

تأثیر متیل ژاسمونات بر میزان استویوزید و ربادیوزید A و بیان ژن کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز در گیاه استویا در شیشه

کامران مرادی پینودی^۱، مظفر شریفی^{۱*} و مهرداد بهمنش^۲

^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

گلیکوزیدها شکلی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای تنوع ساختاری وسیعی هستند و در مواردی، در متابولیسم اولیه گیاهان نیز نقش دارند. گلیکوزیدهای استویول که تنها در گیاه استویا تولید می‌شود، به عنوان شیرین کننده طبیعی در صنایع غذایی و دارویی اهمیت ویژه‌ای دارند. سنتز استویول از مسیر ترپنوئیدی کلروپلاستی آغاز شده و با تولید آن از کائورنوئیک اسید توسط کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز به سنتز گلیکوزیدهایی همچون استویوزید و ربادیوزید A منجر می‌شود که گروهی از دی‌ترین‌ها به حساب می‌آیند. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر متیل ژاسمونات بر میزان گلیکوزیدهای استویا بود که با دستگاه HPLC به سنجش دقیق گلیکوزیدها پرداخته شد. بیان ژن کلیدی این مسیر با روش نیمه کمی RT-PCR صورت گرفت. نتایج تیمار متیل ژاسمونات (در غلظت ۲۰ میکرومولار) بر گیاهچه‌های درون شیشه نشان دهنده افزایش گلیکوزیدها بود و بیشترین میزان این ترکیبات ۳ روز پس از تیمار مشاهده شد. تیمار در غلظت‌های بالا (۱۰۰ میکرومولار) بر رشد و تولید گلیکوزیدها در گیاه استویا تأثیر منفی داشت. همچنین، تیمار متیل ژاسمونات سبب افزایش بیان ژن کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز پس از ۶ تا ۴۸ ساعت نیز شد. از آنجا که ژاسمونات‌ها در ایمنی گیاه نقش کلیدی دارند، نتایج نشان می‌دهد که عملکرد این گلیکوزیدها می‌تواند در پاسخ‌های دفاعی به پاتوژن‌های خارجی یا آسیب‌های فیزیکی باشد. همچنین، غلظت‌های مختلف متیل ژاسمونات بیش از آن که سبب افزایش یک نوع گلیکوزید شود باعث تغییر نسبت بین دو گلیکوزید مذکور می‌شود.

واژه‌های کلیدی: استویا، استویوزید، ربادیوزید A، کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز، متیل ژاسمونات

مرکبان (Asteraceae) و از قبیله *Eupatorieae* است

مقدمه

که بومی جنگل‌های پاراگوئه، مکزیک و برزیل است.

استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.) گیاهی از تیره

جیرلین‌ها یا به سوی تولید گلیکوزیدهای شیرین تعیین می‌کنند. کائورنوئیک اسید اکسیداز (KAO) با هیدروکسیله کردن در موقعیت کربن ۷، اسکلت کائورنی را به سمت مسیر بیوسنتزی جیرلین‌ها و کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز با هیدروکسیله کردن در موقعیت ۱۳، اسکلت کائورنی را به سمت تولید استویول هدایت می‌کند. ساخت اسکلت کائورن در کلروپلاست و هیدروکسیله شدن آن توسط آنزیم مستقر بر روی شبکه آندوپلاسمی زبر صورت می‌گیرد. گلیکوزیل ترانسفرازهایی که در سیتوزول مستقر هستند چند قند به استویول اضافه می‌کنند و این گلیکوزیدها توسط ناقل‌های غشای واکوئل وارد آن می‌شوند (Richman *et al.*, 1999).

به غیر از این ناقل‌ها که هنوز شناسایی نشده‌اند، علت ساخت و نقش گلیکوزیدهای استویا با پرش‌های فراوانی روبرو است. گلیکوزیدها ترکیباتی غالباً درشت مولکول و دارای گروه‌های مختلف هستند. این ترکیبات همگی دارای یک یا چند قند روی یک اسکلت مرکزی هستند. این اسکلت مرکزی یک مولکول چربی دوست (لیوفیل) است که روی گروه‌های -SH، -NH₂، -COOH، -OH و C-C آن، قند مونوساکارید قرار می‌گیرد. به دلیل پوشیده شدن این اسکلت توسط قند، گلیکوزیدها در آب حلالیت بالایی دارند و محل ذخیره آنها در سلول، واکوئل است (Bowles *et al.*, 2006).

از آنجا که علت ساخت چنین مولکول پر هزینه‌ای در گیاه استویا روشن نیست، این احتمال می‌رفت که شاید این ترکیبات نقش دفاعی در گیاه داشته باشند که این فرضیه مبنای پژوهش حاضر است. متیل ژاسمونات (MJ) طیف وسیعی از ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

