traits in grape (*Vitis vinifera* cv. Bidaneh Sefid) under boron toxicity. Research in Pomology 1:15-29.

Pastore C, Allegro G, Valentini G, Colucci E, Battista F, Filippetti I (2019) Biochemical and molecular effects of yeast extract applications on anthocyanin accumulation in cv. Sangiovese. In BIO Web of Conferences 13:03005 EDP Sciences.

Patel H, Krishnamurthy R (2013) Elicitors in plant tissue culture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2:60-65.

Pérez-Tortosa V, López-Orenes A, Martínez-Pérez A, Ferrer MA, Calderón AA (2012) Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry 130:362-369.

Rahimi S, Devi BSR, Khorolragchaa A, Kim YJ, Kim JH, Jung SK, Yang DC (2014) Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. Russian Journal of Plant Physiology 61:811-817.

Rajasekaran T, Ramakrishna A, Udaya Sankar K, Giridhar P, Ravishankar G (2008) Analysis of predominant steviosides in Stevia rebaudiana Bertoni by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. Food Biotechnol 22:179–188.

Rasouli D, Maleki B, Jafary H, Bahari A (2018) Expression analysis of genes involed in steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni under biotic and abiotic elicitors. Modern Genetic Journal 13:247-257 (In Farsi).

Rollins JA, Habte E, Templer SE, Colby T, Schmidt J, Von Korff M (2013) Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Experimental Botany 64:3201-3212.

Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE (2009) Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. Plant Signaling and Behavior 4:388-393.

Sami F, Yusuf M, Faizan M, Faraz A, Hayat S (2016) Role of sugars under abiotic stress. Plant Physiology and Biochemistry 109:54-61.

Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P (2005) Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Journal of Biotechnology 119:60-69.

Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA (2006) Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biochemistry 41:50-60.

Singh B, Usha K (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. Plant Growth Regulation 39:137-141.

Singh J, Sangwan NS, Narnoliya LK, Singh N, Bansal S, Mishra B, Sangwan RS (2017) Over-expression of *DXS* gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in rose-scented geranium and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis. Physiologia Plantarum 159:381-400.

Slinkard K, Singleton VL (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 28:49-55.

Tasgin E, Atici O, Nalbantoglou B, Popova LP (2006) Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidants enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Phytochemistry 67:710-715.

Vazquez-Hernandez C, Feregrino-Perez AA, Perez-Ramirez I, Ocampo-Velazquez RV, Rico-García E, Torres-Pacheco I, Guevara-Gonzalez RG (2019) Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and gene expression-associated to biosynthesis of SGs in *Stevia rebaudiana* B. cv. Morita II. Industrial Crops and Products 139:111479.

Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151:59-66.

Yamada M, Morishita H, Urano K, Shiozaki N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshiba Y (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. Journal of Experimental Botany 56:1975-1981.

Yan X, Zhang L, Wang J, Liao P, Zhang Y, Zhang R, Kai G (2009) Molecular characterization and expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) gene from *Salvia miltiorrhiza*. Acta Physiologiae Plantarum 31:1015-1022.

Zhao JL, Zou L, Zhang CQ, Li YY, Peng LX, Xiang DB, Zhao G (2014) Efficient production of flavonoids in *Fagopyrum tataricum* hairy root cultures with yeast polysaccharide elicitation and medium renewal process. Pharmacognosy Magazine 10:234.

Zheng J, Zhuang Y, Mao HZ, Jang IC (2019) Overexpression of *SrDXS1* and *SrKAH* enhances steviol glycosides content in transgenic Stevia plants. BMC Plant Biology 19:1.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]