ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحه ۹۹ - ۸۹

اثر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید بر برخی صفات مورفولوژیکی، بیان ژن کائورنوئیک اسید ۱۳–هیدروکسیلاز و میزان استویول گلیکوزیدها در استویا

The effect of different concentrations of salicylic acid on some of morphological traits, gene expression of Ent-kaurenoic acid 13-hydroxylase and the amount of steviol glycosides in Stevia

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

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

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

1- Phd Student, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Professor, University of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۶)

چکیده

استویا گیاهی با برگ‌های شیرین حاوی استویول گلیکوزیدها (SGها) می‌باشد که به‌عنوان شیرین کننده طبیعی استفاده می‌شود. مطالعات الگوهای بیان ژن در پاسخ به تیمارهای الیسیتوری از اهمیت بسیاری برای اهداف بیوتکنولوژیکی برخوردار است. سالیسیلیک اسید (SA) یک محرک غیرزیستی است که امروزه جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سنتز انحصاری استویول از مسیر ترپنوئیدی کلروپلاست شروع می‌شود و با تولید آن از کائورنوئیک اسید توسط کائورنوئیک اسید هیدروکسیلاز (*KA13H*) منجر به سنتز گلیکوزیدهایی چون استویوزید و ریبودیوزید A می‌شود. در این آزمایش، اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر برخی صفات مورفولوژیک، میزان استویول گلیکوزیدها و نیز مقدار بیان ژن کلیدی *KA13H* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج صفات مورفولوژیک نشان داد که میزان آن‌ها با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، کاهش پیدا می‌کند. داده‌های حاصل از HPLC و بیان ژن حاکی از آن است که استویا در غلظت ۵۰ میکرومولار دارای بالاترین میزان تولید SG و بیان ژن *KA13H* می‌باشد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان ریبودیوزید A در غلظت ۷۵ میکرومولار مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بیش از آن‌که سبب افزایش یک نوع گلیکوزید خاص شود باعث تغییر نسبت بین گلیکوزیدها شده‌است. از طرفی، نتایج نشان‌دهنده تأثیر یک سری مکانیسم‌های پس از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه در این فرآیند است.

واژه‌های کلیدی

استویا
استویول گلیکوزیدها
الیسیتور
سالیسلیک اسید
کائورنوئیک اسید ۱۳–هیدروکسیلاز

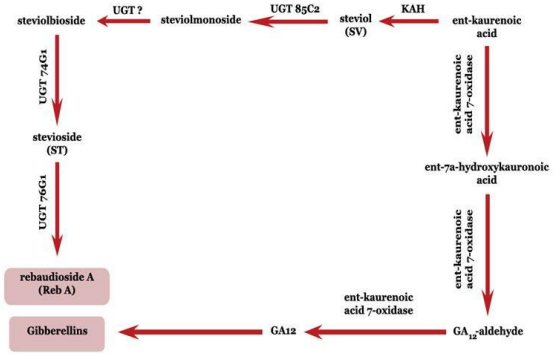
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni که اغلب برگ شیرین نامیده می‌شود عضوی از خانواده Asteraceae است. این گیاه علفی چند ساله کوچک بومی آمریکای جنوبی است و امروزه به فراوانی در بسیاری از کشورها کشت می‌شود (Soejarto 2003). استویا ریبادیانا به‌عنوان یک گیاه مهم تجاری به‌دلیل خواص ضد قند خون بالا، ضد فشار خون بالا و ضد سرطان در درمان‌های پزشکی کاربرد دارد (Dey et al. 2013). هم‌چنین نقش کلیدی در پیشگیری از پوسیدگی دندان، چاقی و مشکلات گوارشی دارد (Liu et al. 2003). شیرین‌کننده‌های بسیار قوی با ارزش بالا در این گیاه، استویول گلیکوزیدها (SG) نامیده می‌شوند مانند ریبودیوزید A – F، دالکوزید A، استویوزید و استویول بیوزید که به‌طور ویژه در برگ‌ها سنتز می‌شوند (Lemus-Mondaca et al. 2012). در میان SGهای مختلف، استویوزید فراوان‌ترین ترکیب شیرین موجود در برگ است که ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از شکر می‌باشد (Singh and Rao 2005; Modi et al. 2014). این خصوصیت شیرین‌کنندگی قوی این ترکیبات و استفاده از آن‌ها به عنوان شیرین‌کننده‌های با پتانسیل بالا آن‌ها را موضوع مهم و مورد علاقه علمی و تجاری قرار داده است (Soejarto 2003). یکی از ویژگی‌های مهم ترکیبات استویول گلیکوزیدها در صنعت نسبت استویوزید به ریبودیوزید A است. به این دلیل که ریبودیوزید A احساس تلخی بعد از مصرف استویوزید را کاهش می‌دهد قند مطلوبتری نسبت به استویوزید است. در مطالعات هدف افزایش نسبت ریبودیوزید A به استویوزید است (Michalec-Warzecha et al. 2016).

