

بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت KH_2PO_4 بر میزان بیان ژن‌های *UGT85C2* و *KO* و برخی خصوصیات بیوشیمیایی گیاه *Stevia rebaudiana bertonii*

منصوره کرمانی^{۱*}، بهاره کریمی^۲، الهام عزیزی^۳، علی معصومی^۴

۱. استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

۳. دانشیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

۴. استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۲۷)

Effect of different concentrations of KH_2PO_4 on the expression of *UGT85C2* and *KO* genes and some biochemical traits of *Stevia Rebaudiana bertonii*

Mansoor Kermani¹, Bahare Karimi^{2*}, Elham Azizi³, Ali Masoumi⁴

1. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payam Noor University, Iran

2. M.Sc. of Plant Breeding, Department of Agriculture, Payam Noor University, Iran

3. Associate Professor, Department of Agriculture, Payam Noor University, Iran

4. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payam Noor University, Iran

(Received: Feb. 11, 2018 - Accepted: Jun. 4, 2018)

Abstract

Stevia rebaudiana bertonii is a natural sweetener that is sweeter than sugar; however, it does not have any calorie and can be used for diabetic patients. The sweet taste of stevia is because of the steviol glycosides (SGs) accumulated in the leaves. Rebaudioside A-F and Stevioside are the main compounds of stevia. *KO* and *UGT85C2* genes are two important genes involved in biosynthesis pathway of steviol and steviolmonoside that are precursors of other SGs. Due to the very low germination rate of stevia seeds, tissue culture is the fastest way for propagation of it. Therefore, optimizing the composition of the culture medium is necessary to increase of pharmaceutical ingredients in stevia. This experiment was conducted to study the effect of different concentrations of KH_2PO_4 (0, 4.25, 8.5, 17, 34 μM) on the expression of *KO* and *UGT85C2* genes using semi-quantitative RT-PCR technique as well as soluble sugar content and antioxidant activity of stevia. Analysis of variance showed a significant difference between the treatments ($p \leq 0.01$) for all measured parameters. Mean comparison using LSD ($p \leq 0.05$) showed that *UGT85C2* and *KO* genes possessed the highest expression level in 4.25 and 17 μM KH_2PO_4 respectively. Also, the stevia showed the highest content of soluble sugars and antioxidant activity in 34 μM KH_2PO_4 . According to our results it seems that total steviol glycosides increased after adding KH_2PO_4 into the culture medium, but its effect on different glycosides was not the same and probably changed the ratio of different SGs in this plant.

Keywords: Antioxidant activity, *KO* gene, *Stevia Rebaudiana*, Soluble sugars, *UGT85C2* gene.

چکیده

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana bertonii* یک شیرین کننده طبیعی است که از قند شیرین تر بوده، با این حال میزان کالری آن صفر می باشد و می تواند برای بیماران دیابتی استفاده شود. شیرینی این گیاه به دلیل گلیکوزیدهای انباشته شده در برگ آن است. ریباودیوساید A تا F و استویوساید ترکیب های اصلی استویا هستند. ژن های *KO* و *UGT85C2* دو ژن مهم در مسیر بیوسنتز استویول و استویول مونوساید هستند که پیش ساز سنتز سایر گلیکوزیدهای استویا می باشند. به دلیل جوانه زنی ضعیف بذر استویا، کشت بافت سریع ترین روش برای تکثیر این گیاه است. بنابراین، بهینه سازی ترکیب محیط کشت غذایی، برای افزایش تولید مواد مؤثره دارویی در گیاه استویا ضروری است. در این مطالعه، تأثیر محیط MS حاوی غلظت های مختلف نمک KH_2PO_4 (0، 4.25، 8.5، 17، 34 μM) بر روی بیان ژن های *KO* و *UGT85C2* به روش RT-PCR نیمه کمی و نیز ظرفیت آنتی اکسیدانی و میزان قندهای محلول گیاه استویا بررسی گردید. نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح 0.01 بود. مقایسه میانگین تیمارها با روش LSD در سطح 0.05 نشان داد که ژن های *UGT85C2* و *KO* به ترتیب در غلظت های 4.25 و 17 میکرومولار KH_2PO_4 بیشترین افزایش بیان را داشتند. همچنین گیاه استویا در غلظت 34 میکرومولار KH_2PO_4 بالاترین میزان قند محلول و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود. به طور کلی با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می رسد که KH_2PO_4 می تواند باعث افزایش تولید کل قندهای استویا بشود اما تأثیر آن بر روی گلیکوزیدهای مختلف، یکسان نیست و احتمالاً نسبت گلیکوزیدهای مختلف در این گیاه را تغییر می دهد.

واژه های کلیدی: استویا، فعالیت آنتی اکسیدانی، قندهای محلول، ژن *KO*، ژن *UGT85C2*.

