ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۲۵۷ - ۲۴۷

بررسی بیان ژن‌های کلیدی در مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول در گیاه *Stevia rebaudiana* تحت الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی

Expression analysis of genes involed in steviol glycosides biosynthesis pathway in Stevia rebaudiana Bertoni under biotic and abiotic elicitors

دیاکو رسولی*[۱]، بهرام ملکی[۱]، حسین جعفری[۲]، عباس بهاری[۳]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- دانشیار، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان

Rasouli D*[1], Maleki B[1], Jafary H [2], Bahari A[3]

1- PhD Student, Associated Professor, of Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2- Associated Professor of Plant Protection Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran
3- Assistant Professor of Modern Biotechnology Research Center, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: diakorasouli@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. در این پژوهش اثر الیسیتورهای کیتوزان، عصاره مخمر و متیل جاسمونات بر بیان ژن‌های *KO*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* در مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول در گیاه *Stevia rebaudiana* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاه استویا تحت الیسیتورهای مذکور با غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر تیمار شدند و بعد از یک ماه برداشت از برگ‌های انتهایی انجام گرفت. نتایج حاصل نشان داد که کیتوزان در غلظت ۲۰ (میلی‌گرم بر لیتر) باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* نسبت به تیمار شاهد (۱۶ و ۵ درصد) شد. هم‌چنین غلظت ۴۰ کیتوزان نیز باعث افزایش معنی‌دار (۱۴ درصد) بیان ژن *UGT85C2* شد. تیمار متیل جاسمونات ۲۰ باعث بیش‌ترین میزان بیان ژن KO شد که به نسبت تیمار شاهد ۱۳ درصد افزایش داشت. هم‌چنین بیان ژن *UGT85C2* تحت غلظت ۲۰ متیل جاسمونات نیز افزایش معنی‌داری نشان داد. طبق نتایج مشخص شد که افزایش غلظت الیسیتورهای کیتوزان و متیل جاسمونات (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویول اثر منفی داشته و باعث کاهش بیان ژن شدند. عصاره مخمر در غلظت ۴۰ باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* شد که به نسبت تیمار شاهد به‌ترتیب ۱۱ و ۵ درصد افزایش بیان نشان دادند. به‌نظر می‌رسد که غلظت ۴۰ نسبت به غلظت‌های ۲۰ و ۸۰ عصاره مخمر تأثیر بهتری در افزایش بیان داشته است. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که الیسیتورهای کیتوزان و متیل جاسمونات در غلظت‌های پایین و عصاره مخمر در غلظت متوسط، می‌توانند از طریق تحریک بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول و افزایش میزان ترکیبات شیمیایی در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا تأثیر گذار باشند.

واژه‌های کلیدی

استویا
الیسیتور
بیان ژن
کیتوزان
متیل جاسمونات
گلیکوزیدهای استویول

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به خانواده Asteraceae بوده که امروزه در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می‌شود (Gupta Sharma and Saxena 2015). برگ‌های استویا شیرین کننده‌های قوی بدون کالری مقاوم به حرارت را سنتز کرده که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد فراوانی دارند. در حال حاضر، استویا به خاطر محتوای بالای دی‌ترپن‌های شیرین (حدود ۲۰/٤ درصد) در برگ‌های خشک شده آن، به خوبی شناخته شده‌است. این گیاه منبعی از گلیکوزیدهای دی ترپن[1] شیرین است که عامل مزه شیرین این گیاه هستند (Cacciola et al. 2011; Savita et al. 2004). گلیکوزیدهای استویول[2] در گیاه استویا به‌عنوان جایگزینی برای ساکاروز برای درمان چاقی، دیابت، فشار خون و پیشگیری از پوسیدگی‌های دندانی استفاده می‌شوند (Goyal and Goyal 2010). گلیکوزیدهای استویول همچنین در صنایع غذایی برای شیرین کردن نوشیدنی‌های غیر الکلی، سس سویا، ماست و دیگر محصولات غذایی در ژاپن، کره جنوبی، برزیل، استرالیا، نیوزیلند و بسیاری از کشورهای اتحادیه نظیر فرانسه و آلمان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tadhani et al. 2007).

سنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاهان از طریق مسیر متیل اریتریتول فسفات[3] (MEP) در پلاستیدها آغاز و در سیتوزول به اتمام میرسد. تعداد زیادی از محققان ویژگی و عملکرد ژن‌های مسیر متیل اریتریتول فسفات را شناسایی و کلون کرده‌اند (Brandle and Telmer 2007). در مسیر متیل اریتریتول فسفات موسوم به مسیر بیوسنتز ترپن‌ها، گلیکوزیدهای استویول طی ۱۵ مرحله تولید می‌شوند که در آن ایزوپنتیل دی فسفات به همراه دی متیل آلیل پیروفسفات در ابتدای مسیر طی یک سری واکنش‌های اکسید و احیاء و ایزومریزاسیون کائورونیک اسید[4] را بوجود می‌آورد. از طرفی، مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در این گیاه با مسیر سنتز جیبرلین‌ها تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است. این ترکیب توسط کائورونیک اسید هیدروکسیلاز[5] (*KO*) استویول را به‌وجود می‌آورد. استویول نیز توسط گلیکوزیل ترانسفراز- 85C2 (*UGT85C2*) به استویولمونوزید[6] تبدیل شده که خود توسط گلیکوزیل ترانسفراز- UGT استویولبیوزید[7] را به‌وجود می‌آورد. همچنین استویولبیوزید توسط گلیکوزیل ترانسفراز- 74G1 (*UGT74G1*) به استویوزید[8] تبدیل شده و در نهایت استویوزید (ST) نیز توسط گلوکوزیل ترانسفراز- 76G1 (*UGT76G1*) ربودیوزید[9] A (Reb A) را به‌وجود می‌آورد (شکل (شکل ۱). که در واقع ۲ ترکیب انتهایی ST و Reb A به‌عنوان بیش‌ترین و مهم‌ترین ترکیبات گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا محسوب می‌شوند (Modi et al. 2014). مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا با مسیر سنتز جیبرلین‌ها تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است. بنابراین *KO* نقش مهمی را می‌تواند در سنتز و تنظیم گلیکوزیدهای استویول و یا مسیر جیبرلین‌ها ایفا کند (Humphrey et al. 2006). گزارش شده‌است که ارتباط نزدیکی بین افزایش بیان ژن *KO* و در نتیجه افزایش میزان گلیکوزیدهای استویول وجود دارد (Kumar et al. 2012). گلیکوزیل ترانسفرازهای *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* در مسیر انتهایی بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول متعلق به خانواده ۱(GT1) بر اساس طبقه‌بندی CAZy می‌باشند (http://www.cazy.org/fam/GT1.html) که بیش از ۹۱ خانواده مجزا را شامل می‌شوند. گیاهان CAZy زیر مجموعه خانواده ۱ (Family 1) شامل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، سیانوژنیک گلوکوزیدازها و گلکوزینولات‌ها هم‌چنین فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها و دیگر فنیل پروپانوئیدها می‌باشند. بنابراین، گلیکوزیدهای *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های انتهایی مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول می‌باشند که ST و Reb A را به‌عنوان ۲ ترکیب انتهایی و مهم این مسیر بیوسنتز می‌کنند (Mohamed et al. 2011)