گیاه استویا به عنوان یک شیرین‌کننده خوراکی طبیعی از لحاظ دارویی و اقتصادی مطرح است. گلیکوزیدهای استویا، استویوزید و ربادیوزید A، ۳۵۰ تا ۴۰۰ برابر (از لحاظ وزنی) شیرین‌تر از سوکروز هستند. برای مثال، ۲/۵ گرم از این شیرین‌کننده‌ها معادل یک کیلوگرم شکر توانایی شیرین کردن مایعات را دارد. ربادیوزید A با یک گلوکوز بیشتر از استویوزید ساخته می‌شود. با توجه به بروز روزافزون بیماری‌هایی چون دیابت، چاقی، سکنه‌های قلبی و مغزی این گیاه می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند باشد (Sardesai and Waldshan, 1991). استفاده اصلی از این گیاه در مواد غذایی و به عنوان شیرین‌کننده و قند رژیمی است. قندهای استویا به دلیل این که طبیعی هستند، همانند سایر شیرین‌کننده‌های مصنوعی (مانند سوربیتول، آسپارتام، نتوتام، ساخارین و غیره) عوارض جانبی ندارند. به دلیل تولید بالای این مواد بسیار شیرین در گیاه، استخراج گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A مقرون به صرفه است و بازده بالایی خواهد داشت (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

بر اساس شواهد به دست آمده تاکنون ثابت شده است که بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا از پلاستید شروع شده و در سیتوزول به اتمام می‌رسد. اسکلت اصلی که گلوکز روی آن متصل می‌شود، مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت-کائورن برای سنتز جیرلین است. بنابراین، ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها صورت می‌پذیرد و یک دی‌ترپن است. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای شیرین در این گیاه با مسیر سنتز جیرلین‌ها تا تشکیل کائورنوئیک اسید مشترک است. دو آنزیم، سرنوشت کائورنوئیک اسید را به سوی سنتز

را نوعی سازوکار دفاعی می‌داند (Nanayakkara *et al.*, 1987) و با این رویکرد که احتمالاً تحریک استویا با متیل ژاسمونات می‌تواند سبب افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز گلیکوزیدهای آن شود، این پژوهش به منظور بررسی آثار متیل ژاسمونات بر استویا انجام شد.

مواد و روش‌ها

گیاه استویا به منظور انجام آزمایش از باغ ملی گیاه‌شناسی ایران تهیه شد. به منظور تهیه نمونه گیاهی کافی برای انجام آزمایش‌ها ابتدا از یک پایه سالم گیاه تعدادی قلمه که هر یک دارای دو جوانه بودند تهیه شد و به این ترتیب ضدعفونی گردید: پس از شستشوی سطحی با آب شیر به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد حجمی قرار گرفت؛ سپس، سه بار با آب استریل شستشو داده شد. بعد به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفت پس از آن، سه بار با آب استریل شستشو شد و قلمه‌ها در محیط جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. انشعابات جدید آنها مجدداً در ظروف کشت مناسب و در شرایط استریل در محیط کشت MS تکثیر شدند تا علاوه بر داشتن گیاهان یکدست از تنوع افراد جلوگیری شود. قلمه‌های استویا در محیط بدون هورمون MS ریشه‌دار شدند. هر دو تا سه هفته یکبار عمل تکثیر از طریق قلمه و ریشه‌دار کردن تکرار گردید.

به منظور تیمار، محیط کشت MS مایع که در آن غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار از متیل ژاسمونات (MJ) استفاده شده بود تهیه شد. متیل ژاسمونات از شرکت SAFCT™ (آمریکا) خریداری و غلظت‌های مختلف آن از رقیق کردن استوک اصلی تهیه شد. استوک اصلی در غلظت ۱ میلی‌مولار در اتانول ۷۰

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که متیل ژاسمونات سبب افزایش بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز انواع گلیکوزیدها در گیاهان می‌شود. از آنجا که اغلب گلیکوزیدها در پاسخ به انواع گیاه‌خواران نقش دفاعی دارند و از طرفی آسیب دیدگی‌های غشای سلول سبب تولید ژاسمونات‌ها می‌شود علت این افزایش بیان در ژن‌های گلیکوزیدها قابل توجه است. در مقالات بسیاری به نقش ژاسمونات‌ها در افزایش گلیکوزیدهای گیاهان اذعان شده است (Bodnaryk, 1992, 1994؛ Brader *et al.*, 2001؛ Doughty *et al.*, 1995؛ Mikkelsen *et al.*, 2003؛ Grubb *et al.*, 2004). 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. متیل ژاسمونات می‌تواند تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه را در گیاه نظیر: آلکالوئیدها (Ruiz-May *et al.*, 2009)، لیگنان‌ها (Berim *et al.*, 2005)، تریپنوئیدها و فلاونوئیدها (Mikkelsen *et al.*, 2003؛ Shimizu *et al.*, 2010) افزایش دهد. ژاسمونیک اسید یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد است که بیشتر در پاسخ به صدمات فیزیکی ناشی از حمله گیاه‌خواران و حشرات به گیاه تولید می‌شود. البته این ترکیب در مراحل مختلف گیاه نقش‌های متعدد دیگری نیز دارد. ژاسمونات‌ها سبب بیان ژن‌هایی می‌شوند که در مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها و حشرات دخیل هستند. ژاسمونات‌ها سبب افزایش ذخیره پروتئین در بافت‌های رویشی و سبب کاهش پروتئین‌های فتوسنتزی می‌شوند (Creelman and Mullet, 1997).

یک مطالعه قدیمی، تولید گلیکوزید در گیاه استویا

داشت. شرایط کشت اندام هوایی و برداشت مشابه شرایط ذکر شده در مرحله اول (تعیین غلظت مناسب بین چهار غلظت) بود.

