مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲)

بررسی اثرات الیسیتور عصاره مخمر بر بیان ژن ایزوفلاون سینتاز و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*)

امیر آراسته‌فر[۱]، علی ریاحی مدوار*[۲]، مسعود توحیدفر[۳]، کبری یوسفی[۱]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[۲] استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

[۳] دانشیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۲۰

چکیده

تاکنون اثرات عصاره مخمر بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان مختلف به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. در این تحقیق، میزان بیان ژن ایزوفلاون سینتاز (IFS)، محتوی فلاونوئیدی و آنتوسیانین و همچنین فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهچه‌های ۹ روزه سویا تحت تیمار با غلظت-های مختلف (۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) عصاره مخمر در بازه‌های زمانی ۸ و ۱۶ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. سویا گیاهی یکساله از خانواده نخود است. دانه‌های این گیاه سرشار از ترکیبات ایزوفلاونوئیدی (جنیستئین و دیدزین) می‌باشد که از پیش ماده فلاونونی توسط آنزیم IFS تولید می‌شوند. نتایج نشان دهنده افزایش محتوی فلاونوئیدها و آنتوسیانین و همچنین بیان ژن ایزوفلاون سینتاز و محتوی پروتئین کل گیاهچه-های تیمار شده با این الیسیتور در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با گیاه شاهد است که در تیمار بمدت ۱۶ ساعت بیشتر از زمان ۸ ساعت می‌باشد. از طرف دیگر، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان تیمار شده بطور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است که در تیمار بمدت ۸ ساعت در مقایسه با زمان ۱۶ ساعت بیشتر می‌باشد. در مجموع چنین استنباط می‌شود که عصاره مخمر باعث اعمال نوعی تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌ها شده است. در این شرایط، بمنظور کاهش رادیکال‌های آزاد در زمان ۸ ساعت تیمار، سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی فعالتر بوده درحالیکه در زمان ۱۶ ساعت تیمار، بیشتر سیستم آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی (فنیل پروپانوئیدی) وارد عمل می‌شود. لذا بنظر می‌رسد، تیمار گیاه به مدت ۱۶ ساعت با این الیسیتور، زمانی مناسب جهت تحریک بیان ژن‌ها و همچنین سنتز مواد موثره می‌باشد.

کلمات کلیدی: *ایزوفلاونوییدها، ایزوفلاون سینتاز، سویا، عصاره مخمر*

* نویسنده مسئول: علی ریاحی مدوار تلفن: ۰۳۴۲۶۲۳۳۲۰۴ Email: ariahi@icst.ac.ir

مقدمه

سویا (*Glycine max*) گیاهی یک‌ساله، از خانواده نخود و بومی آسیای شرقی است (PIBA, 2001). این گیاه بوته‌ای، بالارونده (مستقیم)، یک-ساله و تابستانه است که ارتفاع آن از ۰/۳ تا ۱/۲ متر متغیر می‌باشد. برگ‌های این گیاه متراکم، متناوب و بیضوی سه برگی است که هر کدام ۵-۱۰ سانتی-متر عرض دارند. کولتیوارهای مختلفی از این گیاه وجود دارند که رسیدگی دانه آن‌ها تحت شرایط اقلیمی مختلف ۷۵-۱۰۰ روز می‌باشد (Mcgregor *et al.*, 1976).

ایزوفلاونوییدها ترکیبات فلاونوییدی (از مسیر فنیل پروپانوئیدی) هستند که به‌صورت غالب در گیاهان خانواده نخود وجود دارند. ایزوفلاونوییدها و همچنین پیش‌سازهای آن‌ها می‌توانند تحت تاثیر آنزیم‌های فرودست به ترکیبات فیتوالکسینی تبدیل شوند. فیتوالکسین‌های ایزوفلاونوییدی از جمله عوامل اصلی مقاومت گیاهان به بیماری‌های گیاهی و آفات محسوب می‌شوند که تولید آن‌ها تحت تاثیر محرک‌های زنده و غیر زنده قرار می‌گیرد. گونه‌های مختلف خانواده نخود، ترکیبات فیتوالکسینی ایزوفلاونوییدی مختلفی را تولید می-نمایند که به عنوان مثال می‌توان به پتروکارپان مدیکارپین در *Medicago sativa* (Dixon, 1999) و *Medicago truncatula* (Liu *et al.*, 2003; Farag, 2007) و ماکاین و فورمونونتین در *Trifolium repens* اشاره نمود (Tebayashi *et al.*, 2001). ایزوفلاونوییدها معمولاً به‌صورت پیوسته در اشکال گلوکوزید و گلوکوزیدهای مالونیل، ابتدا در ریشه‌ها و سپس در ساقه‌ها تولید می‌شوند. در مقابل، اشکال آزاد (غیرگلوکوزیله) این ترکیبات در اثر آلودگی‌های میکروبی یا حملات حشرات و یا پس از القا با الیسیتورهای غیرزنده مانند نور ماورای بنفش و فلزات سنگین، تولید می‌شوند (Dixon, 1999).

مسیر فنیل پروپانوئیدی در حضور آنزیم‌های تیروزین آمینو ترانسفراز و فنیل آلانین آمینولیاز شروع می‌شود. این آنزیم‌ها گروه آمینی را از اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین/تیروزین برداشته و اسید سینامیک را تولید می‌نمایند. اسید سینامیک توسط آنزیم‌های دیگر از جمله چالکون سینتاز، پیش ماده لیکویریتیجینین (Liquiritiginin) و نارینجنین (Naringenin) را تولید می‌نمایند، که توسط آنزیم IFS به ترتیب به دیدزین و جنیستین تبدیل می-شوند (Hashim *et al.*, 1990). یکی از مهمترین ویژگی‌های ترکیبات ایزوفلاونی خواص استروژنی آن‌ها است که می‌تواند در درمان بیمارانی که عدم تعادل هورمونی دارند مورد استفاده قرار گیرند (Dewick, 1997). ترکیبات ایزوفلاونی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از قبیل پیشگیری از ابتلا به سرطان‌های وابسته به هورمون (مانند سرطان پروستات و سینه)، کاهش علایم یائسگی، بهبود سطح کلسترول خون و همچنین بهبود بیماری‌های قلبی-کرونری مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنزیم

IFS متعلق به خانواده سیتوکروم P450 است (Jung *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 1999; Akashi *et al.*, 1999) که واکنش تبدیل پیش ماده فلاونونی لیکویریتیجینینی و نارینجینی را به دیدزین و جنیستین در طی دو مرحله کاتالیز می‌نماید. این مراحل شامل ۲-هیدروکسیلاسیون و مهاجرت حلقه‌ی پیش ماده فلاونونی بوده، که در ابتدا ترکیب ۲-هیدروکسی ایزوفلاونونی تولید و به دنبال آن دهیدراسیون این ترکیب (به‌صورت آنزیمی یا خودبخودی) سبب تولید محصول ایزوفلاونی می‌شود (Hashim *et al.*,1990). ژن کدکننده این آنزیم از ژن‌های خانه‌دار (House keeping) نبوده و معمولاً تحت شرایط خاص بیان می‌شود. در این تحقیق، میزان بیان ژن IFS و همچنین فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاهچه‌های ۹ روزه سویا در تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر مورد آنالیز قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تیمار گیاهچه‌ها با الیسیتور عصاره مخمر(YE)

بذر گیاه سویا (رقم ویلیامز III) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. به منظور ضدعفونی کردن سطحی بذرها از اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۲/۵٪ به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و درنهایت سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرهای استریل شده داخل محیط پیت ماس اتوکلاو شده کشت و به مدت ۹ روز در شرایط تاریکی کامل داخل انکوباتور با دمای ۲۸ ^{o}C قرار گرفتند. گیاهچه‌های ۹ روزه جدا شده از محیط به مدت‌های ۸ و ۱۶ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) که بطور جداگانه در آب مقطر استریل تهیه شده بودند قرار گرفتند. از هرکدام از غلظت‌ها مقدار ۵۰ میلی‌لیتر به صورت جداگانه تهیه و گیاهچه‌های رشد کرده در طی زمان‌های ذکر شده در معرض آن‌ها روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm قرار گرفتند. به منظور حذف سطحی الیسیتور، گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل شسته و بلافاصله بر روی دستمال‌های کاغذی استریل (زیر هود) قرار گرفتند تا آب اضافی آن‌ها حذف شود، سپس گیاهچه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در نیتروژن مایع قرار گرفته و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

آنالیز بیان ژن

بررسی بیان ژن ایزوفلاون سینتاز در گیاهچه‌های تیمار شده با عصاره مخمر به شرح زیر انجام گرفت.

استخراج RNA کل

استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX – Plus (شرکت سینا ژن، شماره کاتالوگ: RN7713C) مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد.

به منظور حذف آلودگی‌های DNA، در مرحله آخر استخراج، از آنزیم DNase 1 (۱ میکرولیتر آنزیم، ۲۰ دقیقه در دمای $37\ ^{o}C$) استفاده شد. پس از استخراج RNA کل بمنظور بررسی کیفیت تخلیص آن، از ژل آگارز یک درصد و جهت بررسی کمیت RNA تخلیص شده از دستگاه اسپکتروفتومتر (جذب ۲۶۰ بر روی ۲۸۰) استفاده شد.

ساخت cDNA

به منظور ساخت cDNA، ابتدا ۲ میکروگرم از RNA کل به تیوب‌های ۰/۲ اضافه شد (کلیه مراحل ساخت cDNA روی یخ انجام شد). در ادامه پس از اضافه نمودن ۲ میکرولیتر پرایمر عمومی الیگو dT به تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $65\ ^{o}C$ قرار گرفتند. پس از انتقال تیوپ‌ها به روی یخ، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) (MMuLV از شرکت فرمنتاز)، مقدار ۲/۵ میکرولیتر بافر رونوشت RT (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر RNase inhibitor، و در نهایت آب دیونیزه استریل (RNase free) تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به تیوپ‌ها اضافه شد. واکنش ساخت cDNA به مدت ۸۰ دقیقه در دمای $42\ ^{o}C$ انجام شد. در انتهای واکنش به منظور حذف اثر RT، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای $70\ ^{o}C$ قرار گرفتند. همچنین به منظور حذف آلودگی‌های اضافی RNA از آنزیم RNase A (۱ میکرولیتر،۲۰ دقیقه در دمای $37\ ^{o}C$) استفاده شد.

تکثیر ژن ایزوفلاون سینتاز و کنترل داخلی در حضور پرایمرهای اختصاصی

واکنش تکثیر ژن IFS و توبولین (به عنوان کنترل داخلی) با استفاده از آنزیم *Taq* پلیمراز و در حضور پرایمرهای اختصاصی است انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ژن ایزوفلاون سینتاز و توبولین و Tm و درصد GC هرکدام.

Table 1- The sequence of Tubulin and IFS primers and whose Tm and GC contents.

محتوی Content GC (%)	Tm (°C)	توالی sequence	نام پرایمر Primer name
40.9	61.7	5´- TCTAGA ATGTTACTGGAACTTGCACTTG -3´	F-IFS
33.3	63	´5- AAGCTT TTAAGAAAGGAGTTTAGATGCAAC -3´	R-IFS
45.5	63.7	5´-GCTTTCAACACCTTCTTCAGTG-3´	F-Tubulin
50	63.3	5´-CTTTCTCAGCTGAGATCACTGG-3´	R-Tubulin

توالی مربوط به ژن ایزوفلاون سینتاز بر اساس توالی این ژن از گیاه سویا با شماره دسترسی NM-001249093 ثبت شده درGene Bank و توالی پرایمرهای مربوط به توبولین بر اساس توالی ژن توبولین بر اساس ژن توبولین گیاه گندم با شماره دسترسی DQ435671.1 ثبت شده در Gene Bank طراحی و توسط شرکت MWG آلمان ساخته شدند.