[1] Diterpene glycosides
[2] Steviol Glycoside
[3] Methyl erythritol-4-phosphate
[4] Kaurenoic acid

[5] Kaurenoic acid hydroxylase
[6] Steviolmonoside
[7] Steviolbioside
[8] Stevioside
[9] Rebaudiosides

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

الیسیتورها به‌صورت ترکیباتی زیستی و یا غیر زیستی می‌باشند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می‌توانند باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه شوند (Zhao et al. 2005). الیسیتورهای زیستی شامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشند. الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیبات مشخصی مانند کیتین و کیتوزان و یا مانند قارچ‌های همگن و عصاره مخمر مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند (Vasconsuelo and Boland 2007). الیسیتورهای غیر زیستی نیز مانند اشعه ماورا بنفش، نمک و بعضی از ترکیبات شیمیایی با مکانیسم‌های عمل متفاوت مانند جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید به‌منظور افزایش تولید ترکیبات ثانویه مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Matkowski 2008). مطالعات متعددی در رابطه با تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر تحریک ژن‌های درگیر در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه و در نتیجه افزایش میزان آن‌ها صورت گرفته است. کیتوزان با تحریک بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید فنیل آلانین باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه در گیاه ریحان شد (Naderi et al. 2014). از طرفی متیل جاسمونات با افزایش بیان ژن *KAH* در گیاه استویا باعث افزایش ترکیبات انتهایی از گلیکوزیدهای استویول شد (Peynevandi et al. 2014).

گیاه استویا امروزه به‌عنوان یک شیرین کننده طبیعی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، از قند آن در تولید محصولات غذایی شیرین استفاده می‌شود (The European Commission 2011). در کشور ایران به‌دلیل بومی نبودن این گیاه و عدم شناخت کافی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است که پیش‌بینی می‌شود در آینده‌ای نزدیک به‌عنوان یک گیاه استراتژیک جهت تولید محصولات شیرین بدون کالری مورد استفاده قرار گیرد (Peynevandi et al. 2014). بنابراین تولید مواد مؤثره این گیاه به‌عنوان یکی از اهداف مهم در تولید و تکثیر این گیاه محسوب می‌شود. از طرفی، با توجه به تحقیقات انجام گرفته مشخص شده‌است که الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی می‌توانند با تحریک بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار باشند. با توجه به این‌که تاکنون اثر الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر بیان ژن‌های کلیدی و انتهایی در بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا صورت نگرفته است، بنابراین در تحقیق حاضر هدف استفاده از این الیسیتورها جهت بررسی بیان ژن‌های *KO*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* به‌عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از نشاهای گیاهان استویا که در گلدان کشت داده شده بودند استفاده شد. خاک گلدان‌ها حاوی ورمی‌کولیت و پرلیت به نسبت ۱:۲ بود. گیاهان در شرایط یکسان در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان با طول دوره ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی و در دمای روزانه ۲۴ تا ۲۸ و شبانه ۱۶ تا ۱۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Hajihashemi 2017). سطح رطوبت گلخانه بین ۴۰ تا ۶۰ درصد بود. آبیاری به‌صورت یک روز درمیان طوری‌که خاک گلدان‌ها مرطوب باشد صورت گرفت. هم‌چنین از محلول غذایی (PH 6.0) جهت افزایش رشد و استقرار بهتر استفاده شد (Hajihashemi 2017). بعد از ۲ ماه قرار گرفتن در گلخانه گیاهان آماده اعمال تیمار شدند. الیسیتورهای مورد استفاده شامل کیتوزان و عصاره مخمر به‌عنوان الیسیتورهای زیستی و متیل جاسمونات به‌عنوان الیسیتور غیر زیستی بودند که هر کدام در ۳ غلظت ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر هر ۵ روز یک‌بار به‌صورت افشانه برگی بر روی گیاهان به مدت ۱ ماه اعمال شدند. از آب مقطر نیز به‌عنوان تیمار شاهد استفاده شد. بعد از گذشت ۱ ماه، از برگ‌های انتهایی تازه رشد یافته برداشت شد و بلافاصله در ازت مایع توزین و جهت بررسی بیان ژن در یخچال ۸۰- نگه‌داری شد.

