



Effect of *Serendipita indica* Symbiosis on the Relative Expression of Some Genes Involved in the Early Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Sahar Mohammadi-GomYek¹ | Alireza Shafeinia^{1*} | Esmacil Ghasemi Goojani¹ | Babak Pakdaman Sardrood²

1- Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mullasani, Khuzestan, Iran

2- Department of Phytomedicine, Faculty of Agriculture, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mullasani, Khuzestan, Iran

*Corresponding author ✉: shafeinia@asnrukh.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: September 26, 2025;
Received in revised form: December 01, 2025;
Accepted: December 07, 2025;
Available online: December 30, 2025

Keywords:

Stevia rebaudiana,
Steviol glycosides,
Gene expression,
Natural sweetener

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bert. is a medicinal plant widely utilized as a source of natural sweeteners. Its sweetening potency is attributed to steviol glycosides, diterpenoid compounds present in the leaves. Similar to other plant secondary metabolites, production of steviol glycosides can be modulated by biotic and abiotic elicitors. Among biotic elicitors, the fungus *Serendipita indica* has been shown to positively influence steviol glycoside production. In the present study, the effect of *S. indica* symbiosis on the relative expression patterns of key early biosynthetic pathway genes of steviol glycosides, including *Dxs*, *Cms*, *Mcs*, *Hds*, *Hdr*, and *Ggdps* was investigated. Following fungal inoculation and confirmation of root colonization, samples were collected from treated plants. After RNA extraction and cDNA synthesis, transcript levels of the target genes were assessed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) with three biological and three technical replicates. The results demonstrated that symbiotic association with *S. indica* significantly up-regulated the expression of all examined genes. The highest up-regulation expression was observed for *Ggdps* gene, suggesting that it can be considered as a candidate gene for metabolic engineering aimed at enhancing steviol glycoside biosynthesis.



Cite this article: Mohammadi-GomYek, S., Shafeinia, A., Ghasemi Goojani, E. and Pakdaman Sardrood, B. (2025). Effect of *Serendipita indica* Symbiosis on the Relative Expression of Some Genes Involved in the Early Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Plant Genetic Research*, 12(2): 75–88.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2079667.1025>



Introduction

Stevia rebaudiana Bert. is a perennial medicinal plant belonging to the Asteraceae family and is globally recognized as a natural source of high-intensity, non-caloric sweeteners. The sweetness of stevia leaves is mainly attributed to diterpenoid steviol glycosides, predominantly stevioside and rebaudioside A, which are synthesized and accumulated in leaf tissues. These compounds are characterized by their high sweetness potency, non-toxicity, and absence of caloric value, making them suitable alternatives to sucrose and artificial sweeteners, particularly for diabetic and obese populations. Among steviol glycosides, rebaudioside A is mainly responsible for the desirable sweet taste, whereas stevioside contributes to bitterness, highlighting the importance of regulating both the quantity and composition of these metabolites. The biosynthesis of steviol glycosides occurs through a complex metabolic network that involves the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in plastids. The early steps of this pathway play a crucial regulatory role in determining the metabolic flux toward diterpenoid biosynthesis. Key enzymes involved in these initial stages include 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS), 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase (CMS), 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (MCS), 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (HDS), 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (HDR), and geranylgeranyl diphosphate synthase (GGDPS). The final product of this enzymatic cascade, geranylgeranyl diphosphate (GGPP), serves as the primary precursor for steviol glycoside biosynthesis. Therefore, transcriptional regulation of these genes is of particular importance for metabolic engineering strategies aimed at increasing steviol glycoside accumulation. Secondary metabolite production in plants is known to be influenced by environmental factors and elicitors, both biotic and abiotic. Among biotic elicitors, endophytic fungi have gained considerable attention due to their ability to modulate plant metabolism, enhance growth, improve nutrient acquisition, and increase tolerance to biotic and abiotic stresses. *Serendipita indica* is a root-colonizing endophytic basidiomycete fungus that establishes a mutualistic association with a wide range of plant species. This fungus is known to induce systemic resistance against pathogens, enhance water and mineral uptake, and promote plant growth under both optimal and stress conditions, including drought and salinity. Despite extensive reports on the growth-promoting effects of *S. indica*, its influence on the transcriptional regulation of steviol glycoside biosynthesis in stevia remains insufficiently explored. The present study aimed to investigate the effect of *S. indica* symbiosis on the relative expression patterns of key genes involved in the early steps of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana*.

Materials and Methods

Stevia seedlings were grown under controlled conditions and transplanted into pots containing a mixture of soil, cocopeat, and perlite (1:1:1). After reaching the 10-12 leaf stage, seedlings were inoculated with *S. indica* by placing barley grains colonized with fungal spores near the root system. Fourteen days after inoculation, successful root colonization was confirmed through root staining and microscopic examination. Following confirmation of symbiosis, the five uppermost leaves of inoculated and non-inoculated (control) plants were harvested for molecular analysis. Total RNA was extracted, and its quality and quantity were evaluated using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. After DNase I treatment to remove genomic DNA contamination, complementary DNA (cDNA) was synthesized using oligo (dT) primers. Gene-specific primers were designed using Primer3Plus software, and optimal annealing temperatures were determined through gradient PCR. Relative expression levels of *Dxs*, *Cms*, *Mcs*, *Hds*, *Hdr*, and *Ggdps* genes were quantified using quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

The experiment was conducted with three biological replicates and three technical replicates, and relative expression data were analyzed using REST software.

Results and Discussion

The results demonstrated that symbiosis with *S. indica* significantly enhanced the expression of all six investigated genes compared to control plants. This coordinated up-regulation suggests a global induction of the early MEP pathway in response to fungal colonization. Among the studied genes, *Ggdps* gene exhibited the highest level of induction. Since GGDPS catalyzes the condensation of isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) to form GGPP, its pronounced up-regulation indicates a potential increase in metabolic flux toward steviol glycoside biosynthesis. This finding highlights *Ggdps* gene as a promising candidate gene for metabolic engineering and genetic manipulation aimed at enhancing steviol glycoside production.

Conclusions

In conclusion, the present study demonstrates that symbiosis with *Serendipita indica* positively modulates the transcriptional regulation of key genes involved in the early stages of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana*. The observed upregulation of *Dxs*, *Cms*, *Mcs*, *Hds*, *Hdr*, and *Ggdps* genes suggests that *S. indica* acts as an effective biotic elicitor capable of enhancing the biosynthetic capacity of stevia plants. Given that increased gene expression within biosynthetic pathways is often correlated with higher accumulation of end products, it is expected that fungal inoculation may lead to elevated levels of stevioside and rebaudioside in stevia leaves. These findings provide a valuable biological strategy for improving stevia productivity, particularly in low-yield or stress-prone environments, and offer new insights into the use of beneficial endophytic fungi for sustainable enhancement of medicinal plant metabolites.

Author Contributions

Sahar Mohammadi-GomYek: Plant Culture, Treatments application, RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Conducted qRT-PCR. Alireza Shafeinia: Primer design, qRT-PCR data analysis, and manuscript preparation. Esmail Ghasemi Goojani: Participated in manuscript writing. Babak Pakdaman Sardrood: Technical assistance with treatment procedures.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

This work was supported by the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan. The authors extend their gratitude for the funding provided.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research was funded by the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

تأثیر همزیستی قارچ *Serendipia indica* بر بیان نسبی برخی از ژن‌های موجود در ابتدای مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.)