استویول گلیکوزیدها مسیر تولید مشترکی با جیبرلیک اسید به عنوان یک ترپنوئید دارند و هر دو از مسیر 2-C-methyl-D-erythrose-4-phosphate (MEP) که در داخل پلاستیدها عمل می‌کند مشتق می‌شوند و در نتیجه این گلیکوزیدها در برگ‌ها و در مقادیر بسیار جزئی در دیگر اندام‌ها سنتز می‌شوند (Bondarev et al. 2003). سنتز SGها منحصرا در سلول‌های مزوفیل برگ‌های استویا رخ می‌دهد و تا ۲۰ درصد وزن خشک برگ‌ها را می‌توانند شامل شوند (Brandle et al. 1998). غلظت استویول گلیکوزیدها ۱۰۰۰۰ برابر بیشتر از جیبرلیک اسید است که نشان‌دهنده تمایل این گیاه به سمت تولید SGها در مسیر MEP است (Brandle and Telmer 2007). در این مسیر همه مراحل تا کائورن در پلاستیدها، یکی از دو مرحله اکسیداسیون روی سطح شبکه آندوپلاسمی رخ می‌دهد و گلیکوزیلاسیون در سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد (Brandle et al. 2002; Brandle and Telmer 2007). آنزیم‌های P450 سیتوکروم گیاهی به دلیل توانایی آن‌ها در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مختلف با خواص بیولوژیکی در بیوتکنولوژی مهم‌اند. کائورنوئیک اسید یکی از دی‌ترپن‌های مطالعه شده با دامنه وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیک است (Villa-Ruano et al. 2015). بیوسنتز استویول از بیوسنتز جیبرلین با هیدروکسیلاسیون آنزیم کلیدی کائورنوئیک اسید ۱۳– هیدروکسیلاز (*KA13H*) جدا می‌شود (Kundu et al. 2014). این اولین مرحله در سنتز استویول گلیکوزیدها است. این آنزیم از اهمیت قابل توجهی در بیوتکنولوژی برخوردار است. Lucho et al. (2018)، *KA13H* و چند ژن دیگر مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها را ژن‌های پاسخ دهنده به الیسیتور معرفی کردند که می‌تواند به‌طور مؤثری حداقل در سطح نسخه‌برداری تنظیم شود. *KA13H* عضوی از خانواده پروتئینی CYPs است که بر روی غشای ER قرار دارد و گروه هیدروکسیل را در موقعیت کربن ۱۳ اسکلت پیش‌ساز برای سنتز SGهای شناخته شده به نام استویول قرار می‌دهد. در حالی که اضافه شدن یک گروه OH در موقعیت کربن هفتم منجر به سنتز GA12 که به‌عنوان پیش‌سازی برای همه جیبرلین‌ها است می‌شود. پس از تولید استویول توسط *KA13H*، چهار UGT که در سیتوزول قرار دارند طی فرآیند گلیکوزیلاسیون تولید استویول گلیکوزیدها را می‌کنند (Singh et al. 2017) (شکل ۱).



شکل ۱– مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

با توجه به ارزش تجاری استویول گلیکوزیدها، چندین استراتژی بیوتکنولوژیکی برای ایجاد یا بهبود بیوسنتز این متابولیت‌های ثانویه در استویا به‌کار گرفته شده‌است. روش کشت آزمایشگاهی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای مطالعه و نیز بهره‌برداری تجاری از تجمع ترکیبات زیست فعال تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای کنترل شده می‌باشد، چرا که حضور این ترکیبات در گیاهان به شدت وابسته به شرایط کشت و فاکتورهای اقلیمی است. تکنیک‌های کشت آزمایشگاهی برای تکثیر توده‌های کلونال استویا در مقیاس تجاری، از جمله استفاده از بیوراکتورهای بزرگ به‌منظور کاهش هزینه‌های تولید گیاهان استفاده می‌شود (Álvarez-Robles et al. 2016). استفاده از الیسیتورها (هر چیزی با طبیعت فیزیکی یا شیمیایی) به‌عنوان یک روش امیدوارکننده برای افزایش تجمع این ترکیبات کاربرد دارد (Gupta et al. 2014; Álvarez-Robles et al. 2016; Bayraktar et al. 2016; Yoneda et al. 2017). فیتوهورمون‌ها به فراوانی به‌عنوان الیسیتور استفاده می‌شوند. سالیسیلیک اسید (SA) که یک فیتوهورمون فنولیک است به‌دلیل نقش مهم آن در پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها و حشرات به عنوان یک الیسیتور شیمیایی مؤثر به‌کار گرفته می‌شود (Lucho et al. 2018). مکانیسم القائی الیسیتورها عموما به‌دلیل القاء بیان ژن‌های دفاعی و فعال کردن مسیرهای دفاعی مرتبط با متابولیت‌های ثانویه مورد توجه است (Wang et al. 2007). کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه به‌دلیل القاء پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شود (Bayraktar et al. 2016). مثلا در مطالعات تولید تاکسول در *Taxus chinensis* (Wang et al. 2007)، تروپان آلکالوئیدها در *Scopolia parviflora* (Kang et al. 2004) و Jaceosidin و Syringing در *Saussurea medusa* (Yu et al. 2006) نشان داده شده‌است سالیسیلیک اسید بر متابولیسم ثانویه ترپنوئیدها مؤثر است. همچنین سالیسیلیک اسید تجمع تری ترپنوئیدهای جینسنوزین را در جنسینگ و گلیسیرهیزین را در شیرین‌بیان القاء می‌کند (Ali et al. 2006; Shabani et al. 2009). در مطالعه‌ای کاربرد الیسیتور سالیسلیک اسید به میزان ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در محیط کشت، سنتز استویوزید را در مقایسه با گیاهچه‌های تیمار نشده در شرایط آزمایشگاهی افزایش داد (در تیمار ۱۰۰ میکرومولار ۸/۸۹ برابر بیشتر در مقایسه با گیاهان شاهد) (Bayraktar et al. 2016). در بررسی اثر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر محتوای استویوزید در شرایط درون شیشه‌ای استویا، محلول‌پاشی هر دو محرک باعث افزایش معنی‌دار استویوزید در مقایسه با تیمار شاهد شده‌است (Hoseini Hashemzadeh et al. 2013). در تحقیقی دیگر اضافه کردن ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به محیط MS به‌طور موثری استویوزید و ریبودیوزید A را در مقایسه با شاهد افزایش داد و منجر به تولید بیشترین مقدار ریبودیوزید A به‌میزان ۳/٤۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک کالوس شد. که به‌دلیل فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ درگیر در بیوسنتز این استویول گلیکوزیدها عنوان شده است (Golkar et al. 2018). در مطالعه‌ای در شرایط هیدروپونیک تیمار ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید، بیان ژن *KA13H* را در تیمار ۲٤ ساعت کاهش داد اما در زمان‌های بعدی تیمار (٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت) نسبت به شاهد افزایش بیان نشان داد. این تحقیق نشان می‌دهد که *KA13H* و چند ژن دیگر مسیر، ژن‌های واکنش‌دهنده به الیسیتور می‌باشند که می‌توانند به‌طور مؤثری حداقل در سطح نسخه‌برداری تنظیم شوند (Lucho et al. 2018). *KA13H* سرشاخه‌ی بیوسنتز جیبرلین‌ها است که دارای ظرفیت هدایت جریان متابولیکی به سمت بیوسنتز استویول گلیکوزیدها می‌باشد (Humphrey et al. 2006). بنابراین افزایش در رونویسی آن باعث افزایش در تولید استویوزید می‌شود.