استخراج RNA کل از برگ‌های استویا بر اساس پروتکل پیشنهادی از روش CTAB (Majidi et al. 2013) صورت گرفت. کمیت و غلظت RNA کل به‌وسیله نانودراپ (Themo, Wilmington, USA) و کیفیت آن توسط الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد.

حذف ژنومی توسط تیمار با DNase 1 محصول شرکت فرمنتاز (Thermo Scientific) با کد lot: 00516018- Pub

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

NO:MAN0012000 انجام گرفت. با توجه به پروتکل پیشنهادی و محاسبه غلظت RNA، ۱ میکروگرم RNA به یک تیوب جدید که حاوی ۱ میکرولیتر DNase 1 و ۱ میکرولیتر بافر محلول DNase بود اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت انکوبه شدن ۱ میکرولیتر EDTA ۵۰ میلی‌مولار به تیوپ‌های حاوی DNase 1 اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦٥ درجه قرار گرفت. بعد از اتمام این مرحله RNAهای تیمار شده آماده سنتز cDNA شدند. سنتز cDNA با استفاده از کیت Hyperscript ™ RT master mix شرکت GeneAll و پرایمر Oligo dT انجام گرفت. به این‌صورت که بر اساس غلظت RNA، ابتدا ۲ میکروگرم از RNA کل به همراه ۵۰ میکرومولار Oligo dT به تیوپ ۰/۲ اضافه کرده و با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله بر روی یخ سرد شد. بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از محلول RT master mix به تیوپ اضافه و به آرامی اسپین شد. سپس به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ۵۵ درجه و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه قرار گرفت. بعد از اتمام این مرحله بلافاصله بر روی یخ سرد شد. کمیت سنجی cDNAهای ساخته شده با استفاده از دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ به روش طیف‌سنجی انجام شد. پس از طیف‌سنجی به‌منظور همسان‌سازی غلظت cDNAهای تولید شده، رقیق‌سازی cDNAها با آب‌مقطر به غلظت تقریبی ۵۰۰ ng/µl صورت گرفت و غلظت نهایی توسط نانودراپ تایید شد.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در RT-qPCR و ژن‌های مرجع

ژن Gene	توالی آغازگرها Primer sequence	طول قطعه PCR Length of PCR produc	کد دسترسی Accession number
KO	F: 5′ CAGAGAAGATTACAGAAGAACA 3′ (22 mer) R: 5′ TGGAATTATAGGAACTGGACTA 3′ (22 mer)	۹۸	AY364317
UGT85C2	F: 5′ CAATGGCTACAACTGAGAAG 3′ (20 mer) R: 5′ ACGAAGGTTATCTGGAGTC 3′ (19 mer)	۱۲٤	AY345978
UGT74G1	F: 5′ CTTGGTCTCAGATGTTGTT 3′ (19 mer) R: 5′ CCACTCTATTACCTCTTCCT 3′ (20 mer)	۱۰۱	AY345982
UGT76G1	F: 5’ GTTATGGTGGATGAAGAAG 3’ (19 mer) R: 5’ GAGACTCTAATGATTCGTAAG 3’ (21 mer)	۱۱۲	AY345974
EL	F: 5′ CTGCTGTAACAAGATGGAT 3′ (19 mer) R: 5′ CCGACCTTCTTCAAGTATG 3′ (19 mer)	۹٦	AY157315.1
بتا اکتین *B-actin*	F: 5′ GAAGCGTTATCATCATCTACTC 3′ (22 mer) R: 5′ GACCATTCCAGTTCCATTG 3′ (19 mer)	۱۰۸	AF548026

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

طراحی پرایمرهای اختصاصی *KO*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* و همچنین ژن *EL*[1] به‌عنوان ژن مرجع (House-keeping gene) با استفاده از نرم‌افزارهای AlleleID 7 و PrimerPriemier 5 صورت گرفت، همچنین بررسی و تایید پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار آنلاین OligoAnalyzer 3.1 انجام گرفت.

تکثیر ژن‌های هدف و مرجع به‌منظور اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس پروتکل پیشنهادی کیت 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (شرکت Solis BioDyne، استونی) صورت گرفت. تعین کمیت نسبی در Real time PCR به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ (Eva Green) با استفاده از دستگاه (RG-6000 Corbett Research) انجام شد.

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های هدف و مرجع با استفاده از Real time PCR یکسان و شامل: ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه جهت فعال‌سازی ابتدایی آنزیم طی ٤٠ سیکل، سپس ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه به منظور واسرشت شدن، ۵۳ درجه به مدت ۲۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه جهت طویل شدن بود. پیک انحصاری برای هر ژن منحنی ذوب از ۵۰ تا ۹۹ درجه در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش به‌دست آمد. برای هر نمونه ۳ تکرار تکنیکی و ۲ تکرار بیولوژیکی وجود داشت که عموما تفاوت آن‌ها کمتر از ۰/۵ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش qRT-PCR داده‌های خام به‌صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. فراوانی ژن‌های هدف با ژن مرجع برای هر نمونه نرمال‌سازی شد و نسبت به نمونه‌های کنترل گیاهان شاهد بر اساس روش $۲^{-\Delta\Delta CT}$ تنظیم شد (Livak and Schmittgen 2001). آنالیز داده‌های حاصل از نتایج qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار GenEx 5 به‌دست آمد.