سحر محمدی‌گم‌یک^۱ | علیرضا شافعی‌نیا^{۱*} | اسماعیل قاسمی‌گوجانی^۱ | بابک پاکدامن سردرود^۲

۱- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران
۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.) یک گیاه دارویی با کاربرد گسترده به‌عنوان شیرین‌کننده طبیعی است. قدرت شیرین‌کنندگی این گیاه به‌سبب ترکیبات دی‌ترپنی گلیکوزید استویول موجود در برگ‌های آن می‌باشد. متابولیت‌های ثانویه استویا همچون متابولیت ثانویه دیگر گیاهان می‌توانند تحت تأثیر الیستورهای زیستی و غیرزیستی قرار گیرند. در میان الیستورهای زیستی، قارچ *Serendipita indica* تأثیر مثبتی بر میزان تولید گلیکوزید استویول در گیاه دارد. در پژوهش حاضر، اثر همزیستی قارچ *S. indica* بر تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های کلیدی و ابتدایی مسیر بیوسنتزی گلیکوزید استویول شامل *Cms*، *Dxs*، *Gdps* و *Hdr.Hds* مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، پس از اعمال تیمار قارچ *S. indica* و تأیید همزیستی آن با ریشه گیاه استویا، نمونه‌برداری از برگ گیاهان تحت تیمار انجام شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، میزان رونوشت ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش qRT-PCR در سه تکرار زیستی و سه تکرار فنی ارزیابی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که همزیستی قارچ *S. indica* با ریشه گیاهچه‌های استویا، منجر به افزایش بیان همه ژن‌های مورد مطالعه گردید. بیشترین میزان افزایش بیان، مربوط به ژن *Gdps* بود. محصول نهایی این ژن دی‌متیل‌آلیل‌دی‌فسفات و ایزوپنتیل‌دی‌فسفات را به ژرانیل-ژرانیل-ژرانیل دی‌فسفات تبدیل می‌کند که پیش‌ماده اصلی سنتز گلیکوزیدهای استویول در برگ‌های گیاه است. این یافته می‌تواند نشان‌دهنده قابلیت ژن *Gdps* به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای مهندسی متابولیت باشد.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹

واژگان کلیدی:

استویا،

استویوزید،

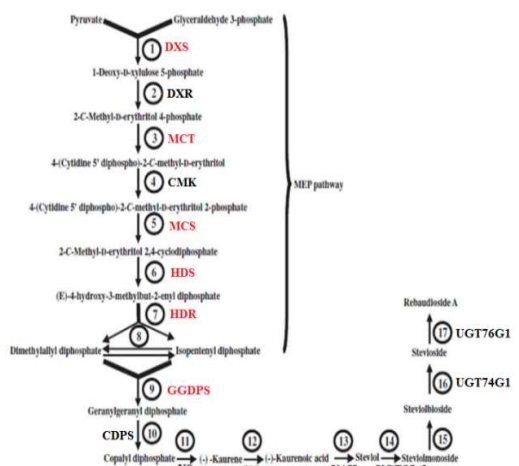
بیان ژن،

شیرین‌کننده

مقدمه

جنس *Stevia* از خانواده‌ی Asteraceae بالغ بر ۲۳۰ گونه‌ی علفی و درختچه‌ای دارد و *Stevia rebaudiana* (Bertoni) یکی از پرکاربردترین گونه‌های این جنس است که گیاهی چندساله، علفی، دیپلوئید با ۲۲ کروموزوم و خودناسازگار می‌باشد (Raina et al., 2013; Yadav et al., 2011). برگ‌های استویا سرشار از دی‌ترین‌گلیکوزیدهای (Diterpene glycosides) استویوزید و ربادیوزید (Stevioside and rebaudioside) است که خاصیت شیرین‌کنندگی آن را سبب می‌شوند. بدون کالری و غیرسمی بودن بارزترین ویژگی این شیرین‌کننده‌ها است و در مقایسه با ساکارز و شیرین‌کننده‌ها مصنوعی، شیرین‌کنندگی بیشتری دارند، به‌گونه‌ای که در منابع عنوان شده است که شیرین‌کنندگی آن می‌تواند تا چهارصد برابر بیشتر از ساکارز باشد (توانایی شیرین کردن ۲/۵ گرم از آن معادل ۱ کیلوگرم شکر است). در توضیح این دو ماده باید اشاره کرد که عطر و طعم شیرینی برگ استویا را ربادیوزید A در برگ‌های استویا موجب شده و طعم تلخی آن ناشی از حضور استویوزید است. از این‌رو اهداف به‌نژادی استویا به سمت ایجاد کولتیوارهای جدید با محتوای بیشتر ربادیوزید و مقدار کمتر استویوزید، سوق دارد (Yadav et al., 2011). مصرف قند استویا به‌سبب نداشتن عوارض جانبی نسبت به شیرین‌کننده‌های مصنوعی چون سوربیتول، آسپاراتام، نئوتام و ساخارین برتری دارد (Ahmad et al., 2020; El-Housini et al., 2014; Sardesai and Waldshan, 1991). به‌علاوه به‌علت اثر شیرین‌کنندگی بیشتر، نداشتن کالری، عدم عوارض جانبی و داشتن خواص دارویی (ضدسرطان، ضدقند خون و بیماری‌های قلبی عروقی) می‌تواند قند استویا را به‌عنوان جایگزین مناسب قندهای معمول، معرفی کرد (Goyal et al., 2010; Peteliuk et al., 2021). به‌سبب اهمیت دارویی و تغذیه‌ای این گیاه، انجام تحقیقات به‌زرعی برای یافتن روش یا روش‌های مؤثر و کارا بر کشت استویا در خاک‌های با شرایط مختلف و نیز اطلاع از مسیرهای تولید قند آن از منظر مولکولی با هدف افزایش عملکرد گیاه و میزان قند استحصالی آن، حائز اهمیت است. تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از جمله استویا تحت تأثیر عوامل محیطی و محرک‌ها، چه زیستی و چه غیرزیستی، قرار می‌گیرد. در میان محرک‌های زیستی، قارچ‌های اندوفیت به‌دلیل توانایی‌شان در تعدیل متابولیسم، افزایش رشد، بهبود جذب مواد مغذی و افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند (Eslahi et al., 2019).