آنزیم می‌باشد (Yadav and Guleria, 2012). اسکلت اصلی این گلیکوزیدها، مولکول استویول است که ساخت آن از مسیر ترپنوئیدها صورت می‌گیرد و در این مسیر با مسیر بیوستنتر جیبرلین‌ها تا تشکیل کائورنیک اسید مشترک می‌باشد. ژن تشکیل کائورنیک اسید *kaurene oxidase (KO)* یک ژن کلیدی در مسیر تولید کائورنیک اسید بیان شده است (Kumar et al., 2012). دو آنزیم، سرنوشت کائورنیک اسید را به سوی سنتز جیبرلین‌ها یا استویول تعیین می‌کنند. کائورنیک اسید اکسیداز (KAO) اسکلت کائورنیک را به سمت بیوستنتر جیبرلین‌ها برده و کائورنیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز (KAH) باعث تبدیل کائورنیک به استویول می‌شود (Richman et al., 1999). پس از آن آنزیم‌های Uridine Diphosphate-glycosyltransferases (UGTs) وارد مسیر می‌شوند. در گیاه استویا چهار مورد از این آنزیم‌ها موجود است که عبارت‌اند از: UGT74G1، UGT76G1 و UGT85C2. استویول، مولکول پیش‌ساز برای ورود به این زنجیره است که توسط آنزیم UGT85C2 به استویول مونوساید تبدیل می‌شود. سپس آنزیم‌های UGT74G1، UGT76G1 و UGT85C2 به ترتیب وارد زنجیره شده و مولکول‌های استویول بیوساید، استویوساید و ریبادیوساید A (یعنی مهم‌ترین گلیکوزیدهای استویا) را می‌سازند (شکل ۱) (Hanson and White, 1968).

در سال‌های اخیر تکنیک‌های کشت بافت گیاهی به صورت ابزاری بسیار توانمند جهت تکثیر و اصلاح بسیاری از گونه‌های گیاهی ظاهر شده‌اند (Moini and Kahrizi, 2003). به دلیل جوانه‌زنی ضعیف بذر استویا، ریزازدیادی یکی از کارآمدترین روش‌ها برای تکثیر این گیاه در مقیاس صنعتی است. (Luwanska et al., 2015). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که فاکتورهای ژنتیکی، مواد غذایی و شرایط محیطی، مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار روی رشد،

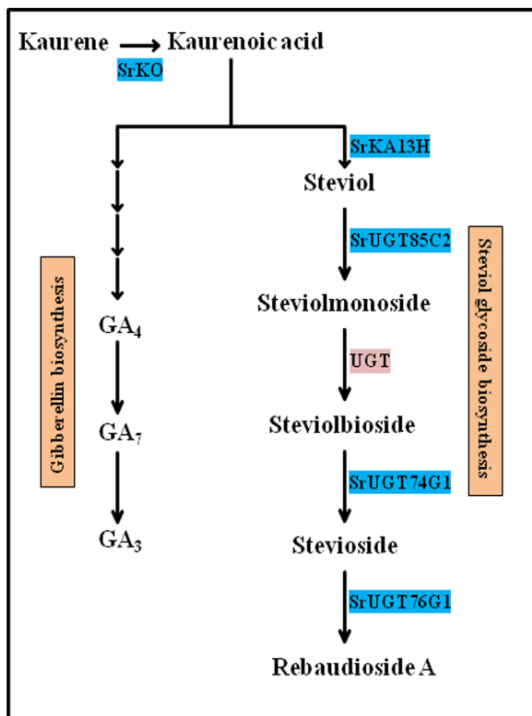
مقدمه

گیاه استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana bertonii* از خانواده Asteraceae، گیاهی علفی، چندساله، کوتاه قد و بومی منطقه کوهستانی آمازی واقع در مرز برزیل و پاراگوئه است (Curry and Ashley, 2008). برگ‌های این گیاه حدود ۳۰۰ بار شیرین‌تر از قند است با این حال میزان کالری گلیکوزیدهای آن صفر می‌باشد. قند استویا برخلاف شکرهای شیمیایی تولید شده که اکثراً اثرات کوتاه‌مدت و بلندمدت سوءای برای سلامت انسان دارند، نه تنها یک ماده کاملاً طبیعی و مفید به لحاظ عاری بودن از انرژی و کالری می‌باشد بلکه به جهت تأثیر مثبتش بر افزایش طعم و بهتر کردن مزه غذا در جهان شناخته شده است (Mohamed et al., 2011).

استویا می‌تواند به عنوان شیرین‌کننده برای بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرد و علاوه بر شیرین‌کنندگی خواص دارویی هم دارد. خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچ و ضد میکروبی، تنظیم‌کننده فشار خون، ضد سرطان، ضد چاقی، جلوگیری کننده از پوسیدگی دندان، برطرف کننده التهابات روده‌ای، تقویت‌کننده حافظه و غیره (Gupta et al., 2013). تاکنون بیش از ۱۰۰ ترکیب شیمیایی در استویا شناخته شده که دی‌ترپنوئیدها از همه مهم‌تر هستند. دی‌ترپنوئیدها دارای فرمول عمومی $C_{20}H_{22}$ هستند که از چهار واحد ایزوپرن تشکیل شده‌اند و به عنوان عامل اصلی ایجاد طعم شیرین در گیاه استویا شناخته شده‌اند. دی‌ترپنوئیدهای مهم در استویا عبارت‌اند از: ریبادیوساید A تا F، استویوساید، استویول، استویوبیوساید و دالکوساید که از این میان، استویوساید (۹/۱٪)، ریبادیوساید A (۳/۸٪)، ریبادیوساید C (۰/۶٪) و دالکوساید (۰/۳٪) بیشترین سهم را در وزن خشک برگ‌های استویا دارا هستند (Brandle et al., 1998).