تکثیر ژن IFS با شرایط زیر انجام شد. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ °C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشت سازی در دمای ۹٤ °C، ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ °C، ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ °C، به مدت۹۰ ثانیه و یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. تکثیر ژن توبولین مشابه شرایط قبل بجز اینکه دمای اتصال پرایمرها در دمای °C ۵۱ انجام گرفت. مقایسه بیان این ژن در غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر با استفاده از روش نیمه کمی RT-PCR و از روی شدت باند تکثیر شده که بر روی ژل آگارز یک درصد تفکیک شدند و پس از نرمالیز نمودن با ژن توبولین تکثیر شده مربوطه، توسط نرم افزار Gene tools انجام شد.

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید کل

جهت سنجش محتوی فلاونوئید کل، مقدار ۰/۲ گرم از بافت‌تر گیاهچه‌های در اتانول اسیدی (شامل اتانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) هموژنیزه شد. پس از همگن و سانتریفوژ کردن عصاره با دور ۳٦۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی جدا و ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت. سپس جذب محلول رویی در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Krizek, 1998). در این مطالعه از ضریب خاموشی $\varepsilon =$ ۳۳۰۰mM^{-1} cm^{-1} جهت محاسبه محتوی فلاونوئید کل استفاده و مقدار آن بر حسب µM/g fw گزارش گردید.

اندازه‌گیری محتوی آنتوسیانین

محتوی آنتوسیانین گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد بر اساس روش Krizek (1993) انجام شد. به این منظور مقدار ۰/۲ گرم بافت‌تر گیاهچه‌ها در متانول اسیدی (شامل متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) سائیده شد. محلول رویی پس از سانتریفوژ شدن با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت یک شب در تاریکی قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از ضریب خاموشی $\varepsilon =$ ۳۳۰۰ mM^{-1} cm^{-1} جهت محاسبه محتوی آنتوسیانین استفاده و مقدار آن بر حسب µM/g fw گزارش گردید.

عصاره‌گیری و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان

به منظور تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مقدار نیم گرم از بافت‌تر گیاهچه‌های سویا در بافر پتاسیم فسفات

۵۰ میلی‌مولار (pH=7/5) حاوی پلی ونیل پیرولیدین (PVP) ۱٪، EDTA ۱ میلی‌مولار و PMSF ۱ مولار سائیده و محلول همگن به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۸۰۰۰ در دمای ^{o}C ٤ سانتریفوژ گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش Giannopolitis & Ries (1997) استفاده شد. یک واحد فعالیت سوپراکسیددیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۱۰۰٪ احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم می‌گردد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۲٤۰ nm (Dhindasa, *et al.*, 1981) سنجیده و میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش با استفاده از ضریب خاموشی 0.28 $\varepsilon=mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در مدت زمان یک دقیقه محاسبه گردید.

سنجش فعالت آنزیم پراکسیداز (POD)

سنجش فعالت آنزیم پراکسیداز با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکول تشکیل شده از گایاکول در مدت زمان ۳ دقیقه در طول موج ٤۷۰nm انجام گرفت (Plewa *et al.*, 1991). ضریب خاموشی تتراگایاکل ε =25.5 $cm^{-1}\ mM^{-1}$ می‌باشد.

سنجش مقدار پروتئین

مقدار پروتئین‌های محلول در گیاهچه‌های به روش Bradford (1976) اندازه گیری شد. غلظت پروتئین با استفاده از رسم منحنی استاندارد محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم بافت‌تر گزارش گردید.

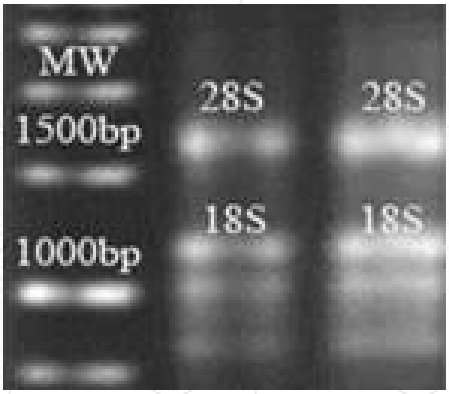
آنالیز آماری

تمامی آزمایشات با ۳ تکرار مستقل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده-ها با استفاده از نرم افزار SAS توسط آزمون دانکن و با در نظر گرفتن سطح اطمینان $P\leq0.05$ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفتند.

نتایج

میزان بیان ژن ایزوفلاون سینتاز در تیمار با غلظت-های مختلف الیسیتور عصاره مخمر

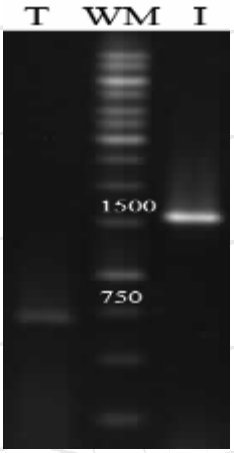
کیفیت RNA استخراج شده با تفکیک باندهای rRNA بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد. طبق شکل ۱ دو باند مربوط به ۲۸S rRNA و ۱۸S نشان دهنده کیفیت مناسب RNA تخلیص شده و دست نخورده بودن آن است.



شکل ۱- نمونه‌ای از RNA کل استخراج شده از گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت ۰/۱ درصد عصاره مخمر بمدت ۸ ساعت بر روی ژل آگارز. دو باند مربوط به ۲۸S و ۱۸S، rRNA به وضوح قابل مشاهده می‌باشند. از چپ به راست؛ چاهک ۱ مربوط به مارکر وزن مولکولی و چاهک ۲ و ۳ بترتیب مربوط به نمونه RNA تخلیص شده از نمونه شاهد و تیمار شده با غلظت ۰/۱ درصد عصاره مخمر می-باشند.