قارچ *Serendipia indica* قارچی اندوفیت و همزیست با ریشه‌ی گیاهان است که در غالب موارد سبب القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان علیه بیمارگرها (Pathogens) می‌گردد. همچنین به‌دلیل افزایش جذب مواد معدنی و بهبود تغذیه‌ی گیاه می‌تواند منجر به افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌ها از جمله تنش خشکی و شوری شود (Hajipoor et al., 2015). این قارچ متعلق به خانواده بازیدیومیست‌ها (Basidiomycete) است و عملکردی مشابه با قارچ مایکوریز آریسکولار دارد، به‌طوری که می‌تواند به درون سلول‌های ریشه نفوذ کند (Waller et al., 2005) که قادر به همزیستی با ریشه‌ی اکثر گیاهان بوده و می‌تواند در فضای بین سلولی ریشه رشد کرده و سبب تحریک مقاومت سیستمیک در گیاهان همزیست خود شود. *S. indica* از طرق مختلفی چون تحریک سیستم ایمنی گیاه، بهبود جذب آب و مواد غذایی امکان رشد بیشتر گیاه را فراهم می‌کند و امکان کشت را در طی تنش‌های زیستی و غیرزیستی سبب می‌شود (Gill et al., 2016; Waller et al., 2005; Yaghoubian et al., 2013; Zolfaghari et al., 2014). والر و همکاران (Waller et al., 2005) عنوان کردند که استفاده از ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرها به‌سبب کاهش ورود مواد شیمیایی به محیط زیست روشی قدرتمند برای کشاورزی پایدار محسوب می‌گردد، به‌همین علت به بررسی پتانسیل قارچ *S. indica* بر روی القای مقاومت سیستمیک به بیماری‌های قارچی و ایجاد تحمل نسبت به تنش شوری در گیاه جو پرداختند و به این نتیجه رسیدند که با هم‌زیستی قارچ مذکور با ریشه‌ی گیاه جو، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌دنبال فعال شدن چرخه‌ی گلوکاتایون-آسکوربات سبب افزایش عملکرد دانه و بالا رفتن تحمل گیاه می‌گردد. والر و همکاران (Waller et al., 2005) در مطالعه‌ی خود به‌عنوان نتیجه‌ی نهایی بیان داشتند که قارچ *S. indica* می‌تواند جهت افزایش مقاومت و بالا بردن عملکرد گیاه مورد استفاده قرار گیرد. خالوندی و همکاران (Khalvandi et al., 2017) با مطالعه‌ی تأثیر قارچ *S. indica* بر بعضی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه نعنای فلفلی در تنش شوری (در چهار سطح ۰، ۳، ۶ و ۹ ds/m) بیان داشتند که همزیستی قارچ *S. indica* با ریشه گیاه نعنای فلفلی افزایش آنتوسیانین (۱۷ درصد) و فلاونوئید (۳۲ درصد) را در مقایسه با تیمار گیاهان شاهد موجب شد و منجر به تعدیل اثرات منفی تنش شوری بر صفاتی چون عملکرد اسانس، وزن خشک، هدایت روزنه‌ای و محتوای



شکل ۱- مسیر MEP که منجر به تشکیل گلیکوزیدهای استویول در گیاه *Stevia rebaudiana* Bertoni می‌شود (Kumar et al., 2012; Modi et al., 2014). در مطالعه حاضر بیان نسبی ژن‌های مشخص شده با رنگ قرمز، مورد ارزیابی قرار گرفت.

Figure 1. The MEP pathway involved in the biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert. (Kumar et al., 2012; Modi et al., 2014). The current study assesses the relative expression levels of the genes highlighted in red.

از آنجا که هر گونه افزایش در ساخت مواد قندی استویا راه‌حلی کارا جهت افزایش عملکرد در زمین‌های کم‌بازده بوده و از نظر اقتصادی دارای اهمیت است، مطالعه حاضر به ارزیابی تأثیر همزیستی قارچ مذکور بر تغییر الگوی بیان نسبی ژن کدکننده آنزیم‌های دوئوکسی‌زیلوز ۵-فسفات سینتاز (DXS)، ۲-سیفسو سیاتیدیل ۲-متیل اریتریتول سینتاز (CMS)، ۲-متیل اریتریتول ۲ و ۴ سیکلودیفسفات سینتاز (MCS)، ۴-هیدروکسی ۲-متیل بوت-۲-انیل دیفسفات سینتاز (HDS)، ۴-هیدروکسی ۳-متیل بوت-۳-انیل دیفسفات سینتاز (GGDPs) و ژرانیل دیفسفات سینتاز (GGDPs) که ژن‌های ابتدای مسیر سنتز استویوزید هستند با در نظر گرفتن ژن اکتین به‌عنوان ژن مرجع، پرداخت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه‌ها و اعمال تیمار: نشاهای استویا از شرکت گل‌ساران شمال، تهیه و طی مدت زمان یک هفته برای انجام مرحله سازگاری، به گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی خاک، کوکویت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ منتقل شدند. در هر گلدان سه نشاء کشت شد و گلخانه با دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری شدند. پس از گذشت مدت زمان تقریبی یک ماه و

سدمیم، فسفر و پتاسیم برگ گردید، به گونه‌ای که در تیمار همزیستی قارچ و شوری ۹ ds/m، فنل کل برگ ۳۷ درصد و عملکرد اسانس ۸۰ درصد نسبت به گیاهان تیمار شاهد افزایش نشان داد. محققین در نتیجه‌گیری مطالعه مذکور عنوان کردند که همزیستی قارچ *P. indica* با ریشه‌های گیاه دارویی نفع‌افزایی علاوه‌بر تحریک سنتز ترکیبات فنولیک و اسانس آن، با افزایش جذب فسفر و پتاسیم کاهش آثار تنش شوری را نیز موجب می‌شود (Khalvandi et al., 2017). تأثیر قارچ *S. indica* در کاهش اثرات نامطلوب سمیت کادمیوم بر روی استویای تکثیر شده از طریق کشت‌بافت مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج تجزیه رگرسیون با افزایش غلظت کادمیم در تیمار عدم تلقیح با قارچ، در میان صفات اندام هوایی، وزن خشک ساقه بیشترین کاهش را نشان داد. به‌علاوه بهبود وزن خشک ریشه در گیاهچه‌های هم‌زیست شده مشاهده گردید. در میان صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده، سطح برگ با کاهش ۹۶ درصدی بیشترین حساسیت را با افزایش غلظت کادمیم نشان داد، اما در شرایط تلقیح قارچ درصد برگ سبز (حدود ۵۱ درصد کاهش) مقاوم‌ترین صفت نسبت به تنش کادمیم بود. همزیستی قارچی نسبت به عدم همزیستی، کاهش محتوی کارتونوئید از ۷۷ درصد به ۴۰ درصد و کلروفیل a/b از ۳۷ درصد به ۱۱ درصد را در پی داشت. محققان مطالعه مذکور عنوان کردند که همزیستی با قارچ *S. indica* در سطوح پایین کادمیم احتمالاً از طریق کاهش غلظت پراکسید هیدروژن، افزایش نسبی تحمل به تنش در گیاهان هم‌زیست شده نسبت به گیاهان شاهد را به‌دنبال داشته است (Salami-Tamali et al., 2019).

علت ساخت مواد گلیکوزیدی در استویا به‌درستی روشن نیست اما این فرضیه وجود دارد که ترکیبات حاضر نقش دفاعی در گیاه داشته باشند (Moradi Peynevandi et al., 2014)، به‌همین سبب احتمال می‌رود که همزیستی قارچ *S. indica* علاوه‌بر بهبود شرایط تغذیه‌ای و رشدی استویا به‌سبب نقشی که در فعال شدن سیستم دفاعی گیاهان دارد، بتواند افزایش تولید گلیکوزیدهای استویا را نیز به‌همراه داشته باشد (Seraj et al., 2016). مسیر متیل‌اریتریتول ۴-فسفات (4-Methylerythritol phosphate, MEP) به سنتز گلیکوزیدهای استویول در استویا منجر می‌شود (شکل ۱).