مسیر بیوستنتر گلیکوزیدهای استویا دارای ۱۶

غلظت ۲۰ میکرومولار می‌تواند میزان بیان ژن *KAH* و نیز محتوای استویوساید و ریبادیوساید A را در گیاه استویا افزایش دهد (Moradi Peyvandi, et al., 2014). در تحقیقی دیگر مشخص شده است که محیط MS حاوی ۴/۲۵ و ۱۷ میکرومولار KH_2PO_4 می‌تواند به ترتیب میزان بیان ژن‌های *UGT74G1* و *UGT76G1* را افزایش دهد. همچنین گیاهان استویای رشد کرده در محیط MS حاوی ۱۷ میکرومولار KH_2PO_4 بالاترین محتوای استویوساید و ریبادیوساید A را داشتند (Kahrizi et al., 2017). در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف نمک KH_2PO_4 در محیط کشت بافت بر روی میزان بیان دو ژن *UGT85C2* و *KO* (دو ژن مهم در مسیر بیوستنز استویول و استویول مونوساید که پیش‌ساز سنتز سایر گلیکوزیدهای استویا می‌باشند) با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی و همچنین بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و میزان قندهای محلول در گیاه استویا مورد مطالعه قرار گرفت.



شکل ۱. مسیر بیوستنزی گلیکوزیدهای استویا (Gluria and Yadav, 2013)

محصول و کیفیت گیاه استویا هستند (Inugraha et al., 2014). بنابراین بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه برای این گیاه، یکی از پیش‌نیازهای ضروری برای تولید انبوه آن از طریق کشت درون شیشه می‌باشد.

عناصر معدنی پرمصرف که در ترکیب محیط کشت غذایی در کشت بافت به کار می‌روند، جزو مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر روی رشد گیاهان می‌باشند. فسفر که در بافت‌های مریستمی و سایر بافت‌های سریع‌الرشد به میزان زیاد یافت می‌شود، یک عنصر ضروری برای فتوسنتز و تنفس بوده و بر روی گسترش ریشه و رشد زایشی مؤثر است (Sathyanarayana, 2007). پتاسیم نیز تقریباً در تمام فرآیندهای متابولیسمی گیاه نقش دارد و وظیفه برقراری پتانسیل اسمزی، فعال کردن آنزیم‌ها (به‌عنوان کوآنزیم)، تثبیت PH، سنتز پروتئین، حرکات روزنه‌ای، انبساط سلولی، فتوسنتز و ... را در گیاه به عهده دارد. نمک KH_2PO_4 یکی از منابع تأمین فسفر و پتاسیم در کشت بافت می‌باشد (Tisdale et al., 1993).

تاکنون گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر مثبت کودهای فسفر و پتاسیم در افزایش عملکرد استویا در شرایط مزرعه (Aladakatti et al., 2012) و نیز بهبود شاخص‌های رشدی استویا در کشت بافت بر اثر افزودن KH_2PO_4 (۸۵ میلی‌گرم بر لیتر) و KNO_3 (۹۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به چاپ رسیده‌اند (Ibrahim et al., 2008). در پژوهشی دیگر، محیط کشت MS حاوی ۳۴ میکرومولار KH_2PO_4 توانست بیشترین تأثیر را روی نرخ رشد، تعداد و طول شاخه‌های جانبی در گیاه استویا بگذارد (Kahrizi et al., 2017).

در برخی تحقیقات به تغییرات میزان بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوستنزی گلیکوزیدهای استویا تحت تأثیر تیمارهای مختلف، پرداخته شده است. به‌طور مثال گزارش شده که تیمار متیل جاسمونات در

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از شاخه‌های گیاه استویا (*Satevia rebaudiana* Bertoni) استفاده شد که از شرکت ایده‌سازان زیستی زاگرس، دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه شدند. ریزنمونه‌های استفاده‌شده در این آزمایش جوانه‌های جانبی بودند که از شاخه‌های گیاه استویا جدا شدند. ریزنمونه‌ها پس از برش و ضدعفونی توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) حاوی ساکارز به نسبت ۳۰ gr/l، آگار به نسبت ۸ gr/l و نمک KH_2PO_4 با غلظت‌های (۰، ۴/۲۵، ۸/۵، ۱۷ و ۳۴ میکرومولار) قرار داده شدند. برای هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر ظرف کشت، پنج ریزنمونه قرار گرفت. نمونه‌ها در دمای $1 \pm 25^\circ\text{C}$ و دوره ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۳۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از ۳۰ روز، گیاهان رشد کرده برای بررسی بیان ژن‌های *UGT85C2* و *KO* و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و میزان قندهای محلول استفاده شدند. این آزمایش در سال ۱۳۹۵ در دانشگاه رازی کرمانشاه اجرا گردید.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه برگ تازه، با استفاده از کیت RNx-plus شرکت سیناکلون بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Nanodrop®, ND-1000, Nanodrop Technologies, and Wilmington, USA) غلظت RNA استخراج شده بر حسب ng/ μl محاسبه و میزان خلوص آن بر حسب (A260/A280) تعیین گردید و در نهایت برای اطمینان از کیفیت، RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

