

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی فاسلہ

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی

بررسی اثر براسینواستروئید بر بیوسنتز دایوسجنین  
در گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)  
تحت شرایط تنش دمایی بالا

نگارنده: شہلا شیخی

اساتید راهنما:

دکتر امین ابراہیمی

دکتر پرویز حیدری

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا عامریان

شہریور ۹۸

تقدیم بہ:

تقدیم بہ:

روح پاک پدرم کہ عالمذہب من آموخت تا چگونہ در عرصہ زندگی، استادگی را تجربہ نمایم.

تقدیم بہ:

روح پاک خواہر مہربانم کہ یادش ہموارہ با من ہمراہ بودہ و ہست.

تقدیم بہ:

استاد فریختہ ام جناب آقای دکتر امین ابراہیمی کہ در راہ کسب علم و معرفت مراری نمودند.

و این پایان نامہ را تقدیم می نمایم بہ:

خانوادہ بزرگ، مہربان و دلسوزم و بہچنین ہمسرم کہ ہموارہ در تمامی مراحل زندگی ہمراہ، مشوق و پشتیبانم بودہ اند.

## مشکر و قدردانی:

خداوند بزرگ را شکر گزارم که لطف و عنایت خویش را به من عطا فرمود و موفقیت را در اتمام این مقطع تحصیلی و ارتقای سطح دانش ام ارزانی داشت. از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر امین ابراهیمی که در راهنمایی این پایان نامه مرایاری نمودند صمیمانه شکر می‌نمایم. از راهنمای دومم، جناب آقای دکتر پرویز حدیری که همواره از ایشان آموختم، قدردانی بسیار می‌نمایم و همچنین از سرکار خانم دکتر مهدیه پارسایان نیز کمال شکر را دارم.

با تقدیر و درود فراوان خدمت خانواده ام و همسرم که همواره پشتیبانم بوده‌اند و صبر و سکینایی را به من هدیه نموده‌اند. با شکر خالصانه خدمت کارشناس آزمایشگاه جناب مهندس مطهری نژاد، دوستان و تمامی کسانی که به نوعی مراد به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند.

سهلا شیخی

شهریور ۱۳۹۸

## تعمدنامه

اینجانب شهلا شیخی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی اثر براسینواستروئید بر بیوسنتز دایوسجنین در گیاه سنبليله (*TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.*) تحت شرایط تنش دمایی بالا راهنمائی دکتر امین ابراهیمی و دکتر پرویز حیدری متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ: ۱۳۹۸/۷/۷

امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .  
استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

شنبليله گیاهی دارویی و زمستانه، حاوی مقادیر زیادی از ماده مؤثره دایوسجنین می‌باشد. دایوسجنین، ساپوچنینی استروئیدی و یکی از فاکتورهای مهم کیفی در شنبليله به شمار می‌رود، که بصورت گسترده‌ای در صنایع دارویی به عنوان ماده‌ی خام برای تولید داروهای استروئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تحقیق با هدف بررسی اثر اپی براسینواستروئید بر تغییرات بیان برخی از ژن‌های مسیر دایوسجنین و خصوصیات فیزیولوژیک گیاه شنبليله تحت تنش دمایی بالا انجام شد. در این تحقیق از سطوح مختلف اپی براسینواستروئید (۵،۲،۰ و ۱۰ ppm)، همچنین بازه‌های زمانی ۶ و ۲۴ ساعت و تنش دمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دو توده بوشرویه (با دایوسجنین بالا) و همدان (دایوسجنین پایین) از گیاه شنبليله استفاده گردید. نتایج نشان داد، که الگوی بیان ژن *CAS* در هر دو توده یکسان است. بیان ژن *SEP* نیز در هر دو توده مشابه ژن *CAS* بود، اگرچه افزایش بیان این ژن در توده همدان بسیار بالاتر از توده بوشرویه بود. الگوی بیان ژن *SMT* نیز در هر دو توده تقریباً از یک روند خاصی برخوردار بود، با این تفاوت که بیان این ژن در توده بوشرویه در زمان اعمال تنش دمایی بالا و سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید تقریباً ۱۷ برابر افزایش یافت. الگوی بیان ژن *SSR* در تیمار دمایی بالا و کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در دو توده متفاوت بود، طوری که بیان این ژن در توده همدان در سطح ۲ ppm نسبت به دمایی نرمال به میزان ۳ برابر افزایش یافت. بیان ژن *SQS* در هر دو توده با کاربرد تیمار دمایی بالا و سطوح مختلف اپی براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت. در مجموع تیمار دمایی طولانی مدت (۲۴ ساعت) نسبت به تیمار دمایی کوتاه مدت (۶ ساعت) به صورت مؤثرتری بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق را افزایش داد. در بخش دیگر این تحقیق، تنش دمایی بالا منجر به کاهش محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید و نشت الکترولیت گردیده و به کار بردن اپی براسینواستروئید در زمان تنش نه تنها مانع از کاهش این صفات شد، بلکه این صفات را نیز را افزایش داد. کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در هنگام تنش دمایی بالا (سطوح ۲ و ۵ ppm)، منجر به کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید و افزایش مقاومت گیاه شنبليله گردید، که احتمالاً به علت کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد. محتوی آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش دمایی بالا افزایش یافت و کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm اپی

براسینواستروئید منجر به افزایش بیشتر سطوح این دو آنزیم تحت شرایط تنش شد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از اپی براسینواستروئید (۲ و ۵ ppm) به عنوان یک محرک مناسب به منظور افزایش مقاومت گیاه شنبلیله به تنش گرما و از همچنین تیمار دمای بالا (مخصوصاً در مدت زمان ۲۴ ساعت) و سطوح مختلف اپی براسینواستروئید (۲ و ۵ ppm) به منظور افزایش بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و متعاقباً افزایش محتوی دایوسجنین استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** اپی براسینواستروئید، دمای بالا، شنبلیله، مالون‌دی‌آلدهید، دایوسجنین و محتوی کلروفیل

## فهرست مطالب

ز	فهرست جدول ها	.....
س	فهرست شکل ها	.....
۱	فصل اول	.....
۱	مقدمه	.....
۲	۱-۱- مقدمه	.....
۵	۱-۲- هدف	.....
۷	فصل دوم	.....
۷	کلیات و مرور منابع	.....
۸	۱-۲- تعریف گیاهان دارویی	.....
۱۱	۲-۲- پتانسیل اقتصادی گیاهان دارویی	.....
۱۱	۳-۲- متابولیت های ثانویه	.....
۱۴	۴-۲- گیاه شناسی شنبلیله	.....
۱۷	۱-۴-۲- پراکنش شنبلیله	.....
۱۷	۲-۴-۲- جوانه زنی، عناصر مورد نیاز و کاشت شنبلیله	.....
۱۸	۵-۲- موارد مصرف شنبلیله	.....
۲۱	۶-۲- ژن های درگیر در مسیر بیوسنتز شنبلیله	.....
۲۱	۱-۶-۲- اسکوالن سنتاز (SQS)	.....
۲۱	۲-۶-۲- اسکوالن اپوکسیداز (SEP)	.....
۲۲	۳-۶-۲- سیکلوآرتنول سنتاز (CAS)	.....
۲۲	۴-۶-۲- استرول متیل ترانسفرازها (SMTs)	.....
۲۳	۷-۲- تنش های زیستی و غیر زیستی	.....
۲۴	۱-۷-۲- تنش دمای بالا	.....
۲۹	۸-۲- هورمون های گیاهی	.....
۳۰	۱-۸-۲- براسینواستروئیدها	.....
۳۱	۹-۲- تجزیه کمی رونوشت	.....



۳۲	۲-۹-۱- اصول روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی
۳۳	۲-۹-۲- نسخه برداری معکوس
۳۳	۲-۹-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی (qRT-PCR)
۳۴	۲-۹-۴- روش‌های ارزیابی کمی
۳۵	۲-۹-۵- منحنی‌های ذوب
۳۶	۲-۹-۶- نرمال‌سازی
۳۷	۲-۹-۷- موارد کنترلی
۳۷	۲-۱۰- مرور منابع
۴۵	فصل سوم
۴۵	مواد و روش‌ها
۴۶	۳-۱- مواد و روش‌ها
۴۶	۳-۲- اندازه‌گیری کلروفیل
۴۷	۳-۳- اندازه‌گیری تحمل به گرما بر اساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی
۴۸	۳-۴- اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون‌دی‌آلدهید (MDA)
۴۹	۳-۵- اندازه‌گیری پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی
۴۹	۳-۵-۱- استخراج پروتئین کل
۵۰	۳-۵-۲- تهیه بافر استخراج
۵۰	۳-۵-۳- رسم منحنی استاندارد پروتئین با آل‌بومین سرم گاوی
۵۰	۳-۵-۳-۱- تهیه محلول بردفورد
۵۰	۳-۵-۳-۲- تهیه محلول استوک
۵۱	۳-۵-۳-۳- تهیه محلول کار
۵۱	۳-۵-۳-۴- اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها
۵۱	۳-۶- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز
۵۲	۳-۷- سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز
۵۴	۳-۸- سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)
۵۴	۳-۹- استخراج RNA
۵۵	۳-۱۰- ساخت cDNA
۵۶	۳-۱۱- طراحی آغازگرها

۵۷	۱۲-۳- بررسی صحت سنتز آغازگرها
۵۸	۱۳-۳- انجام واکنش PCR زمان واقعی
۵۸	۱۴-۳- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها
۵۹	۱۵-۳- تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی
۵۷	فصل چهارم
۵۷	نتایج و بحث
۵۸	۱-۴- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی
۶۶	۲-۴- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی
۶۶	۱-۲-۴- کلروفیل a
۶۸	۲-۲-۴- کلروفیل b
۷۱	۳-۲-۴- کلروفیل کل
۷۳	۴-۲-۴- کارتنوئید
۷۵	۵-۲-۴- نشت الکترولیت
۷۷	۶-۲-۴- محتوی مالون‌دی‌آلدهید
۷۹	۷-۲-۴- پروتئین
۸۱	۸-۲-۴- آسکوربات پراکسیداز
۸۳	۹-۲-۴- کاتالاز
۸۵	۱۰-۲-۴- گایاکول پراکسیداز
۸۷	۳-۴- بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین
۸۷	۱-۳-۴- بیان ژن CAS
۸۹	۲-۳-۴- بیان ژن SSR
۹۱	۳-۳-۴- بیان ژن SEP
۹۴	۴-۳-۴- بیان ژن SMT
۹۶	۵-۳-۴- بیان ژن SQS
۹۸	۴-۴- بحث
۹۸	۱-۴-۴- محتوی کلروفیل و کارتنوئید
۱۰۳	۲-۴-۴- نشت الکترولیت و محتوی مالون‌دی‌آلدهید
۱۰۵	۳-۴-۴- پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

- ۴-۴-۴- ژن‌های دخیل در مسیر سنتز دایوسجنین ..... ۱۰۹
- ۴-۵- نتیجه گیری کلی ..... ۱۰۷
- ۴-۶- پیشنهادات ..... ۱۱۰
- ۵- منابع ..... ۱۱۸

## فهرست جدول؛

- جدول ۳-۱- مواد استفاده شده برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ..... ۵۳
- جدول ۳-۲- ترکیبات مورد استفاده به منظور حذف DNA ژنومی ..... ۵۵
- جدول ۳-۳- ترکیبات مورد استفاده برای ساخت cDNA ..... ۵۵
- جدول ۳-۴- ترکیبات مورد استفاده برای ساخت cDNA ..... ۵۶
- جدول ۳-۵- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آنها ..... ۵۶
- جدول ۳-۶- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR به منظور تایید سنتز cDNA ..... ۵۷
- جدول ۳-۷- برنامه زمانی ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ..... ۵۷
- جدول ۳-۸- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی ..... ۵۸
- جدول ۴-۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه بر روی توده بوشرویه ..... ۶۴
- جدول ۴-۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه بر روی توده همدان ..... ۶۵

## فهرست شکل؛

- شکل ۱-۲- مسیر تولید متابولیت‌های اولیه و ارتباط آن‌ها با مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان..... ۱۳
- شکل ۲-۲- تصویری شماتیک از گیاه شنبلیله و قسمت‌های مختلف آن..... ۱۶
- شکل ۳-۲- تصویری شماتیک از مسیر بیوسنتز دایوسجنین و ژن‌های مرتبط با این مسیر..... ۲۰
- شکل ۱-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کلروفیل a توده بوشرویه..... ۶۷
- شکل ۲-۴- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی محتوی کلروفیل a توده همدان..... ۶۸
- شکل ۳-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کلروفیل b توده بوشرویه..... ۶۹
- شکل ۴-۴- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی محتوی کلروفیل b توده همدان..... ۷۱
- شکل ۵-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کلروفیل کل توده بوشرویه..... ۷۲
- شکل ۶-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی محتوی کلروفیل کل توده همدان..... ۷۳
- شکل ۷-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کارتنوئید توده بوشرویه..... ۷۴
- شکل ۸-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان کارتنوئید توده همدان..... ۷۵
- شکل ۹-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار نشت الکترولیت توده بوشرویه..... ۷۶
- شکل ۱۰-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان نشت الکترولیت توده همدان..... ۷۷
- شکل ۱۱-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی مقدار مالون‌دی‌آلدهید توده بوشرویه..... ۷۸
- شکل ۱۲-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان مالون‌دی‌آلدهید توده همدان..... ۷۶