Moradi Peyvandi et al. (2014) در مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر بیان ژن *KA13H* افزایش بیان را در ٦ تا ٤۸ ساعت بعد از تیمار مشاهده کردند. آن‌ها همچنین نشان دادند که غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بیش از آنکه سبب افزایش یک نوع گلیکوزید شود باعث تغییر نسبت بین این دو گلیکوزید می‌شود. علاوه بر این چندین آزمایش برای مشخص کردن سطوح نسخه‌برداری ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها انجام شده‌است (Modi et al. 2014; Mandal et al. 2015; Behroozi et al. 2017; Hajihashemi and Genus 2017; Kilam et al. 2017; Yoneda et al. 2017). با این وجود اطلاعات بسیار اندکی در زمینه بیان ژن *KA13H* تحت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

تیمار الیسیتوری سالیسیلیک اسید در شرایط کشت بافت وجود دارد.

هر چند که میزان تولید گلیکوزیدها در گیاه استویا بسیار بالاتر از سایر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دیگر است، با این وجود پایه‌گذاری یک روش مناسب برای تولید بیشتر مقرون به صرفه است و بهره اقتصادی بالایی خواهد داشت. با توجه به استفاده از برخی مواد شیمیایی به‌عنوان الیسیتور برای تولید ترکیبات خاص با ارزش افزوده مورد علاقه در صنعت، هدف از این مطالعه بررسی اثر الیسیتور سالیسیلیک اسید بر روی برخی صفات رشدی گیاه و محتوای استویول گلیکوزیدها و نیز سطح بیان ژن *KA13H* درگیر در مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها در برگ‌های استویا ریبادیانا است.

مواد و روش‌ها

گیاه مادری (*Stevia rebaudiana* Bertoni) از گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واحد کرج تهیه شد. مواد گیاهی قبل از قرار گرفتن در شرایط آزمایشگاهی باید استریل شوند. بنابراین قبل از فرآیند استریلیزاسیون، خاک باقیمانده و بخش‌های مرده و برگ‌های خشک آن حذف شدند. نمونه‌ها با آب روان به مدت ۲۰ دقیقه شسته شده و سپس زیر هود لامینار به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰ درصد و پس به مدت ده دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد شستشو داده شدند. پس از پنج بار شستشو با آب مقطر استریل، جهت حذف عوامل ضد عفونی کننده، نمونه‌ها آماده کشت شدند. بعد از حذف برگ‌ها، ساقه به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری تقسیم شد که هر قطعه دارای دو جوانه جانبی بود. و سپس در محیط MS فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشدی کشت شدند. عمل واکشت نمونه‌ها هر یک ماه یک بار جهت به دست آوردن گیاهان یکپارچه صورت گرفت. محیط کشت مورد استفاده در این آزمایش MS (موراشیگ و اسکوگ) تهیه شده با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود. پس از تنظیم PH محیط روی ۵/۸، ۷ گرم در لیتر آگار به محیط اضافه و در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد تحت فشار ۱۵ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. محلول ذخیره سالیسیلیک اسید با غلظت ۲۰ میلی‌مولار در حلال اتانول ساخته شد و زیر هود لامینار با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ µm استریل و در غلظت‌های مد نظر (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) پس از اتوکلاو به محیط کشت‌ها اضافه شد. ریزنمونه‌های گره استویا در محیط‌های کشت حاوی سطوح متفاوت تیمار سالیسیلیک اسید کشت شدند و در اطاقک رشد در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس تحت فتوپریود ۸ / ۱۶ ساعت به مدت یک ماه نگهداری شدند. سی روز پس از کاشت، اندازه‌گیری‌های مورفولوژیکی شامل تعداد ساقه، طول ساقه، تعداد برگ، ماکزیمم طول و عرض برگ، وزن تر و خشک گیاهچه انجام شد. وزن تر بلافاصله بعد از برداشت و وزن خشک پس از خشک کردن گیاهان در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد. برگ‌ها نیز جهت انجام HPLC جمع‌آوری و خشک شدند.

برای اندازه‌گیری استویول گلیکوزیدها مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ خشک گیاه را در هاون چینی ساییده و مقدار ۲۵ میلی‌لیتر مخلوط ۷ حجم آب و ۳ حجم استونیتریل به آن افزوده و ورتکس شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اولتراسونیک استخراج انجام گرفت و در پایان به مدت چهار دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی به نسبت ۱ به ۱۰ با فاز متحرک HPLC رقیق شد و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ µm جهت آنالیز HPLC مورد استفاده قرار گرفت. در روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا جداسازی بر پایه تفاوت قطبیت ماده مورد جداسازی در دو فاز ساکن و متحرک انجام می‌شود. محلول‌های استاندارد استویوزید و ریبودیوزید (شرکت Sigma، آلمان) برای اندازه‌گیری میزان استویول گلیکوزیدها مورد استفاده قرار گرفتند. فاز ساکن ستون‌های HPLC از جنس فولاد ضدزنگ یا شیشه و فاز متحرک ترکیبی از حلال‌های قطبی (الکل) و غیرقطبی (هیدروکربن) می‌باشد و با تغییر حلال‌های (قطبیت) فاز متحرک، اجزای نمونه از هم جدا می‌شود. پیک هر کدام از دو ماده بر اساس زمان بازداری مشخص و میزان هر یک بر اساس سطح زیر منحنی پیک و با استناد به منحنی استاندارد تعیین شد. در این آزمایش از دستگاه HPLC مدل KNAUER، نوع ستون LICHROSPHER 100 NH2 5µm 25×0.46 cm، مدل پمپ (KNAUER-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

K1001)، مدل دتکتور ((KNAUER-UV 210 nm (K2501)، سرعت جریان 1 ml/min و فاز متحرک آب با درجه HPLC– استونیتریل با درجه HPLC (۸۰/۲۰) استفاده شد.