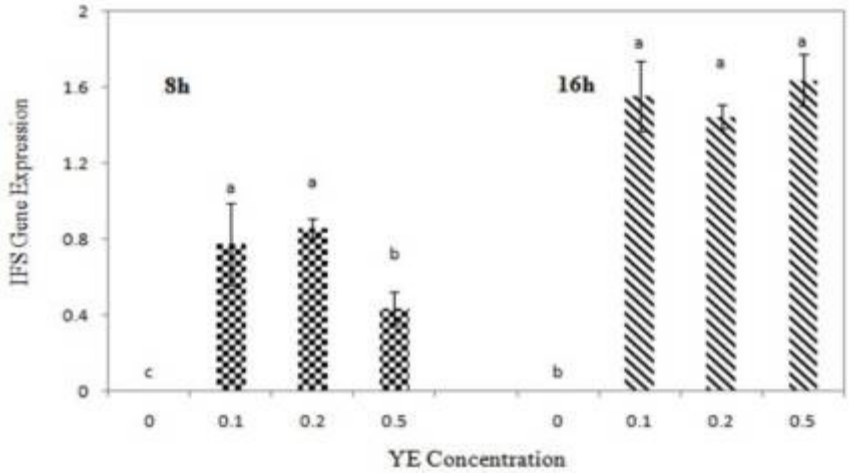
Figure 1- Sample of total RNA extracted of control and treated seedlings with 0.1% yeast extract after 8-hour elicitation on agarose gel. The both rRNA 18S and 28S bands are clearly revealed. Left to right; lane 1 is related to molecular weight marker and lane 2 and 3 are related to RNA extracted of control and treatment with 0.1% yeast extract respectively.

از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای عمومی الیگو dT و آنزیم نسخه‌بردار معکوس، کتابخانه cDNA مربوط به هر نمونه ساخته شد. از cDNA ساخته شده در حضور پرایمرهای اختصاصی عمل تکثیر انجام و ژن IFS و توبولین تکثیر شدند. مطابق شکل ۲ قطعه تکثیر شده IFS باندی معادل ۱۵٦٦ bp و برای ژن توبولین باندی معادل ۷۰۰ bp بر روی ژل ظاهر شد.



شکل ۲- محصولات تکثیر ژن IFS (I) و توبولین (T) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ درصد عصاره مخمر بمدت ۸ ساعت. قطعه تکثیر شده IFS باندی معادل ۱۵٦٦ bp و برای توبولین باندی تقریباً معادل ۷۰۰bp بر روی ژل آگارز ظاهر گردید. WM نشان دهنده مارکر وزن مولکولی می‌باشد.

Figure 2- Amplified products of IFS (I) and Tubulin (T) genes in seedlings that treated with 0.1% yeast extract after 8-hour elicitation. The IFS and Tubulin genes show a band about 1566 bp and 700 bp on 1% of agarose gel respectively. WM indicate the molecular weight marker.



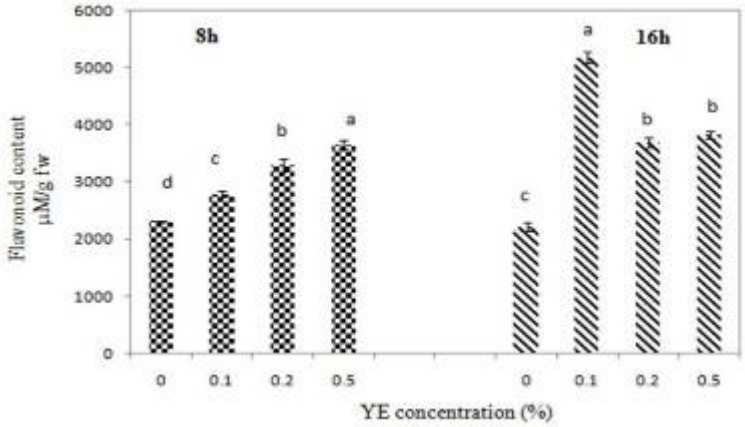
شکل ۳- میزان بیان ژن IFS در گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر به مدت ۸ و ۱٦ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

Figure 3- Comparison of IFS gene expression in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

در این مطالعه از نرم افزار Gene Tools برای آنالیز نیمه کمی بیان ژن IFS در مقایسه با ژن توبولین (کنترل داخلی) استفاده شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود درحالیکه بیانی برای این ژن در نمونه شاهد مشاهده نشد در حضور تمامی غلظت‌های الیسیتور میزان بیان ژن افزایش یافت. در زمان ۸ ساعت اعمال تیمار، بیشترین میزان بیان در غلظت ۰/۲ درصد مشاهده می‌گردد ولی با افزایش غلظت الیسیتور در محیط میزان بیان ژن کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار ۰/۲ درصد نشان داد. درحالیکه در تیمار بمدت ۱۶ ساعت نیز بیانی در نمونه شاهد مشاهده نشد، بیان آن بطور قابل توجهی در حضور تمامی غلظت‌های الیسیتور افزایش یافت. میزان بیان این ژن در زمان ۱۶ ساعت تقریبا معادل دو برابر زمان ۸ ساعت است.

محتوی فلاونوئیدی

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود محتوی فلاونوئیدی کل گیاهچه‌ها در تمامی غلظت‌ها و در هر دو زمان اعمال تیمار، نسبت به نمونه شاهد بطور معنی‌داری افزایش یافته است. افزایش محتوی این متابولیت‌ها، در زمان ۸ ساعت تیمار بطور خطی با افزایش غلظت الیسیتور در محیط افزایش می‌یابد و بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۰/۵ درصد مشاهده گردید. درحالیکه در زمان ١٦ ساعت، بیشترین محتوی فلاونوئید در غلظت ۰/۱ درصد مشاهده گردید و با افزایش غلظت الیسیتور در محیط محتوی آن نسبت به غلظت ۰/۱ درصد به طور معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ٤- محتوی فلاونوئید کل گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر بمدت ۸ و ١٦ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

Figure 4- Total flavonoid content in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