آزمایش به‌صورت طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ فزار آماری SAS و آزمون چند دامنه‌ای در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

[1] Elongation Factor

نتایج و بحث

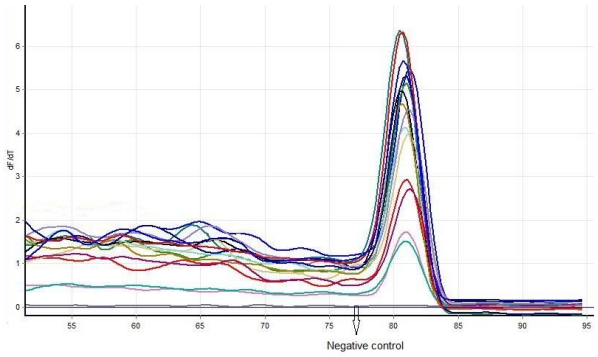
نتایج حاصل از داده‌های qRT-PCR با ژن مرجع *EL* نرمال‌سازی شد. ژن مرجع استفاده شده در این تحقیق به‌عنوان کنترل داخلی، الگوی بیان ژن مشخصی را نشان داد. کنترل منفی استفاده شده هیچ پیکی را تکثیر نکرد که نشان‌دهنده خلوص مناسب نمونه‌ها بود. هم‌چنین برای کلیه نمونه‌ها منحنی ذوب یکسان بود (شکل ۱). الگوی رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول تحت الیسیتورهای مختلف با توجه به CTهای به‌دست آمده از ژن مرجع و ژن هدف و محاسبه آن‌ها متفاوت بود. متیل جاسمونات، کیتین و کیتوزان و عصاره مخمر به‌عنوان تغییر دهنده‌های مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها شناخته شده‌اند (Zeneli et al. 2006). بنابراین درک نقش هر کدام از این الیسیتورها به عنوان فیتوهورمون بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول می‌تواند جذاب باشد.

در این تحقیق مشاهده شد که با افزایش غلظت کیتوزان از ۲۰ به ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بر بیان ژن‌های مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا کاسته شد. بیش‌ترین تأثیر کیتوزان مربوط به غلظت‌های ۲۰ و ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر بود که باعث افزایش بیان ژن *UGT85C2* شد که نسبت به تیمار شاهد به‌ترتیب ١٦ و ١٤ درصد افزایش داشت (شکل ۲). همبستگی معنی‌داری بین بیان *UGT85C2* و میزان انباشت گلیکوزیدهای استویول نشان می‌دهد که آنزیم *UGT85C2*، که یک گلوکز[2] C-13 را به استویول جهت تشکیل استویول مونوساید اضافه می‌کند، باعث محدود شدن سرعت مسیر گلیکولیزه شدن در طی مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول می‌شود (Mohamed et al. 2011). هم‌چنین کیتوزان ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *UGT76G1* (۵ درصد) شد که به نسبت بیان ژن *UGT85C2* کم‌تر بود. با توجه به این‌که افزایش بیان ژن *UGT85C2* باعث کند شدن ادامه مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول می‌شود، کاهش بیان ژن‌های *UGT74G1* و *UGT76G1* به نسبت بیان *UGT85C2* می‌تواند قابل توجیه باشد. از طرفی افزایش غلظت کیتوزان باعث کاهش بیان همه ژن‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر شد که کم‌ترین

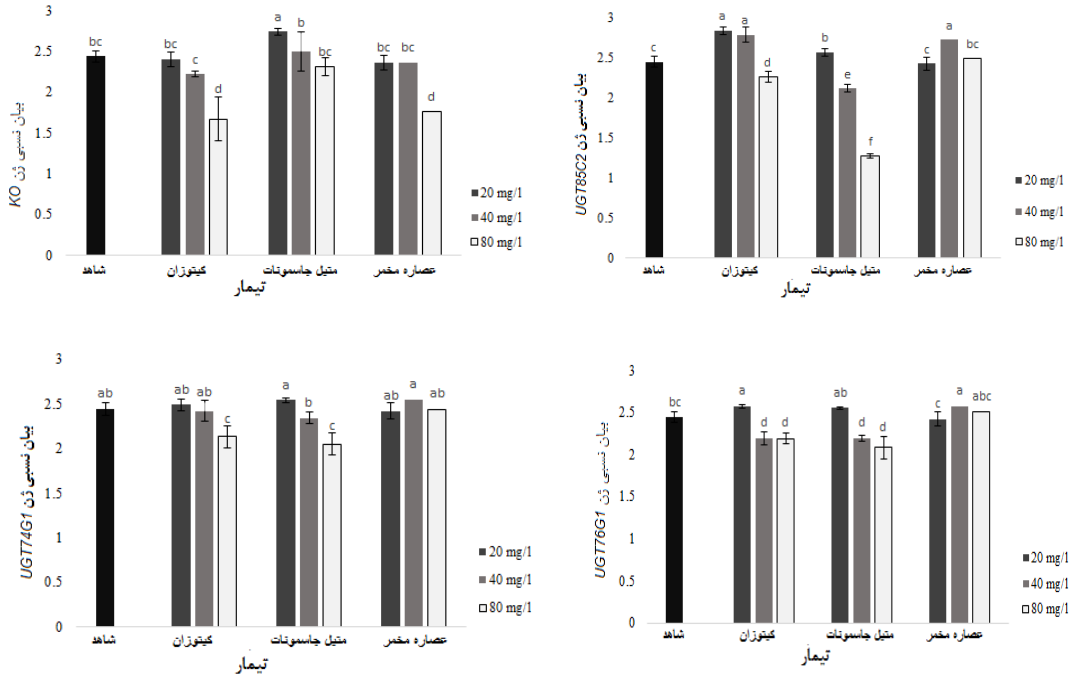
[2] C-13-glucose

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

میزان مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *KO* شد که نسبت به تیمار شاهد ۳۱/۵ درصد کاهش نشان داد. هم‌چنین بیان ژن‌های *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* تحت غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش معنی‌داری داشتند (شکل ۲). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کیتین و کیتوزان در غلظت‌های پایین باعث افزایش میزان ترکیبات ثانویه می‌شود. Naderi et al. (2014) گزارش کردند که کیتوزان باعث افزایش بیان ژن *PAL* در گیاه ریحان شد به‌طوری که این ترکیب می‌تواند به‌عنوان یک الیسیتور کارآمد باعث افزایش بیوسنتز ترکیبات ثانویه مانند متیل چاویکول شود. هم‌چنین در تحقیقی مشخص شد که افزایش میزان گلیکوزید فنیل اتانوئید در ارتباط با افزایش بیان ژن‌های درگیر تحت تأثیر کیتوزان بود (Cheng et al. 2006). در این تحقیق مشخص شد که غلظت‌های ٤٠ و ٨٠ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث کاهش بیان ژن‌های مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول شدند و به نوعی نقش بازدارنده را بر بیان ژن‌های گیاه استویا داشتند که با تحقیق Kumar et al. (2012) مطابقت داشت.