RNAی کل از بافت برگ کشت‌های سی روزه طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده RNX Plus [Cinna Gene] استخراج شد. کمیت و کیفیت RNAی کل با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. سپس cDNA با استفاده از ۵۰۰ نانوگرم از RNAی کل با استفاده از کیت سنتز cDNAی TAKARA ژاپن بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. سپس با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع *GAPDH*، بر روی cDNAهای ساخته شده واکنش PCR انجام شد. در این واکنش ۱ ماکرولیتر از هر آغازگر، ۱ ماکرولیتر از cDNA و ۷/۵ ماکرولیتر از MasterMix Amplicon استفاده شد و حجم واکنش ۱۵ ماکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه دمایی PCR به این شرح بود: واسرشت اولیه به مدت ده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و بسط ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. بسط نهایی هفت دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. یک ماکرولیتر از cDNAی سنتز شده (با غلظت ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم) به‌عنوان الگو برای Real time PCR استفاده شد. آغازگرها برای ژن کائورنوریک اسید ۱۳– هیدروکسیلاز با توجه به اطلاعات ژنومی موجود در NCBI و *GAPDH* به‌عنوان ژن خانه‌دار برای گیاه استویا با استفاده از نرم‌افزار BatchPrimer3 (http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/) طراحی (Singh et al. 2017) و توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). این پرایمرها از نظر تکثیر اختصاصی ژن‌های مزبور در بانک اطلاعاتی NCBI و به کمک Primer BLAST مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند و عملکرد آن‌ها با PCR نیز بررسی شد. واکنش PCR زمان واقعی در حجم نهایی ۱۵ ماکرولیتر، با استفاده از کیت مستر میکس تاکارا (SYBR Premix Ex Taq II) و دستگاه Real time PCR مدل Rotor-Gene Q و طبق شرایط شرکت سازنده (QIAGEN Hilder, Germany) انجام شد. CDNAی استفاده شده تولید یک CT (چرخه آستانه) می‌کند. فراوانی نسخه‌برداری ژن هدف با استفاده از ژن کنترل طبق روش $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ نرمال شد (Livak and Schmittgen 2001). برای هر تکرار بیولوژیک سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد.

$\Delta\Delta CT$ = (CT of treated sample - CT of reference) - (CT of control sample-CT of reference)

همه آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و پانزده نمونه برای هر تکرار انجام شد. بررسی آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq 0/05$) با نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹) صورت گرفت.

جدول ۱– توالی آغازگرهای استفاده شده ژن *GAPDH* و ژن کائورنوئیک اسید ۱۳– هیدروکسیلاز (*KA13H*)

ژن	توالی آغازگرها	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	کد دسترسی Accession number
KA13H	Forward primer: 5'-CCTTCCATTTGGAGCAGGTA-3'	۱۱۶	DQ398871.3
	Reverse primer: 5'-TTGGATTGTCCCTTTCAAGC-3'		
GAPDH	Forward primer: 5'-CCAGCCTTAGCATCAAAGAT-3'	۹۷	KC508619.1
	Reverse primer: 5'-GCCATTAAGGAGGAATCAGA-3'		

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

نتایج و بحث

گیاه استویا دارای گره‌های دو تایی است. تقریبا سه روز بعد از کشت ریزنمونه‌ها، چون از تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده نشد در تمامی سطوح تیماری بین یک تا دو ساقه از هر ریزنمونه به دست آمد. بیشترین تعداد ساقه مربوط به تیمار ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بود هر چند که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از لحاظ طول ساقه در هر ریزنمونه اختلافات معنی‌داری بین سطوح تیماری مشاهده شد به‌طوری‌که بیشترین طول ساقه مربوط به سطح ۲۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید و کمترین آن مربوط به سطح ۱۰۰ میکرومولار آن بود. اگرچه از نظر تعداد برگ اختلاف معنی‌داری بین سطوح تیماری وجود نداشت، با این حال بیشترین تعداد برگ در گروه شاهد و کمترین آن در گروه تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. از نظر صفت طول و عرض برگ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها مشاهده شد بیشترین مقدار مشاهده شده مربوط به شاهد و کمترین آن مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار بود. وزن تر و خشک اندام هوایی نیز با افزایش میزان سالیسیلیک اسید کاهش یافت که در واقع کاهش وزن به دلیل ایجاد ساقه‌های کوتاه با ابعاد کوچکتر برگ است. این اختلافات در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین مقدار وزن تر و خشک در سطح شاهد و کمترین آن مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بود (جداول ۲ و ۳). نتایج نشان دهنده اثر منفی سالیسیلیک اسید در غلظت‌های بالاتر بر صفات رشدی گیاه استویا است.

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر صفات رشدی گیاه استویا نشان داده شده است که میزان صفات رشدی در تیمار شاهد بیشترین مقدار و در تیمار ۲۰۰ میکرومولار کمترین مقدار بوده است و با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید مورد استفاده به تدریج رشد کاهش یافته است (Bayraktar et al. 2016). همچنین پژوهش Hoseini Hashemzadeh et al. 2013 نشان داده است غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر گیاه استویا تفاوت معنی‌داری را در تعداد شاخساره ایجاد نکرده است. سالیسیلیک اسید نقش مهمی در دفاع بر ضد حملات میکروب‌ها و گیاهخواران، و بر ضد تنش‌های غیر زنده مانند زخم‌ها و در معرض قرارگیری ازن دارد. بنابراین در بسیاری از موارد از آن به عنوان الیسیتور در کشت‌های درون شیشه استفاده می‌شود (Muffler et al. 2011). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که الیسیتور سالیسیلیک اسید روی تولید SG کل تاثیر چندانی نداشته است و باعث افزایش بسیار اندک آن شده است.