قبل از سنتز cDNA، هضم DNA احتمالی استخراج شده همراه نمونه‌ها با تیمار آنزیمی *DNase I* (سیناکلون- Cat. No. MO5401) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد.

طراحی آغازگرها، انجام واکنش Real time-PCR و آنالیز نتایج حاصل: طراحی آغازگرها در سایت Primer 3 plus انجام گردید. اطلاعات مربوط به توالی و طول قطعات تکثیری در جدول ۱ قابل مشاهده است. به منظور یافتن بهترین دمای اتصال آغازگرها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در شیب دمایی ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از تعیین دمای بهینه، واکنش Real time-PCR با استفاده از کیت سایبرگرین New England Biolabs و شماره کاتالوگ M3003S، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با سه تکرار زیستی و سه تکرار فنی و در شرایط شرایط واکنش 95°C به مدت ۱۰ و ۴۰ چرخه شامل 95°C به مدت ۲۰s، 60°C مدت ۲۰s و 72°C به مدت ۲۰s، انجام شد. داده‌های واکنش Real time-PCR با استفاده از روش اختلاف در چرخه آستانه ($\Delta\Delta\text{CT}$)، در نرم‌افزار REST تجزیه و تحلیل و نتایج بیان نسبی ژن‌ها محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl et al., 2002).

نتایج و بحث

چهارده روز پس از مایه‌زنی ریشه گیاهچه‌های استویا با قارچ *S. indica*، همزیستی قارچ با ریشه، با میکروسکوپ نوری به روش ویرهیلیگ و همکاران (Vierheilg et al., 1998) مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).

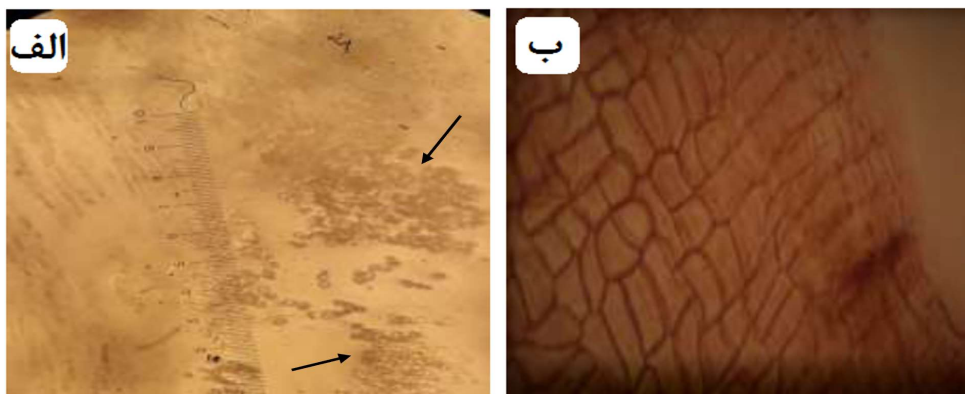
رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۱۲-۱۰ برگی، مایه‌زنی گیاهچه‌ها با قارچ *S. indica* تهیه شده از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صورت گرفت. برای این منظور خاک اطراف ریشه کنار زده شد و یک گرم از دانه‌های جوی حاوی اسپور قارچ در نزدیکی ریشه قرار داده شد (Abdul-Khaliq and Alam, 2002). پس از گذشت ۱۴ روز از مایه‌زنی، نمونه‌برداری از بافت ریشه و پنج برگ بالایی هر ساقه، صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی بافت ریشه، استخراج RNA و سنتز cDNA: به منظور تأیید همزیستی قارچ با ریشه گیاه، چهار گیاهچه به صورت تصادفی انتخاب شدند، پس از خارج کردن ریشه از خاک، بافت ریشه به خوبی شسته شد و به قطعات یک سانتی‌متری برش داده شد. قطعات به روش ویرهیلیگ و همکاران (Vierheilg et al., 1998) با میکروسکوپ و بزرگ‌نمایی X ۴۰-۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تأیید همزیستی، استخراج RNA کل از برگ گیاه با استفاده از کیت Super RNA Extraction شرکت یکتا تجهیزآزما به شماره کاتالوگ YT9080 از ۰/۱ گرم بافت پودر شده برگی، انجام شد. پس از بررسی کمیت و کیفیت آن با دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد، سنتز cDNA با کیت سنتز رشته اول cDNA شرکت New England Biolabs (به شماره کاتالوگ E6300S)، از ۵۰۰ نانوگرم RNA با استفاده از آغازگر الیگو dt در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در واکنش qRT-PCR

Table 1. Sequences of Forward and Reverse Primers used in the qRT-PCR Reaction

نام ژن Gene name	توالی آغازگر (۳'-۵')	شماره دسترسی Accession number	طول قطعه تکثیرشده (bp) PCR Product (bp)
<i>Dxs</i>	F: GGTTCCCAAGAGGCAATG R: CCGTATCCAATATCGCAAC	KT276232.1	121
<i>Cms</i>	F: ACTTGGTGTCTCTGCTAAA R: TTGATGACCTGTGGAGTTTG	DQ269452.4	111
<i>Mcs</i>	F: ATGGCTACTTCTTCGTCGTG R: AATGGGAGAGCGTCTGTTG	DQ631427.3	120
<i>Hds</i>	F: CAGGATGGTCTTGGTGATAC R: CCACGCCCTTGTTGAATTTG	DQ768749.4	121
<i>Hdr</i>	F: GGGAGAAACAGAGGAAATTGG R: GTCGTTCTTGAGTAGCATCAC	DQ269451.4	122
<i>Ggdps</i>	F: CAATAAGCCACAAGGTGTACG R: TCGGACGATCCTGTCTTTG	DQ432013.3	122
<i>Actin</i>	F: TCTGTTCCAACCGTCTTTG R: CCACTGAGCACGATGTTAC	AF548026.1	123