- شکل ۴-۱۳- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار پروتئین توده بوشرویه ..... ۸۰
- شکل ۴-۱۴- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان پروتئین توده همدان ..... ۸۱
- شکل ۴-۱۵- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار آسکوربات توده بوشرویه ..... ۸۲
- شکل ۴-۱۶- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان آسکوربات توده همدان ..... ۸۳
- شکل ۴-۱۷- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کاتالاز توده بشرویه ..... ۸۴
- شکل ۴-۱۸- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان کاتالاز توده همدان ..... ۸۵
- شکل ۴-۱۹- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی مقدار گایاکول توده بشرویه ..... ۸۶
- شکل ۴-۲۰- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان گایاکول توده همدان ..... ۸۷
- شکل ۴-۲۱- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر بیان ژن *CAS* توده بوشرویه ..... ۸۸
- شکل ۴-۲۲- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *CAS* توده همدان ..... ۸۹
- شکل ۴-۲۳- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر(سمت چپ) در ژن *CAS* ..... ۸۹
- شکل ۴-۲۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SSR* توده بوشرویه ..... ۹۰
- شکل ۴-۲۵- نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SSR* توده همدان ..... ۹۱
- شکل ۴-۲۶- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر(سمت چپ) در ژن *SSR* ..... ۹۱
- شکل ۴-۲۷- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SEP* توده بوشرویه ..... ۹۲

- شکل ۴-۲۸- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی‌براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SEP* توده همدان  
۹۳.....
- شکل ۴-۲۹- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر(سمت چپ) در ژن *SEP*.....  
۹۳.....
- شکل ۴-۳۰- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی‌براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SMT* توده  
بوشرویه .....  
۹۴.....
- شکل ۴-۳۱- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی‌براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SMT* توده همدان  
۹۵.....
- شکل ۴-۳۲- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر(سمت چپ) در ژن *SMT*.....  
۹۵.....
- شکل ۴-۳۳- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی‌براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SQS* توده  
بوشرویه .....  
۹۶.....
- شکل ۴-۳۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی‌براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SQS* توده  
همدان .....  
۹۷.....
- شکل ۴-۳۵- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر(سمت چپ) در ژن *SQS*.....  
۹۸.....

## مقاله مستخرج از پایان نامه

• اثر ۲۴- اپی براسینواستروئید بر افزایش مقاومت و برخی از خصوصیات فیزیولوژیک گیاه

شنبلیله تحت تنش دمای بالا.

سومین همایش بین‌المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران ۱۳۹۸. دانشگاه علوم

پزشکی ایران، تهران، شهریور ۱۳۹۸.



# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱- مقدمه

با توجه به عوارض جانبی کمتر مصرف گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی، در حال حاضر گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین منابع زیستی در عرصه‌هایی همچون پزشکی و صنعت بوده، در نتیجه جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی محسوب می‌گردند. آثار درمانی گیاهان دارویی از دیر باز در میان ایرانیان بسیار مورد توجه بوده است. در طی دهه‌ی اخیر، استفاده از گیاهان دارویی از ۳ درصد به بیش از ۵۰ درصد افزایش یافته است (هاشمی و عظیمی، ۱۳۸۶). ایران دارای منابع ژنتیکی فراوانی از گیاهان دارویی و معطر است و قابلیت بالایی در زمینه تولید گیاهان دارویی دارد. از طرفی گیاهان دارویی دارای متابولیت‌های ثانویه مهمی هستند، که در حقیقت مواد اولیه اساسی بسیاری از داروها محسوب می‌شوند، در حقیقت تقریباً ۳۰ درصد از فرآورده‌های دارویی دارای منشاء گیاهی هستند (جعفرزاده و همکاران، ۱۳۹۳).

شنبليله با نام علمی *Trigonalla foenum-graecum* از راسته‌ی گل سرخ<sup>۱</sup>، تیره‌ی نخود<sup>۲</sup>، تیره‌ی فرعی پروانه داران<sup>۳</sup> و جنس (*Trigonella L.*) از گروه *Trifolia* است. این گیاه جزء نهان‌دانگان است و متعلق به دسته دو لپه‌ای‌های جدا گلبرگ می‌باشد. ساقه‌ی شنبليله منفرد، غالباً خوابیده و با انشعابات کم، بدون کرک یا کرک‌های پراکنده است. شنبليله دارای برگ‌های متناوب سه برگچه‌ای، بیضی شکل و دندانه‌دار است. این گیاه علفی و یکساله است و ارتفاع آن به ۵۰ سانتی‌متر می‌رسد. میوه‌ها به صورت نیام و خمیده و حاوی ۵۰-۲۰ دانه هستند. بذور تخم مرغی شکل آن بوی قوی و طعمی تلخ دارند (Dini.,2006). شنبليله در طب سنتی ایران و کشورهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و خواص درمانی گسترده‌ای دارد (حسن‌زاده و همکاران، ۱۳۸۹). دانه و برگ شنبليله ضد کلسترول و کاهنده‌ی قند خون، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد نفخ، ملین، ضد سنگ مثانه،

---

1- Rosace

2- Leguminosae

3- Papilionaceae

تب‌بر و انگل‌کش است. دانه‌ی آن دارای موسیلاژ مقاومی است و برای التهاب روده، زخم معده و مشکلات گوارشی مفید می‌باشد. پودر دانه‌ی آن به عنوان ضماد برای درمان آبسه، جوش، زخم‌ها و سوختگی‌ها به‌کار می‌رود (Mehrafarin *et al.*, 2011).

مهم‌ترین خواص دارویی این گیاه به علت وجود دایوسجنین (از ساپونین‌های استروئیدی) آن است (Joanna *et al.*, 2015). دایوسجنین برای اولین بار در سال ۱۹۳۶، از گیاه *Dioscorea tokoro* ژاپنی جدا شده (Fujii and Matsukawa., 1936) و در درمان بیماری‌های متابولیکی مانند چاقی، دیابت، کلسترول و چربی خون بالا، التهاب و سرطان موثر است (Upadhyay *et al.*, 2014). گیاهان علاوه بر متابولیت‌های اولیه‌ی ضروری مانند کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و آمینواسیدها قادر به تولید ترکیبات مختلفی با وزن مولکولی پایین به نام متابولیت‌های ثانویه هستند. متابولیت‌های ثانویه به گروهی از ترکیبات گفته می‌شود که در فرآیندهای اصلی توسعه‌ی گیاه نقش دارند و میزان آن‌ها تحت شرایط استرس افزایش می‌یابد، که این تغییرات به افزایش مقاومت گیاه منجر می‌گردد. متابولیت‌های ثانویه اغلب دارای خواص دارویی هستند امروزه بیشتر متابولیت‌های ثانویه ای که دارای اهمیت دارویی هستند و به دلیل به صرفه نبودن سنتز آنها از نظر شیمیایی، از گیاهان وحشی یا زراعی استخراج می‌شوند (Oksman and Inze., 2004).

تولید متابولیت‌های ثانویه در تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌یابد و این ترکیبات در سلول‌ها یا اندامک‌های ویژه‌ی ذخیره می‌شوند (Oksman and Inze., 2004). میزان متابولیت ثانویه به شدت تحت تاثیر محیط رشد گیاه قرار دارد. به عنوان مثال در زمان انتقال گیاه از محیط طبیعی به محیط زراعی و یا آزمایشگاه، میزان متابولیت ثانویه آن کاهش می‌یابد. برای مقابله با چنین شرایطی می‌توان با استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی و یا اعمال شرایط تنش محتوای متابولیت ثانویه را افزایش داد (Gorelick and Bernstein., )

2014). گیاهان و یاخته‌های گیاهی پاسخ‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی متفاوتی نسبت به عامل‌های میکروبی، شیمیایی و فیزیکی از خود نشان می‌دهند (Patel *et al.*, 2013). گیاهان برای حفاظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو از سیستم‌های پاکسازی کننده رادیکال‌های آزاد شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز و همچنین ترکیبات غیر آنزیمی مانند کارتنوئیدها استفاده می‌کنند. بنابراین هر تیماری که به کاهش میزان گونه‌های فعال اکسیژن کمک نماید در بهبود وضعیت گیاه می‌تواند مؤثر باشد. این شبکه برای کنترل تولید مازاد گونه‌های فعال اکسیژن در طی تنش و همچنین در حفظ سطح مناسب و صحیح گونه‌های فعال اکسیژن برای رشد و پیام‌رسانی مهم است (Hussain *et al.*, 2012).

گیاهان در دوره رشد و نمو خود با انواع مختلفی از تنش‌ها مواجه می‌شوند. تنش دمایی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محسوب می‌شود. این نوع تنش تحت تاثیر درجه حرارت، طول دوره و میزان افزایش دما است. در حقیقت شدت و وسعت وقوع این تنش در نواحی مختلف آب و هوایی به احتمال و طول دوره افزایش دمای شبانه یا روزانه وابسته است، که بر رشد و نمو گیاه و میزان متابولیت به صورت مستقیم اثرگذار است (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

براسینواستروئیدها، گروهی از هورمون‌های استروئیدی هستند که در بسیاری از پدیده‌های نموی در گیاهان از قبیل تقسیم و طویل شدن سلولی ساقه و ریشه، اندام‌زایی، پیری برگ و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. نقش اپی براسینواستروئید در رشد و نمو کالوس و رشد و نمو جنین در بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است. همچنین وجود آثار متقابل این هورمون با اکسین و جیبرلین در بسیاری از آزمایش‌ها مشاهده شده است (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

با توجه به اهمیت گیاه شنبلیله به عنوان یک گیاه دارویی مهم و همچنین دایوسجنین به عنوان یک متابولیت دارویی مهم، این تحقیق با هدف بررسی آثار تنش دمای بالا و اپی براسینواستروئید و ترکیب این دو تیمار (به عنوان محرک) بر بیان ژن‌های مسیر دایوسجنین و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه شنبلیله انجام شد. با توجه به اینکه این تحقیق برای اولین بار و با گستردگی کامل انجام شده است، لذا نتایج این تحقیق می‌تواند در شناخت مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه شنبلیله و نحوه تاثیرگذاری استرس دمای بالا و اپی براسینواستروئید در برنامه‌های اصلاحی آینده تاثیرگذار باشد، چراکه اولین مرحله در انجام یک روش اصلاحی شناخت مکانیسم‌ها و فرآیندهای موجود در گیاهان در طی تنش است. در ضمن نتایج این تحقیق، احتمالا می‌تواند در شناسایی یک ترکیب تیماری مناسب به منظور افزایش محتوی دایوسجنین موثر باشد.

## ۱-۲-هدف

- بررسی آثار هورمون اپی براسینواستروئید بر بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و ویژگی‌های فیزیولوژیکی شنبلیله تحت شرایط تنش دمای بالا.



## فصل دوم

### کلیات و مرور منابع

## ۲-۱- تعریف گیاهان دارویی

حدود ۳۵۰۰۰ گونه از ۳۵۰۰۰۰ گونه گیاهی شناخته شده در سراسر جهان برای اهداف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. تعداد زیادی از گیاهان دارویی در صنایع غذایی، پزشکی، مواد ساختمانی، رنگ و غیره کاربرد دارند. کمتر از ۵ درصد از گیاهان دارویی، در حدود ۲۵ درصد از فرمولاسیون تمام داروهای تجویز شده در کشورهای پیشرفته به کار می‌روند (فتاحی و همکاران، ۱۳۸۹).

گیاهان دارویی به گستره وسیعی از گیاهان اطلاق می‌شود که در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند (دوازده‌امامی، ۱۳۸۲). در این گیاهان بخش‌های گوناگون اندام آنها مانند ریشه، ساقه، برگ، گل، دانه، یا تمام اندام گیاه در بردارنده مواد فعال و مفید بیولوژیکی می‌باشد (تقوی و ایمان‌خان، ۱۳۸۴).

از گیاهانی که حاوی مواد مؤثره هستند در زمینه‌های مختلفی استفاده می‌شود و این گیاهان به سه گروه اصلی گیاهان دارویی<sup>۱</sup>، گیاهان ادویه‌ای<sup>۲</sup> و گیاهان عطری<sup>۳</sup> طبقه‌بندی می‌شوند (امیدبیگی، ۱۳۹۲).

گیاهانی به عنوان داروی گیاهی شناخته می‌شوند که مواد خاصی را در اندام‌های خود سنتز و ذخیره کنند، در حقیقت این مواد در درمان برخی از بیماری‌ها کاربرد دارند. این ترکیبات مؤثره در طی فرایندهای ویژه و پیچیده بیوشیمیایی به مقدار بسیار کم (معمولاً کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه) ساخته می‌شوند و متابولیت‌های ثانویه نام دارند. گیاهان دارویی برخلاف سایر گیاهان متداول در کشاورزی صرفاً در موارد خاص و معدود مورد استفاده قرار می‌گیرند (امیدبیگی، ۱۳۹۲).