سنجش بیان ژن

در این پژوهش، از واکنش RT-PCR نیمه کمی دو مرحله‌ای برای تعیین میزان بیان ژن‌های *UGT85C2* و *KO* استفاده شد. برای ساخت cDNA تک رشته‌ای از کیت Vivantis two step RT-PCR kit شرکت سیناکلون بر طبق دستورالعمل شرکت استفاده شد. بدین منظور، ۱۰ میکروگرم از نمونه RNA به همراه ۱ میکرولیتر آغازگر oligo dT و ۱ میکرولیتر dNTPs در میکروتیوب ریخته شده و با آب مقطر تیمار شده با DEPC به حجم ۱۱ میکرولیتر رسانیده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای 65°C درجه سانتی‌گراد و سپس ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از آن، ۱۰۰ واحد آنزیم M-Mulv R-transcriptase به همراه ۲ میکرولیتر بافر 10X M-MuLV و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر تیمار شده با DEPC به حجم فوق اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای 42°C درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای 85°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای دو ژن *UGT85C2* و *KO* و ژن *β -Actin* به عنوان استاندارد داخلی، با استفاده از نرم‌افزار Oligo Primer Analysis 7 آغازگر طراحی شد (جدول ۱). جهت انجام واکنش PCR نیمه کمی، ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر (10mM) dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۰/۳۲ میکرولیتر MgCl_2 و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5U/ μL) در میکروتیوب ریخته شده و با آب مقطر دیونیزه nuclease-free به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. برنامه چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت بود: واسرشته‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۷ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشته‌سازی در دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 55°C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط زنجیره در دمای 72°C به مدت ۳۰ ثانیه، و سپس بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۷ دقیقه.

$$\%DPPH_{SC} = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

$\%DPPH_{SC}$ = درصد بازدارندگی

$A_{control}$ = میزان جذب DPPH در شاهد

A_{sample} = میزان جذب DPPH در نمونه

سنجش میزان قندهای محلول

برای سنجش محتوای قند محلول، ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر نمونه‌های خشک شده با ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm دور سانترفیوژ شدند. سپس فاز مایع رویی هر نمونه داخل پتری ریخته شد و پتری‌ها ۱ ساعت در انکوباتور $50^{\circ}C$ قرار داده شدند تا الکل تبخیر گردد. این عمل سه بار تکرار گردید. پس از آن، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به پتری‌ها افزوده شد و محلول به ظرف ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. به منظور حذف رسوبات اضافی، ۵ میلی‌لیتر محلول سولفات روی (۵ درصد) و ۴/۷ میلی‌لیتر محلول محلول هیدروکسید باریم (۰/۳ نرمال) به ظرف افزوده شد. مقدار ۴۵ میلی‌لیتر از هر نمونه برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm دور سانترفیوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره رویی به شیشه درپوش‌دار منتقل شد و در زیر هود ۲ میلی‌لیتر محلول فنل (۵ درصد) به هر نمونه افزوده شد و به شدت تکان داده شد. سپس و به سرعت، ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به هر شیشه اضافه شد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه (بهتر است در تاریکی باشد) و با تثبیت رنگ قهوه‌ای مایل به زرد میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید (Dubios et al., 1956).

محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و بافر 1x TAE تفکیک شد و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه Gel documentation System انجام گردید. کمی‌سازی شدت باندها و تبدیل آنها به داده‌های عددی بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار Total Lab TL120 V2009 (Nonlinear Dynamics Ltd) صورت گرفت و نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن‌های *UGT85C2* و *KO* با تقسیم آنها بر داده‌های بیان ژن β -Actin انجام شد.

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تیمارهای مختلف گیاهی، از طریق خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۲ و ۲) دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) تعیین شد (Molyneux, 2004). برای این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر نمونه‌های خشک‌شده، با ۴۰۰ میکرولیتر استون مطلق مخلوط گردید و پس از گذشت یک روز نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شدند. سپس ۲۵ میکرولیتر از عصاره شفاف رویی به همراه ۶۷۵ میکرولیتر محلول اتانول-DPPH (۸ میلی‌گرم بر لیتر) به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد و پس از قرار دادن نمونه‌ها در تاریکی به مدت نیم ساعت، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید.