شکل ۱- منحنی ذوب یکسان برای ژن‌های بیان شده. کنترل منفی نشان‌دهنده عدم وجود ناخالصی در ژن‌های بیان شده‌است.



شکل ۲- بیان ژن‌های *ent-KO*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* درگیر در بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا تحت تأثیر الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

بر اساس مطالعات صورت گرفته کیتوزان با فعال کردن مسیرهای بیوسنتزی باعث افزایش بیان ژن می‌شود (Howlett 2006)، اما در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد افزایش غلظت آن و تیمار هر ۵ روز یک‌بار بر روی گیاهان اثر عکس داشته و باعث کاهش بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویول شده‌است. از طرفی، غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به‌عنوان یک الیسیتور زیستی عمل کرده و باعث افزایش بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول شد. اگرچه تاکنون سازروکار عمل کیتوزان روی رشد ناشناخته باقی‌مانده است (Cheng et al. 2006) با این حال احتمالا کیتوزان سیگنالی را برای سنتز هورمون‌های گیاهی مانند جیبرلین القا می‌کند و رشد و نمو گیاه را توسط بعضی مسیرهای سیگنالینگ مربوط به بیوسنتز اکسین، از طریق مسیر وابسته به تریپتوفان، افزایش می‌دهد (Cheng et al. 2006). بنابراین کاهش بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویول تحت غلظت‌های بالای کیتوزان، می‌تواند با افزایش بیان ژن‌های مسیر جیبرلین‌ها همراه بوده و درنتیجه نقش بازدارنده را بر مسیر گلیکوزیدهای استویول داشته باشد. در واقع افزایش غلظت کیتوزان باعث مسدود شدن مسیر تولید گیکوزیدهای استویول و در نتیجه کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های درگیر شده‌است که در تحقیق حاضر به وضوح کاهش بیان ژن را با افزایش غلظت کیتوزان نشان می‌دهد. از طرفی غلظت پایین کیتوزان به مانند یک هورمون تنظیم کننده رشد عمل کرده که با القا بیان ژن‌های مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول، می‌تواند باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه نیز شود.

تیمار متیل جاسمونات ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث بیش‌ترین میزان بیان ژن *KO* شد که به نسبت تیمار شاهد ۱۳ درصد افزایش داشت. هم‌چنین بیان ژن *UGT85C2* تحت غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات نیز افزایش معنی‌داری نشان داد، به‌طوری که نسبت به تیمار شاهد ۵ درصد افزایش نشان داد (شکل ۲). پژوهش‌های مختلف در رابطه با تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر MEP انجام گرفته است که باعث افزایش و یا کاهش بیان ژن شده‌است. Goklany et al. (2009) در تحقیقی بیان کردند که متیل جاسمونات می‌تواند باعث افزایش تجمع اندول آلکالوئیدها با تنظیم ژن‌های درگیر در مسیر مونوترپن‌ها در سلول‌های گیاه پروانش[1] شود. هم‌چنین افزایش میزان ترپنوئیدها در آوند چوبی ساقه‌های درختان صنوبر که تحت تأثیر متیل جاسمونات بودند گزارش شده‌است (Zeneli et al. 2006). Peynevandi et al. (2014) بیان کردند که غلظت‌های پایین متیل جاسمونات باعث فعال شدن مسیر گلیکوزیدهای استویول شد به‌طوری که باعث افزایش بیان ژن کائورونیک هیدروکسیلاز[2] به عنوان پیش‌ساز ژن *KO* شد. همچنین مشخص کردند که متیل جاسمونات باعث افزایش میزان استویوزید و ریبودیوزید A به‌عنوان دو ترکیب انتهایی مسیر گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا شده است. با توجه به تحقیقات صورت گرفته مشخص شد که غلظت‌های پایین متیل جاسمونات به فعال شدن ژن *KAH* به‌عنوان پیش‌ساز ژن *KO* و در نتیجه افزایش بیان آن کمک می‌کند. همچنین با توجه به اینکه *KO* به‌عنوان یک دوراهی عمل کرده که ادامه مسیر آن از یک طرف به مسیر گلیکوزیدهای استویول و از طرف دیگر به مسیر جیبرلین‌ها منتهی می‌شود (Humphrey et al. 2006)، افزایش بیان آن ممکن است باعث افزایش یا کاهش گلیکوزیدهای استویول شده و از طرف دیگر میزان جیبرلین‌ها را نیز تغییر دهد (Kumar et al. 2012) که با تحقیقات Lucho et al. (2018) مشابه است. آن‌ها بیان کردند که متیل جاسمونات بر اساس غلظت و زمان مورد استفاده می‌تواند باعث افزایش یا کاهش بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا شود که در تحقیق مذکور نشان داده شد که این الیسیتور در غلظت پایین باعث افزایش بیان ژن *KO* شد در صورتی‌که بیان ژن‌های *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* کاهش داشتند که دلیل این امر را افزایش در بیان ژن‌های مسیر جیبرلین‌ها عنوان کردند. Hajihameshi et al. (2013) در پژوهشی عنوان کردند که جیبرلیک اسید به تنهایی باعث افزایش بیان ژن *KO* شد، در حالی‌که تأثیری بر بیان ژن‌های *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* نداشت. که با توجه به اینکه جیبرلیک اسید تأثیری بر بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویول نداشته است می‌توان پیش‌بینی کرد که ژن *KO* باعث فعال شدن مسیر جیبرلین‌ها شده‌است و تأثیری بر مسیر