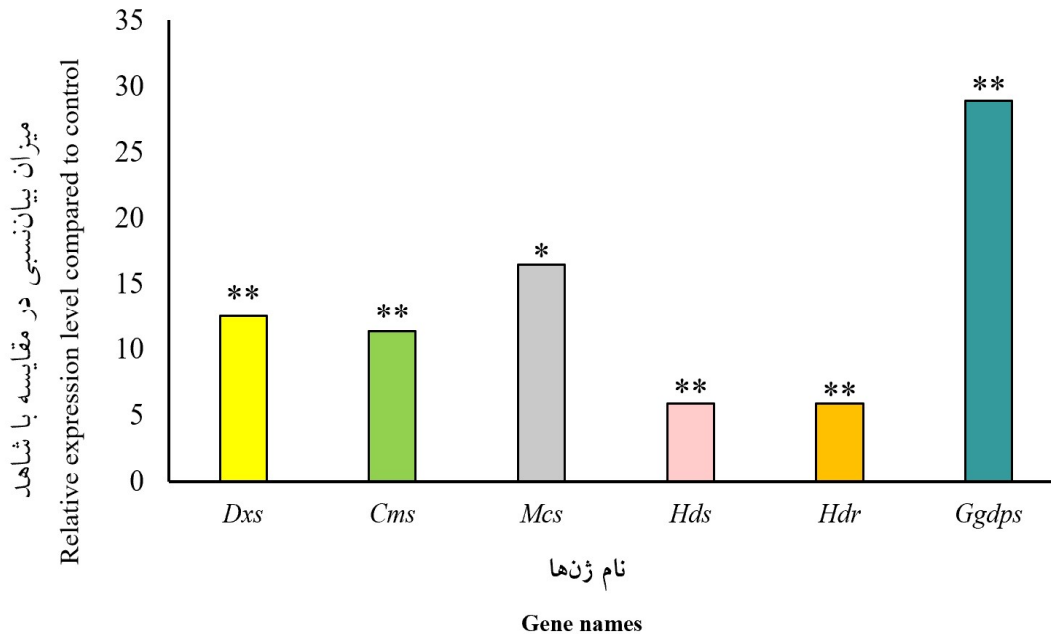
شکل ۲- برش عرضی ریشه گیاه استویا. الف) ریشه گیاه شاهد و ب) ریشه گیاه تیمار شده با قارچ *S. indica*. فلش های سیاه رنگ حضور اسپورهای قارچ در ریشه گیاهان را نشان می دهد

Figure 2. Cross-section of the root of the Stevia plant. A) Root of the control plant; B) Root of Stevia seedlings treated with the fungus *S. indica*

به گونه‌ای که با افزایش میزان بیان این ژن، مقدار ایزوپروپونوئیدها گیاه افزایش و با سرکوب بیان آن، مقدار ترکیب مورد نظر کاهش می‌یابد (Estévez et al., 2001). بر اساس ارتباط بین میزان رونویسی ژن *Dxs* و فرآورده ایزوپروپونوئیدی و مقدار فسفات ایزوپنتیل (Isopentyl Phosphate, IPP) به‌عنوان پیش‌ساز تولید ایزوپروپونوئیدها در پلاستید، مشخص شد که ژن *Dxs* می‌تواند نقش بسزایی در فرآورده‌های تولید شده در مسیر MEP داشته باشد. در پژوهش حاضر اعمال تیمار همزیستی قارچ *S. indica* بر ریشه گیاهچه‌های استویا افزایش بیان نسبی ژن *Dxs* را به‌دنبال داشت. استوز و همکاران (Estévez et al., 2001) در مطالعه خود بیان داشتند که میان تغییرات میزان رونویسی از ژن *Dxs* با میزان ایزوپروپونوئیدها موجود در برگ گیاه، ارتباط مستقیم وجود دارد، بر این اساس می‌توان چنین عنوان داشت که افزایش در میزان بیان نسبی ژن *Dxs* در گیاهچه‌های تحت تیمار قارچی، می‌تواند منجر به افزایش میزان استویل به‌عنوان یک پرونوئید گردد. در بررسی نقش ژن *Dxs* در گیاه *Salvia miltorrhiza* که نوعی سالویا با خاصیت دارویی و از خانواده نعنائیان محسوب می‌شود، مشخص شد که کاربرد تیمار متیل‌جاسمونات، میزان بیان ژن *Dxs* را افزایش داده و به طبع در بیوسنتز تانشینون (*Tanshinone*) که ترکیبی دی‌تریپنی است مؤثر بوده و موجب افزایش آن گردید. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که بین میزان رونویسی از ژن *Dxs* و میزان متابولیت ثانویه‌ای چون تانشینون ارتباط مستقیم وجود دارد (Yang et al., 2012).

پس از اطمینان از همزیستی قارچ با ریشه گیاه، بیان نسبی ژن‌های مسیر بیوسنتز گلیکوزید استویول مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مسیر آبشاری، فعالیت پانزده ژن حائز اهمیت هستند. به‌طور معمول ژن آغازین در مطالعات مرتبط با ترکیبات تریپنوئیدی ژن کدکننده آنزیم دئوکسی‌زایلوز ۵- فسفات‌سیناز (*DXS*) است که تولید ۴- هیدروکسی دی- زایلوز ۵- فسفات را بر عهده دارد، این ژن نخستین ژن در مسیر ۱۵ ژنی یاد شده است (شکل ۱). فرآورده‌های مسیر بیوسنتز گلیکوزید استویول در مراحل پایانی مسیر، با فعالیت آنزیم‌های سنتز شده از ژن‌های *Ugt* ایجاد می‌شوند و به‌طبع تغییر در بیان هر یک از ژن‌های مسیر قادر خواهد بود بر بیان ژن‌های پایین‌دست و فرآورده‌های پایانی (استویوزید و ربادیوزید) اثرگذار باشد.

بیان نسبی شش ژن ابتدایی مسیر (*Hds*, *Mcs*, *Cms*, *Dxs*), *Hdr* و *Ggdps*- ترتیب اسامی با در نظر گرفتن ترتیب قرار گرفتن در مسیر MEP است) در اثر اعمال تیمار قارچ *S. indica* به روش اختلاف در چرخه آستانه ($\Delta\Delta CT$) و استفاده از ژن اکتین به‌عنوان ژن مرجع، محاسبه شد. نکته جالب توجه افزایش بیان هر شش ژن در مقایسه با تیمار شاهد بود. در ارزیابی الگوی تغییرات بیان نسبی ژن‌ها به‌صورت جداگانه، مشخص شد که بیان ژن دئوکسی‌زایلوز ۵- فسفات‌سیناز (*Dxs*) در گیاهچه‌های استویا تیمار شده با قارچ *S. indica* به میزان ۱۲/۱ برابر بیش‌تر از تیمار شاهد بود (شکل ۳). بررسی نقش این ژن در مقدار ایزوپروپونوئیدها در گیاهان تراریخته نشان داد که تغییر در سطح رونویسی ژن *Dxs* با تغییر مقدار ایزوپروپونوئیدها، هم‌سو است.



شکل ۳- تأثیر قارچ *S. indica* بر میزان بیان نسبی شش ژن ابتدایی در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول گیاه استویا. ** معنی‌داری افزایش بیان نسبی ژن را با سطح ۹۹ درصد و * معنی‌داری افزایش بیان نسبی ژن را با سطح اطمینان ۹۵ درصد را نشان می‌دهد.

Figure 3. Effect of *Serendipita indica* on the transcriptional levels of six genes involved in the initial steps of the stevioside glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. ** and * indicate a statistically significant increase in relative gene expression at the 99% and 95% confidence levels, respectively.