برای ترسیم منحنی استاندارد، محلول استاندارد آسکوربات (۰/۰۲ درصد) تهیه شد و از این محلول مقادیر ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵ میکرولیتر برداشته و با محلول DPPH به حجم ۷۰۰ میکرولیتر رسانده شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

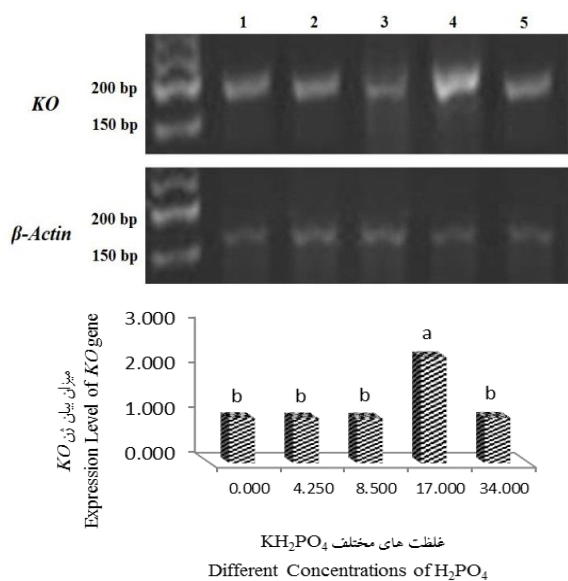
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت باز) (bp)
KO-F	5'-CTTGCTATCGGAAGCACAAA-3'	186
KO-R	5'-ATCTTCTCTGACCCGCAAAC-3'	
UGT85C2-F	5'-TTCCACACGTTTCGATGAGTT-3'	191
UGT85C2-R	5'-TGAAGCCACTGGAAACACTC-3'	
β -Actin-F	5'-TTGCCCTGAGGTTCTGTTC-3'	171
β -Actin-R	5'-ATCCGGTCAGCAATACCAGG-3'	

ژن *UGT85C2* در غلظت ۴/۲۵ میکرومولار KH_2PO_4 بیشترین بیان را در مقایسه با تیمار شاهد داشتند و این درحالی است که در سایر سطوح غلظت KH_2PO_4 تفاوت معنی داری را نسبت به شاهد نشان ندادند (شکل های ۳ و ۴). به عبارت دیگر، بیان این دو ژن روند مشخصی را در غلظت های مختلف KH_2PO_4 نشان نداد.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس بیان ژن *KO* و *UGT85C2*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		ژن <i>KO</i>	ژن <i>UGT85C2</i>
تیمار	4	1.094**	0.665**
خطا	10	0.006	0.063
کل	14		



شکل ۳. اثر غلظت های مختلف KH_2PO_4 بر بیان ژن *KO*. الف) نتایج RT-PCR ژن *KO* روی ژل آگارز ۲٪. ۱) شاهد (MS)، ۲) ۴/۲۵ میکرومولار KH_2PO_4 ، ۳) ۸/۵ میکرومولار KH_2PO_4 ، ۴) ۱۷ میکرومولار KH_2PO_4 ، ۵) ۳۴ میکرومولار KH_2PO_4 . ب) میزان بیان نسبی ژن *KO* (نسبت به ژن β -Actin) در غلظت های مختلف KH_2PO_4 . ستون های حاوی حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ هستند.

تجزیه و تحلیل داده ها

داده های به دست آمده در این آزمایش، بر اساس طرح کاملا تصادفی با سه تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده ها با روش LSD در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت. همچنین نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم شد.

نتایج و بحث

یک ماه پس از کشت ریزنمونه های جوانه جانبی در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف نمک KH_2PO_4 ، گیاهان استویا به حجم و اندازه مطلوب جهت استخراج RNA رسیدند (شکل ۲).



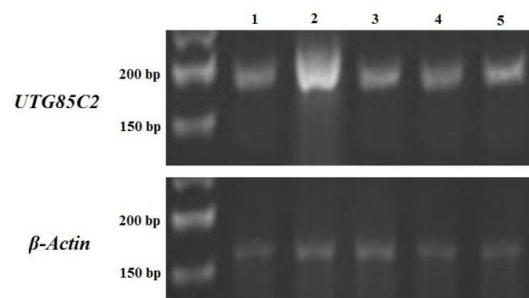
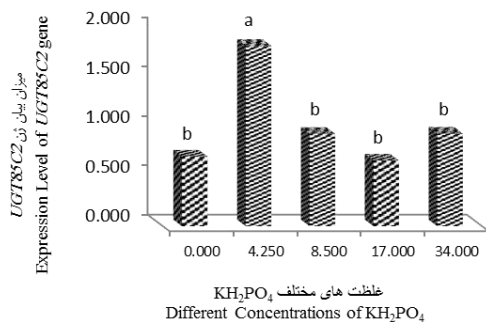
شکل ۲. گیاهان استویا رشد یافته در شرایط درون شیشه ای پس از ۳۰ روز

نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از بیان ژن های *KO* و *UGT85C2*، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۱ بود (جدول ۲). بر اساس نتایج به دست آمده از کمی سازی نتایج بیان ژن ها توسط برنامه Total lab و مقایسه میانگین تیمارها با روش LSD در سطح ۰/۰۵، مشخص شد که ژن *KO* در غلظت ۱۷ میکرومولار KH_2PO_4