[1] Catharanthus roseus
[2] KAH-13

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

گلیکوزهای استویول نداشته است. در تحقیق حاضر غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن *KO* شد که با توجه به افزایش بیان ژن *UGT85C2* و عدم کاهش بیان ژن‌های *UGT74G1* و *UGT76G1* می‌توان این غلظت را به‌عنوان یک غلظت مؤثر در سنتز گلیکوزیدهای استویول پیشنهاد داد. از طرفی غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* شد. هم‌چنین غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز باعث کاهش معنی‌دار گلیکوزیل ترانسفرازهای *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* نسبت به تیمار شاهد شد. کم‌ترین میزان بیان ژن تحت تیمار متیل جاسمونات مربوط به ژن *UGT85C2* بود که نسبت به تیمار شاهد ٤٨ درصد کاهش بیان نشان داد (شکل ۲). براساس بسیاری از تحقیقات صورت گرفته، گیاه استویا می‌تواند تحت بسیاری از الیسیتورهای غیر زیستی به رشد خود ادامه داده و افزایش گلیکوزیدهای استویول را در پی داشته باشد. در تحقیقی گزارش شد که غلظت گلیکوزیدهای استویول تحت تیمارهای پلی اتیلن گلایکول (PEG) و NaCl به‌عنوان الیسیتورهای غیر زیستی افزایش یافت (Gupta et al. 2014). در تحقیقی دیگر Pandey and Chikara (2015) به مطالعه اثر NaCl و مانیتول (الیسیتورهای غیر زیستی) بر روی تنش شوری و خشکی در محیط MS بر روی گیاه استویا پرداختند. آن‌ها بیان کردند که تنش شوری و خشکی بیان ژن‌های *KAH*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* را به‌طور معنی‌داری کاهش داد، در حالی‌که مانیتول باعث افزایش بیان ژن شد. گزارش شده که متیل جاسمونات باعث کاهش میزان کلروفیل در گیاه کدوی تخمه کاغذی[1] شده است (Ananieva et al. 2004). بنابراین، باتوجه به اینکه کلروفیل نیز از مسیر MEP جدا می‌شود، کاهش میزان کلروفیل تحت متیل جاسمونات احتمالا از طریق کاهش بیان ژن‌های مسیر MEP می‌باشد. هم‌چنین گزارش شده‌است که تیمارهای پلی اتیلن گلایکول و پاکروبوترازول باعث کاهش هر چهار ژن درگیر در مسیر MEP و در نتیجه کاهش میزان گلیکوزیدهای استویول شدند (Hajihameshi et al. 2013)، که اثر بازدارندگی این تیمارها و عدم القای بیان ژن باعث کاهش بیان و در نتیجه عدم سنتز گلیکوزیدهای استویول نداشته است. در تحقیق حاضر غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن *KO* شد که با توجه به افزایش بیان ژن *UGT85C2* و عدم کاهش بیان ژن‌های *UGT74G1* و *UGT76G1* می‌توان این غلظت را به‌عنوان یک غلظت مؤثر در سنتز گلیکوزیدهای استویول پیشنهاد داد. از طرفی غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* شد. هم‌چنین غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز باعث کاهش معنی‌دار گلیکوزیل ترانسفرازهای *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* نسبت به تیمار شاهد شد. کم‌ترین میزان بیان ژن تحت تیمار متیل جاسمونات مربوط به ژن *UGT85C2* بود که نسبت به تیمار شاهد ٤٨ درصد کاهش بیان نشان داد (شکل ۲). براساس بسیاری از تحقیقات صورت گرفته، گیاه استویا می‌تواند تحت بسیاری از الیسیتورهای غیر زیستی به رشد خود ادامه داده و افزایش گلیکوزیدهای استویول را در پی داشته باشد. در تحقیقی گزارش شد که غلظت گلیکوزیدهای استویول تحت تیمارهای پلی اتیلن گلایکول (PEG) و NaCl به‌عنوان الیسیتورهای غیر زیستی افزایش یافت (Gupta et al. 2014). در تحقیقی دیگر Pandey and Chikara (2015) به مطالعه اثر NaCl و مانیتول (الیسیتورهای غیر زیستی) بر روی تنش شوری و خشکی در محیط MS بر روی گیاه استویا پرداختند. آن‌ها بیان کردند که تنش شوری و خشکی بیان ژن‌های *KAH*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* را به‌طور معنی‌داری کاهش داد، در حالی‌که مانیتول باعث افزایش بیان ژن شد. گزارش شده که متیل جاسمونات باعث کاهش میزان کلروفیل در گیاه کدوی تخمه کاغذی[1] شده است (Ananieva et al. 2004). بنابراین، باتوجه به اینکه کلروفیل نیز از مسیر MEP جدا می‌شود، کاهش میزان کلروفیل تحت متیل جاسمونات احتمالا از طریق کاهش بیان ژن‌های مسیر MEP می‌باشد. هم‌چنین گزارش شده‌است که تیمارهای پلی اتیلن گلایکول و پاکروبوترازول باعث کاهش هر چهار ژن درگیر در مسیر MEP و در نتیجه کاهش میزان گلیکوزیدهای استویول شدند (Hajihameshi et al. 2013)، که اثر بازدارندگی این تیمارها و عدم القای بیان ژن باعث کاهش بیان و در نتیجه عدم سنتز گلیکوزیدهای استویول شدند. Kumar et al. (2012) گزارش کردند که تیمار جیبرلیک اسید به‌عنوان یک فیتوهورمون تأثیری در افزایش بیان ژن *KO* نداشت به‌طوری که نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان نداد، هم‌چنین بیان کردند که متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول نشده‌است که با توجه به اینکه اعمال تیمار متیل جاسمونات در تحقیق مذکور به‌صورت اسپری و به مدت ۲ ساعت بوده است احتمالا تأثیری در افزایش بیان نداشته است. طبق تحقیقات صورت گرفته افزایش یا کاهش بیان ژن *KO* تأثیر مستقیمی در افزایش یا کاهش بیان ژن‌های *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* دارد و می‌توان پیش‌بینی کرد که تفاوت در بیان ژن *KO* باعث تغییراتی در پیش‌سازهای گلیکوزیدهای استویول و در نتیجه میزان آن‌ها می‌شود (Humphrey et al. 2006). بنابراین در این تحقیق نیز کاهش بیان ژن KO در غلظت‌های ٤٠ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات، کاهش بیان ژن‌های دیگر را نیز باعث شده‌است. عصاره مخمر در غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* شد که به نسبت تیمار شاهد به‌ترتیب ۱۱ و ۵ درصد افزایش بیان نشان دادند. ژن *UGT74G1* نیز تحت هر ۳ غلظت عصاره مخمر تأثیر معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد از خود نشان نداد (شکل ۲). Mohamed et al. (2011) گزارش کردند که ژن *UGT85C2* به‌عنوان پیش‌ساز گلوکوزیل ترانسفرازهای *UGT74G1* و *UGT76G1*، می‌تواند نقش کلیدی را در سنتز گلیکوزیدهای استویول ایفا کند، هم‌چنین بیان کردند که افزایش بیان UGT85C2، بیان ژن‌های *UGT74G1* و *UGT76G1* را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد Esmaeili et al. (2018) در تحقیقی اثر غلظت‌های مختلف گلوتامین را بر روی بیان ژن‌های *UGT74G1*، *UGT76G1* و هم‌چنین میزان گلیکوزیدهای استویول را در محیط MS بر روی گیاه استویا بررسی کردند. آن‌ها گزارش دادند که بیان ژن *UGT74G1* تحت غلظت‌های مختلف گلوتامین افزایش نشان نداد در حالی که بیان *UGT76G1* تحت غلظت ۳۰ گرم بر لیتر گلوتامین بیش‌ترین افزایش را نشان داد. همچنین غلظت ۳۰ و ۲۰ گرم بر لیتر گلوتامین باعث بیش‌ترین میزان استویوزید و