گره‌های زودرس را در گیاهان تیمار شده ایجاد کرد و میزان رونوشت ژن‌های موجود در مسیر بیوسنتزی MEP، از جمله ژن *Cms* افزایش یافت. مشخص شده‌است که سنتز پیش‌ماده تولید فیتوالکسین‌ها (Phytoalexins) در گیاه برنج در مسیر MEP رخ می‌دهد (Okada et al., 2007) و این تصور ایجاد می‌شود که در پژوهش حاضر نیز کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ *S. indica* به‌عنوان الیستور عمل کرده و موجب افزایش بیان ژن‌های مسیر MEP از جمله ژن *Cms* شده است. آنزیم ۴- هیدروکسی ۳- متیل بوات- ۲- انیل دی‌فسفات سینتاز (HDS)، پیش‌ماده تولید شده در اثر فعالیت آنزیم MCT را به ۴- هیدروکسی ۲- متیل ۲- بوتنیل - ۴- دی‌فسفات تبدیل می‌کند، ژن کدکننده این آنزیم نیز در مسیر بیوسنتزی MEP حضور دارد و همچون ژن‌های موجود در این مسیر آبشاری، تغییر در الگوی بیان آن می‌تواند بر مقدار فرآورده پایانی مسیر (استویوزید و ربادیوزید) مؤثر باشد (Mirzaei et al., 2022; Rahmani et al., 2024). ارزیابی میزان بیان نسبی ژن *Hds* در اثر همزیستی با قارچ *S. indica*، چهارده روز پس از اعمال تیمار قارچی نیز افزایش بیان (۵/۸۸) را نسبت به تیمار

با توجه به افزایش میزان بیان نسبی ژن *Dex* در گیاهچه‌های استویا تحت تیمار قارچ *P. indica* نسبت به گیاهچه‌های شاهد در پژوهش حاضر و داشتن ارتباط میان تغییرات بیان این ژن با فرآورده‌های نهایی، انتظار افزایش در میزان ماده موثره گیاه استویا، استویول، استویوزید و ربادیوزید می‌رود. دیگر ژن موجود در مسیر MEP، ژن ۴-سایتیدین ۵-دی‌فسفو ۲-متیل‌اریتریتول‌سینتاز (*Cms*) است که در واقع پیش‌ماده تولید ۲-متیل‌اریتریتول ۴، ۲ سیکلودی‌فسفات می‌باشد (Narayanasamy et al., 2010; Yousefi et al., 2025). همچنین فرآورده ژن ۲-متیل‌اریتریتول ۴، ۲ سیکلودی‌فسفات سینتاز (*Mcs*) نیز در مسیر تولید ایزوپروپونوئید پیش‌ماده‌ای برای فعالیت آنزیم ۴-هیدروکسی ۳-متیل بوات- ۲-انیل دی‌فسفات‌ریدوکتاز (HDR) است (Herz et al., 2000) و ژن کدکننده پنجمین آنزیم در مسیر MEP می‌باشد. میزان بیان نسبی ژن‌های *Cms* و *Mct* در بافت برگ گیاهچه‌های استویا چهارده روز پس از تیمار با قارچ *S. indica*، به ترتیب ۱۱/۳۳ و ۱۶/۴۵ برابر افزایش را نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ۳). استفاده از کیتین در گیاه برنج،

شاهد نشان داد. مطالعه ژن‌های کلیدی مسیر MEP در جلبک اقتصادی *Pyropia haitanensis*، نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *Hds* متأثر از نور، دما، شوری، تیمار متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بوده و در مواجهه با این تنش‌ها و ایستورها افزایش می‌یابد. این افزایش بیان نسبی در نهایت منجر به افزایش میزان تولید ایزوترپنوئیدها در جلبک شد (He et al., 2017). چنین به نظر می‌رسد که کاربرد تیمار قارچ *S. indica* شبیه به تأثیر متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک، نقش ایستور داشته و افزایش بیان ژن *Hds* را سبب شده است که با نتایج حاصل از مطالعه هی و همکاران (He et al., 2017) مطابقت دارد.

آنزیم ۴- هیدروکسی-۳- متیل‌بوات-۲- انیل دی- فسفات‌ریدوکتاز (HDR) در بیوستز ترکیبات ایزوپرنوئیدهای پلاستییدی نقشی مهم ایفا می‌کند (Singh et al., 2017). بررسی میزان بیان نسبی ژن کدکننده این آنزیم در مطالعه حاضر، افزایش بیان ۵/۸۹ برابری را در گیاهچه‌های تیمار شده با قارچ *S. indica* نسبت به گیاهچه‌های تیمار شاهد، نشان داد. مطالعه این ژن در گیاه *Artemisia annua* نشان داد که افزایش و کاهش بیان ژن *Hdr* موجب افزایش و کاهش میزان آرتمیسینین (Artemisinin) می‌گردد. در نظر گرفتن این نکته که آرتمیسینین مانند استویول ترکیبی ایزوترپنوئیدی است و افزایش بیان ژن *Hdr* رابطه مستقیمی با افزایش میزان تولید آن داشته است (Ma et al., 2017) می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش یا کاهش در بیان ژن *Hdr* در تغییر میزان فرآورده‌های مرتبط با این مسیر (صرف نظر از تفاوت در استویول یا آرتمیسینین) مؤثر باشد؛ بنابراین انتظار می‌رود که تیمار قارچی *S. indica* افزایش بیان این ژن و در نهایت افزایش میزان استویول در استویا را به همراه داشته باشد.

آنزیم ایزوپنتیل‌دی‌فسفات‌ایزومراز (GGDPS)، پیش‌ماده عمومی برای همه‌ی ترکیبات با پایه دی‌ترین را فراهم می‌کند (Mirzaei et al., 2022; Singh et al., 2017). در مطالعه ما میزان رونویسی ژن ایزوپنتیل‌دی‌فسفات‌ایزومراز (*Ggdps*) در گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica*، به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش (۲۸/۸۷) نشان داد. بررسی تأثیر متیل جاسمونات در گیاه توتون افزایش بیان ژن *Ggdps* را نشان داد. این ژن در گیاه یکی از ژن‌های کلیدی در تولید سولانسول