برای اندازه‌گیری میزان ژن تحت تأثیر تیمار متیل ژاسمونات غلظت ۲۰ میکرومولار انتخاب شد و سرشاخه‌ها با همان ترتیب بالا کشت شدند. برداشت‌های این مرحله به ترتیب در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار انجام شد. نمونه‌های گیاهی در هر مرحله در ازت مایع منجمد و به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند.

استخراج و سنجش گلیکوزیدها: استخراج

استویوزید و ربادیوزید A از اندام‌های هوایی گیاهان تیمار شده و شاهد بر اساس روش Kolb و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. ابتدا تمامی اندام هوایی گیاه تیمار شده (خشک) در هاون ساییده شد و با ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد. سپس در حمام آبگرم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس از فیلتر کاغذ صافی برای جداسازی تفاله‌ها استفاده شد. در ادامه برای تغلیظ نمونه‌ها اتانول آنها در هوای آزاد به مدت ۲۴ ساعت تبخیر شد و دوباره در ۵۰۰ میکرولیتر اتانول حل شدند. این نمونه‌های آماده شده به دستگاه HPLC تزریق شدند.

سنجش استویوزید و ربادیوزید A با روش Hearn و Subedi (۲۰۰۹) انجام شد که از دستگاه HPLC (مدل Knauer، آلمان) و از ستون آمین (شرکت Teknokroma، اسپانیا) با طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر ۴/۶ میلی‌متر و با اندازه ذرات ۵ میکرومتر استفاده شد. سرعت جریان حلال ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک، حاوی آب و استونیتریل به ترتیب با نسبت ۲۰:۸۰ بود و آشکارساز (detector) دستگاه از

درصد آماده شد. محیط کشت مایع پس از اتوکلاو در لوله‌های آزمایشی که به همین منظور تهیه شده بود پخش شد. در هر لوله، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد که به همراه متیل ژاسمونات اضافه شده به غلظت‌های مورد نظر رسانده شد. سرشاخه گیاهان کشت شده در محیط MS جامد (گیاهان یک هفته‌ای) بریده شد و در این لوله‌ها قرار گرفت. برای اطمینان از عدم تأثیر اتانول بر متابولیسم گیاه، در هر دو قسمت فیزیولوژی و مولکولی تحقیق حاضر به نمونه‌های شاهد به اندازه حجم محلول متیل ژاسمونات، اتانول اضافه شد. هر سرشاخه گیاه طوری بریده شد که دارای ۶ برگ (۳ جفت برگ) و از لحاظ اندازه و طول یکسان باشند.

تمامی گیاهان کشت شده زیر نور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۲۸۰۰ لوکس (۵۶ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) قرار داده شدند. پس از سه روز گیاهچه‌ها از شیشه‌ها خارج و وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. برای سنجش گلیکوزیدها، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک و وزن آنها اندازه‌گیری شد (Kolb et al., 2001). در بخش فیزیولوژیک مطالعه حاضر تمامی گروه‌ها با سه تکرار انجام شدند.

در مرحله بعد، برای به دست آوردن این که چند روز پس از تیمار متیل ژاسمونات، بیشترین میزان گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A تولید می‌شود، گیاهان تحت تیمار ۲۰ میکرومولار از MJ قرار گرفتند. علت انتخاب این غلظت، اثربخشی و مناسب بودن آن نسبت به غلظت‌های بالاتر (۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بود. زمان‌های در نظر گرفته شده برای برداشت ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز پس از تیمار بود. در هر گروه ۳ تکرار وجود

در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا ساختمان ثانویه احتمالی RNA باز شود. سپس مخلوط شماره ۱ وارد یخ و مخلوط شماره ۲ به آن اضافه شد. در ادامه، برای ساخت cDNA مجموع این دو مخلوط (۲۰ میکرولیتر) به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. الگوی cDNA ساخته شده تا انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰- نگهداری شد. واکنش RT-PCR نیز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل مستر میکس PCR (۲x) ساخت CinnaGen به مقدار ۱۰ میکرولیتر، آغازگر (پرایمر)های بالا و پایین دست [Bioneer] با غلظت ۵ پیکومول، (جدول ۱)، از هر کدام ۰/۸ و آب تزریقی عاری از RNase به مقدار ۷/۴ میکرولیتر و از الگوی cDNA ساخته شده ۱ میکرولیتر بود. آغازگرها (پرایمرها) برای ژن کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز (کد دسترسی: EU722415.1) با توجه به اطلاعات ژنومی موجود در NCBI و اکتین (کد دسترسی: AF548026.1) برای گیاه استویا با نرم افزار Gene Runner طراحی شد. شرایط انجام PCR به این شرح بود: واسرشت سازی اولیه ۲ دقیقه با ۹۴ درجه، واسرشت سازی با ۳۵ سیکل ۴۰ ثانیه در ۹۳ درجه، جفت شدن آغازگرها ۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه و طویل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد.

نوع UV بود و طول موج دستگاه روی ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد. مقدار عصاره استفاده شده در هر تزریق ۴۰ میکرولیتر بود و میزان دو گلیکوزید استویوزید و ربادیوزید A (شرکت Sigma، آلمان) بر اساس سطح زیر منحنی و مقدار استانداردهای تزریق شده به دست آمد. استانداردهای استویوزید و ربادیوزید A در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر به دستگاه تزریق و منحنی استاندارد آنها رسم شد.