A در گیاه استویا گزارش نمودند. بر طبق نتایج آنان، پتاسیم در غلظت 4x بیشترین تأثیر را در افزایش شاخص‌های رشدی و بیومس گیاه استویا داشت در حالی که بالاترین میزان استویوساید و ریبادیوساید A به ترتیب در غلظت‌های 0K و 2x K به دست آمد. همچنین گزارش شده است که برخی تنش‌ها نیز می‌توانند روی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوستنز گلیکوزیدهای استویا و همچنین نسبت این گلیکوزیدها تأثیرهای متفاوتی بگذارند (Karimi et al., 2015). مثلاً عنوان شده که تنش خشکی در حد ۷۵٪ ظرفیت زراعی بر روی بیان ژن‌های *UGT85C2* و *UGT74G1* و نیز محتوای استویوساید اثر افزایشی داشته، در حالی که تنش خشکی در حد ۶۰٪ ظرفیت زراعی میزان بیان ژن *UGT76G1* و محتوای ریبادیوساید A را افزایش داده است (Behroozi et al., 2017). هاشم‌پور و همکاران (۱۳۹۳) نیز با بررسی اثر مانیتول به‌عنوان القاکننده تنش اسمزی در کشت بافت بر بیان ژن‌های *UGT85C2* و *KO* با استفاده از روش RT-PCR گزارش کردند که ژن *UGT85C2* در غلظت ۱ و ۳ درصد مانیتول و ژن *KO* در غلظت ۵ درصد مانیتول بیشترین افزایش بیان را داشتند و بیان این ژن‌ها روند مشخصی را در غلظت‌های مختلف مانیتول نشان ندادند.

نتیجه این پژوهش با نتایج Kahrizi و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت زیادی داشت، چراکه بیشترین بیان برای ژن *UGT74G1* (تبدیل‌کننده استویول بیوساید به استویوساید) را غلظت ۴/۲۵ میکرومولار KH_2PO_4 و بالاترین بیان برای ژن *UGT76G1* (تبدیل‌کننده استویوساید به ریبادیوساید A) را غلظت ۱۷ میکرومولار KH_2PO_4 گزارش نمودند. همچنین آنان بر اساس آزمایش HPLC، بهترین محیط کشت برای تجمع استویوساید و ریبادیوساید A را محیط حاوی ۱۷ میکرومولار KH_2PO_4 معرفی نمودند (Kahrizi et al., 2017) که نتایج حاصل از بیان ژن‌ها در پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. با مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج Kahrizi و همکاران (۲۰۱۷) می‌توان گفت که افزودن KH_2PO_4 در غلظت‌های پائین و متوسط، اثر افزایشی بر بیان ژن‌های مسیر بیوستنزی گلیکوزیدهای استویا دارد، اما تأثیر غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 بر روی بیان این ژن‌ها یکسان نیست و به‌نظر می‌رسد که نسبت گلیکوزیدهای این گیاه را که محصول بیان این ژن‌ها هستند، نیز تغییر خواهد داد.

Fakhrul و همکاران (۲۰۱۴) نیز تأثیر متفاوت غلظت‌های مختلف پتاسیم در محیط MS را بر صفات رشدی و نیز میزان استویوساید و ریبادیوساید

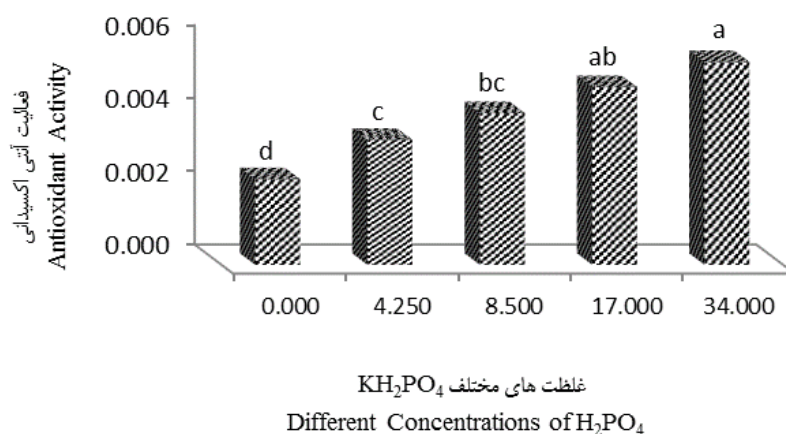


شکل ۴. اثر غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 بر بیان ژن *UGT85C2* (الف) نتایج RT-PCR ژن *UGT85C2* روی ژل آگارز ۲٪ (۱) شاهد (MS)، (۲) $MS + 4/25$ میکرومولار KH_2PO_4 ، (۳) $MS + 8/5$ میکرومولار KH_2PO_4 ، (۴) $MS + 17$ میکرومولار KH_2PO_4 ، (۵) $MS + 34$ میکرومولار KH_2PO_4 (ب) میزان بیان نسبی ژن *UGT85C2* (نسبت به ژن β -Actin) در غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 ، ستون‌های حاوی حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ هستند.