(Solanesol) است. سولانسول‌ترین‌الکی بدون ساختار حلقوی است که در مسیر MEP و در پلاستید تولید می‌شود. نتایج تحقیقات یان و همکاران (Yan et al., 2017) نشان داد که اعمال تیمار متیل جاسمونات به مقدار قابل‌توجهی باعث افزایش میزان بیان ژن *Ggdps* می‌شود (Yan et al., 2017). در پژوهش حاضر به‌نظر می‌رسد که استفاده از تیمار قارچ *S. indica* همچون تیمار متیل جاسمونات اثر ایستوری داشته و موجب افزایش بیان ژن *Ggdps* به‌عنوان ژنی مهم در مسیر MEP شده است. در پژوهش کمپبل و همکاران (Campbell et al., 2016) بیش‌بیان ژن *Ggdps* از گیاه سیب‌زمینی در توتون که موجب افزایش قابل‌توجهی در مقدار سولانسول شد و این فرضیه را پررنگ می‌کند که ژن *Ggdps* ژنی کلیدی در بیوستز تروپنوئیدهایی چون استویول و سولانسول است. میزان بیان نسبی ژن *Ggdps* در اثر تیمار قارچ *S. indica* در پژوهش حاضر، در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش بیان نشان داد. با توجه به این‌که تیمار با قارچ *S. indica* باعث افزایش میزان ماده مؤثره استویول در گیاه استویا می‌شود (Zare et al., 2015)، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این قارچ هم‌سو با افزایش بیان نسبی ژن‌های مسیر و افزایش در مقدار استویوزید و ربادیوزید نیز را سبب گشته که هم‌راستا با پژوهش حاضر و تحقیقات پیشین است. در مسیر بیوستزی استویول گلیکوزید، ژن‌های *UGT74G1* و *UGT76G* دو ژن پایانی در مسیر تولیدکننده استویوزید و ربادیوزید می‌باشند. در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف مانیتول بر تغییرات بیان ژن‌های این مسیر و مقدار فرآورده پایانی مسیر در کشت‌بافت استویا صورت گرفت، مشخص گردید که غلظت ۲۰ و ۳۰ گرم بر لیتر مانیتول، به‌ترتیب افزایش بیان نسبی ژن‌های *UGT74G* و *UGT76G* را سبب شده است و همچنین مقدار استویول گلیکوزید در این تیمار و ربادیوزید در تیمار ۳۰ گرم در لیتر مانیتول، افزایش نشان داده است (Ghaheiri et al., 2019). به‌طور کلی و همان‌گونه که پیش‌تر بیان شد ژن‌های پژوهش حاضر در مسیر MEP در کلیه ترکیبات با پایه ترپنوئید نقش ایفاء می‌کنند، در مطالعات دیگر کل مسیر ترپنوئیدی و از جمله شش ژن مورد بررسی در پژوهش حاضر، در سایر گیاهان از جمله زنیان (Soltani et al., 2018)، پروانش (Howyzeh et al., 2022) و

به‌طور کلی همزیستی قارچ *S. indica* با ریشه‌ی گیاهچه‌های استویا افزایش بیان نسبی شش ژن ابتدایی در مسیر MEP (*Ggtps* و *Hdr*, *Hds*, *Mcs*, *Cms*, *Dxs*) را در مقایسه با تیمار شاهد، به‌دنبال داشت. انتظار می‌رود افزایش بیان هر یک از ژن‌های موجود در مسیرهای بیوسنتز بر مقدار نهایی فرآورده پایانی مسیر، اثرگذار باشد، با توجه به افزایش در بیان هر شش ژن ابتدایی مسیر آبشاری بیوسنتزی گلیکوزیدی استویول، به‌نظر می‌رسد که اعمال تیمار قارچی *S. indica* و همزیستی ریشه گیاهچه‌های استویا با قارچ، علاوه‌بر افزایش بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در نهایت بتواند موجب افزایش در فرآورده نهایی (استویوزید و ربادیوزید) نیز گردد.

سپاسگزاری

به این وسیله از همکاری آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در راستای کمک به اجرای این پژوهش، قدردانی می‌گردد.

زیره (Samandari-Bahraseman *et al.*, 2025) مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مطالعات مربوط به گیاه استویا نیز تغییر در ژن‌های این مسیر، بر مقدار فرآورده پایانی استویول و ربادیوزید مؤثر بوده است (Fallah *et al.*, 2017; Ghaheri *et al.*, 2019). بر این اساس و صرف نظر از نوع محرک یا تنش به‌کار رفته، مشخص شده است که در مسیرهای آبشاری چون مسیر MEP تغییر در بیان هر یک از ژن‌های بالادستی، در نهایت موجب تغییر در بیان ژن‌های پایین‌دست و فرآورده پایانی مسیر می‌گردد (Noormohammadi *et al.*, 2023; Soltani *et al.*, 2021; Soltani *et al.*, 2020). بر این اساس چنین به‌نظر می‌رسد که افزایش در شش ژن مورد مطالعه (*Ggtps* و *Hdr*, *Hds*, *Mcs*, *Cms*, *Dxs*) در اثر اعمال تیمار قارچی *S. indica* می‌تواند منجر به افزایش در میزان استویول گردد که با نتایج زراع حسینی و همکاران (Zare Hoseini *et al.*, 2015) نیز مطابقت دارد.

References

- Abdul-Khaliq, G.M. and Alam, M. (2002). Biotechnological Approaches for Mass Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Current Scenario and Future Strategies. *Techniques in Mycorrhizal Studies*, Springer Netherlands: 299-312. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3209-3_16
- Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J. and Mahomoodally, M.F. (2020). Stevia rebaudiana Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 100: 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.030>
- Campbell, R., Freitag, S., Bryan, G.J., Stewart, D. and Taylor, M.A. (2016). Environmental and genetic factors associated with solanesol accumulation in potato leaves. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1263. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01263>
- El-Housini, E.A., Ahmed, M., Hassanein, M. and Tawfik, M. (2014). Effect of salicylic acid (SA) on growth and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) under salt stress. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences CABI Databases*, 14: 275-281 ref. 34.
- Eslahi, N., Kowsari, M., Motallebi, M., Zamani, M.R. and Akbari, S. (2025). Evaluation of Effect of Improved Trichoderma inocula on Flowering and Crop Productivity of Bean. *Plant Genetic Research*, 6(1), 47-54 (In Persian). <https://doi.org/10.29252/pgr.6.1.47>
- Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S. and León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 22901-22909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100854200>
- Fallah, F., Nokhasi, F., Ghaheri, M., Kahrizi, D., Agha, A.B.A., Ghorbani, T., Kazemi, E. and Ansarypour, Z. (2017). Effect of salinity on gene expression, morphological and biochemical characteristics of Stevia rebaudiana Bertoni under in vitro conditions. *Cellular and Molecular Biology*, 63: 102-106. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.7.17>
- Ghaheri, M., Kahrizi, D., Bahrami, G. and Mohammadi-Motlagh, H.-R. (2019). Study of gene expression and steviol glycosides accumulation in Stevia rebaudiana Bertoni under various mannitol concentrations. *Molecular Biology Reports*, 46: 7-16. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4250-4>