سنجش بیان ژن: استخراج RNA مطابق شیوه پیشنهادی شرکت سازنده RNX Plus [CinnaGen] انجام شد. برای تبدیل RNA به cDNA به دو مخلوط نیاز بود. مخلوط شماره ۱ شامل RNA کل استخراج شده از استویا به مقدار ۷ میکرولیتر، بازدارنده ریونوکلئاز در غلظت ۴۰ U/μl به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، Oligo dT در غلظت ۰/۵ μg/μL به اندازه ۱ میکرولیتر و آب DEPC، ۵ میکرولیتر بود (در مجموع، ۱۳/۵ میکرولیتر). مخلوط شماره ۲ شامل بافر PCR (۵x) به مقدار ۴ میکرولیتر، dNTP در غلظت ۲/۵ میلی مولار، ۱ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر بازدارنده ریونوکلئاز (همانند مخلوط شماره ۱) و ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس (reverse transcriptase) در غلظت ۲۰۰ U/μl بود (در مجموع، ۶/۵ میکرولیتر). پس از مشخص شدن غلظت RNA، یک ویال از مخلوط شماره ۱ ساخته و به مدت ۱۰ دقیقه

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده ژن اکتین (ACT) و ژن کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز (KA13H)

اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	توالی	ژن
۵۲۰	Forward primer : 5' GCA GGG ATC CAC GAG ACC ACC 3' Reverse primer: 5' CCC ACC ACT GAG CAC AAT GTT CC 3'	ACT
۴۰۶	Forward primer: 5' ATA TCG AAG ACG AAA GAA GCA TGG 3' Reverse primer : 5' TCT CAT CAG GTA TCA ACA GGT CCC 3'	KA13H

زمان سنجیده شده اختلاف معنی داری با شاهد نداشت (۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک). متیل ژاسمونات تنها درصد این دو نوع گلیکوزید را در غلظت‌های مختلف تغییر داد. در پژوهش حاضر نیز آثار منفی ناشی از غلظت بالای تیمار متیل ژاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) بر رشد و فتوسنتز دیده شد. گیاهان در این غلظت از تیمار زرد رنگ شدند و رشد کمتری داشتند.

نتایج میزان گلیکوزیدهای استویا در زمان‌های

مختلف پس از تیمار متیل ژاسمونات: تغییرات میزان استویوزید و ربادیوزید A در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با ۲۰ میکرومولار از MJ در زمان‌های مختلف پس از تیمار در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در گیاهان شاهد میزان ربادیوزید A در طول زمان تغییرات چندانی نداشته است و بین ۱۰ تا ۱۸ میلی گرم در گرم وزن خشک بوده است. در حالی که در حضور MJ تغییرات معنی‌داری در میزان ربادیوزید A در طول زمان حاصل شد و سه روز پس از آغاز تیمار به بالاترین مقدار رسید (شکل ۳). میزان استویوزید نیز در گیاهان شاهد در زمان‌های مختلف تفاوت چندانی نداشت اما در گیاهان تیمار شده با متیل ژاسمونات در دو و سه روز پس از آغاز تیمار به بیشترین حد خود رسید که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل ۴). اختلافی که بین نمونه‌های شاهد وجود دارد ممکن است به علت آسیب‌های فیزیکی غشا باشد که به تولید ژاسمونیک اسید منجر می‌شود. این آسیب‌ها در حین کار با گیاه اجتناب‌ناپذیر است و ناخواسته توسط ابزارهای مانند پنس یا به علت برش‌های ساقه، صورت می‌گیرد. هرچند در حین آزمایش حداکثر تلاش بر این بود که از این آسیب‌ها که در نتایج، تداخل ایجاد می‌کند (غلظت متیل ژاسمونات را غیر واقعی می‌کند) پرهیز شود.

محصول PCR در ژل ۱ درصد آگاروز با اختلاف پتانسیل ۸۰ تا ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید. در پایان الکتروفورز، باندهای PCR در دستگاه Gel Documentation بررسی شد. برای ارزیابی کمی بیان ژن‌ها، از مقایسه شدت چگالی باندها نسبت به شاهد (اکتین) با نرم‌افزار Image Guage نسخه ۴ استفاده شد.

تحلیل‌های آماری: از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۶

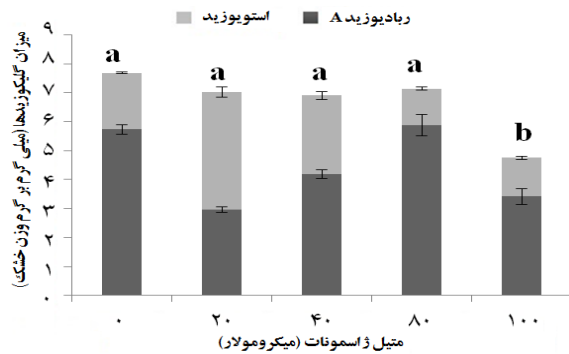
و Excel برای انجام محاسبات آماری استفاده شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آنالیز غیر پارامتری تحلیل شد. برای مشخص کردن معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بین گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney در سطح $P \leq 0/05$ استفاده شد. آزمون آماری گروه‌های مختلف دو نوع گلیکوزید نیز به طور جداگانه انجام شد.