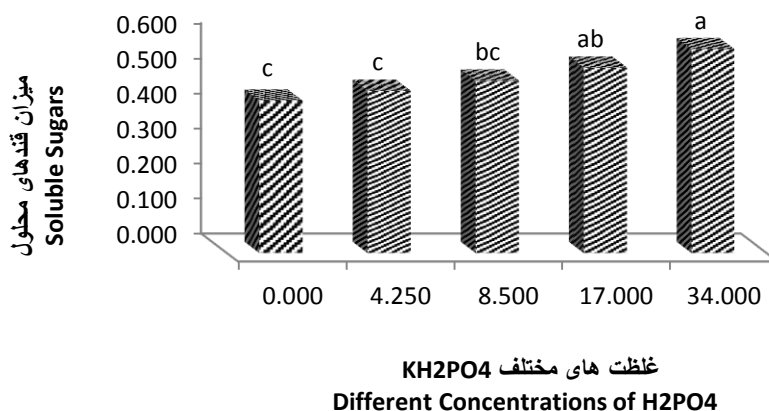
محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص دادند (شکل‌های ۵ و ۶).

بین مقدار پتاسیم و تولید قند رابطه مثبتی وجود دارد. پتاسیم فعالیت دیاستازی و قندسازی را در گیاه افزایش می‌دهد و به همین دلیل گفته می‌شود که پتاسیم از طریق افزایش قندهای محلول در سلول، باعث افزایش مقاومت گیاهان به برخی تنش‌ها نظیر سرما و خشکی می‌شود (Malekoti *et al.*, 2016). گزارش شده کاربرد کود پتاس در مزرعه، میزان کربوهیدرات تولید شده در استویا را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است (Saber-Hamyshegy *et al.*, 2012)، که نتایج پژوهش حاضر در شرایط کشت بافت را تأیید می‌کند.

در این پژوهش، تأثیر غلظت‌های مختلف نمک KH_2PO_4 بر روی محتوای قندهای محلول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه استویا نیز بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ وجود دارد (جدول ۳) و مشخص شد که محتوای قندهای محلول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه با افزایش غلظت KH_2PO_4 روند صعودی دارد. به‌طوری‌که گیاهان رشد کرده در محیط کشت حاوی بالاترین غلظت KH_2PO_4 (۳۴ میکرومولار) دارای بیشترین میزان قندهای محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و گیاهان رشد کرده در محیط کشت شاهد (MS) پایین‌ترین محتوای قندهای



شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه استویا



شکل ۶. اثر غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 بر میزان قندهای محلول در گیاه استویا

مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تنظیم بیان ژن‌ها واکنش نشان می‌دهند (Ibrahim et al., 2008).

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قندهای محلول

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میزان قندهای محلول	میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی
تیمار	4	0.010**	0.047**
خطا	10	0.001	0.002
کل	14		

به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش، می‌توان گفت که بهینه‌سازی شرایط محیط کشت می‌تواند در بهبود خواص دارویی استویا مؤثر باشد. در این پژوهش مشخص شد که KH_2PO_4 بر بیان ژن‌های *KO* و *UGT85C2* و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان قندهای محلول در استویا تأثیر افزایشی دارد. نکته مهمی که در تحقیق حاضر باید مورد توجه قرار گیرد اثرات متفاوت غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 بر بیان ژن‌های مورد مطالعه و رفتار متفاوت این ژن‌ها در پاسخ به این مولکول می‌باشد. به‌عبارت دیگر به‌نظر می‌رسد که KH_2PO_4 می‌تواند باعث افزایش تولید کل قندهای استویا بشود اما تأثیر آن بر روی گلیکوزیدهای مختلف، یکسان نیست و احتمالاً نسبت گلیکوزیدهای مختلف در این گیاه را تغییر می‌دهد.

REFERENCES

Aladakatti YR, Palled YB, chetti MB, Halikatti SI, Alagundagi SC, Patil PL, patil VC, janawade AD (2012) Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). Karnataka J. Agr. Sci. 25(1): 25-29.

Alavi Matin SM, Rahnama A, Meskarbashee M (2016). Effect of potassium supply on the activity of

آنتی‌اکسیدان‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که خاصیت دفاعی سلول را بالا برده و رابطه مهمی با پیشگیری از سرطان دارند. افزایش غلظت پتاسیم در دسترس گیاه می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را افزایش داده و بدین ترتیب از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری کند (Cakmak, 2005).

بر اساس گزارش Devi و همکاران (۲۰۱۲) افزایش غلظت پتاسیم، سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه جین‌سینگ را فعال‌تر کرده و باعث افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه در این گیاه دارویی شده است. همچنین تأثیر کاربرد پتاسیم بر افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گندم دوروم (Alavi Matin et al., 2016, Tavakoli Hasanaklou et al., 2016) نیز به اثبات رسیده است. در مورد سازوکارهای مرتبط با اثر پتاسیم در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان اطلاعات کمی وجود دارد، اما برخی محققان بر وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین غلظت پتاسیم و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ریداکتاز (Alavi Matin et al., 2016) تأکید کرده‌اند که ممکن است به دلیل نقش کلیدی این عنصر به‌عنوان کوفاکتور در فعال‌سازی آنزیم‌های مختلف باشد (Marshner et al., 1995).