[1] d*Cucurbita pepo*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

ریبودیوزید A (به ترتیب) شد که نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار بود. عصاره مخمر به‌عنوان یک الیسیتور شناخته شده (Naoumkina et al. 2007) باعث فعال شدن نوعی مکانیسم دفاعی در گیاهان شده و ژن‌های خاص مربوط به آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌نماید. پیشنهاد شده‌است که احتمالا غلظت‌های بالای این محرک از طریق گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی مکانیزم تحریک را راه‌اندازی می‌کند (Savitha et al. 2006). در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد که غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر نسبت به غلظت‌های ٢٠ و ٨٠ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر بیش‌تری بر گلیکوزیل ترانسفرازهای استویول داشته است. ژن *KO* تحت غلظت‌های ٢٠ و ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان نداد در حالی که غلظت ٨٠ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش معنی‌دار آن شد. با توجه به نقش *KO* و حضور آن در ابتدای مسیرهای گلیکوزیدهای استویول و جیبرلین‌ها، عدم معنی‌داری آن منجر به عدم معنی‌داری بیان ژن UGT74G1 شده‌است. از طرفی بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* افزایش یافته است، که احتمال دارد افزایش این ٢ ژن به کاهش بیان ژن‌های مسیر جیبرلین‌ها انجامیده باشد. Arastefar et al. (2013) در پژوهشی عنوان داشتند که غلظت‌های بالا عصاره مخمر بر بیان ژن *IFS* و سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های سویا تأثیر معنی‌داری داشته به‌طوری که با افزایش زمان از ٨ به ١٦ ساعت سطح بیان به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که عصاره مخمر به‌عنوان یک الیسیتور زیستی در گیاهان می‌تواند بر روی مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها و گلیکوزیدها تأثیر گذارد (Naoumkina et al. 2007). در این تحقیق نیز به‌نظر می‌رسد که عصاره مخمر با تحریک گیرنده‌های سطح غشا پلاسمایی و فعال کردن مکانیسم دفاعی گیاه باعث افزایش بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT76G1* شده‌است و در نتیجه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالا افزایش بیان ژن‌های مذکور به‌عنوان ژن‌های کلیدی، باعث افزایش میزان گلیکوزیدهای استویول نیز شده‌است.