نتایج

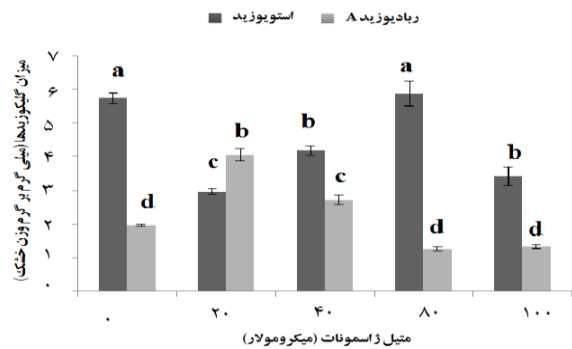
تأثیر غلظت‌های مختلف تیمار متیل ژاسمونات

بر میزان گلیکوزیدهای استویا: همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است در غلظت ۲۰ میکرومولار MJ بیشترین میزان تولید گلیکوزید ربادیوزید A به دست آمد که نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود. اما با افزایش غلظت متیل ژاسمونات مقدار آن به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P \leq 0/05$). میزان استویوزید در نمونه شاهد بیشتر از نمونه‌های تیمار شده بود و با افزایش غلظت MJ، مقدار آن افزایش یافت و در غلظت ۸۰ میکرومولار MJ به بیشترین مقدار، یعنی مشابه شاهد رسید. روند تغییرات مقدار استویوزید و ربادیوزید A در حضور غلظت‌های MJ برعکس یکدیگر بود.

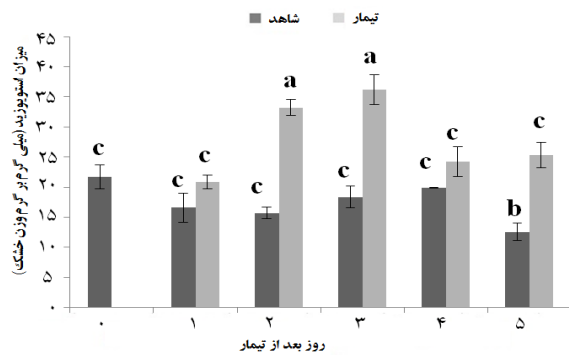
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، میزان گلیکوزید کل در غلظت‌های مختلف MJ در



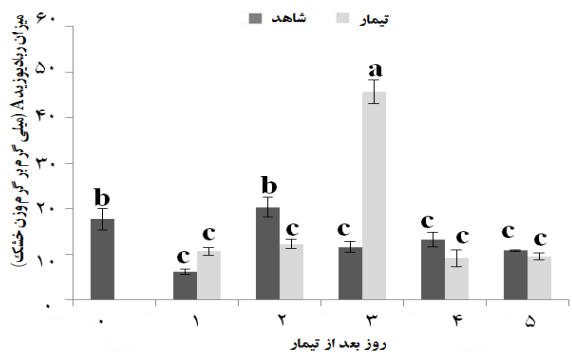
شکل ۲- مجموع میزان بیوسترز گلیکوزیدهای استویزید و ربادیوزید A در غلظت‌های مختلف تیمار متیل ژاسمونات پس از ۳ روز. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در میزان استویزید و ربادیوزید A در هر گروه و در سطح $P \leq 0.05$ است.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیمار متیل ژاسمونات بر میزان استویزید و ربادیوزید A در اندام هوایی پس از ۳ روز. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در میزان استویزید و ربادیوزید A در هر گروه و در سطح $P \leq 0.05$ است.



شکل ۴- میزان قند استویزید در تیمار متیل ژاسمونات در غلظت ۲۰ میکرومولار پس از ۵ روز. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در میزان استویزید در گروه‌ها در سطح $P \leq 0.05$ است.



شکل ۳- میزان قند ربادیوزید A در غلظت ۲۰ میکرومولار متیل ژاسمونات پس از ۵ روز. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در میزان ربادیوزید A در گروه‌ها در سطح $P \leq 0.05$ است.

گلیکوزیدها در روز چهارم و پنجم پس از تیمار به اندازه روزهای اول و دوم بود (شکل ۵).

تأثیر غلظت ۲۰ میکرومولار متیل ژاسمونات بر

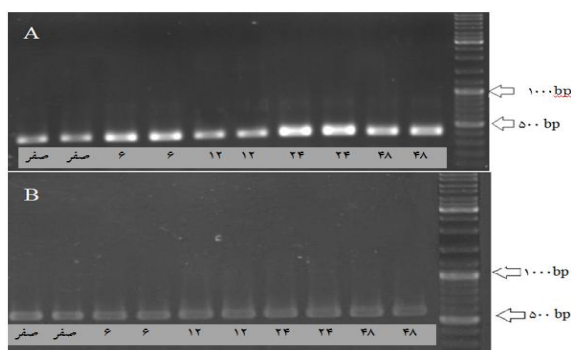
بیان ژن کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز

(*KAI3H*): برای بررسی بیان ژن *KAI3H* از آغاز گره‌های اختصاصی طراحی شده برای این ژن استفاده شد، همچنین از ژن اکتین (*ACT*) به عنوان

نتایج حاصل از بررسی زمان تولید بیشینه گلیکوزیدها نشان داد که هر دو گلیکوزید ۳ روز پس از آغاز تیمار به بیشترین مقدار خود می‌رسند. این افزایش در مورد ربادیوزید A بیشتر از استویزید بود به طوری که میزان افزایش ربادیوزید A در تیمار MJ حدود ۵ برابر شاهد بود. اما MJ سبب افزایش استویزید در حدود ۱/۵ تا ۲ برابر شاهد شد. میزان

رونوشت‌بردار معکوس (reverse transcriptase-PCR) انجام شد. تفاوت در شدت رنگ ژل‌ها به علت میزان رنگ‌پذیری آنها با اتیدیوم بروماید است که توسط نرم‌افزار Image Guag با توجه به شدت رنگ زمینه اصلاح شده است.