با افزایش میزان سالیسیلیک اسید تا غلظت ۵۰ میکرومولار میزان SG کل افزایش یافته و بعد از آن شروع به کاهش می‌کند، به طوری‌که در ۱۰۰ میکرومولار میزان SG کل تقریبا برابر با شاهد می‌شود. یعنی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید میزان SG روند کاهشی پیدا می‌کند.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف تیمار سالیسیلیک اسید بر صفات مورفولوژیکی مورد بررسی استویا

منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد ساقه	طول ساقه	تعداد برگ در گیاهچه	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)
غلظت	٤	۰/۰۰۷^{ns}	۹/۸۷**	۱۰/۲۷ ^{ns}	۰/۱۷*	۰/۰۷*	۰/۰۲**	۰/۰۰۱**
خطا	۱۰	۰/۰۳	۱/۲۱	۳۹/٤۷	۰/۰٤	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)		۸/۹۱	۱۵/۳۳	۲٦/۳۲	۱۱/۹۷	۲۰/٤	۵/۲۳	۸/۹۷

* و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

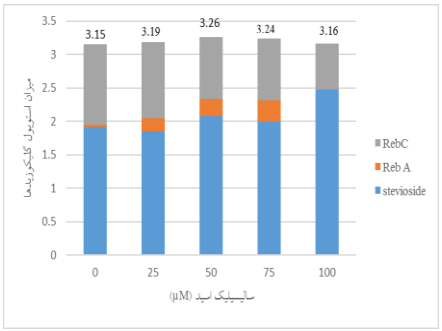
جدول ۳- اثر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید روی صفات مورفولوژیک بعد از ٤ هفته از اعمال

غلظت سالیسیلیک اسید (µM)	تعداد ساقه	طول ساقه (cm)	تعداد برگ در گیاهچه	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)
شاهد	۱/۸۹ ± ۰/۱۱^{a}	۸/۵۸ ± ۱/۰۸^{ab}	۲٦ ± ۰/۰۷^{a}	۲/۰۳ ± ۰/۱^{a}	۰/۹۲ ± ۰/۰۱^{a}	۰/٤۷ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۰۷ ± ۰/۰۰^{a}
۲۵	۱/۸۹ ± ۰/۱۱^{a}	۹/٤۳ ± ۰/۸^{a}	۲۵/۳ ± ۳/۷۱ ^{ab}	۱/۸٦ ± ۰/۱۹^{ab}	۰/۷۸ ± ۰/۱۳ ^{ab}	۰/۳٦ ± ۰/۰۰^{b}	۰/۰۳۹ ± ۰/۰۰ ^{b}
۵۰	۱/۸۹ ± ۰/۱۱^{a}	۷/۰٦ ± ۰/٤^{bc}	۲۳/۳ ± ٤/٦۷^{b}	۱/٦۷ ± ۰/۰۲^{abc}	۰/۷ ± ۰/۰۵^{ab}	۰/۳۲ ± ۰/۰۰^{c}	۰/۰۳۵ ± ۰/۰۰^{bc}
۷۵	۲/۰ ± ۰/۰۰^{a}	۵/٤۷ ± ۰/۱۳^{c}	۲۳/۳ ± ۱/۷٦^{b}	۱/۵۳ ± ۰/۰۷^{bc}	۰/٦۸ ± ۰/۰٤^{ab}	۰/۲۸ ± ۰/۰۰^{d}	۰/۰۲۹ ± ۰/۰۰^{cd}
۱۰۰	۱/۸۹ ± ۰/۱۱^{a}	۵/٤ ± ۰/۱۳^{c}	۲۱/۳ ± ٤/۷^{c}	۱/٤۳ ± ۰/۰۳^{c}	۰/۵ ± ۰/۰۵^{b}	۰/۲٦ ± ۰/۰۱^{d}	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰^{d}

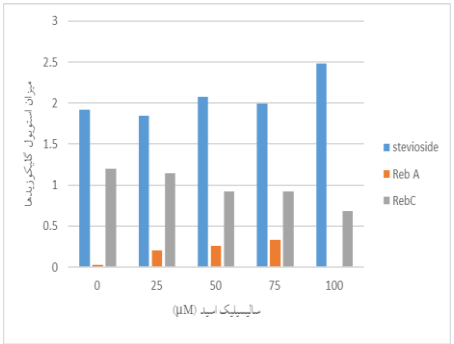
مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، حروف یکسان دارای تفاوت معنی‌دار نیست.

نکته قابل توجه در این نتایج افزایش نسبت ریبودیوزید A به استویوزید با مصرف سالیسیلیک اسید است. این نسبت به تدریج افزایش یافته تا این که در ۷۵ میکرومولار بالاترین نسبت ریبودیوزید A به استویوزید را داشته و بعد از آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار تقریبا هیچ ریبودیوزیدی تولید نشده است. به‌نظر می‌رسد در غلظت‌های بالا، سالیسیلیک اسید اثر ممانعت‌کنندگی بر روی تولید ریبودیوزید A دارد. بیشترین مقدار ریبودیوزید A در تیمار ۷۵ میکرومولار و پس از آن در غلظت ۵۰ و ۲۵ میکرومولار به‌دست آمد. بنابراین می‌توان گفت مناسبترین غلظت برای تولید ریبودیوزید A که بهترین قند در استویا است در اینجا غلظت ۷۵ میکرومولار بوده است همچنین عملکرد کل گلیکوزیدهای استویوزید و ریبودیوزید A و C در تیمارهای ۵۰ و ۷۵ میکرومولار بیشتر از سایرین بود (شکل‌های ۲ و ۳).