- 
1. Medicinal plants
  2. Spice plants
  3. Essential oil plants



## ۲-۱-۱- اهمیت گیاهان دارویی

استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان، یکی از قدیمی‌ترین روش‌های درمانی است، چرا که حدوداً سابقه‌ای ۶۰۰۰ ساله دارد (قاسمی، ۱۳۸۸). گیاهان دارویی به عنوان بخشی از تنوع زیستی گیاهی، همواره در معرض آسیب‌های انسانی و محیطی بوده‌اند. در حقیقت برداشت بی‌رویه و ناصحیح، چرای بی‌رویه دام و گسترش شهرسازی و بسیاری از عوامل دیگر، گونه‌های ارزشمند دارویی را با تهدید مواجه ساخته است و در بعضی موارد موجب انقراض آن‌ها شده است. ارائه‌ی برنامه‌های حفاظت از گیاهان دارویی از جمله برنامه‌های بسیار مهم و حیاتی به شمار می‌رود که باید توسط کشورها و ملت‌ها پیگیری شود (بیگناه، ۱۳۹۳).

نخستین متون و دست‌نوشته‌ها از کاربرد گیاهان دارویی در دوره پیش از تاریخ را می‌توان در سنگ‌نوشته‌های آشور بانیپال در میان رودان، در پاپیروس‌های مصری و در نوشته‌های چین، هند، ایران باستان، سایر اقوام و ملل باستانی مشاهده کرد (ضیائی، ۱۳۸۴؛ Pribitkin and Boger., 2001).

اگرچه مصرف و تولید گیاهان دارویی به‌واسطه توسعه و پیشرفت داروهای صنعتی و شیمیایی که به طرق مختلف تولید می‌شوند، محدود شده است، اما اکنون در تمام دنیا توجه خاصی به این منابع برای درمان بیماران معطوف گردیده است، به نحوی که بزرگان علم داروسازی، قرن بیستم را قرن بازگشت به طبیعت و قرن استفاده از داروهای گیاهی نام نهاده‌اند (گلشادی، ۱۳۸۱).

در حال حاضر، گیاهان دارویی در عرصه پزشکی جایگزینی شایسته برای داروهای شیمیایی محسوب می‌شوند. بسیاری از بیماران برای درمان بیماری خود به گیاه درمانی روی آورده‌اند، از طرفی طب جدید علیرغم توانمندی‌ها و پیشرفت‌های اخیر، در درمان برخی بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های مزمن با مشکلاتی مواجه است (Feng et

(al., 2005). به صورت کلی، گیاهان دارویی دارای آثار جانبی کمتری نسبت به سایر داروهای شیمیایی هستند، اگرچه استثنائاتی نیز وجود دارد (Huang and Chen., 2008). طب گیاهی در درمان بیماری‌های مزمن و مشکلات مرتبط با آن تاکنون موفق عمل کرده است (Wang et al., 2008).

طبیعت، حاوی گونه‌های گیاهی ناشناخته‌ای از نظر خواص دارویی است، که کشف خواص آن‌ها بسیار مهم و ضروری است. تهیه و گردآوری فهرستی از گیاهان دارویی در نقاط مختلف جهان اولین گام در جهت کاربرد آن‌ها با استفاده از علوم و فنون جدید تلقی می‌شود و تا به امروز فهرست‌های زیادی از این گیاهان گزارش شده است (Falsetto, 2009 ; Proestos et al., 2008). در ایران نیز تحقیقات متعددی در این رابطه انجام شده است (سلطانی پور، ۱۳۸۴).

بر اساس منابع علمی حدود ۷۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ گونه گیاه دارویی در مناطق مختلف جهان وجود دارد. سازمان بهداشت جهانی، فهرستی بالغ بر ۲۰۰۰۰ گونه گیاه دارویی را که در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند، را گردآوری کرده است. براساس اعلام این سازمان حدود ۴۰۰ گونه گیاه دارویی در اروپای غربی تجاری سازی شده است (زارعزاده و همکاران، ۱۳۸۶).

در کشور ایران در حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی و بیش از ۱۰۰۰ گونه دارویی وجود دارد، لذا ایران بستر بسیار مناسبی برای دستیابی به گونه‌های با ارزش دارویی و نادر می‌باشد، که می‌توان نسبت به اهلی سازی، زراعی سازی و معرفی تعدادی از آن‌ها اقدام کرد (زارعزاده و همکاران، ۱۳۸۶). امروزه نیز در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، تقاضای روز افزونی برای داروهای گیاهی وجود دارد، که این افزایش درخواست، اصولاً به علت شناسایی گسترده‌تر فواید زیست شناختی داروهای گیاهی، برخورداری این داروها از خاصیت ایجاد سازگاری مناسب‌تر با بدن و قیمت ارزانتر آن‌ها نسبت به داروهای شیمیایی است (منتظری و همکاران، ۱۳۸۸).

## ۲-۲- پتانسیل اقتصادی گیاهان دارویی

ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی همواره با رشد قابل توجهی همراه بوده است. بخش گسترده‌ایی از بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مربوط است. متابولیت‌های ثانویه معمولاً از ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند، به نحوی که ارزش فروش برخی از این ترکیبات مانند شیکونین، دیجیتوکسین (Digitoxin) و عطرهايي همچون روغن جاسمین (Jasmin)، از چند دلار تا چند هزار دلار به ازای هر کیلوگرم متغیر است. همچنین قیمت هر گرم از داروهای ضد سرطان گیاهی مانند وین بلاستین (Vinblastin)، وین کریستین (Vincristin)، آجمالسین (Ajmalicine) و تاکسول (Taxol) به چند هزار دلار می‌رسد (ناصری، ۱۳۸۳).

ارزش بازارهای جهانی داروهای مشتق از گیاهان در سال ۲۰۰۲، با رشد ۶/۲ درصدی نسبت به سال قبل از آن، به ۱۳/۷ میلیارد دلار رسیده بود. این مقدار در ۲۰۰۷ به رقمی معادل ۱۸/۸ میلیارد دلار افزایش یافته است. آمریکا در سال ۲۰۰۲ بیش از ۵۰ درصد بازار گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است. انتظار می‌رود ارزش این بازار تا ۲۰۵۰ به رقمی معادل ۵ تریلیون دلار افزایش یابد (کشفی‌بناب، ۱۳۹۲).

## ۲-۳- متابولیت‌های ثانویه

یک ماده ضروری برای متابولیسم یک ارگانیسم خاص یا برای یک فرآیند متابولیکی خاص، متابولیت نامیده می‌شود. در طی قرن‌ها، انسان‌ها بر گیاهان برای نیازهای اولیه مثل غذا، پوشاک، مسکن تکیه کرده‌اند، که همه از بخش‌های مختلف گیاه (برگ، چوب، فیبر، میوه) تولید یا ساخته شدند (حبیبی‌خانیانی و همکاران، ۱۳۸۴). گیاهان همچنین برای اهداف بیشتری (اضافی)، مثل تیر و نیزه‌های سمی برای شکار، سمومی برای قتل،

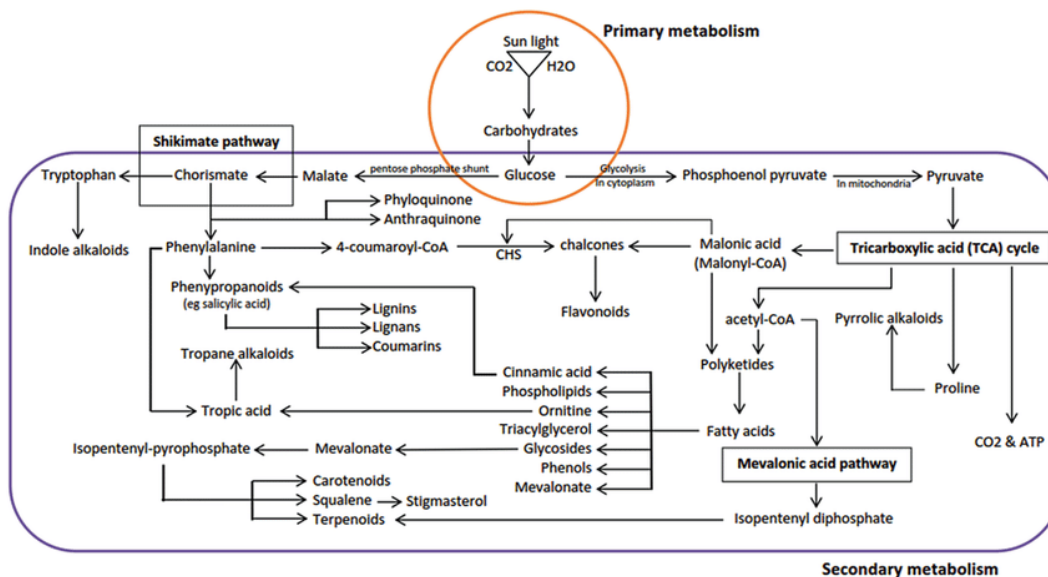
هالوسینوزن (توهم‌زا) ها استفاده شده برای مقاصد (اهداف) تشریفاتی، محرک‌هایی برای استقامت و سرکوب گرسنگی و نیز داروها استفاده شده‌اند. مواد شیمیایی گیاهی استفاده شده برای این اهداف اخیر، تا حد زیادی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که از متابولیت‌های اولیه‌ی گیاهی مشتق شده‌اند و مستقیماً در رشد، توسعه یا تولید مثل گیاهان دخیل نیستند (Irchhaiya *et al.*, 2015).

گیاهان حاوی ترکیبات اولیه‌ای هستند که طی فرآیند فتوسنتز تولید شده و سپس در ساخت ترکیبات سلولی دیگری به کار می‌روند. این ترکیبات در حجم زیاد و با ارزش اقتصادی پایین تولید می‌شوند و به عنوان ماده خام صنعت، مواد غذایی و افزودنی‌ها کاربرد دارند. کربوهیدرات‌هایی مانند ساکارز، نشاسته، پکتین، سلولز، اسیدهای چرب، روغن‌های گیاهی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به عنوان متابولیت‌های اولیه محسوب می‌شوند. همچنین گیاهان گروه متنوعی از ترکیباتی به نام متابولیت‌های ثانویه را نیز تولید می‌کنند. این ترکیبات معمولاً دارای وزن مولکولی پایینی (کمتر از ۱۵۰ کیلو دالتون) هستند و تاکنون بیش از ده‌ها متابولیت ثانویه شناسایی شده‌اند (Oksman *et al.*, 2004). متابولیت‌های اولیه نقش مهمی در بقای گیاهان (در فتوسنتز و تنفس) ایفا می‌نمایند. وجود ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و آلی، ویتامین‌ها، هورمون‌ها و گلوکوزینولات‌ها برای رشد، توسعه، تطابق با استرس و دفاع گیاه ضروری هستند. در ضمن وجود چنین ترکیباتی، کیفیت تغذیه‌ای مواد غذایی، رنگ، طعم، بو، خاصیت آنتی‌اکسیدانتی، ضد سرطانی، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد میکروبی، تحریک‌کننده سیستم ایمنی، و خواص پایین آورنده کلسترول را تعیین می‌کنند (Irchhaiya *et al.*, 2015).

متابولیت‌های ثانویه، در حفاظت گیاهان در برابر گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی، به‌عنوان جذب‌کننده گرده افشان‌ها و جانوران منتشر کننده بذر، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب و تنش‌های غیرزیستی نقش دارند (Wink., 2010).

متابولیت‌های ثانویه در سه خانواده مولکولی بزرگ شامل گروه ترکیبات نیتروژن‌دار، ترپن‌ها و فنل‌ها تقسیم می‌شوند. ترکیباتی که در گروه ترکیبات نیتروژن‌دار قرار دارند، شامل ترکیبات دفاعی ضد گیاه‌خواران هستند و شامل آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای سیانوژنی می‌باشند. این ترکیبات به علت ایجاد مسمومیت در انسان و خواص دارویی به‌شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Bourgaud *et al.*, 2001).

متابولیت‌های ثانویه نقش چندانی در فرآیندهای اصلی مانند فتوسنتز و تنفس ندارند. بیشتر این ترکیبات‌ها در اندامها (واکوئل) و بافت‌های خاصی سنتز، ذخیره و نهایتاً ترشح می‌شوند. معمولاً مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها از مسیریایی مانند گلیکولیز و چرخه کربس مشتق می‌شود (شکل ۱-۲) (Castillo *et al.*, 2012).



شکل ۱-۲- مسیر تولید متابولیت‌های اولیه و ارتباط آن‌ها با مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان (Castillo *et al.*, 2012).