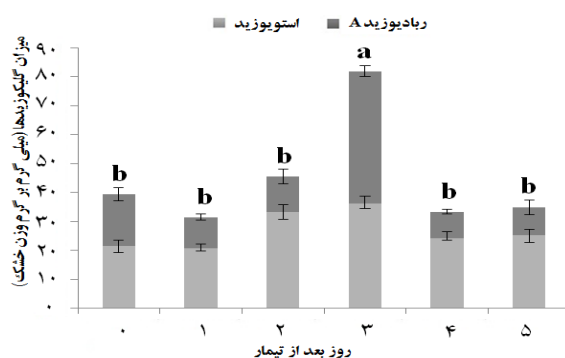
نتایج اندازه‌گیری کمی بیان ژن *KAI3H* و اکتین به طور خلاصه در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج بیانگر آن است که میزان بیان ژن *KAI3H* ۶ ساعت پس از تیمار متیل ژاسمونات، نسبت به شاهد روند افزایشی داشته و تا زمان ۴۸ ساعت بر این روند باقی مانده است.



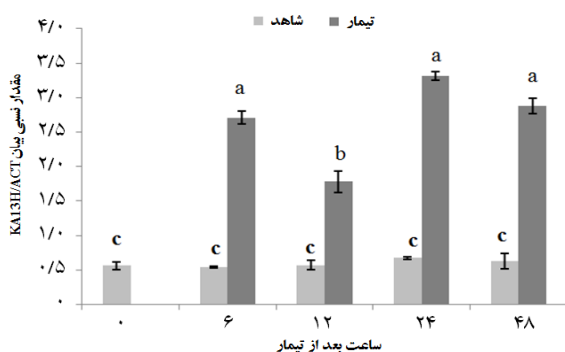
شکل ۶- تغییرات بیان ژن *KAI3H* در اثر تیمار متیل ژاسمونات در طی ۴۸ ساعت. (A) طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن *KAI3H*. هر دو باند مربوط به تکرارهای یک گروه بر اساس ساعات نوشته شده است. (B) ژن اکتین به عنوان شاهد داخلی. منظور از صفر زمان شروع آزمایش است.

شکل ۷- تغییرات مقدار نسبی بیان ژن *KAI3H* در اندام هوایی کشت شده تحت تیمار متیل ژاسمونات نرم‌افزار Image Guag. مقادیر، میانگین ۲ تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار میزان نسبی بیان ژن در گروه‌ها در سطح $P \leq 0.05$ است.

شاهد داخلی برای بررسی مقایسه کمی بیان *KAI3H* نسبت به این ژن مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۶ نتایج تکثیر ژن *KAI3H* و اکتین را بر ژل آگاروز ۱/۵ درصد پس از ۳۵ دور PCR در اندام هوایی استویا نشان می‌دهد. تمامی شرایط PCR (دما، تعداد چرخه PCR و شاهد داخلی) از قبل برای این ژن بهینه شده بود. برای هر مرحله از دو تکرار، استخراج RNA انجام شد و از هر RNA، cDNA سنتز شد و برای هر cDNA به منظور استفاده در سنجش RT-PCR با استفاده از شاهد داخلی اکتین هم‌غلظت‌سازی انجام گرفت. پس از هم‌غلظت‌سازی، PCR نیمه کمی



شکل ۵- میزان گلیکوزید کل (گلیکوزیدهای استویزید و ریادویزید A) در اثر تیمار متیل ژاسمونات طی ۵ روز در غلظت ۲۰ میکرومولار. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار میزان گلیکوزیدها در گروه‌ها در سطح $P \leq 0.05$ است.



بحث

بر اساس پژوهش حاضر، اثر محرک بودن متیل ژاسمونات، در غلظت مؤثر، برای تولید گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A ثابت شد. در زمان ۳ روز پس از تیمار، گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A به بیشترین مقدار خود رسیدند و این در حالی بود که این اثر فقط در غلظت‌های پایین تیمار متیل ژاسمونات وجود داشت. در غلظت‌های بالاتر به وضوح آثار مهاری متیل ژاسمونات بر روی رشد و فتوسنتز دیده شد.

هورمون متیل ژاسمونات در غلظت‌های بالاتر اثر ممانعتی بر روی رشد و تولید دارد. نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف متیل ژاسمونات بر میزان تولید تاکسول در گیاه سرخدار نشان داده است که تیمار ۱۰ میکرومولار از متیل ژاسمونات سبب افزایش تاکسول تا بیش از سه برابر می‌شود در حالی که تولید این ماده در گیاهان شاهد و در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار کمتر بود. بیشترین تولید تاکسول از سلول‌های سرخدار ۷ روز پس از تیمار ذکر شده است (Ketchum *et al.*, 1999).