گیاهان نسبت به تغییرات محیطی از جمله تغییر در میزان فراهمی مواد غذایی، از طریق تغییرات

some antioxidant enzymes of two durum wheat cultivars under salt stress. The Plant Production, 38(4): 1-12. (In Persian)

Behroozi P, Baghizadeh A, Saei A, Kharazmi S (2017) Quantitative Analysis of Uridine Diphosphate Glycosyl transferase *UGT85C2*, *UGT74G1* and *UGT76G1* Genes Expression in *Stevia rebaudiana* under

- Different Irrigations. Russian J. Plant Physiol. 64: 67-72.
- Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M (1998) *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Can. J. Plant Sci. 78: 527-536.
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. J. Plant Nutr. Sc. 168: 521-530.
- Curry LL, Ashley R (2008) Subchronic toxicity of rebaudioside A. Food Chem. Toxicol. 46: S11-S20.
- Devi BSR, Kim YJ, Selvi SK, Gayathri S, Altanzul K, Parvin S, Yang DU, Lee OR, Lee S, Yang DC (2012) Influence of potassium nitrate on antioxidant level and secondary metabolite genes under cold stress in *Panax ginseng*. Russian J. Plant Physiol. 59: 318-325.
- Dubios MK, Gilles A, Hamilton JK, Roberts PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substrate. Annu. Chem. 28: 350-356.
- Fakhrul RH, Norrizah JS, Jaapar SS, Noor Anilizawatima S (2014) The Effect of Potassium Concentrations on the Growth and Development of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and Production of Stevioside and Rebaudioside A. American-Eurasian J. Sustainable Agric. 8: 42-51.
- Gluria P, Yadav SK (2013) Agrobacterium mediated transient gene silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: insights into steviol glycoside biosynthesis pathway, PLOS One, 8(9): e74731.
- Gupta E, Purwar SH, Sundaram SH, Rai, G (2013) Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. J. Med. Plants Res. 7: 3343-3353
- Hanson JR, White AF (1968) Studies in terpenoid biosynthesis-ii. the biosynthesis of steviol. Phytochemistry, 7: 595- 597
- Ibrahim IA, Nasr MI, Mohammedm BR, El-Zefzafi MM (2008) Nutrient factors effecting in vitro cultivation of *stevia rebaudiana*. Sugar Technol. 10: 248-253.
- Inugraha M, Maghfoer D, Widaryanto E. (2014) Response of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M) to Nitrogen and Potassium Fertilization. Int. J. Agric. Vet. Sci.; 10 (1): 47-55.
- Kahrizi D, Ghari SM Ghaheri M, Fallah F, Ghorbani T, Beheshti Ale Agha A, Kazemi E, Ansarypour Z, (2017) Effect of KH₂PO₄ on gene expression, morphological and biochemical characteristics of *stevia rebaudiana* Bertoni under in vitro conditions. Cell Mol Biol. 63(7): 107-111.
- Karimi M, Ahmadi A, Hashemi J, Abbasi A, Tavarini S, Guglielminetti L (2015) The effect of soil moisture depletion on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity, Sci. Hortic. 183: 93-99.
- Kumar H, Kaul K, Bajpai-Gupta S, Kumar Kaul V, Kumar S (2012) A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Gene, 492: 276-284.
- Luwanska A, Perz A, Mankowska G, Wielgus K (2015) Application of in vitro stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cultures in obtaining steviol glycoside rich material. Herba Pol. 61(1): 50-63.
- Malekoti MJ, Shahabi A, Bazargan K (2016) Potassium in agriculture "The role of potassium in the production of healthy agricultural products" Publishing amount. 331 p.
- Marshner H, (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Mohamed A, Ceunen S, Geuns J, Ende W, Ley M (2011) UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. J. Plant Physiol. 168: 1136-1141.
- Moini A, Kahrizi D (2003) Plant tissue

- culture (Persian Translated “Plant Tissue Culture Practice: Taji A., Williams, R., Dodd R., and William, A.”), Basij Student Organization Publications.
- Molyneux p (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakar J. Sci. Technol. 26: 211-219.
- 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 J. Plant Biol. 21: 99-110 (In Persian)
- Richman AS, Gijzen M, Starratt AN, Yang Z, Brandle JE (1999) Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: Recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. Plant J. 19(4): 411-421.
- Saber-Hamyshegy p, Torang A, Moballeghi M, Dehpouri A, Saber-Hamyshegy Z (2012) The Effect of different levels of nitrogen and potassium on morphological and chemical characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni. New Agric. Findings, 7: 127-135. (In Persian)
- Sathyanarayana BN (2007) Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols. I. K. International Pvt Ltd, Botany, Experimental, 316 pages.
- Tavakoli Hasanaklou N, Ebadi A, Davari M, Tavakoli Hasanaklou H (2016) Effect of potassium and nitrogen on the wheat resistance against fusarium head blight. Cereal Res. 6(2): 159-171 (In Persian)
- Tisdale SL, Nelson WL, beaton JD, Havlein JL (1993) Soil fertility and fertilizer. 5th. Eds. Ma cmillan, Pub. Co. New York.
- Yadav S, Guleria P (2012) Steviol glycosides from stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 52: 988-998.