در بررسی اثر سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار بر روی گیاه استویا، تیمار سالیسیلیک اسید به میزان بسیاری بر روی تولید استویوزید مؤثر بوده و میزان تولید در غلظت ۵۰ میکرومولار بیشترین مقدار بوده و پس از در غلظت ۱۰۰ میکرومولار استویوزید فراوانی تولید شد. این محققان ریبودیوزید Aای در ترکیبات استویا مشاهده نکردند (Bayraktar et al. 2016). Golkar et al. (2018) در کشت کالوس استویا بالاترین مقدار ریبودیوزید A را در غلظت ۰/۲۵ mg/l سالیسیلیک اسید مشاهده کردند. در مطالعه‌ای تحریک استویا با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید دارای اثر معنی‌داری روی تولید ریبودیوزید A بود و میزان آن با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۳۰ mg/l افزایش پیدا کرده و با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۳۰ mg/l تا ۱۲۰ mg/l کاهش پیدا کرده است (Tahmasi et al. 2017).



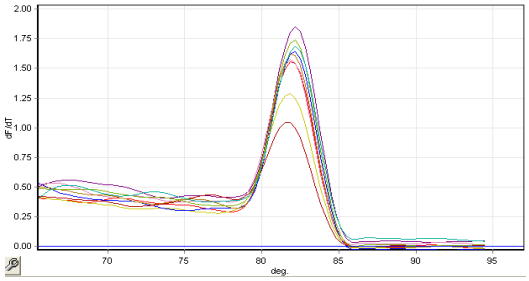
شکل ۲- مجموع میزان بیوسنتز استویول گلیکوزیدها در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در برگ‌های استویا ریبادیانا



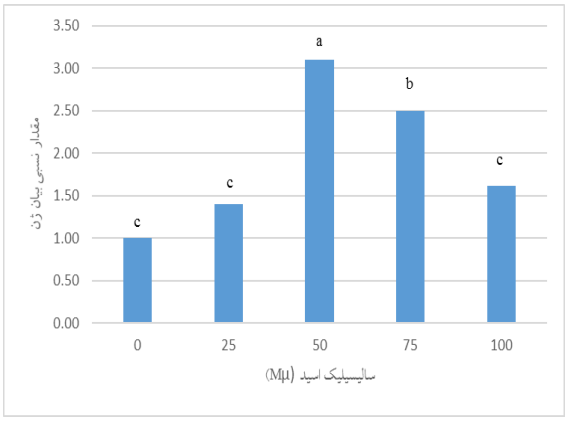
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان استویوزید، ریبودیوزید A و ریبودیوزید C در برگ‌های استویا ریبادیانا

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

برگ‌های استویا ریبادیانا برتونی مقدار زیادی استویول گلیکوزید را در خود انباشته می‌کنند، که غلظت آن‌ها می‌تواند بسیار وابسته به ژنوتیپ، شرایط رشدی و مرحله نموی باشد. برای بررسی بیان ژن *KA13H* از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای این ژن استفاده شد، ژن *GAPDH* نیز به‌عنوان کنترل داخلی برای بررسی مقایسه کمی بیان *KA13H* نسبت به این ژن مورد استفاده قرار گرفت. تمامی شرایط PCR برای این ژن بهینه شده‌است. برای هر مرحله از سه تکرار، استخراج RNA انجام شد و از هر RNA، cDNA سنتز شد و در نهایت RT- PCR انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده با ژن مرجع *GAPDH* نرمال سازی شد. ژن مرجع استفاده شده در این تحقیق به‌عنوان کنترل داخلی، الگوی بیان ثابتی را نشان داد. همچنین برای کلیه نمونه‌ها منحنی ذوب یکسان بود (شکل ٤). غلظت نسبی ژن *KA13H* با p-value ارزیابی شد. الگوی رونویسی ژن *KA13H* تحت سطوح مختلف الیسیتوری با توجه به CTهای به‌دست آمده از ژن مرجع و ژن هدف و محاسبه آن‌ها متفاوت بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بیان ژن *KA13H*، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح یک درصد بود. ژن *KA13H* در غلظت ٥٠ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشترین بیان را در مقایسه با تیمار شاهد داشت و پس از آن در غلظت ٧٥ میکرومولار بیشترین بیان مشاهده شد. بین سطوح تیماری صفر، ٢٥ و ١٠٠ میکرومولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٥). بالا بودن مقدار استویول گلیکوزیدها در غلظت ٥٠ و ٧٥ میکرومولار همسو با بالا بودن میزان بیان ژن *KA13H* در این غلظت نسبت به سایر سطوح است. سالیسیلیک اسید احتمالا باعث افزایش بیان ژن *KA13H* در غلظت‌های ٥٠ و ٧٥ میکرومولار و نیز افزایش تبدیل استویوزید به ریبودیوزید A شده‌است در غلظت ٧٥ میکرومولار میزان بیان و استویول گلیکوزیدها کمی کاهش یافته با این حال میزان تبدیل به ریبودیوزید A بیشتر است. در غلظت ١٠٠ میکرومولار بیان نسبت به شاهد بیشتر شده که باعث افزایش بسیار اندکی در میزان استویول گلیکوزیدها شده‌است. در این سطح استویول گلیکوزیدها بیشتر به شکل استویوزیدند و میزان کمتری از آن تبدیل به ریبودیوزید C شده‌است ریبودیوزید A در این سطح مشاهده نشد. در نتیجه افزایش غلظت سالیسیلیک اسید اثر ممانعت کنندگی بر تبدیل استویوزید به ریبودیوزید دارد. Lucho et al. (2018) در ٢٤ ساعت پس از تیمار استویا با سالیسیلیک اسید تحت شرایط هیدروپونیک کاهش بیان را در *KA13H* مشاهده کردند. نتایج به‌دست آمده می‌تواند به دلیل نقش مؤثر سالیسلیک اسید به‌عنوان یک فعال‌کننده مسیرهای درگیر در سنتز متابولیت ثانویه و آنزیم‌های copalyl diphosphate synthase (and ent-kaurene synthase درگیر در تولید کائورنوئیک اسید (Brandle and Telmer 2007) که پیش‌ساز سنتز ریبودیوزید A است باشد. با این وجود، اثرات الیسیتورها بر تجمع استویول گلیکوزیدها وابسته به نوع و غلظت الیسیتورها، عملکرد فیزیولوژیکی آن‌ها روی مسیر درگیر در سنتز گلیکوزیدها و مدت زمان پس از تحریک می‌باشد. به عنوان مثال، محتوای SGها به هنگام کاربرد تنش‌های شوری (Gupta et al. 2014) و خشکی (Hajihashemi and Geuns 2017) به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا می‌کند.