پژوهش Jung (۲۰۰۴) ثابت کرده است که تیمار متیل ژاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار پس از دو روز متوالی تیمار سبب کاهش میزان کلروفیل شده است. بر اساس تحقیقات Weidhase و همکاران (۱۹۸۷) خیساندن برگ‌های جو در محلول آبی ۴۵ میکرومولار متیل ژاسمونات سبب کاهش سطح کلروفیل و آنزیم روویسکو شد. در پژوهش حاضر نیز در غلظت ۱۰۰ میکرومولار از لحاظ ریخت‌شناسی، کاهش رشد و زرد شدن گیاه به طور محسوسی مشاهده شد.

با توجه به نتایج مولکولی ثابت شد که ژن *KAI3H*

تحت تأثیر متیل ژاسمونات قرار می‌گیرد. افزایش بیان این ژن از ۶ ساعت پس از تیمار آغاز شد و در ۲۴ ساعت پس از تیمار دارای بیشترین بیان بود. از سوی دیگر، تولید گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A پس از ۷۲ ساعت پس از تیمار به بیشینه مقدار خود در بافت گیاه رسید. به نظر می‌رسد پس از ۲۴ ساعت مدت زمانی لازم است تا عملیات پس از رونویسی صورت گیرد. بنابراین از ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از تیمار احتمالاً مدت زمان لازم برای ساخت محصول ژن *KAI3H* است و این فاصله زمانی بین افزایش بیان ژن و تولید گلیکوزید نیز به چند مرحله‌ای بودن تولید گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A مربوط می‌شود. چون این دو گلیکوزید در انتهای مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویا قرار می‌گیرند و انباشتگی آنها پس از افزایش بیان ژن مدت زمانی طول می‌کشد. بنابراین نتیجه حاصل از تیمار متیل ژاسمونات مؤثر بودن آن در غلظت‌های پایین است. در بسیاری از موارد بین بیان ژن تا ترجمه مدت زمانی طول می‌کشد؛ فعال شدن برخی پروتئین‌ها یا آنزیم‌ها نیازمند تغییرات خاصی است و در مواردی بین جایگاه اثر تا پاسخ، فاصله مکانی وجود دارد (Kleinhofs *et al.*, 1989). از آنجا که افزایش گلیکوزیدها در اثر MJ احتمال دفاعی بودن این ترکیبات را قوت می‌بخشد، افزایش ترکیبات دفاعی در کوتاه مدت، گیاه را در مقابل حمله حشرات مصنوعیت می‌بخشد. از طرفی، چون تولید متابولیت‌های ثانویه و به طور کلی آمادگی گیاه برای مقابله و دفاع، از رشد و متابولیسم اولیه می‌کاهد، مسیر پیام‌رسانی MJ پس از علامت‌دهی باید خاموش شود. این نتیجه‌گیری می‌تواند دلیل کاهش گلیکوزیدها در ۴

سنجش ترکیبات مختلف (اعم از پیش‌سازها، ترکیبات حد واسط، متابولیت‌های انتهایی مسیر اصلی و سایر مسیرهای مرتبط) و همچنین ژن‌های مرتبط (نظیر ژن‌های مسیر جیبرلیک اسید، گلیکوزیل ترانسفرازها و سایر ژن‌های پاسخگر به ژاسمونات‌ها) نتایج دقیق‌تر و موثقی‌تری را خواهد داد.

جمع‌بندی

با توجه به نتایج به دست آمده، متیل ژاسمونات اثر فزاینده بر میزان گلیکوزیدهای استویا دارد که دفاعی بودن این ترکیبات را پیشنهاد می‌کند. البته میزان تغییرات در نسبت دو نوع گلیکوزید بیشتر مشهود بود. در صورت استفاده از متیل ژاسمونات در مزارع به جهت افزایش بهره تولید، زمان برداشت آن باید حداکثر تا ۳ روز پس از تیمار لحاظ شود. این گلیکوزیدها نقش‌های احتمالی دیگری نیز دارند که پژوهش‌های بیشتری را می‌طلبد.

سپاسگزاری

نگارندگان از زحمات خانم‌ها احمدیان و فخاری و آقایان دکتر یوسف‌زادی و دکتر رضایی به خاطر مشاوره و راهنمایی کمال تشکر را می‌نمایند.

و ۵ روز پس از تیمار باشد. از طرفی این احتمال وجود دارد که این گلیکوزیدها در گیاه مصرف شده باشد یا قند انتتقالی باشند و MJ سبب افزایش موقتی در محتوای گلیکوزیدی گیاه شود.

با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ این نتیجه به دست می‌آید که غلظت‌های مختلف تیمار متیل ژاسمونات بیش از آن که سبب افزایش گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A 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 گلیکوزیدهای استویول مطابقت دارد. در این مسیر ابتدا استویوزید تولید و ربادیوزید A از استویوزید سنتز می‌شود. بنابراین اگر از میزان استویوزید کم شده باشد به همان مقدار ربادیوزید A سنتز شده است. در واقع، آثار غلظت‌های مختلف MJ بر متابولیت‌های مختلف یک مسیر می‌تواند متفاوت باشد. از سوی دیگر، احتمال دارد تیمارهایی نظیر MJ سبب بیان گلیکوزیل ترانسفرازهایی شود که سبب ساخت گلیکوزیدها به یک اندازه شود. از این داده‌ها به نتیجه مهم دیگری نیز می‌توان رسید که در تیمار با محرک‌هایی همچون متیل ژاسمونات نباید به سنجش یک ترکیب شیمیایی از مسیر مورد مطالعه اکتفا کرد.