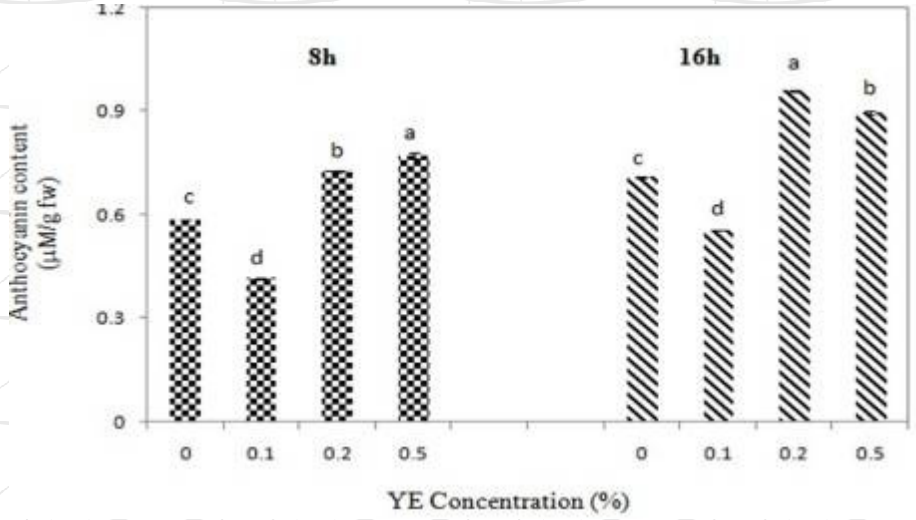
محتوی آنتوسیانین

محتوی آنتوسیانین گیاهچه‌های تیمار شده با الیسیتور عصاره مخمر در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است. همانطور که در شکل قابل مشاهده است در حالیکه کاهش معنی‌دار محتوی آنتوسیانین در غلظت ۰/۱ درصد در هر دو زمان اعمال تیمار در مقایسه با نمونه شاهد صورت گرفته است افزایش معنی‌دار محتوی آنتوسیانین در غلظت‌های بالاتر اعمال تیمار به وضوح قابل مشاهده می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاهچه-های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر

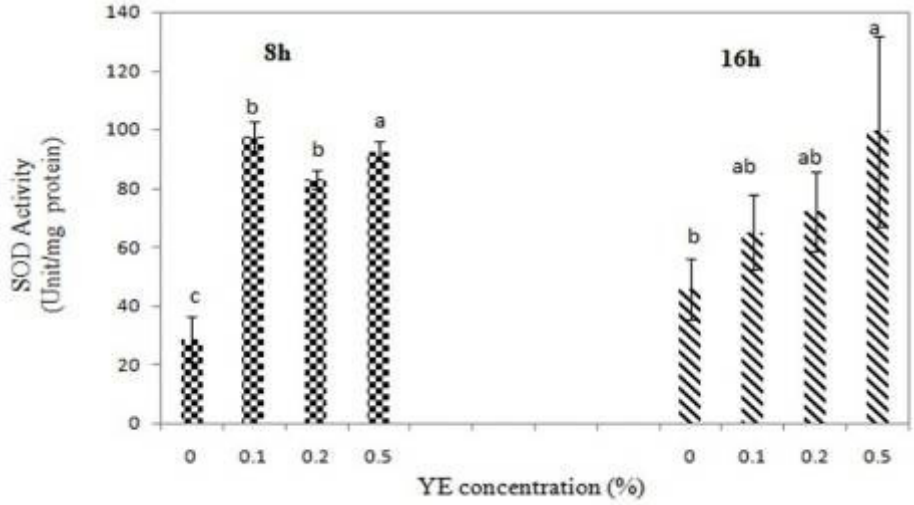
اثر عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم SOD

مطابق با شکل ٦، میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در مدت زمان ۸ ساعت تیمار در تمامی غلظت‌های مورد استفاده نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد و بیشترین افزایش فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۵ درصد تیمار مشاهده گردید. درحالیکه در تیمار بمدت ١٦ ساعت نیز مانند تیمار بمدت ۸ ساعت، تمامی غلظت‌ها مورد استفاده الیسیتور نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم را نشان می‌دهند و بیشترین افزایش فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۲ درصد مشاهده گردید.



شکل ۵- محتوی آنتوسیانین گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف الیسیتور عصاره مخمر بمدت ۸ و ١٦ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می-باشد.

Figure 5- Anthocyanin content in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.



شکل ٦- فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بمدت ۸ و ١٦ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

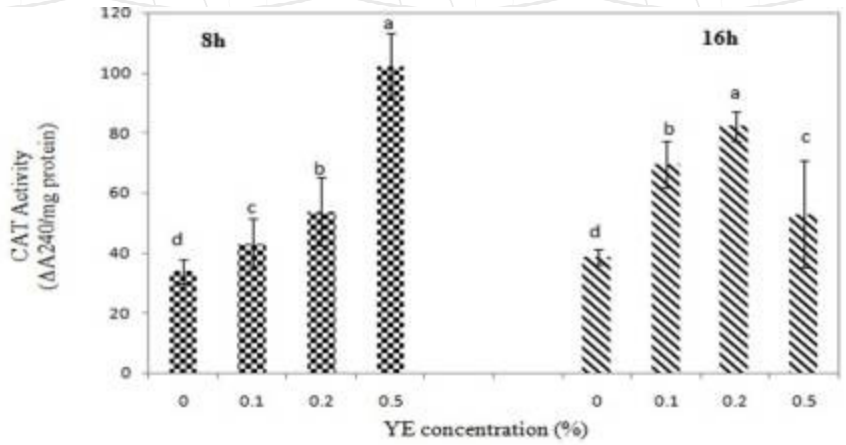
Figure 6 - Activity of superoxide dismutase in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

اثر الیسیتور عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم CAT

فعالیت آنزیم کاتالاز (شکل ۷) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر در هر دو زمان ۸ و ١٦ ساعت بطور معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته است. در تیمار بمدت ۸ ساعت ، افزایش فعالیت آنزیم با افزایش غلظت الیسیتور در محیط همخوانی دارد و بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده گردید. در حالیکه فعالیت این آنزیم در زمان ١٦ ساعت اعمال تیمار تا غلظت ۰/۲ درصد بصورت خطی افزایش و سپس بطور معنی‌داری کاهش نشان می-دهد.