شکل ٤- منحنی ذوب برای ژن *KA13H*



شکل ٥- تغییرات مقدار نسبی بیان ژن *KA13H* در برگ‌های استویا تحت تیمار سالیسیلیک اسید

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

با این‌که میزان بیان ژن *KA13H* در بین سطوح الیسیتوری به طور معنی‌داری متفاوت است ولی تفاوت معنی‌داری در میزان استویول گلیکوزیدها مشاهده نشد. به عبارتی ژن *KA13H* پاسخ‌های متفاوتی به سطوح تیمار سالیسیلیک اسید نشان داد بنابراین ممکن است الیسیتور استفاده شده تاثیر مستقیمی روی سطح بیان این ژن نداشته باشد. معمولا افزایش سطوح رونویسی یک ژن به افزایش در میزان متابولیت‌های ثانویه سنتز شده از طریق آن مسیر بیوسنتزی خاص منجر می‌شود (Modi and others 2014). ولی در اینجا افزایش معنی‌داری در میزان استویول گلیکوزیدها نسبت به تیمار شاهد وجود ندارد. این ممکن است به دلیل مکانیسم‌های پیچیده‌ای ایجاد شود که نه تنها در سطح رونویسی قابل ایجاد هستند، بلکه همچنین شامل تغییرات پس از رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه نیز می‌شوند. همچنین وجود میکرو RNAهای تنظیمی ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتزی ممکن است باعث تفاوت در بیان شوند. Saifi et al. (2015) برای اولین بار میکرو RNAهای ژن‌های هدف مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها را در استویا ریبادیانا شناسایی کردند. با این حال به‌نظر می‌رسد سالیسیلیک اسید بیش از آن‌که باعث افزایش میزان استیووزید کل شود نسبت بین این استویول گلیکوزیدها را تغییر می‌دهد. تقاضای روزافزون برای منابع شیرین‌کننده طبیعی با کالری پایین، همراه با اختلاف نظر درباره استفاده از برخی شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند سیکلامات، آسپارتام و... توسعه استراتژی‌هایی برای افزایش تولید SG در گیاه استویا را افزایش می‌دهد. برای برداشتن اولین گام در بهینه‌سازی تولید SGها، آنالیز نسخه‌برداری ژن‌های مهم مسیر بیوسنتزی SGها دارای اهمیت اساسی است. نتایج به‌دست آمده ژن‌های هدف را برای مطالعات آینده در مهندسی متابولیک تعیین خواهد کرد. در این مطالعه تغییرات محتوای SGها و سطح رونویسی ژن کلیدی *KA13H* تحت سطوح متفاوت تیمار سالیسیلیک اسید مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به نتایج بررسی بیان ژن، مشخص شد که ژن *KA13H* تحت تاثیر سالیسیلیک اسید قرار می‌گیرد. بیان این ژن در تیمار ۵۰ میکرومولار و پس از آن در ۷۵ میکرومولار بیشترین مقدار بود. از طرف دیگر میزان استویول گلیکوزیدها نیز در این دو سطح بیشتر از سایر سطوح است. هر چند که این اختلاف معنی‌دار نبود ولی از نتایج به‌دست آمده مشخص است که غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بیش از آنکه سبب افزایش استویول گلیکوزیدها شود نسبت این دو گلیکوزید را تغییر می‌دهد. در واقع هر چه از مقدار یک گلیکوزید کم می‌شود بر مقدار دیگری افزوده می‌شود. این نتیجه با مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها مطابقت دارد. در این مسیر ابتدا استویوزید تولید و ریبودیوزید A از آن سنتز می‌شود. در حقیقت اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر متابولیت‌های مختلف یک مسیر در این‌جا متفاوت بوده است. از سوی دیگر، احتمال دارد تیمارهایی مانند سالیسیلیک اسید باعث بیان گلیکوزیل ترانسفرازهایی شود که سبب ساخت گلیکوزیدها به یک اندازه می‌شود. با توجه به این نتایج سالیسیلیک اسید می‌تواند در تحقیقات بعدی در جهت افزایش میزان ریبودیوزید A که قند مطلوبتری می‌باشد مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین لازم است میزان جیبرلیک اسید و ژن‌های مسیر بیوسنتزی آن بررسی شود تا نتایج دقیق‌تری به ما ارائه دهد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌تواند به عنوان یک نقشه راه برای مطالعات آینده در مورد افزایش تولید استویوزید و ریبودیوزید A عمل کند. تیمار الیسیتوری برای افزایش مقدار تولید متابولیت در گیاهچه‌های تکثیر یافته درون شیشه استویا ریبادیانا در بیوراکتورها می‌تواند استفاده شود و تولید استویوزید و ریبودیوزید A در غلظت‌های مطلوب می‌تواند تحت شرایط کنترل شده بهینه شود.

بهترین تیمارهای تحریک در این مطالعه ۵۰ و ۷۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بود که می‌توانند برای افزایش نسبت ریبودیوزید A نسبت به استویوزید در کشت‌های درون شیشه استفاده شوند. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که کشت‌های درون شیشه تحریک شده با سالیسیلیک اسید استویا می‌توانند به‌عنوان یک روش پتانسیل برای افزایش نسبت ریبودیوزید A مورد استفاده قرار گیرند. در مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها ژن‌های کد کننده آنزیم‌های *KA13H*، *UGT85C2T*، *UGT74G1* و *UGT76G1* اهمیت بسیاری دارند. همچنین برای بررسی کامل اثر سالیسیلیک اسید لازم است بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی جیبرلیک اسیدها و نیز میزان تغییر در آن‌ها نیز مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

منابع

Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Plant Cell Reports 25:613-620.