با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که ژن‌های *KO* و *UGT85C2* همبستگی بیش‌تری نسبت به *UGT74G1* و *UGT76G1* داشتند، به‌طوری که به‌عنوان پیش‌ساز عمل کرده و احتمالا افزایش یا کاهش سایر ژن‌ها بر اساس بیان آن‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش تأثیر کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر بیان ژن‌های *KO*، *UGT85C2*، *UGT74G1* و *UGT76G1* در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا را مورد بررسی قرار داد. بر اساس نتایج به‌دست آمده کیتوزان و متیل جاسمونات در غلظت‌های پایین‌تر و عصاره مخمر در غلظت متوسط بیش‌ترین تأثیر را بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول داشتند. غلظت‌های بالای کیتوزان سنتز هورمون‌های مسیر جیبرلین‌ها را افزایش داده بنابراین بیان ژن‌های مسیر جیبرلیک اسید افزایش یافت و به موازات آن سبب کاهش بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویول شدند. هم‌چنین غلظت‌های بالای متیل جاسمونات به‌عنوان یک بازدارنده عمل کرده که کاهش همه ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق را باعث شد. بیش‌ترین تأثیر متیل جاسمونات بر روی ژن *KO* بود که با توجه به نقش آن به‌عنوان یک پیش‌ساز در ابتدای ٢ مسیر بیوسنتزی، احتمالا افزایش بیان ژن‌های مسیر جیبرلین‌ها، کاهش در بیان گلیکوزیل ترانسفرازهای استویول را باعث شد. از طرفی غلظت‌های ٢٠ و ٨٠ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر با کاهش تحریک گیرنده‌های سطح پلاسمایی باعث کاهش بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول شدند که در غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر لیتر عکس این قضیه ثابت شد. بنابراین مشخص شد که الیسیتورهای استفاده شده در غلظت‌های بیشتر و غیر بهینه باعث کاهش بیان ژن‌های مسیر گلیکوزیدهای استویا شده‌اند که طبیعتا کاهش در بیان ژن‌های موردنظر، باعث کاهش میزان گلیکوزیدها و متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا می‌شود. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی استفاده شده در این تحقیق در غلظت‌های مناسب می‌توانند از طریق تحریک بیان ژن‌های درگیر و افزایش میزان ترکیبات شیمیایی در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا تأثیر گذار باشند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

منابع

Ananieva K, Malbeck J, Kamínek M, Van Staden J (2004) Methyl jasmonate downregulates endogenous cytokinin levels in cotyledons *of Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings. Physiologia Plantarum 122: 496- 503.

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. Journal of Agriculture Biotechnology 5: 1- 18. (In Farsi).

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

Cacciola F, Delmonte P, Jaworska K, Dugo P, Mondello L, Rader JI (2011) Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. Journal of Chromatography A 1218: 2012-2018.

Cheng XY, Zhou HY, Cui X, Ni W, Liu CZ (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. Journal of Biotechnology 121:253-260.

Esmaeili F, Ghaheri M, Kahrizi D, Mansouri M, Safavi SM, Ghorbani T, Muhammadi S, Rahmanian E. Vaziri S (2018) Effects of various glutamine concentrations on gene expression and steviol glycosides accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France) 64: 1- 5.

Goklany S, Loring RH, Glick J, Lee-Parsons CW (2009) Assessing the limitations to terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures through gene expression profiling and precursor feeding. Biotechnology Progress 25:1289-1296.

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

Gupta P, Sharma S, Saxena S (2014) Effect of Salts (NaCl and Na- 2CO3) on Callus and Suspension Culture of *Stevia rebaudiana* for Steviol Glycoside Production. Applied Biochemistry Biotechnology 172: 2894-2906

Gupta P, Sharma S, Saxena S (2015) Biomass Yield and Steviol Glycoside Production in Callus and Suspension Culture of *Stevia rebaudiana* Treated with Proline and Polyethylene Glycol. Applied Biochemistry and Biotechnology 176: 863-874.

Hajihashemi S (2017) Physiological, biochemical, antioxidant and growth characterizations of gibberellin and paclobutrazol-treated sweet leaf (*Stevia rebaudiana* B.) herb. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 1-4.

Hajihashemi S, Geuns JM, Ehsanpour AA (2013) Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethylene glycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. Acta Physiologiae Plantarum 35: 2009-2014.

Howlett B (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic Fungi. Curr Opin. in Plant Biol 9:371- 5.

Humphrey TV, Richman AS, Menassa R, Brandle JE (2006) Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. Plant Molecular Biology 61:47-62.

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.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods 25: 402-408.

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 1-15.

Majidi M, Farsi M, Bahrami A, Behravan J, Marashi S (2013) Cloning, Gene Expression Analysis, and Phylogenic Relationship of dbat Gene from Iranian Endemic Yew (*Taxus baccata* L.). Journal of Medicinal Plants 4: 91-103. (In Farsi).

Matkowski A (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review. Biotechnology Advances 26: 548-560.

Modi AR, Raj S, Kanani P, Patel A, Narayanan S (2014) Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with steviol as an immediate precursor. Journal of Plant Growth Regulation 33: 481-488.

Mohamed AA, Ceunen S, Geuns JM, Van den Ende W, De Ley M (2011) UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. Journal of Plant Physiology 168:1136-1141.

Naderi S, Fakheri B, Esmaielzade Bahabadi S, Kamaladini H (2014) Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan. Modern Genetics Journal 3: 259-266. (In Farsi).

Naoumkina M, Farag MA, Sumner LW, Tang Y, Liu CJ, Dixon RA (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:17909-17915.

Pandey M, Chikara SK (2015) Effect of salinity and drought stress on growth parameters, glycoside content and expression level of vital genes in steviol glycosides biosynthesis pathway of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). International Journal of Genetics 7:153- 160.

Peynevandi KM, Sharifi M, Behmanesh M (2014) Effects of methyl jasmonate, on stevioside and rebaudioside A content and expression of the ent-Kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bert. in vitro. Iranian Journal of Plant Biology 21: 99- 110 (In Farsi).

Savita S, Sheela K, Sunanda S, Shankar A, Ramakrishna P (2004) *Stevia rebaudiana*–A functional component for food industry. Journal of Human Ecology 15:261-264.

Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar G (2006) Different biotic and abiotic elicitors

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]

influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biochemistry 41: 50-60.
Tadhani M, Patel V, Subhash R (2007) In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis 20:323-329.
The European Commission (2011) COMMISSION REGULATION (EU) No 1131/2011. Official Journal of the European Union, pp. 205-211.
Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science 172:861-875.
Zeneli G, Krokene P, Christiansen E, Krekling T, Gershenzon J (2006) Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by Ceratocystis polonica, a bark beetle-associated fungus. Tree Physiology 26:977-988.
Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23:283-333.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.8.7]