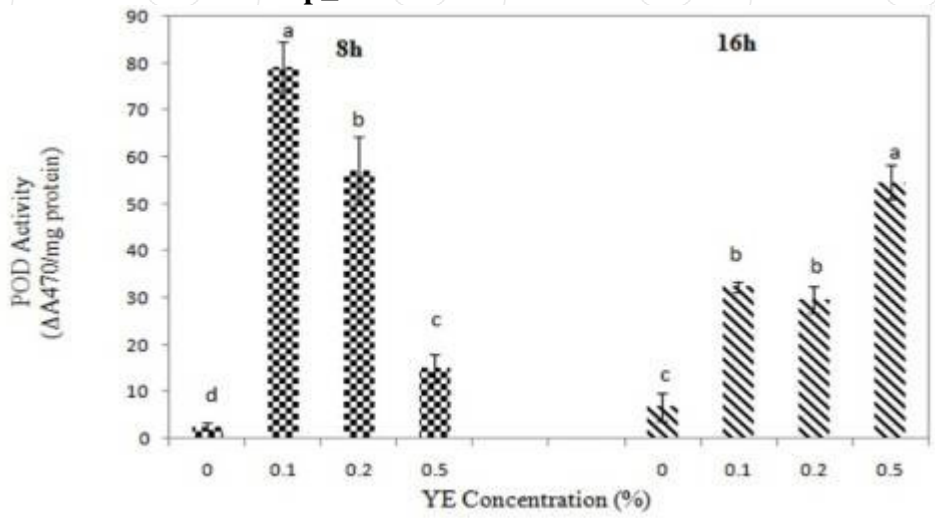
اثر الیسیتور عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم POD

همانطور که در شکل ۸ قابل مشاهده است، فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های تیمار شده به مدت ۸ ساعت در تمامی غلظت‌ها نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری یافته است. بیشترین افزایش در تیمار با غلظت ۰/۱ درصد الیسیتور مشاهده گردید ولی با افزایش غلظت آن در محیط، فعالیت این آنزیم به صورت خطی کاهش یافت. در حالیکه فعالیت این آنزیم در زمان ١٦ ساعت اعمال تیمار به صورت خطی با افزایش غلظت الیسیتور در محیط افزایش نشان می‌دهد.



شکل ۷- فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بمدت ۸ و ۱۶ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

Figure 7- Activity of catalase in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

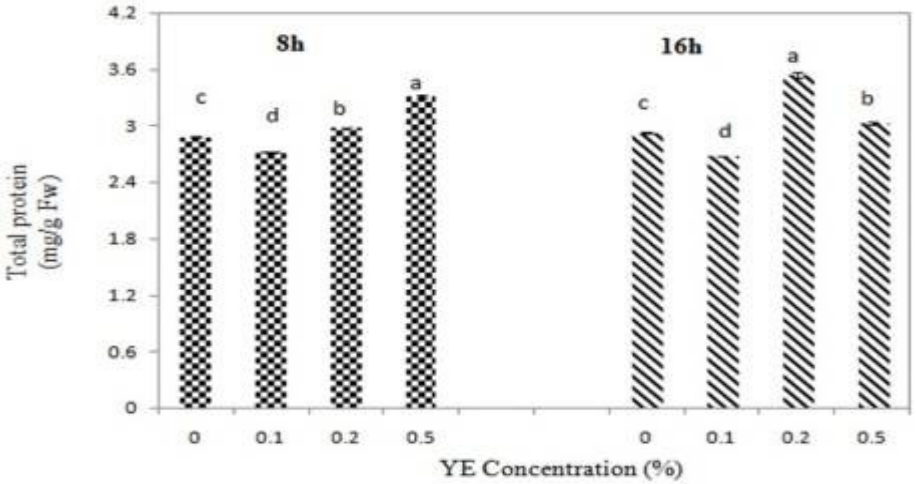


شکل ۸- فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بمدت ۸ و ۱۶ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

Figure 8- Activity of peroxidase in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

اندازه گیری میزان پروتئین کل

میزان پروتئین کل (شکل ۹) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ درصد عصاره مخمر نسبت به نمونه شاهد در هر دو زمان اعمال تیمار بطور معنی‌داری کاهش یافت. در حالیکه در حضور غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ درصد الیسیتور، افزایش معنی‌داری محتوی پروتئین نسبت به نمونه شاهد مشاهده می‌شود.



شکل ۹- محتوی پروتئین کل گیاهچه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بمدت ۸ و ۱۶ ساعت. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

Figure 9- Total protein content in control and treated seedlings with different concentrations of yeast extract after 8 and 16 hours elicitation. In each group, signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

بحث

عصاره مخمر که از مخمر ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) تهیه می‌شود به عنوان یک الیسیتور شناخته شده است. در واقع الیسیتور مذکور باعث فعال شدن نوعی مکانیسم دفاعی در گیاهان شده و ژن‌های خاص مربوط به آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌نماید. پیشنهاد می‌شود، که محرک، ممکن است از طریق گیرنده‌های موجود در سطح غشاء پلاسمایی مکانیزم تحریک را، راه بیندازند (Savitha *et al.*, 2006). زمانیکه سلول‌های گیاهی در معرض تنش‌های غیرزیستی و زیستی مانند تیماردهی با محرک‌ها قرار می‌گیرند، قطع واکنش‌های اکسایشی، یک رویداد قابل توجه در پاسخ‌های دفاعی می‌باشد. مشخص شده است که عصاره مخمر، مخلوطی از آمینو اسیدهای مختلف، ویتامین‌ها و ترکیبات معدنی می‌باشد. همچنین اثر عصاره مخمر به عنوان محرک می‌تواند ناشی از ترکیبات دیگری باشد که هنوز به درستی شناسایی نشده‌اند. یک دلیل ممکن برای تولید