همانطور که در شکل ۱-۲ نشان داده شده است، مسیرهای اصلی سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شامل مسیر اسید موالونیک و مسیر اسید شیکمیک است. سنتز اغلب ترکیب‌های ثانویه در جایگاه‌ها و اندامک‌های خاصی صورت می‌گیرد، در حالی که محل تولید اغلب مسیرها و فرآیندهای بیوسنتزی مربوط به متابولیت‌های اولیه در داخل سیتوپلاسم سلول است. از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه می‌توان به آلکالوئید، ترپن‌ها و فنل‌ها اشاره کرد (قاسمی، ۱۳۸۸). آلکالوئید به دسته‌ای از ترکیبات آلی شیمیایی اطلاق می‌گردد، که دست کم دارای یک اتم نیتروژن در حلقه هتروسیکلیک خود باشد. مشخصه آلکالوئیدها داشتن ترکیبات نیتروژنی است. تاکنون بیش از ۱۰۰۰۰ آلکالوئید در طبیعت یا در آزمایش‌های شیمیایی شناسایی شده‌است. ترپن‌ها، دسته‌ای از مواد آلی هستند که در طبیعت گستردگی فراوانی دارند. اکثراً در گیاهان به عنوان جز اصلی اسانس‌ها وجود دارند. بسیاری از ترپن‌ها هیدروکربن هستند، اما ترکیباتی نیز یافت می‌شوند که جز هیدروکربن محسوب نمی‌شوند و در ساختمان مولکولی آن‌ها اکسیژن وجود دارد و جز ترپن‌ها به‌شمار می‌روند (مانند الکل‌ها، آلدهید یا کتون‌ها) (قاسمی، ۱۳۸۸).

## ۲-۴- گیاه‌شناسی شنبلیله

شنبلیله گیاهی است علفی و یکساله متعلق به تیره لگومینوزه<sup>۱</sup>، راسته گلسرخ<sup>۲</sup>، تیره فرعی پروانه داران از جنس *Trigonella L.* و از گروه *Trifolia* می‌باشد (Mozafarian., 1995). تاکنون ۷۰ گونه متعلق به جنس تریگونولا شناسایی شده است، که شامل گیاهان یک ساله تا چند ساله هستند (Dini., 2006).

---

1 -Legouminosae  
2 -Rosaceae

ارتفاع شنبلیله با توجه به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه بین ۱۰ تا ۶۰ سانتی متر متغیر است. شنبلیله دارای یک ریشه اصلی عمودی طویل و ریشه‌های خزنده و شاخه‌دار زیاد و انشعاب‌های متعددی است (Ahmad et al., 2016). برگ‌های آن متناوب و مرکب از سه برگچه است و برگچه‌ها به شکل تخم‌مرغ وارونه یا دوک مانند و کشیده هستند. دم‌برگ به طول ۱ تا ۳ سانتی متر و کم و بیش کرک‌دار است. گل‌های شنبلیله دو جنسی سفید-زرد و بندرت بنفش رنگ هستند و به صورت تکی یا جفت، در زاویه بین برگ‌ها و ساقه‌ها قرار می‌گیرند. به صورت کلی دو نوع گل جانبی و انتهایی در این گیاه مشاهده می‌شود، که نوع معمول آن گلدهی جانبی است. مقدار کمی گل انتهایی نیز در این گیاه مشاهده می‌شود، که نسبت آن به مقدار گل‌دهی جانبی، تقریباً ۱:۱۰ می‌باشد. بیشتر گل در شنبلیله کلیستوگام هستند (Ahmad et al., 2016). میوه‌های آن بدون کرک، به صورت نیام مستقیم یا داسی شکل به طول ۱۰ تا ۱۲ سانتی متر و پهنای آن ۰/۵ تا ۱ سانتی متر است. داخل میوه تعدادی دانه قرار دارد. غلاف‌ها دراز و استوانه‌ای شکل هستند. طول دانه به چهار تا پنج میلی‌متر می‌رسد. دانه‌ها بسیار محکم و در طول آن یک شیار کم و بیش عمیق وجود دارد. وزن هزار دانه ۱۰/۵ تا ۱۲ گرم متغیر است (شکل ۲-۲) (Dini., 2006).

دانه زرد مایل به قهوه‌ای، پهن و کم و بیش مکعبی شکل است. دانه‌ها حاوی پروتئین، غنی از لایزین و تریپتوفان، آمینواسیدهای آزاد مانند آرژینین، لایزین، هیستیدین و هیدروکسی ایزولوسین هستند. همچنین، آلکالوئیدهایی مانند تریگونلین و موسیلاژ، تانیک اسید، روغن‌های فرار و غیر فرار، دایوسجینین، جیتوجنین و مقدار کمی تریگوجنین در این گیاه وجود دارند. برگ‌های شنبلیله حاوی کلسیم، آهن، بتاکاروتن و انواع ویتامین، لکتین، کولین، مواد معدنی، کمپلکس ویتامین‌های A، B، و D، آهن، فسفات، پاراآمینوبنزوئیک اسید و ترکیبات شیمیایی مهمی مانند ساپونین‌ها، کومارین، نیکوتینیک اسید، فیتیک اسید و تریگونلین هستند

(Sheikhlar., 2013). شنبلیله هم‌چنین حاوی جنتانین<sup>۱</sup>، کارپائین<sup>۲</sup>، لوتئین<sup>۳</sup>، اورینتین<sup>۴</sup>، کوئرستین<sup>۵</sup>، ویتکس<sup>۶</sup> و ایزوویتکسین<sup>۷</sup> است (Newall *et al.*, 1996). شنبلیله برای بازسازی خاک خوب است و معمولا به عنوان کود سبز استفاده می‌شود (Ahmad *et al.*, 2016).



شکل ۲-۲- تصویری شماتیک از گیاه شنبلیله و قسمت‌های مختلف آن (Acharya *et al.*, 2008)

- 
- 1-Gentianine
  - 2-Carpaine
  - 3-Luteolin
  - 4-orientin
  - 5-Quercetin
  - 6-Vitexin
  - 7-Isovitexin



## ۲-۴-۱- پراکنش سنبلیه

سنبلیه بومی شرق مدیترانه تا هند، چین، نواحی غربی اندونزی، تا جنوب اروپا و اتیوپی در آفریقا می‌باشد و در ترکیه، هند و چین، اروپای مرکزی و جنوبی و شمال آفریقا، به صورت وسیعی کشت می‌گردد. بیشترین صادرات این گیاه مربوط به کشورهای هند، مراکش، چین و ترکیه است. این گیاه در نقاط مختلف ایران نیز کشت می‌گردد و به حالت خودرو در آذربایجان، اصفهان، فارس، خراسان، سمنان، دامغان می‌روید (Dini., 2006).

## ۲-۴-۲- جوانه‌زنی، عناصر مورد نیاز و کاشت سنبلیه

سنبلیه، دارای طبیعت گرم و خشک بوده و دانه آن در تاریکی جوانه می‌زند. سنبلیه بعلت زمستانه بودن نسبت به دماهای پایین مقاوم است، اما در طول رویش به هوای گرم نیاز دارد، اگرچه در خاک‌های شنی و فقیر می‌روید ولی برای کشت انبوه این گیاه باید از خاک‌های غنی از مواد و عناصر غذایی استفاده کرد. pH مناسب برای سنبلیه بین ۵/۳ تا ۸/۲ است. مواد و عناصر غذایی مناسب در خاک نقش عمده‌ای در افزایش عملکرد دانه دارد (Helambe and Dandeh., 2012). این گیاه در فصل پائیز به ۴۰ تا ۶۰ کیلوگرم در هکتار اکسید فسفر و ۴۰ تا ۸۰ کیلوگرم در هکتار اکسید پتاس نیاز دارد. چنانچه زمین فاقد ازت باشد، توصیه می‌شود در فصل بهار ازت به صورت سرک در اختیار گیاهان قرار گیرد و مقدار آن به وضعیت ازت در خاک بستگی دارد. سنبلیه دارای توانایی تثبیت ازت است، بنابراین زمین‌هایی که در آن این گیاه کشت می‌شود غنی از ازت خواهند بود (امیدبیگی، ۱۳۹۲).

اوایل بهار زمان مناسبی برای کشت مستقیم بذر در زمین اصلی است. بذرهای شنبلیله را به صورت ردیفی و یا با استفاده از ردیف کار غلات در ردیف‌هایی به فاصله ۲۵ سانتی‌متر و عمق مناسب ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر کشت می‌کنند. برای هر هکتار زمین به ۲۰ تا ۲۵ کیلوگرم بذر با کیفیت مناسب نیاز است (امیدیگی، ۱۳۹۲).

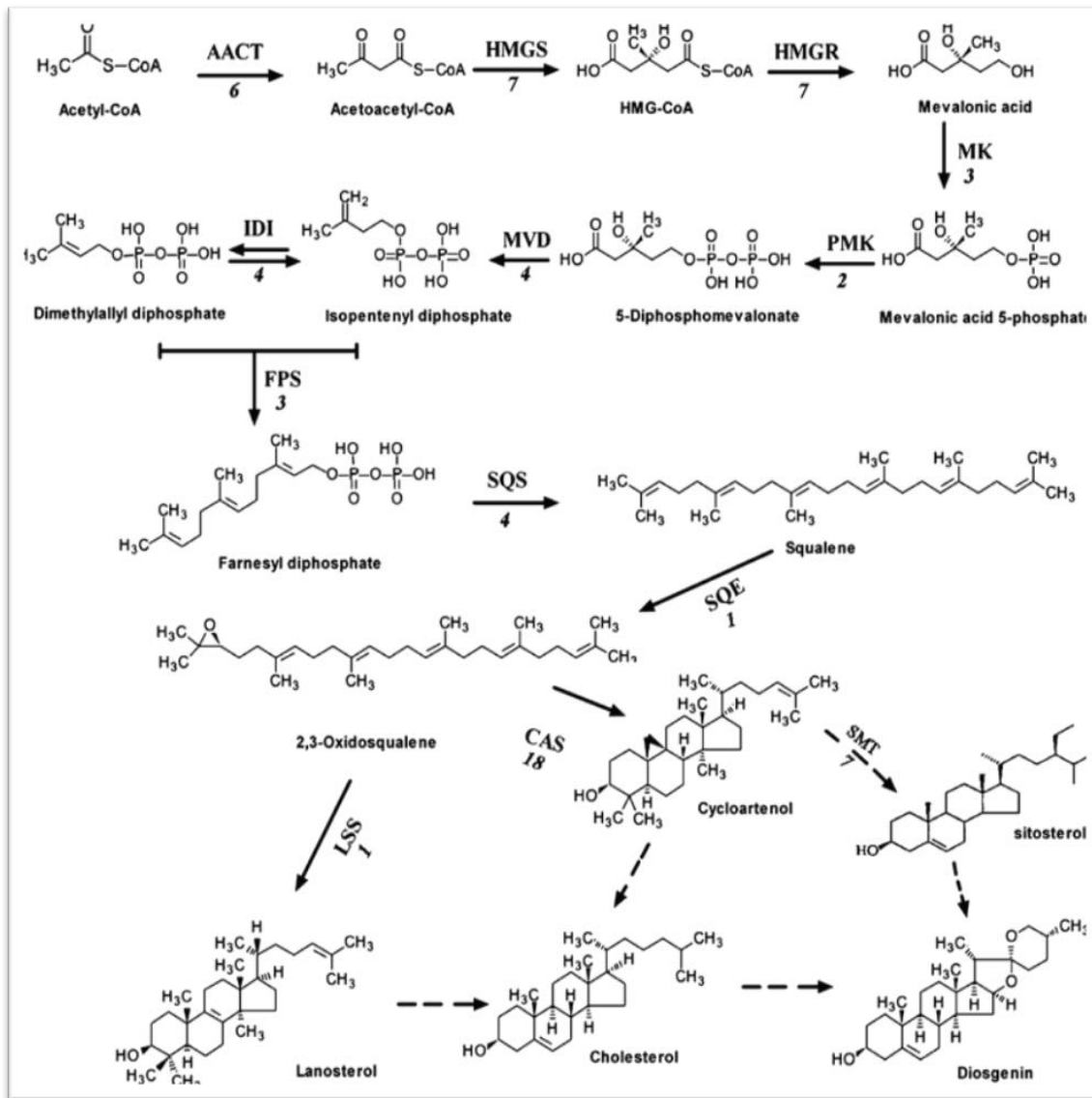
## ۲-۵- موارد مصرف شنبلیله

شنبلیله حاوی منبع ارزشمندی از پروتئین غذایی برای تغذیه انسان و حیوانات است. از دانه‌ها به عنوان یک مکمل برای طعم غذا و از برگ شنبلیله به عنوان سبزی در انواع غذاها و ادویه‌جات استفاده می‌شود. بذرهای شنبلیله حاوی موادی نظیر آلکالوئید، کولین و ساپونین‌های استروئیدی شامل دایوسجینین و تریگونلین به مقدار ۰/۸ تا ۲/۲ درصد است. همچنین بذرها شامل ترکیبات موسیلاژی، پروتئین (۱۲ تا ۱۶ درصد) و روغن هستند. (Rajabian, et al., 2008). از شنبلیله در درمان بیماری‌هایی از قبیل نفخ شکم، دیسانتری، اسهال، بزرگی کبد و طحال، راشیت، دیابت و استفاده می‌شود. احتمالاً، ترکیبات فلاونوئیدی در شنبلیله نقش مهمی در پیشگیری از سرطان دارند (Zuk-Golaszewska et al., 2015).

مهم‌ترین خاصیت دارویی شنبلیله مربوط به محتوای دایوسجینین آن است. (Joanna ciura et al., 2015) برای تولید داروهای استروئیدی و هورمون‌هایی مانند تستوسترون، گلوکوکوریکوئیدها و پروژسترون استفاده می‌شود. دایوسجینین یک ساپونین استروئیدی است و برای درمان بیماری‌هایی همچون سرطان خون، ضد کلسترول بالا، سندروم یائسگی، فعالیت ضد توموری و سرطان روده کاربرد دارد. این ماده پیش‌ساز سنتز داروهای مانند قرص‌های ضدبارداری، هورمون‌های جنسی و ترکیبات استروئیدی است (Ciura et al., 2017).