Álvarez-Robles MJ, López-Orenes A, Ferrer MA, Calderón AA (2016) Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. Industrial Crops and Products 87:273-279.

Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, Bedir E, 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.

Behroozi P, Baghizadeh A, Saei A, Kharazmi S (2017) Quantitative analysis of uridine diphosphate glycosyltransferase *UGT85C2*, *UGT74G1* and *UGT76G1* genes expression in *Stevia rebaudiana* under different irrigations. Russian Journal of Plant Physiology 64:67-72.

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

Brandle JE, Richman A, Swanson AK, Chapman BP (2002) Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. Plant Molecular Biology 50:613-622.

Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M (1998) *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Canadian Journal of Plant Science 78:527-536.

Bondarev NI, Sukhanova MA, Reshetnyak OV, Nosov AM (2003) Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. Biologia Plantarum 47:261-264.

Dey A, Kundu S, Bandyopadhyay A, Bhattacharjee A (2013) Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Comptes Rendus Biologies 336:17-28.

Golkar P, Moradi M, Garousi GA (2018) Elicitation of Stevia Glycosides Using Salicylic Acid and Silver Nanoparticles Under Callus Culture. Sugar Tech 1-9.

Gupta P, Sharma S, Saxena S (2014) Effect of salts (NaCl and Na_2CO_3) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. Applied Biochemistry and Biotechnology 172:2894-2906.

Hajihashemi S, Geuns JM (2017) Steviol glycosides correlation to genes transcription revealed in gibberellin and paclobutrazol-treated *Stevia rebaudiana*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 26:387-394.

Hoseini Hashemzadeh H, Mohebali poor N, Noorafkan H (2013) Effect of salicylic acid period time and different concentrations on number of shoot and shoot length in *stevia rebaudiana* Bert. Under *in vitro* conditions. 2nd National Conference on New Concepts in Agriculture. Iran, Saveh, Islamic Azad University, Faculty of Agriculture 41-45. (In Farsi).

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.

Jun MZQWZ, Jin YY (2000) Study on the effects of salicylic acid on taxol biosynthesis. Chinese Journal of Biotechnology 4.

Kang YM, Min JY, Moon HS, Karigar CS, Prasad DT, Lee CH, Choi MS (2004) Rapid *in vitro* adventitious shoot propagation of *Scopolia parviflora* through rhizome cultures for enhanced production of tropane alkaloids. Plant Cell Reports 23:128-133.

Kilam D, Saifi M, Abdin MZ, Agnihotri A, Varma A (2017) Endophytic root fungus Piriformospora indica affects transcription of steviol biosynthesis genes and enhances production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. Physiological and Molecular Plant Pathology 97:40-48.

Kundu S, Dey A, Bandyopadhyay A (2014) Stimulation of *in vitro* morphogenesis, antioxidant activity and over expression of kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bertoni by chlorocholine chloride. Acta Physiologiae Plantarum 36:2683-2693.

Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132:1121-1132.

Liu CJ, Huhman D, Sumner LW, Dixon RA (2003) Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome p450 81E enzymes from *Medicago truncatula*. The Plant Journal 36:471-484.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ 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.

Mandal S, Upadhyay S, Singh VP, Kapoor R (2015) Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: a concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. Plant Physiology and Biochemistry 89:100-106.

Michalec-Warzecha Ż, Pistelli L, D'Angiolillo F, Libik-Konieczny M. (2016). Establishment of highly efficient Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation for *Stevia rebaudiana* Bertoni explants. Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica 58:113-118.

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.

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]

Moradi Peynevandi K, 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 6:99-110. (In Farsi).

Muffler K, Leipold D, Scheller MC, Haas C, Steingroewer J, Bley T, Neuhaus HE, Mirata MA, Schrader J, Ulber R (2011) Biotransformation of triterpenes. Process Biochemisrty 46:1-15

Naik PM, Al–Khayri JM (2016) Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through *In Vitro* Culture of Medicinal Plants. In: Shanker AK, Shanker C (eds) Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and future perspectives. InTech, Rijeka; Chapter 10, 247–277.

Saifi M, Nasrullah N, Ahmad MM, Ali A, Khan JA, Abdin MZ (2015) In silico analysis and expression profiling of miRNAs targeting genes of steviol glycosides biosynthetic pathway and their relationship with steviol glycosides content in different tissues of *Stevia rebaudiana*. Plant Physiology and Biochemistry 94:57-64.

Shabani L, Ehsanpour AA, Asghari G, Emami J (2009) Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology 56:621-626.

Singh SD, Rao GP (2005) Stevia: the herbal sugar of 21st century. Sugar Tech 7:17-24.

Singh G, Singh G, Singh P, Parmar R, Paul N, Vashist R, Kumar Swarnkar M, Kumar A, Singh S, Kumar Singh S, Kumar S (2017) Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in *Stevia rebaudiana* Bert. Scientific Reports 7:11835.

Soejarto DD (2003) Ethnobotany of Stevia and *Stevia rebaudiana*. In Stevia (pp. 53-80). CRC Press.

Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Lozoya-Gloria E, Castro-Juárez CJ, Mosso-Gonzalez C, Ramirez-Garcia SA (2015) Cytochrome P450 from plants: platforms for valuable phytopharmaceuticals. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 14:731-742.

Tahmasi S, Garoosi GA, Ahmadi J, Farjaminezhad R (2017) Effect of salicylic acid on stevioside and rebaudioside A production and transcription of biosynthetic genes in *in vitro* culture of *Stevia rebaudiana*. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 6:1-8.

Wang YD, Wu JC, Yuan YJ (2007) Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei. Cell Biology International 31:1179-1183.

Yoneda Y, Nakashima H, Miyasaka J, Ohdoi K, Shimizu H (2017) Impact of blue, red, and far-red light treatments on gene expression and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 137:57-65.

Yu ZZ, Fu CX, Han YS, Li YX, Zhao DX (2006) Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. Biotechnology Letters 28:1027-1031.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.2.1.7]