متابولیت‌های ثانویه از طریق عصاره مخمر می‌تواند مربوط به برخی ترکیبات از قبیل کاتیون‌های فلزی Zn, Co و Ca در این ترکیب باشد که به عنوان محرک غیر زنده عمل می‌کنند (Sandra *et al.,* 2000). در این تحقیق، اثرات غلظت‌های مختلف عصاره مخمر در زمان‌های متفاوت بر بیان ژن IFS و سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های سویا مورد بررسی قرار گرفت. سویا (از خانواده نخود) حاوی ایزوفلاونوئیدهای مختلفی از قبیل دیدزنین و جنیستئین می‌باشد که اثرات دارویی متفاوتی دادند. این ترکیبات دارویی مهم در مسیر فنیل پروپانوئید از پیش ماده فلاونونی تحت تاثیر آنزیم IFS سنتز می‌شوند. در این پژوهش بیان ژن IFS در گیاهچه-های تیمار شده سویا با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر در دو زمان ۸ و ۱۶ ساعت به صورت نیمه کمی مورد سنجش قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود درحالیکه هیچ باندی مبنی بر بیان این ژن در گیاه شاهد (غلظت صفر عصاره مخمر) مشاهده نشد، بیان آن در حضور غلظت‌های مختلف الیسیتور به طور چشمگیری افزایش یافته است. افزایش بیان این ژن در زمان ۱۶ ساعت تیمار در مقایسه با زمان ۸ ساعت تقریباً دو برابر است. این ترکیب تاکنون برای تحریک مواد موثره در گونه‌های گیاهی متعددی از قبیل *Orthosphomaristatus* (Mizukam *et al.,* 1992)، حسن یوسف (*Coleus blumei*) (Szabo *et al.,* 1999) و همچنین ریشه‌های موئی گیاه مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) مورد استفاده قرار گرفته است (Yan *et al.,* 2006). آزمایشات انجام شده روی بذرهای گیاه *Lupinus albus* تیمار شده با عصاره مخمر نشان داد که محتوی ایزوفلاون در بذرهای این گیاه افزایش یافته است (Gagnon & Ibrahim, 1997). مطالعات مرتبط با گیاهان کامل و کشت سلول گیاهی نشان داد که مواد شیمیایی محرک مشتق شده از قارچ‌ها که الیسیتور نامیده می‌شوند می‌توانند پاسخ‌های دفاعی موثری را در برابر تنش‌ها القا کنند (Dixon & Lamb, 1990; Bell *et al.,* 1981; Hahlbrock & Scheel, 1989; Vance, 1980; Cassab & Varner, 1988; Boller, 1991). هنگامی که گیاهان مورد تهاجم و حمله میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرند به طور کلی یک پاسخ دفاعی موثر نشان می‌دهند که منجر به بیان آنزیم‌های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه مانند PAL* می‌شوند (Dixon & Lamb, 1990; Hahlbrock & Scheel, 1989). PAL اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که به همراه TAT† در تولید سینامیک اسید نقش دارد (Tanner, 2004). بنابراین دلیل افزایش محتوی فلاونوئیدی و آنتوسیانین (شکل٤ و ٥) در گیاهچه-های تیمار با این الیسیتور، احتمالاً به دلیل افزایش بیان آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز آن‌ها می-باشد. بنابراین، افزایش بیان ژن IFS در مسیر فنیل پروپانوئیدی خود می‌تواند دلیلی بر اثبات این

* Phenylalanine amino lyase

† Tyrosine aminotransferase

فرضیه باشد. مطالعات انجام شده توسط Naoumkina و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که این الیسیتور در گیاهان می‌تواند بر روی کل مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها تاثیر گذارد (Naoumkina *et al.*, 2007). لذا بنظر می‌رسد، افزایش محتوی پروتئین کل در هر دو زمان اعمال تیمار به دلیل افزایش بیان ژن‌های درگیر در سیستم‌های آنتی-اکسیدان از قبیل ژن‌های درگیر در مسیر فنیل پروپانوئیدها می‌باشد. مشخص شده است که ترکیبات فنولیکی نقش مهمی در حفاظت گیاهان در مقابل عوامل تنش‌زای زنده و غیرزنده بازی می‌کند. این ترکیبات رنج وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد التهابی دارند (Soobrattee *et al.*, 2005). بنابراین می‌توان نتیجه گیری نمود که افزایش محتوی فلاونوئید کل پاسخی برای کاهش اثرات تنش حاصله از اعمال الیسیتور می‌باشد. برای اثبات این تئوری در این آزمایش، فعالیت برخی از آنزیم‌های مهم سیستم آنتی‌اکسیدان مورد آنالیز قرار گرفت. ثابت شده است که تنش‌های زنده و غیر-زنده سبب افزایش میزان رادیکال‌های آزاد (از قبیل گونه‌های فعال اکسیژن) می‌شوند. رادیکال‌های آزاد اثرات مخرب بر روی ملکول‌های آلی بر جای می-گذارند و سبب ایجاد عوارض و پی‌آمدهای خطرناکی بر گیاهان می‌شوند. گیاهان در برابر این رادیکال‌ها، دارای مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز که در واکنش تبدیل آنیون‌های سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن نقش اساسی بازی می‌کند (Hollosy, 2002) در تمامی غلظت‌ها و در هر دو زمان اعمال تیمار به طور معنی‌داری فعالیت آن در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته است (شکل ٦) که این افزایش در زمان ۸ ساعت تیمار در مقایسه با زمان ١٦ ساعت بارزتر می‌باشد. از طرف دیگر، سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز و پراکسیداز که در جاروب نمودن H_2O_2 نقش عمده-ای دارند فعالیت آن‌ها نیز نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری را در حضور تمامی غلظت‌ها و زمان‌های اعمال تیمار در سطح ۵ درصد نشان می-دهند (شکل ۷ و ۸). نکته قابل توجه افزایش بارزتر فعالیت این آنزیم‌ها مشابه آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در زمان ۸ ساعت در مقایسه با زمان ١٦ ساعت تیمار می‌باشد. نظر به افزایش بیشتر میزان بیان ژن IFS، محتوی فلاونوئیدی و آنتوسیانینی در زمان ١٦ ساعت تیمار در مقایسه با ۸ ساعت پیشنهاد می‌شود که کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان آنزیمی در زمان ١٦ ساعت تیمار به دلیل فعال‌تر شدن سیستم آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی است. همانطور که در تمامی شکل‌ها به وضوح قابل مشاهده است در شرایط انجام آزمایش‌ها، سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی به طور همزمان و هماهنگ جهت کاهش اثرات تنش وارد عمل می‌شوند. اهمیت این تحقیق علاوه بر اینکه نخستین گزارش در ارتباط با اثرات این الیسیتور بر روی

بیان این ژن و ارتباط آن با سیستم آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های سویا می‌باشد می‌تواند در بیان ژن‌های کلیدی مهم و کلون نمودن آن‌ها و همچنین افزایش تولید مواد موثره این گیاه از قبیل ترکیبات ایزوفلاونوئیدی بسیار حائز اهمیت باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان با قرداد شماره ۱/٤٠٣٦ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

منابع

Akashi T, Aoki T, Ayabe S (1999). Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. Plant physiology and biochemistry 121: 821–828.