بیشترین میزان دایوسجنین در برگ‌های جوان (۲۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و در دانه‌های بالغ (۰/۲۸ تا ۰/۹۲ درصد) وجود دارد (Raju *et al.*, 2004; McAnuff *et al.*, 2002). در حال حاضر دایوسجنین طبیعی، از غده‌های گیاه یام مکزیکی (*Dioscorea villosa*) تولید می‌شود، اما طول عمر این گیاه بالغ بر سه سال است و پروسه تولید آن هزینه‌بر و وقت‌گیر است (Acharya *et al.*, 2008; Zerbino and Birney, 2008). این درحالی است که شنبلیله به دلیل چرخه رشد کوتاه‌تر، عملکرد مناسب، سازگاری بیشتر با شرایط محیطی و خاصیت دست‌ورزی ژنتیکی بالا جایگزین مناسبی برای یام به‌منظور تولید دایوسجنین محسوب می‌گردد (Ahmad *et al.*, 1999).

دایوسجنین از طریق مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها تولید می‌شود (خود مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها، از مسیر موالونات تغذیه می‌شود). این مسیر با استفاده از پیش‌ماده‌ی استیل کوآنزیم‌آ به ایزوپنتیل پیروفسفات می‌رسد (عباسی و همکاران، ۱۳۹۰). برای تولید دایوسجنین مسیر لانوسترول و کلسترول و مسیر سیکلوآرتنول و حدواسط سیتواسترول (Chaudhary *et al.*, 2015) پیشنهاد شده است. سیکلوآرتنول سنتاز و لانوسترول سنتاز دو آنزیم کلیدی متعلق به خانواده‌ی اکسیدواسکوالن سیکلازها هستند و در این مسیر دخالت دارند. در مورد مسیر بیوسنتزی دایوسجنین و پیش‌سازهای آن ابهاماتی وجود دارد و این مسیر به‌صورت کامل شناسایی نشده است (Chaudhary *et al.*, 2015) (شکل ۲-۳).



شکل ۲-۳- تصویری شماتیک از مسیر بیوسنتز دایوسجنین و ژن‌های مرتبط با این مسیر

(Hua *et al.*, 2017)

شناسایی مسیر بیوسنتزی دایوسجنین و ژن‌های مهم این مسیر در مهندسی این متابولیت حیاتی به نظر می‌رسد. متاسفانه پیچیدگی‌ها و نکات مبهم زیادی در این مسیر وجود دارد و تاکنون مطالعه‌ی کاملی بر روی

ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در گیاه شنبلیله انجام نشده است. در ادامه به برخی از ژن‌های مهم در این مسیر اشاره می‌گردد.

## ۲-۶-ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز شنبلیله

### ۲-۶-۱-اسکوالن سنتاز<sup>۱</sup> (SQS)

این ژن نقش بسیاری حیاتی در تنظیم شارکربن در متابولیت اولیه‌های اولیه و ثانویه دارد، به طوری که نقش تنظیمی آن در بیوسنتز استرول در گیاهان، مخمرها و جانوران به اثبات رسیده است. همچنین، این ژن در بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترین‌ها نقش دارد. در حقیقت، اسکوالن سنتاز اولین مرحله آنزیمی در مسیر ایزپرونوئیدها را در بیوسنتز استرول و تری‌ترین‌ها میانجی‌گری می‌کند. در این مسیر دو مولکول فارنسیل پیروفسفات از طریق اسکوالن سنتاز به یکدیگر متصل می‌شوند و یک مولکول اسکوالن را بوجود می‌آورند (Bach and Rohmer, 2012).

### ۲-۶-۲-اسکوالن اپوکسیداز<sup>۲</sup> (SEP)

آنزیم اسکوالن اپوکسیداز با کسید کردن اسکوالن منجر به شکل‌گیری ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن می‌شود. ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن، احتمالاً یکی از دو ساختار چهار حلقه‌ای سیکلوآرتنول یا بتا‌آمیرین را کاتالیز می‌کند (Bach and Rohmer, 2012).

---

1 -Squalene synthase  
2 -Squalen epoxidase

## ۲-۶-۳- سیکلوآرتنول سنتاز<sup>۱</sup> (CAS)

سیکلوآرتنول سنتاز می‌تواند با تغییر سیکلوآرتنول به فرم‌های رایج، ساختارهای استرولی مانند استیگمااسترول، سیتواسترول یا کامپسترول را بوجود آورد. ژن کدکننده‌ی این آنزیم، به صورت گسترده‌ای در دودمان‌های گیاهی حفاظت شده است (Bach and Rohmer, 2012).

## ۲-۶-۴- استرول متیل ترانسفرازها<sup>۳</sup> (SMTs)

از مشتقات ایزوپرنوئید با هسته چهار حلقه‌ای استروئیدی، می‌توان به استرول‌ها اشاره کرد (Edwards and Ericsson., 1999). یکی از ویژگی‌های کلاسترول و فیتواسترول‌های اصلی، تعداد کربن‌های موجود در موقعیت کربن ۲۴ است (Benveniste P., 1986). در حقیقت یک یا دو کربن اضافی فیتواسترول‌ها در طول فرآیند آلکیل شدن، توسط S-آدنوزیل متیونین وابسته به C24-methyltransferase کاتالیز می‌شود. C24-methyltransferase مرحله اول را با اضافه کردن یک گروه متیل آغاز می‌کند و در ادامه C24-methyltransferase 2 و C24-methyltransferase 3 هر کدام یک گروه متیل دیگر (C2) را تا کامل شدن زنجیره جانبی اتیل، به ترکیب اضافه می‌کنند (Schaller et al., 1998). در گیاهان، سیکلوآرتنول یک ترکیب آغازی برای شروع بیوسنتز استرول‌هاست، که سوبسترای C24-methyltransferase هم می‌باشد. اگر چه برخی بی‌نظمی‌ها میان اختصاصیت سوبسترا در میان SMTها وجود دارد (Diener et al., 2000). اخیراً یک مسیر ثانویه استرول شناسایی شده است که لانسترول را بجای سیکلوآرتنول در مراحل اولیه استفاده می‌کند. این مسیر لانسترول، شاخه کوچکی است که تخمین زده می‌شود کمتر از ۱/۵ درصد از کل سیتواسترول را تشکیل دهد

---

1-Cycloartenol synthase

2-Lineage

3-Sterol methyltransferase

(Ohyama *et al.*, 2009). استرول برای رشد و توسعه گیاه دارای نقش تنظیمی است که مستقل از بیوسنتز اپی براسینواستروئیدها است (Schaller., 2004).

## ۲-۷- تنش‌های زیستی و غیر زیستی

تنش به مفهوم تغییر در شرایط طبیعی و بهینه فیزیولوژی در گیاه است، که در نهایت منجر به کاهش می‌گردد. در طبیعت گیاهان تحت تأثیر تنش‌های مختلفی از قبیل شوری، خشکی، سرما، یخ زدگی، دمای بالا، فلزات سنگین، شرایط غرقابی، تابش پرتوهای فرابنفش و آسیب‌های ناشی از کمبود و یا بیش بود برخی از عناصر خاک قرار می‌گیرند. در حقیقت، تنش‌ها مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر عملکرد محصولات کشاورزی محسوب می‌شوند. اثر بعضی از عوامل محیطی مانند دما می‌تواند آبی و اثر سایر عوامل مانند محتوای رطوبت خاک ممکن است روزها و هفته‌ها طول بکشد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). عملکرد واقعی بدون وجود تنش‌های محیطی برابر با پتانسیل حقیقی گیاهان است، درحالی‌که متوسط عملکرد برخی از گیاهان زراعی کمتر از ۲۰ درصد پتانسیل آنها است. ایران از جمله کشورهای است که در اکثر مناطق تحت تاثیر تنش‌های مهم غیر زنده نظیر خشکی، شوری، گرما، باد و عوامل بیماری‌زا مثل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و حشرات قرار دارد و همه این عوامل موجب کاهش عملکرد، از بین رفتن حاصل‌خیزی خاک گردیده است (میبدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱).

در سال‌های اخیر، وقوع تنش‌های غیرزیستی در اثر تغییر اقلیم به‌عنوان یک چالش برای رشد و نمو گیاهان مطرح شده است (Bellard *et al.*, 2012).

سازگاری به انواع تنش‌های محیطی، به‌واسطه تغییرات در سطوح مختلف اندامک‌های موجود زنده از آناتومیکی و مورفولوژیکی تا سلولی، بیوشیمیایی و مولکولی حادث می‌گردد (Hardainiyan *et al.*, 2015). در سطح

آناتومیکی و مورفولوژیکی، می توان به پژمردگی برگها در پاسخ به کمبود آب اشاره کرد، که تعرق و میزان جذب نور و گرما را کاهش می دهد. در سطح سلولی، نیز می توان به تغییر در چرخه سلولی و تقسیم، تغییر در سیستم غشاهای داخلی و دیواره سلولی اشاره کرد. در سطح بیوشیمیایی، متابولیسم گیاه برای تطابق با شرایط تنش تغییر می یابد. این تغییرات شامل تولید تنظیم کننده های اسمزی مانند پرولین و گلیسین بتائین است، که در نهایت منجر به افزایش مقاومت سلول در برابر تنش می گردد. بیشتر تنش های محیطی دارای آثار متقابل با یکدیگر هستند، و تمامی واکنش های مشترک سلولی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی منجر به تطابق و سازگاری گیاهان در معرض تنش می شوند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

## ۲-۷-۱- تنش دمای بالا

تنش دمای بالا، در حقیقت به افزایش دما به بالاتر از سطح آستانه برای یک دوره زمانی اطلاق می گردد، که موجب خسارت در رشد و نمو گیاهان می گردد. در دماهای خیلی بالا، علاوه بر آسیب شدید سلولی، ممکن است مرگ سلول ها نیز رخ دهد، که این موضوع به دلیل تخریب ساختارهای سلولی است. خسارت مستقیم بر اثر تنش گرما شامل تخریب ساختار پروتئین ها و افزایش سیالیت غشای سلولی و همچنین خسارت غیر مستقیم است (احمدی و میرحاجی، ۱۳۹۱).

دمای هوای به میزان ۵/۰ درجه سانتی گراد در هر دهه افزایش می یابد. گیاهان توانایی حرکت و فرار از گرما را ندارند، به همین دلیل فرآیندهای رشد و نمو در آنها تحت تاثیر محیط قرار می گیرد. لذا، گیاهان ناگزیر باید با تغییرات محیطی، سازگار شوند (Bindi and Olesen., 2011; Pereira., 2016). شرایط محیطی گرم و خشک در بسیاری از مناطق دنیا در حال گسترش است. در حقیقت، تنش دمای بالا یکی از معضلات کشاورزی در دنیا محسوب می گردد (Jha et al., 2014) که منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی به دلیل گسترده گی پاسخ



گیاهان به تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شود (Zandalinas *et al.*, 2018). توده‌های گیاهی، در شرایط مشابه عکس‌العمل متفاوتی به عوامل محیطی زیستی و غیر زیستی نشان می‌دهند (Des Marais *et al.*, 2013).

شناخت مکانیسم آثار متقابل تنش‌های محیطی با فرآیندهای فیزیولوژیکی با استفاده از تکنولوژی‌های پیشرفته جهت سازگاری گیاهان و تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های محیطی ضروری است. اصولاً انتخاب گیاهان پرمحصول‌تر، به تولید بیشتر در شرایط تنش منجر نمی‌گردد. در حقیقت تنوع طبیعی، منبع ژنتیکی مناسبی برای سازگاری با تنش‌های غیر زیستی محسوب می‌گردد (Pereira., 2016). تنش دمایی بالا منجر به بسته شدن روزنه‌ها و افزایش دمای برگ در گیاهان می‌شود ( Rizhsky *et al.*, 2002 ; Zandalinas *et al.*, 2018). فتوسنتز مهم‌ترین فرآیند بیولوژیکی است، که در تحت تاثیر تنش دمایی بالا قرار می‌گیرد ( Buchner *et al.*, 2015). تنش‌های محیطی با آسیب به فتوسیستم II و ایجاد بی‌نظمی در آنزیم روبیسکو، باعث کاهش توان فتوسنتزی گیاه می‌شوند (Zandalinas *et al.*, 2018).

تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن در طی استرس دمایی بالا، منجر به استرس اکسیداتیو می‌گردد. گیاهان با تغییرات فیزیولوژیکی و اغلب با ایجاد سیگنال به منظور تغییر در متابولیسم خود با استرس مقابله می‌کنند. متابولیسم گیاه با تولید حلال‌های سازگار (که قادر به سازمان‌دهی پروتئین‌ها و ساختارهای سلولی است)، حفظ تورم سلول توسط تنظیم اسمزی، و تغییر سیستم آنتی‌اکسیدانسی برای ایجاد دوباره تعادل رادیواکتیو سلولی و هموستازی تغییر می‌یابد (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

تنش دمایی همچنین باعث ایجاد تغییراتی در بیان ژن‌های درگیر در محافظت از استرس می‌گردد. این ژن‌ها، مسئول بیان اسموپروتئین‌ها، آنزیم‌های سم‌زدا و پروتئین‌های تنظیم‌کننده هستند. اخیراً، کاربرد خارجی

ترکیبات محافظت‌کننده از قبیل اسموپروتئین‌ها (پرولین، گلیسین بتائین، ترهالوز و غیره)، فیتوهورمون‌ها (آبزیک اسید، اسید جیببرلیک، اسید جاسمونیک، براسینوستروئیدها، سالیسیلیک اسید و غیره)، مولکول‌های سیگنالینگ (به عنوان مثال، نیتریک اکسید)، پلی آمین‌ها (اسپرمیدین و اسپرمین) در مقابله با آسیب ناشی از تنش دمای بالا در گیاهان گزارش شده است (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه زیست مولکولی، منجر به افزایش شناخت ما نسبت به سیستم شبکه تنظیمی بیان ژن در گیاه شده است. این شبکه شامل ژن‌های تحریک‌پذیر (تحت تأثیر فاکتورهای محیطی و علائم نمو)، برنامه‌ریزی بیان آن‌ها و عناصر تنظیم‌کننده آن‌ها (عناصر سیس<sup>۱</sup> و عناصر ترانس<sup>۲</sup>)، مسیرهای بیوشیمیایی مربوط به آن‌ها و عوامل سیگنال‌رسانی مختلف است. به عنوان مثال، تحت شرایط کمبود آب در خاک، عوامل تنش‌زا، همیشه باعث ایجاد پاسخ‌های مشترک می‌شوند. این پاسخ‌ها شامل پاسخ‌های آناتومیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغییرات زیستی است که در نتیجه، بررسی شبکه تنظیم ژن در گیاه را پیچیده‌تر و مشکل‌تر می‌سازد. اطلاعات زیادی در این زمینه و در ارتباط با آرابیدوپسیس وجود دارد (Kawuara *et al.*, 2008).

واکنش‌های مولکولی به تنش‌های محیطی مشترک، به صورت دقیق و بخصوص در آرابیدوپسیس مطالعه شده است. این واکنش‌ها شامل شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنال‌رسانی، تولید پیام‌رسان‌های ثانویه و انتقال سیگنال است. در برخی از منابع، مسیرهای انتقال سیگنال درگیر در تنش‌های غیر زنده را به سه گروه عمده (۱) سیگنال-رسانی تنش اسمزی-اکسیداتیو که به وسیله واحدهای پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (*MAPK*)<sup>۳</sup> صورت می‌گیرد، (۲) سیگنال‌رسانی وابسته به کلسیم که منجر به فعال شدن ژن‌های *LEA*<sup>۴</sup> از جمله ژن‌های گروه

---

1-Cis-elements

2-Trans- elements

3-Mitogen-activated protein kinase

4- Late embryogenesis abundant

*DRE/CRT*<sup>1</sup> می‌شود و <sup>3</sup>) سیگنال‌رسانی فوق‌العاده حساس به نمک (*SOS*)<sup>2</sup> وابسته به کلسیم که تنظیم هموستازی یونی را انجام می‌دهد، تقسیم می‌کنند (Kawuara *et al.*, 2008).

درک سیگنال تنش در گیاهان با استفاده از گیرنده‌های مختلفی انجام می‌شود. در حقیقت، واکنش به تنش با درک سیگنال‌هایی از محیط، شروع و با تولید پیام‌رسان‌های ثانویه‌ای از قبیل اینوزیتول فسفات و گونه‌های فعال اکسیژن ادامه می‌یابد. پیام‌رسان‌های ثانویه میزان کلسیم درون سلولی را تغییر می‌دهند و این تغییر باعث ایجاد زنجیره فسفریلاسیون پروتئینی می‌گردد. پروتئین‌های هدف، عوامل رونویسی هستند که کنترل گروهی از ژن‌های دخیل در تنش را بر عهده دارند. فرآورده این ژن‌ها ممکن است در تولید مولکول‌های تنظیمی از قبیل هورمون‌های گیاهی (*ABA*)<sup>3</sup> آبسزیک اسید، اتیلن و سالیسیلیک اسید دخیل باشند (Valliyodan and Nguyen., 2006)

هر سلول به وسیله یک سد فیزیکی احاطه شده و با محیط اطراف خود در تماس است. این سد فیزیکی تنها به برخی مولکول‌های کوچک لیپیدی از قبیل هورمون‌های استروئیدی اجازه عبور را می‌دهد و سایر ترکیبات محلول در آب، از جمله یون‌ها، پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها قادر به عبور از این سد نیستند. بنابراین پاسخ سلول به محیط بیرونی، با برهم‌کنش مواد خارج سلولی با یکی از پروتئین‌های غشای پلاسمایی آغاز می‌شود. این مولکول خارج سلولی را لیگاند یا محرک و پروتئین غشایی که با این مولکول برهم‌کنش دارند، را گیرنده می‌نامند. تنش‌های مختلف زنده و غیر زنده برای سلول گیاهی به‌عنوان محرک عمل می‌کنند (Russell *et al.*, 2002). بعد از اتصال لیگاند و اتوفسفریلاسیون، چنین کیناز‌هایی به‌عنوان هسته تشکیل کمپلکس‌های پیام‌رسانی

---

1- Dehydration-responsive element/C-repea  
2-Salt-overly-sensitive  
3-Abscisic acid

عمل می‌کنند، که حاوی تعداد زیادی پروتئین هستند (Mahajan and Tuteja., 2005). سیگنال تنش در ابتدا به‌وسیلهٔ گیرنده‌های حاضر بر روی غشای سلول‌های گیاهی درک می‌شود.

این سیگنال سپس به پایین‌دست منتقل شده و باعث تولید پیام‌رسان‌های ثانویه شامل کلسیم، گونه‌های فعال اکسیژن و اینوزیتول فسفات‌ها می‌شود. پیام‌رسان‌های ثانویه مثل اینوزیتول فسفات‌ها، باعث تغییر میزان کلسیم درون سلولی شده و این تغییر سیتوزولی، به‌وسیلهٔ پروتئین‌های چسبنده به کلسیم حس می‌شود که در واقع حسگر کلسیم محسوب می‌شوند. این حسگرها ظاهراً فاقد هر نوع فعالیت آنزیمی هستند و ساختار سه بعدی آنها وابسته به کلسیم تغییر می‌کند. این حسگرهای پروتئینی در ادامه با جزء پروتئینی دیگری که در واقع شریک برهم‌کنش‌کنندهٔ مربوطهٔ آنهاست، برهم‌کنش می‌کنند که در نتیجهٔ آن یک آبشار فسفریلاسیون شروع شده و ژن‌های مهم دخیل در پاسخ به تنش و یا عوامل رونویسی کنترل‌کنندهٔ این ژن‌ها را هدف می‌گیرند (Mahajan and Tuteja., 2005).

تنش‌های محیطی منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند، بنابراین، شناسایی و بررسی پاسخ و مکانیسم‌های گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی در تولید و اصلاح گیاهان زراعی ضروری می‌باشد. از آنجا که شرایط تنش‌زای محیطی سبب اختلال در فعالیت‌های گیاهی می‌شود، لذا بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی به‌عنوان ابزاری برای مطالعه و شناخت مکانیسم‌های مقاومت در گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dieriga *et al.*, 2003). کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی، نیازمند منابع ژنتیکی برای تحمل به تنش و پایداری عملکرد است، بنابراین اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی نیازمند تحقیقات گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به تنش و عوامل تنظیم‌کننده می‌باشد (Chen *et al.*, 2002). عملکرد و بقاء گیاهان همیشه به‌واسطهٔ تنش‌های مختلف محیطی در معرض تهدید می‌باشد و به همین علت تحقیقات زیادی در ارتباط با بررسی

پاسخ گیاهان از نقطه نظر ژنتیکی و فیزیولوژیکی جهت شناسایی سازوکارهای تحمل به تنش انجام شده است. اما این مهم، هنوز نیازمند درک عمیق‌تر از سازوکارهای سلولی و مولکولی پاسخ به تنش و تحمل آن در گیاه است (Merah., 2001). بنابر آنچه ذکر شد، می‌توان گفت که تنش دمایی بالا در حال و آینده، یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش‌روی تولید محصولات کشاورزی خواهد بود. یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های مقابله با تنش دمایی بالا ایجاد و گسترش ارقام متحمل به گرما از طریق برنامه‌های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک می‌باشد.

## ۲-۸- هورمون‌های گیاهی

تحمل به تنش (مقاومت به تنش)، به‌عنوان توانایی گیاه در مواجهه شدن با شرایط نامساعد محیطی تعریف می‌گردد. بیشتر تنش‌های محیطی با یکدیگر مرتبط هستند و منجر به ایجاد پاسخ‌های مشابه‌ای از سمت گیاه می‌شوند. بیشتر این واکنش‌ها بر اساس تنظیم‌کننده‌ها و هورمون‌های گیاهی از جمله آبسزیک اسید و غیره رخ می‌دهند. واکنش‌های هورمونی باید به صورتی باشند، که منجر به ایجاد اختلال در فعالیت‌های متابولیسمی سلول نشوند. در واقع تیمار گیاه با هورمون‌ها و یا مواد تنظیم‌کننده اسمزی با غلظت مناسب به‌صورت خارجی باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش می‌گردد، هر چند که این آثار با توجه به مرحله رشدی و موقعیت گیاه متفاوت خواهد بود (عازمی و دهستانی، ۱۳۹۶).

هورمون‌ها دسته‌ای از ترکیبات هستند، که در بخشی از بدن موجود زنده تولید می‌شوند و پس از انتقال به سایر قسمت‌ها، دارای آثار فیزیولوژیکی محسوسی هستند (در غلظت‌های بسیار کم فعال هستند). هورمون‌های گیاهی که اغلب فیتوهورمون نامیده می‌شوند، در بافت‌های مریستمی و یا جوان ساخته می‌شوند و غالباً اثر خود را پس از انتقال بر جای می‌گذارند (Kagal et al., 2007).

همانطور که گفته شد، واژه هورمون باید به ترکیباتی محدود گردد، که به صورت طبیعی در بدن موجود زنده ساخته می‌شوند. لذا هورمون‌های گیاهی از جمله مواد آلی می‌باشند که توسط گیاهان تولید می‌شوند و در غلظت‌های کم فرآیندهای فیزیولوژیکی را تنظیم می‌کند (Jager *et al.*, 2008). به صورت کلی اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، سایتوکینین‌ها، اسید آبسزیک، اتیلن، اپی براسینواستروئیدها، سالیسیلات‌ها و جاسمونات‌ها از جمله مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی هستند (Jager *et al.*, 2008).

## ۲-۸-۱- براسینواستروئیدها

براسینواستروئید ششمین گروه از هورمون‌های گیاهی است، که بعد از اکسین، جیبرلین، سایتوکینین، اتیلن و آبسزیک اسید در سال ۱۹۷۰ از دانه گرده گیاه کلزا استخراج شد. براسینواستروئیدها در رشد گیاهان متعدد و فرآیندهای رشد، همچون طویل شدن سلول، فوتومورفوژنیز (اثر نور بر شکل گیاه) (Photomorphogenesis)، کنترل زمان گل‌دهی و واکنش‌ها به استرس، دخیل هستند. خواب بذر یا جوانه‌زنی در گیاهان توسط شرایط محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند. جیبرلین‌ها (GAها)، براسینواستروئیدها (BRها)، اسید آبسزیک (ABA)، سیتوکینین (CK)، اتیلن، اسید سالیسیلیک (SA) برای رشد و جوانه زنی گیاهان ضروری هستند (Jager *et al.*, 2008).

براسینواستروئیدها، تنها دسته مشخصی از هورمون‌های استروئیدی در گیاهان هستند. آن‌ها به صورت گسترده در گیاهان وجود داشته و در غلظت‌های خیلی کم نیز فعال هستند (Kagal *et al.*, 2007; Krishna., 2003). براسینواستروئیدها تحمل به تنش غیرزیستی و رشد را ارتقاء داده و مسیرهای پیام‌رسانی آنها دارای آثار متقابلی با آبسزیک اسید، اکسین، سیتوکینین، اتیلن، جیبرلین، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک

اسید هستند. آبسزیک اسید و براسینواستروئیدها بسته شدن روزنه را از طریق نیتریک اکسید و تحمل به خشکی افزایش می‌دهند. در حالی که براسینواستروئیدها، بیوسنتز آبسزیک اسید را ارتقاء می‌دهند، براسینواستروئید و آبسزیک اسید به صورت مشترک تعدادی از ژن‌ها را تنظیم کرده، آبسزیک اسید به صورت منفی اجزاء مسیرهای پیام‌رسانی اپی براسینواستروئید را تنظیم می‌نماید (Planas *et al.*, 2019).