منابع

- Berim, A., Spring, O., Conrad, J., Maitrejean, M., Boland, W. and Petersen, M. (2005) Enhancement of lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum* by coronalon, indanoyl-isoleucine and methyl jasmonate. *Planta* 222(5): 769-776.
- Bodnaryk, R. R. (1992) Effects of wounding on glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* 31(8): 2671-2677.
- Bodnaryk, R. P. (1994) Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* 35(2-3): 301-305.
- Bowles, D., Lim, E. K., Poppenberger, B. and Vaistij, F. E. (2006) Glycosyltransferases of lipophilic

- small molecules. *Annual Review of Plant Biology* 57: 567-597.
- Brader, G., Tas, E. and Palva, E. T. (2001) Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology* 126(2): 849-860.
- Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 48: 355-381.
- Doughty, K. J., Kiddle, G. A., Pye, B. J., Wallsgrove, R. M. and Pickett, J. A. (1995) Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. *Phytochemistry* 38(2): 347-350.
- Grubb, C. D., Zipp, B. J., Ludwig-Müller, J., Masuno, M. N., Molinski, T. F. and Abel, S. (2004) *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant Journal* 40(6): 893-908.
- Hearn, L. K. and Subedi, P. P. (2009) Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(2): 165-168.
- Jung, S. (2004) Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(3): 225-231.
- Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M., Croteau, R. B. and Shuler, M. L. (1999) The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnology and Bioengineering* 62(1): 97-105.
- Kleinhofs, A., Warner, R. L., Lawrence, J. M., Melzer, J. M., Jeter, J. M., Kudrna, D. A. Kinghorn, J. R. (1989) Molecular genetics of nitrate reductase in barley. *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* 197-211.
- Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J. and Uliana, R. F. (2001) Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4538-4541.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. and Ah-Hen, K. (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132: 1121-1132.
- Mikkelsen, M. D., Petersen, B. L., Glawischnig, E., Jensen, A. B., Andreasson, E. and Halkier, B. A. (2003) Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiology* 131(1): 298-308.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nanayakkara, N. P. D., Klocke, J. A., Compadre, C. M., Hussain, R. A., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. (1987) Characterization and feeding deterrent effects on the aphid, *Schizaphis graminum*, of some derivatives of the sweet compounds, stevioside and rebaudioside A. *Journal of Natural Products* 50(3): 434-441.
- Richman, A. S., Gijzen, M., Starratt, A. N., Yang, Z. and Brandle, J. E. (1999) Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: Recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant Journal* 19(4): 411-421.
- Ruiz-May, E., Galaz-Ávalos, R. M. and Loyola-Vargas, V. M. (2009) Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl

jasmonate. *Molecular Biotechnology* 41(3): 278-285.

Sardesai, V. M. and Waldshan, T. H. (1991) Natural and synthetic intense sweeteners. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2(5): 236-244.

Shimizu, Y., Maeda, K., Kato, M. and Shimomura, K. (2010) Methyl jasmonate induces anthocyanin accumulation in *Gynura bicolor* cultured roots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 46(5): 460-465.

Weidhase, R. A., Kramell, H. M., Lehmann, J., Liebisch, H. W., Lerbs, W. and Parthier, B. (1987) Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Science* 51(2-3): 177-186.

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*

Kamran Moradi Peynevandi ¹, Mozaffar Sharifi ^{1*} and Mehrdad Behmanesh ²

¹ Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Glycosides are a form of secondary metabolites that consist variety compounds and in some cases can play a role in primary metabolism. Steviol is lipophilic skeleton of Stevioside and Rebaudioside A, two main glycosides of *Stevia rebaudiana*. Steviol glycosides which are synthesized in *S.rebaudiana* have important medical and nutritional values as high intensity natural sweeteners. Steviol is synthesized from Kaurenoic acid in chloroplastic Terpenoid pathway that mediated by Kaurenoic acid 13-hydroxylase. In this study, HPLC method and RT-PCR were performed for quantification of glycosides and gene expression (*ent*-Kaurenoic acid 13-hydroxylase) respectively. Methyl jasmonate treatment (at 20 micromolar) *in vitro* induced glycoside biosynthesis significantly ($P \leq 0.05$) whereas higher concentration of Methyl jasmonate (100 μ M) caused a decrease in glycoside production and growth. The most glycoside content of the plant was three days after treatment. Also Methyl jasmonate treatment caused an increase in *ent*-Kaurenoic 13-hydroxylase gene expression from 6 hours to 48 hours (after treatment) Results showed that biosynthesis of *Stevia* glycosides was probably a defense mechanism against pathogens and herbivore insects. Also we found that different concentrations of Methyl jasmonate, alter the ratio between glycosides rather than the increase in glycoside contents.

Key words: *Stevia rebaudiana*, Stevioside, Rebaudioside A, *ent*-Kaurenoic acid 13-Hydroxylase, Methyl Jasmonate

* Corresponding Author: msharifi@modares.ac.ir