Bell AA (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 32: 2l-81.

Boller T (1991). Hormone ethylene in the plant. CRC Press pp: 293-314.

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

Cassab GI, Varner JE (1988). Ethylene effect on extension and peroxidases distribution in the subapical region of pea epicotyls. Plant Physiology 39: 321-353.

Dewick PM (1997). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, Inc., New York, 123-124.

Dhindsa RS, Motowe W (1981). Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany 32: 79-91.

Dixon, RA, Lamb CJ (1990). Molecular communication in interaction between plants and microbial pathogens. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 339-367.

Dixon RA (1999). Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology and biological function, in: U. Sankawa (Ed.), Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1, Elsevier, Oxford, pp: 773–823.

Farag MA, Huhman DV, Lei Z, Sumner LW (2007). Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension culture of *Medicago truncatula* using HPLC-V-ESI-MS and GC–MS, Phytochemistry 68: 342–354.

Gagnon H, Ibrahim RK (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. Phytochemistry 44: 1463–1467.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutase I occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309–314.

Hahlbrock K, Scheel D (1989). Physiology and molecular biology of phenyl propanoid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 347-369.

Hashim MF, Hatkamatsuka T, Ebizuka Y, Sankawa U (1990). Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavone in isoflavone biosynthesis. FEBS Letters 271: 219–222.

Hollosy F (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells, Micron 33: 179-197.

Jung W, Yu O, Lau SM, O'Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B (2000). Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nature Biotechnology 18: 208–212.

Krizek DT, Britz SJ, Mirecki RM (1998). Inhibitory effects of ambient levels ofsolar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiol Plantarum 103: 1-7.

Krizek DT, Kramer GF, Upadyaya A, Mirecki RM (1993). UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. Physiologia Plantarum, 88: 350-358.

Liu CJ, Huhman D, Sumner LW, Dixon RA (2003). Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome P450 81E enzymes from *Medicago truncatula*, Plant Journal 36: 471-484.

Mcgregor SE (1976). Insect pollination of cultivated crop plants. USDA, Tucson, Arizona.

Mizukam H, Ogawa T, Ohashi H, Ellis BE (1992). Induction of rosmarinic acid biosynthesis in Lithospermum erythrorhizon cell suspension cultures by yeast extract. Plant Cell Reports 11: 480-483.

Naoumkina M, Farag MA, Sumner LW, Tang Y, Jun LC, Dixon RA (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*, Phytopatholgy18: 259-288.

Plewa MJ, Smith SR, Wanger ED (1991). Diethyl dithio carbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research 247, 57-64.

Sandra I, Pitta-Alvarez TC, spollansky A, Giulietti M (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropan alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, Enzyme and Microbial Technology 26: 252 – 258.

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

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma .I, Bahorun T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : mechanisms and actions. Mutation Research 579: 200-213.

Steele CL, Gijzen M, Qutob D, Dixon RA (1999). Molecular characterization of the enzyme catalyzing an aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. Archives of Biochemistry and Biophysics 367: 146–150.

Szabo, E., Thelen, A. and Petersen, M. 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of Coleus blume. Plant Cell Rep., 18: 485–489.

Tanner GJ (2004). Condensed tannins, in Plant Pigments and their Manipulation, Davies, K.M., Ed., Annual Plant Reviews, Sheffield Academic Press, Sheffield, 150.

Tebayashi S, Ishihara A, Iwamura H (2001). Elicitor-induced changes in isoflavonoid metabolism in red clover, Journal of Experimental Botany 52: 681–689.

Vance CP, Kirk TK, Shenvood RT (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology18: 259–288.

Yan Q, Shi M, Ng J, Yong J (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, Journal of Biological Chemistry 234: 2597-2604.

Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in *Glycine max* seedlings

Arastefar A.[1], Riahi-Madvar A.[2*], Tohid Far M.[3], Yousefi K.[1]

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
[2]Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
[3]Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

Abstract

Several studies have been investigated the effects of Yeast extract (YE) on morphological and biochemical properties of various plant species. In this research, isoflavone synthase (IFS) gene expression profile, flavonoid and anthocyanin contents and also activity of some antioxidant enzymes have been assessed in 9-day soybean (*Glycine max*) seedlings which were treated with various concentrations of YE for 8 and 16 hours. Soybean as an annual plant is a member of the Leguminoseae family. Its seeds are containing of isoflavonoid compound (such as genestin and dedzein) which produce through IFS catalyzes from flavonone precursor. Results showed flavonoid and anthocyanin contents, IFS gene expression and also protein content significantly increased in elicited seedlings in compared to that of the control, but more significantly at 16-hour treatment. On the other hand, activity of antioxidant enzymes including superoxid dismutase, catalase and peroxidase was also elevated in treated seedlings rather than of the control that was more remarkable at 8-hour treatment. Based on the results, it can be concluded that treated soybean seedlings with YE lead to induce an oxidative stress. In this condition, while at 8-hour elicitation time the enzymatic antioxidant systems is more active, higher activity of the non-enzymatic antioxidant system (phenyl propanoid pathway) was seen for 16 hours treatment. Therefore, it seems that YE-treated for 16 hours is optimal for inducing of gene expression and also biosynthesis of active ingredient in this plant.

Key words: *Isoflavone synthase, Isoflavonoids, soybean, Yeast extract.*

[*]Corresponding Author: Riahi-Madvar A. Tel: 03426233204 Email: Ariahi@icst.ac.ir