براسینواستروئید دارای دو فاکتور رونویسی مهم به نام‌های BES1 و BZR1 در گیاهان است. در هنگام عدم وجود پیام اپی براسینواستروئید، این دو عامل رونویسی توسط پروتئینی به نام 14-3-3 احاطه می‌شوند، بنابراین فسفریله نمی‌گردند، عامل BKI1 به گیرنده براسینواستروئید متصل می‌گردد و در این حالت کل مجموعه خاموش شده، ژن‌های مرتبط با براسینواستروئید که در هسته خاموش بودند به محض اتصال اپی براسینواستروئید (کاربرد خارجی) به گیرنده آبخاری از فسفریلاسیون اتفاق می‌افتد. در این حالت پروتئین 14-3-3 از دو فاکتور رونویسی BES1 و BZR1 جدا شده و امکان فسفریلاسیون این دو فاکتور رونویسی فراهم می‌گردد، در ضمن پروتئین 14-3-3 به BKI1 متصل شده و مانع از اتصال BKI1 به گیرنده می‌گردد. مجموعه این رخدادها باعث بیان و رونویسی ژن‌های پاسخ‌دهنده به براسینواستروئید می‌گردد، براسینواستروئیدها دارای ۲۴ زیرمجموعه اصلی و ۲ نوع الحاقی هستند، که اپی براسینواستروئیدها از زیر مجموعه براسینواستروئیدها است (Planas *et al.*, 2019).

## ۲-۹- تجزیه کمی رونوشت

روش‌های متفاوتی به منظور ارزیابی رونوشت‌ها شامل نورترن بلاتینگ<sup>۱</sup> (Parker *et al.*, 1995)، نمایش افتراقی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز<sup>۱</sup> (Liang *et al.*, 1992)، آنالیز زنجیره‌ای تظاهر ژن<sup>۲</sup> (Velculescu *et al.*, 1995)،

---

1-Northern Blotting

هیبریداسیون در محل<sup>۳</sup> (Parker *et al.*, 1995)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی<sup>۴</sup> وجود دارند (Boucher *et al.*, 1999).

روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی، روشی برای تکثیر توالی‌های RNA در نمونه‌های مختلفی از یک سلول است. این روش دارای بیشترین حساسیت در بین روش‌های کمی است و از آن به‌منظور مقایسه سطوح mRNA در نمونه‌های مختلف، تعیین الگوی تظاهر mRNA، تمایز بین mRNAهای بسیار نزدیک (از نظر روابط خویشاوندی) و تجزیه ساختار RNA استفاده می‌شود (Bustine., 2000).

## ۲-۹-۱- اصول روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی

این روش تا حدودی پیچیده است و به عوامل زیادی وابسته می‌باشد، لذا برای نرمال کردن، تکرار پذیری و صحت واکنش باید همزمان عوامل زیادی را مدنظر قرار داد. در حقیقت اختصاصی بودن، حساسیت و تکرار پذیری از مهمترین خصوصیات کیفی مرتبط با این روش است. با توجه به اینکه نمی‌توان از RNA به عنوان الگوی اولیه در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده کرد، لذا اولین مرحله در روش PCR زمان واقعی<sup>۵</sup> تبدیل RNA به cDNA و سپس تکثیر نمایی آن در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. در این روش از پلی‌مرازهای وابسته به DNA و RNA اختصاصی در واکنش‌های جداگانه (دو آنزیم/ دو تیوب) یا در یک واکنش (دو آنزیم/ یک تیوب) استفاده می‌شود (Bustine., 2000).

- 
- 1- Differential Display PCR
  - 2- Serial Analysis of Gene Expression
  - 3- In situ hybridization
  - 4- Quantitative reverse transcriptase PCR
  - 5 -Real time PCR



## ۲-۹-۲- نسخه برداری معکوس

رونوشت‌های RNA، ساختارهای ثانویه‌ای هستند، که عملکرد و توانایی پلی‌مرازهای DNA وابسته به RNA و آنزیم‌های نسخه بردار معکوس<sup>۱</sup> را برای ایجاد رونوشت‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهند. AMV-RT<sup>۲</sup> و MMLV-RT<sup>۳</sup> دو آنزیم معمول برای نسخه هستند. آنزیم AMV-RT، نسبت MMLV-RT قوی‌تر است و فعالیت سنتزی خود را در دمای بالاتر از ۶۰°C نیز حفظ می‌کند. آنزیم MMLV-RT دارای فعالیت RNase H کمتری نسبت به AMV-RT است. از آنجاکه کاهش فعالیت RNase H با تولید رونوشت‌های طولانی تداخل دارد، لذا در زمان تکثیر مولکول‌های کامل cDNA<sup>۴</sup>، استفاده از آنزیم AMV-RT مناسب‌تر است (Bustine *et al.*, 2005).

در نسخه برداری معکوس از آغازگرهای اختصاصی، هگزامرهای تصادفی و یا آغازگرهای Oligo dt استفاده می‌شود. استفاده از آغازگرهای تصادفی و Oligo dt تعداد مولکول‌های mRNA را افزایش می‌دهند (Bustine *et al.*, 2005).

## ۲-۹-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی (qRT-PCR)

با کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پیشرفت‌های چشمگیری در تشخیص DNA حاصل گردید. با استفاده از این روش‌ها، تنها یک کپی از یک توالی خاص را می‌توان تکثیر کرد. از نظر تئوری بین مقدار توالی هدف شروع کننده و مقدار محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در هر سیکل، یک رابطه کمی وجود دارد. با استفاده از روش

---

1- Reverse transcriptase enzymes

2-Avian myeloblastosis virus- reverse transcriptase

3- Moloney murine leukaemia virus - reverse transcriptase

4- Full-length cDNA

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی قادر خواهیم بود تا این تغییرات را کنترل و محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز را به صورت کمی ارزیابی کنیم (Biosystems P., 2005).

اندازه‌گیری اسیدهای نوکلئیک در مراحل اولیه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، نسبت به ارزیابی مرتبط با روش‌های استاندارد در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دارای مزیت بزرگی است، چرا که در روش‌های استاندارد، ارزیابی تکثیر صرفاً با استفاده از ژل آگارز و در آخرین مرحله واکنش انجام می‌گیرد. این روش زمان‌بر است و از دقت بالایی برخوردار نمی‌باشد. از سوی دیگر قدرت تشخیص ژل آگارز بسیار ضعیف است و حداکثر قادر به تشخیص تفاوت‌های بیش از ۸ برابر می‌باشد، در صورتی که در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی می‌توان کمترین تفاوت‌ها در مقدار اسید نوکلئیک را ارزیابی کرد. در حقیقت در روش ارزیابی مبتنی بر ژل آگارز مشکلات دقت پایین، حساسیت کم، قدرت تشخیص پایین، عدم اتوماتیک بودن، تمایز صرفاً براساس اندازه باندها، عدم ارائه نتایج به صورت عددی، عدم کمی بودن رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید وجود دارد (Caldana *et al.*, 2007)

## ۲-۹-۴- روش‌های ارزیابی کمی

نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ابزاری قوی برای ردیابی و تعیین کمیت mRNA می‌باشد. امروزه از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی به فراوانی استفاده می‌شود، زیرا این روش از حساسیت بالایی برخوردار است و تکرار پذیر می‌باشد. این روش به‌ویژه برای مقادیر mRNA کم بسیار حساس و مناسب است (Bustine, 2000؛ Pfaffl *et al.*, 2004) و همچنین برای بررسی تغییرات کوچک در سطح تظاهر mRNA کارآمد می‌باشد (Bustine., 2000؛ Pfaffl *et al.*, 2004). انجام این روش به دقت زیادی نیاز دارد، زیرا به شدت تحت تاثیر شرایط محیط و سایر تغییرات قرار می‌گیرد.

دو روش نسبی<sup>۱</sup> و دقیق<sup>۲</sup> برای ارزیابی اسید نوکلئیک‌های هدف وجود دارد. در ارزیابی دقیق، میزان دقیق DNA هدف (بصورت تعداد کپی و یا غلظت) از طریق مقایسه با منحنی‌های استاندارد تعیین می‌شود (Pfaffl et al, 2004). در حالی که در ارزیابی نسبی، نسبت بین مقدار DNA هدف و یک مولکول مرجع<sup>۳</sup> که معمولاً یک ژن خانه‌دار<sup>۴</sup> است، تعیین می‌شود.

## ۲-۹-۵- منحنی‌های ذوب

از آنجایی که اختصاصی بودن آغازگرها در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز کمی با نسخه برداری معکوس در زمان واقعی از اهمیت بالایی برخوردار است، به همین منظور در پایان هر واکنش با رسم منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر می‌توان از اختصاصی بودن آن‌ها مطمئن شد. برای رسم یک منحنی ذوب، درجه حرارت به آرامی از یک میزان کم (مثلاً نزدیک به دمای اتصال آغازگر) به مقدار بالا (مثلاً ۹۰°C) افزایش می‌یابد. در درجه حرارت‌های پایین تمامی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به صورت دو رشته هستند و رنگ سایبر گرین به آن‌ها متصل است و در نتیجه میزان فلورسنت بالا می‌باشد، در حالی که در درجه حرارت‌های بالا محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تک رشته‌ای خواهد بود و در نتیجه میزان فلورسنت به شدت کاهش می‌یابد. در این روش میزان فلورسنت به صورت پیوسته و همزمان با افزایش درجه حرارت اندازه‌گیری و به صورت یک منحنی دو بعدی همراه با مقادیر حرارت در محور X رسم می‌گردد. در این حالت، در منحنی رسم شده کاهش سریعی در میزان فلورسنت و در درجه حرارت‌های بالا که تقریباً برابر با درجه حرارت ذوب محصولات اختصاصی و غیر اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز می‌باشد، مشاهده می‌گردد. با مشاهده صرفاً یک پیک در محدوده درجه

---

1- Relative quantification  
2- Absolute quantification  
3- Reference molecule  
4- Housekeeping gene

حرارت ذوب آغازگر مورد بررسی، می‌توان به اختصاصیت آغازگر مطمئن شد. وجود بیش از یک پیک در منحنی رسم شده بیانگر تکثیر قطعات غیر اختصاصی همراه با قطعه هدف می‌باشد (Vandesompele *et al.*, 2002).

## ۲-۹-۶- نرمال سازی

به منظور تصحیح تنوع بین نمونه‌ها و اشتباهات روی داده در طی آزمایش، نرمال کردن داده‌ها ضروری می‌باشد. معمولاً مواد آزمایشی جمع‌آوری شده توسط افراد مختلف، از لحاظ مقدار بافت یا تعداد سلول، یکپارچگی یا مقدار RNA یا تیمار آزمایشی با یکدیگر متفاوت هستند. تحت شرایط ایده‌آل، سطوح mRNA بر اساس تعداد سلول استاندارد می‌شود، اما در زمان استفاده از نمونه‌های بافتی کامل، این نوع نرمال کردن غیر ممکن است ( *et al.*, 2002). بنابراین نتایج PCR زمان واقعی معمولاً با یک ژن کنترل نرمال می‌شود، که ممکن است به عنوان یک کنترل مثبت برای واکنش عمل نماید. ژن کنترل مناسب بایستی در یک شکل بدون تغییر، بدون توجه به شرایط آزمایش، از جمله بافت یا نوع سلول، مرحله‌نموی یا تیمار نمونه، بیان شود. از آنجایی که هیچ ژنی وجود ندارد که تمام این خصوصیات را در همه شرایط آزمایشی داشته باشد، لذا ضروریست که پایداری بیان یک ژن کنترل براساس نیازمندی‌های یک آزمایش و قبل از استفاده از آن جهت نرمال‌سازی، تأیید شود (Wong and Medrano., 2005).

## ۲-۹-۷- موارد کنترلی

چند روش کنترل برای تعیین صحت در هر مرحله از فرآیند بررسی بیان ژن وجود دارد. آلودگی DNA در نمونه مورد آزمایش به وسیله کنترل رونویسی معکوس تعیین می‌گردد. همچنین می‌توان از روش طراحی آغازگر PCR برای ژن هدف بر اساس مرز دو اگزون استفاده کرد. تفاوت در کارایی رونویسی معکوس و مقدار rRNA موجود در واکنش ساخت cDNA را می‌توان با استفاده از یک کنترل داخلی تعیین کرد (Liu and saint., 2002). معمولاً از ژن‌هایی با بیان ثابت به عنوان ژن‌های کنترل استفاده می‌شود. به واسطه حساسیت زیاد و دقت این روش نسبت به سایر تکنیک‌های تعیین کمی معمول، مشخص شده است که بسیاری از ژن‌های خانه‌دار مناسب مانند GAPDH و  $\beta$ -actin، در تیمارهای مختلف، فرآیندهای زیستی و حتی بافت‌ها یا انواع سلول‌های مختلف، تحت تأثیر واقع می‌شوند. بدین لحاظ، استفاده از تنها یک ژن خانه‌دار می‌تواند منجر به ایجاد نتایج اشتباه گردد (Bustin., 2000). از ژن‌های rRNA، نیز برای نرمال کردن میزان بیان استفاده می‌شود. از بین دو rRNA عمده، یعنی 28S و 18S، 28S یکپارچگی mRNA را بهتر نشان می‌دهد، زیرا 18S به طور کامل در نمونه و به همراه mRNA تجزیه شده، باقی می‌ماند (Banerjee *et al.*, 2000). rRNAها به وسیله یک آنزیم پلی‌مراز متفاوت نسبت به mRNA رونویسی می‌شوند، بنابراین تغییر در فعالیت پلی‌مراز، بیان هر دو نوع RNA را به یک اندازه تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. در واقع این یک مزیت است که بیان rRNA کمتر تحت تأثیر تیمارهایی قرار می‌گیرد که بیان mRNA را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Banerjee *et al.*, 2000).