- Gill, S.S., Gill, R., Trivedi, D.K., Anjum, N.A., Sharma, K.K., Ansari, M.W., Ansari, A.A., Johri, A.K., Prasad, R. and Pereira, E. (2016). Piriformospora indica: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7: 332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00332>
- Goyal, S., Samsher, N. and Goyal, R. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61: 1-10. <https://doi.org/10.3109/09637480903193049>
- Hajipoor Bagheri, A., Mahdi Sohani, M., Hassani, S.H., Babaiezed, V. and Alavi, S.M. (2015). Symbiotic effect of endophytic fungus Piriformospora indica with rice (*Oryza sativa*) on resistance against Bakanae disease. *Cereal Research*, 5: 219-230 (In Persian).
- He, Y., Yan, Z., Du, Y., Ma, Y. and Shen, S. (2017). Molecular cloning and expression analysis of two key genes, HDS and HDR, in the MEP pathway in *Pyropia haitanensis*. *Scientific Reports*, 7: 17499. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17521-9>
- Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M.H. and Bacher, A. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 2486-2490. <https://doi.org/10.1073/pnas.040554697>
- Khalvandi, M., Amerian, M., Pirdashti, H., Baradaran- Firouzabadi, M. and Gholami, A. (2017). Effects of Piriformospora indica fungi symbiotic on the quantity of essential oil and some physiological parameters of peppermint in saline conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 32: 1-20 (In Persian).
- Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V.K. and Kumar, S. (2012). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492: 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.015>
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, D., Li, G., Zhu, Y. and Xie, D.-Y. (2017). Overexpression and suppression of *Artemisia annua* 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase 1 gene (AaHDR1) differentially regulate artemisinin and terpenoid biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 8: 77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00077>
- Mirzaei, A., Kavooosi, G., Dezhsetan, S. and Behnamian, M. (2022). Metal oxides as a biostimulator for upregulation of genes involved in the biosynthesis of Rebaudioside A. Available at SSRN 4096363. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4096363>
- Modi, A., Litoriya, N., Prajapati, V., Rafalia, R. and Narayanan, S. (2014). Transcriptional profiling of genes involved in steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana bertoni* during plant hardening. *Developmental Dynamics*, 243: 1067-1073. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24157>
- Moradi Peynevandi, K., Sharifi, M. and Behmanesh, M. (2014). Effects of methyl jasmonate, on stevioside and rebaudioside A content and expression of the ent-Kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bert. in vitro. *Iranian Journal of Plant Biology*, 21: 99-110 (In Persian).
- Narayanasamy, P., Eoh, H., Brennan, P.J. and Crick, D.C. (2010). Synthesis of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate and kinetic studies of *Mycobacterium tuberculosis* IspF. *Chemistry & Biology*, 17: 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.01.013>
- Noormohammadi, N., Ismaili, A., Sobhani Najafabadi, A. and Nazarian-Firouzabadi, F. (2023). Transcriptional responses of hypericin and hyperforin to methyl jasmonate elicitation in *Hypericum perforatum*. *Plant Biotechnology Reports*, 17: 229-241. <https://doi.org/10.1007/s11816-022-00794-6>
- Okada, A., Shimizu, T., Okada, K., Kuzuyama, T., Koga, J., Shibuya, N., Nojiri, H. and Yamane, H. (2007). Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 65: 177-187. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9207-2>
- Peteliuk, V., Rybchuk, L., Bayliak, M., Storey, K.B. and Lushchak, O. (2021). Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI Journal*, 20: 1412.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30: e36-e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>

- Rahmani, A.F., Sakandari, M.N., Mirzaei, A. and Uçar, E. (2024). Investigating the Physiological Responses and the Expression of Effective Genes in Steviol Glycosides Production in Stevia (*Stevia rebaudiana*). *Agrotechniques in Industrial Crops*, 4: 126-133.
- Raina, R., Bhandari, S.K., Chand, R. and Sharma, Y. (2013). Strategies to improve poor seed germination in Stevia rebaudiana, a low calorie sweetener. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 1793-1799.
- Salami-Tamali, N., Pirdashti, H., Yaghoobian, Y. and Ghasemi-omran, V. (2019). Response of morphophysiological parameters and antioxidants system of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) medicinal plant to inoculation of *Piriformospora indica* under cadmium stress. *Journal of Plant Process and Function*, 8: 85-101 (In Persian).
- Samandari-Bahraseman, M.R., Hajibarati, M., Khorsand, B., Soltani, N., Esmacilzadeh-Salestani, K. and Loit, E. (2025). Deciphering the biosynthesis pathway of gamma terpinene cuminaldehyde and para cymene in the fruit of *Bunium persicum*. *Scientific Reports*, 15: 22438. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-05415-0>
- Sardesai, V.M. and Waldshan, T.H. (1991). Natural and synthetic intense sweeteners. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2: 236-244. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(91\)90081-F](https://doi.org/10.1016/0955-2863(91)90081-F)
- Seraj, F., Pirdashti, H., Yaghoobian, Y. and Ghasemi-omran, V. (2016). The effect of *Piriformospora indica* inoculation on salt and drought stress tolerance in Stevia Rebaudiana under in vitro conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 8: 1-20 (In Persian).
- Singh, G., Singh, G., Singh, P., Parmar, R., Paul, N., Vashist, R., Swarnkar, M.K., Kumar, A., Singh, S. and Singh, A.K. (2017). Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in Stevia rebaudiana Bert. *Scientific Reports*, 7: 11835. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12025-y>
- Soltani Howyzeh, M., Sadat Noori, S.A., Shariati J, V. and Amiripour, M. (2018). Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant *Trachyspermum ammi* L. *Scientific Reports*, 8: 13405. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31618-9>
- Soltani, N., Firouzabadi, F.N., Shafeinia, A., Shirali, M. and Sadr, A.S. (2021). Expression analysis of some genes involved in Terpenoid Indole Alkaloids pathway in periwinkle (*Catharanthus roseus*) following foliar application of salicylic acid. *Modern Genetics Journal*, 16: 25-32 (In Persian).
- Soltani, N., Firouzabadi, F.N., Shafeinia, A., Shirali, M. and Sadr, A.S. (2022). De Novo transcriptome assembly and differential expression analysis of *Catharanthus roseus* in response to salicylic acid. *Scientific Reports*, 12: 17803. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20314-4>
- Soltani, N., Nazarian-Firouzabadi, F., Shafeinia, A., Sadr, A.S. and Shirali, M. (2020). The expression of Terpenoid Indole Alkaloid (TIAs) pathway genes in *Catharanthus roseus* in response to salicylic acid treatment. *Molecular Biology Reports*, 47: 7009-7016. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05759-y>
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U. and Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 5004-5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.5004-5007.1998>
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C. and Von Wettstein, D. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 13386-13391. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504423102>
- Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D. and Ahuja, P.S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91: 1-27. <https://doi.org/10.4141/cjps10086>
- Yaghoobian, Y., Goltapeh, E.M., Pirdashti, H., Esfandiari, E., Feiziasl, V., Dolatabadi, H.K., Varma, A. and Hassim, M.H. (2014). Effect of *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* on growth and antioxidant defense responses of wheat plants under drought stress. *Agricultural Research*, 3: 239-245. <https://doi.org/10.1007/s40003-014-0114-x>
- Yan, N., Liu, Y., Zhang, H., Du, Y., Liu, X. and Zhang, Z. (2017). Solanesol biosynthesis in plants. *Molecules*, 22: 510. <https://doi.org/10.3390/molecules22040510>
- Yang, D., Ma, P., Liang, X., Wei, Z., Liang, Z., Liu, Y. and Liu, F. (2012). PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 146: 173-183. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01603.x>

- Yousefi, F., Mashhadi, A.A., Lotfi Jalal Abadi, A., Shafeinia, A., Jalily, S. and Soltani, N. (2025). Evaluation of the expression pattern of TIAs pathway genes in response to tryptophan amino acid treatment and drought stress in *Catharanthus roseus*. PLoS One, 20: e0333313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0333313>
- Zare Hoseini, R., Mohammadi-Goltapeh, E., Kalatejari, S. and Dehghani Mashkani, M. (2015). Effect of vermicompost and fungi inoculation on growth characteristics and steviosid content of *Stevia rebaudiana* Bert. Journal of Medicinal Plants, 14: 179-188 (In Persian).
- Zolfaghari, M., Nazeri, V., Sefidkon, F. and Rejali, F. (2013). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of *Ocimum basilicum* L. Iranian Journal of Plant Physiology, 3: 650-643.