## ۲-۱۰- مرور منابع

مرادی و همکاران (۱۳۸۹) به منظور بررسی تنوع توده‌های بومی شنبلیله ایرانی، ۲۰ توده از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری و صفات کمی و کیفی را در آن‌ها بررسی کردند. نتایج نشان داد که توده‌های شنبلیله مورد

بررسی از نظر صفات ارزیابی شده در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند. عملکرد توده‌های مورد بررسی ۲۳/۹۳ الی ۴۴/۴۱ گرم وزن تر در هر بوته متغیر بود. همچنین توده‌های مورد بررسی از نظر زمان گل‌دهی به سه دسته گروه‌های زودگل، میان‌گل و دیرگل طبقه‌بندی شدند. این توده‌ها از ۳۹ تا ۷۶ روز بعد از کاشت وارد مرحله‌ی گلدهی شدند. وزن هزار دانه نیز در میان توده‌ها متفاوت بود و میزان آن از ۵/۵۶ گرم در توده سمنا تا ۱۹/۴۴ گرم در توده کرمانشاه متغیر بود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای، توده‌ها به سه گروه اصلی طبقه‌بندی شدند. نتایج پژوهش نشان داد که توده‌های بومی شنبلیله ایرانی از نظر صفات مورد مطالعه دارای تنوع زیادی هستند.

چاپودهای و همکاران (۲۰۱۵) تغییرات میزان محتوی دایوسجنین را در گیاهچه‌های شش توده شنبلیله تحت تیمار جاسمونیک اسید بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که سطوح مختلف جاسمونیک اسید باعث تغییر در میزان بیان ژن‌های HMG و STRL به ترتیب به میزان ۳/۲ و ۲۲/۲ برابر گردید. نتایج آن‌ها نشان داد، که جاسمونیک اسید می‌تواند به عنوان یک محرک مناسب در افزایش کمیت دایوسجنین در شنبلیله موثر باشد.

به منظور بررسی میزان تاثیر هورمون سالیسیلیک اسید بر کاهش اثر تنش گرما در گیاه بابونه آلمانی رقم اصلاح شده بودگولد (Bodegold) آزمایشی در سال ۹۱ - ۱۳۹۰ توسط قاسمی و همکاران انجام شد. در این طرح از هورمون سالیسیلیک اسید در ۵ سطح (۱۰، ۲۵، ۱۰۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط تنش گرمایی (بیشتر مرحله رویشی و بخشی از دوره زایشی) استفاده شد. نتایج نشان داد که اثر سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر تمام صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هورمون سالیسیلیک اسید نسبت به سایر تیمارها دارای برتری بود. تمامی صفات اندازه‌گیری شده در این سطح هورمون به جز صفت ارتفاع بوته، نسبت به شاهد دارای برتری بودند (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۱).

در یک تحقیق، اثر سالیسیلیک اسید و تنش شوری بر میزان تغییرات متابولیکی در گیاه بابونه بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که، تنش شوری و کاربرد سالیسیلیک اسید بر روی میزان ترکیبات فنولیکی، فنول محلول، مالون دی آلدئید در برگ و ریشه معنی دار بود. در حقیقت کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به کاهش آثار تنش شوری بر روی گیاه گردید (Kovacik et al., 2009).

در یک پژوهش اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف متانول در عملکرد دانه و موسیلاژ شنبلیله ارزیابی شد. در این آزمایش محلول پاشی در طول فصل رشد طی سه نوبت با فواصل زمانی ۱۲ روز یک بار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار شاهد (محلول پاشی با آب مقطر بدون کاربرد متانول) و محلول با چهار غلظت مختلف متانول (شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد حجمی) بود. نتایج این پژوهش نشان داد که محلول پاشی غلظت‌های مختلف متانول تأثیر معنی داری بر تعداد ساقه فرعی بوته، تعداد برگ بوته، وزن خشک بوته، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، عملکرد دانه، عملکرد موسیلاژ دانه، خاکستر دانه، شاخص تورم دانه (در سطح یک درصد)، ارتفاع بوته و وزن هزار دانه (در سطح ۵ درصد) گیاه داشت. نتایج حاصله نشان داد است که محلول پاشی متانول به عنوان یک محرک زیستی فعال و روشی نوین در تولید گیاهان دارویی موجب بهبود عملکرد دانه و موسیلاژ دانه شنبلیله می‌شود. بیشترین مقادیر برای خصوصیات مورد ارزیابی در القای تیمار محلول پاشی با غلظت ۴۰ درصد حجمی متانول بدست آمد (مهرآفرین و همکاران ۱۳۹۴).

در یک بررسی روی کشت سلولی قطعات هیپوکوتیل شنبلیله در محیط کشت MS حاوی نفتالن استیک اسید (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) و کاربرد همزمان سالیسیلیک اسید با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، تغییرات مقادیر تولید تریگونلین و شاخص‌های فیزیولوژیک پس از گذشت یک هفته از اعمال تیمار بررسی شدند. رشد سلولی و زنده‌مانی سلول‌ها تحت اثر تیمارها نسبت به شاهد

کاهش، درحالی‌که، پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌ها نسبت به شاهد تحت اثر تیمارها افزایش یافت. تیمار سلول‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک‌اسید باعث افزایش میزان تریگونلین به میزان دو برابر شاهد گردید. در نتیجه سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان محرک در کشت سلولی شنبلیله معرفی گردید، چراکه منجر به تحریک تولید بیشتر تریگونلین شد (اسمعیل‌زاده به‌آبادی و رضایی‌نوده‌ی، ۱۳۹۲)

نقی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) به منظور بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ذرت، رقم هیبرید سینگل کراس ۷۰۴، محلول‌پاشی برگ‌ی سالیسیلیک‌اسید در شرایط تنش خشکی، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با شش تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۲ انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل سالیسیلیک‌اسید (۰ و ۱۰ میلی‌مولار) و تنش خشکی (۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) بودند. نتایج بدست آمده نشان داد که اعمال تنش خشکی در هر دو سطح، باعث کاهش معنی‌دار، محتوی نسبی آب، کلروفیل a، b و کلروفیل کل، وزن تر بوته، طول ساقه و سطح برگ گردید و این کاهش در تنش، ۵۰ درصد ظرفیت زراعی شدیدتر بود. همچنین هر دو سطح تنش و به‌ویژه تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، افزایش معنی‌دار نشت یونی و میزان فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند: کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را به‌همراه داشت. در مقابل، محلول‌پاشی برگ‌ی بوته‌های ذرت در مرحله چهار برگ‌ی با سالیسیلیک‌اسید موجب افزایش محتوی نسبی آب، کلروفیل a، b و کلروفیل کل، فعالیت آنزیم‌های آن‌تی‌اکسیدان، وزن تر بوته و سطح برگ در هر دو شرایط تنش و عدم تنش خشکی گردید که البته تاثیر مثبت سالیسیلیک‌اسید در شرایط تنش خشکی بیشتر از شرایط عدم تنش بود و در بالاترین سطح خشکی مصرف سالیسیلیک‌اسید، کاهش ۲۰ درصدی نشت یونی را به‌همراه داشت. به نظر می‌رسد که محلول‌پاشی برگ‌ی سالیسیلیک‌اسید از طریق افزایش محتوی نسبی آب و فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های آنزیمی و نیز با کاهش نشت یونی برگ سبب افزایش مقاومت به خشکی برگ گردید.



سرتیپ و سیروس مهر ۱۳۹۶ از اسید سالیسیلیک به منظور کاهش صدمات ناشی از تنش خشکی و بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی زیره سبز استفاده کردند. این آزمایش به صورت کرت‌های خردشده بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل سه سطح ۵۰ (شاهد)، ۱۰۰ و ۱۵۰ (تنش خشکی) میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A به عنوان عامل اصلی و محلول پاشی اسید سالیسیلیک (صفر به عنوان شاهد، ۱ و ۳ میلی‌مولار) به عنوان عامل فرعی در سه تکرار اجرا گردید. نتایج نشان داد که سطوح مختلف تنش، اسید سالیسیلیک و اثر متقابل آن‌ها بر رشد و نمو گیاه زیره سبز دارای آثار معنی‌داری بودند. تنش خشکی سبب کاهش میزان رنگیزه کلروفیل a گردید. در حالی که میزان پرولین و کربوهیدرات را افزایش داد. کاربرد اسید سالیسیلیک باعث افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و هیدرات‌های کربن گردید. اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر تمامی صفات به جز هیدرات کربن و کلروفیل a معنی‌دار شد. استفاده از اسید سالیسیلیک راهکاری مناسب به منظور افزایش مقاومت گیاه زیره سبز در مقابل تنش خشکی است.

قربانلی و همکاران (۱۳۹۱) به منظور بررسی اثر تنش شوری و کاربرد همزمان آسکورات بر محتوی پرولین، آنزیم‌های کاتالاز، آسکورات پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید در گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L) گیاهان را سه هفته بعد از جوانه‌زنی با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ میلی‌مولار) و آسکورات (۹ میلی‌مولار) تیمار کرد. در گیاهان تحت تیمار شوری با افزایش غلظت کلرید سدیم محتوی پرولین، کاتالاز، آسکورات پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید افزایش یافت. در گیاهانی که همزمان با کلرید سدیم و آسکورات تیمار شده بودند، میزان پرولین، کاتالاز و آسکورات پراکسیداز افزایش بیشتری نشان دادند.

به منظور بررسی واکنش گیاه دارویی شوید به تنش خشکی در مرحله رشد رویشی آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این تحقیق صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه شوید در شرایط آبکشت و در

محیط تنش با پتانسیل‌های اسمزی صفر (شاهد)،  $1/5$ ،  $2/5$  و  $3-5$  بار بررسی شد. نتایج نشان داد که، تنش خشکی بر صفاتی مانند طول ساقه، طول ریشه، سطح برگ و تعداد برگ موثر بود. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که، با افزایش تنش خشکی تمامی صفات اندازه‌گیری شده کاهش یافتند. همچنین تنش خشکی تاثیر معنی‌داری بر روی میزان صفات کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئید، پروتئین‌های محلول، ترکیبات فنلی و عناصر پتاسیم، فسفر و کلسیم بخش هوایی و ریشه داشت. با افزایش تنش، میزان کلروفیل، کاروتنوئید، پروتئین‌های محلول، غلظت عناصر پتاسیم، فسفر و کلسیم بافت و نسبت پتاسیم بخش هوایی به ریشه کاهش یافت، درحالی‌که میزان ترکیبات فنلی بخش هوایی و ریشه افزایش یافت. (ستایش‌مهر و گنجعلی، ۱۳۹۲).

در یک تحقیق اثر سه غلظت ۲۴ - اپی براسینواستروئید ( $10^{-10}$ ،  $10^{-8}$ ،  $10^{-6}$  مولار) تحت دو تنش خشکی ملایم (دو سوم ظرفیت زراعی) و خشکی شدید (یک سوم ظرفیت زراعی) بر پارامترهای رشد گیاه بادمجان شامل طول اندام هوایی و ریشه، تعداد برگ و همچنین پارامترهای فیزیولوژیکی شامل کلروفیل a، b و کل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، محلول‌پاشی با اپی براسینواستروئید تحت هر دو تنش خشکی ملایم و شدید منجر به افزایش پارامترهای رشد گیاه بادمجان نسبت به شاهد گردید. نتایج حاصل نشان داد که محتوی کلروفیل a، b و کل و پروتئین با اعمال تنش خشکی کاهش یافت و کاربرد اپی براسینواستروئید سبب افزایش این شاخص‌ها گردید (حسینی و همکاران، ۱۳۹۴).

فتحی‌رضایی و راکعی (۱۳۹۶) در یک پژوهش اثر ساکارز (۱۵، ۳۰ و ۴۵ گرم در لیتر) را بر میزان وزن تر، تولید آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین، پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و گایاکول پراکسیداز تاتوره را بررسی کردند. بیشترین میزان وزن تر ( $0/82$  گرم)، محتوی هیوسیامین (۵ میلی گرم در گرم وزن تر)، اسکوپولامین (۲۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و فعالیت کاتالاز ( $0/5$  واحد در میلی گرم پروتئین) در

ریشه گیاهچه‌های تیمار شده با ساکارز ۴۵ گرم در لیتر اندازه‌گیری شد، در حالی که بیشترین میزان پروتئین (۰/۲۴ میلی گرم در گرم وزن تر) در بخش هوایی گیاهچه‌های تیمار شده با ساکارز ۳۰ گرم در لیتر بدست آمد. در مجموع، نتیجه گیری شد، ساکارز با غلظت ۴۵ گرم در لیتر می‌تواند محرک خوبی برای افزایش تولید هیوسیامین و اسکوپولامین با ارزش دارویی بالا در گیاه تاتوره باشد.

نویخت و همکاران (۱۳۹۴) به منظور بررسی اثر تنش خشکی در نعنای فلفلی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه اجرا کردند. تیماری‌های آزمایشی شامل تنش خشکی در ۳ سطح (۸۵، ۶۰، ۳۵ درصد ظرفیت زراعی) و محلول‌پاشی هیدروژن پراکسید در ۴ سطح (۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌مولار) و صفات مورد بررسی شامل فلورسانس رنگدانه‌ها (نسبت فلورسانس لحظه‌ای به فلورسانس پایه  $(Fv/F0)$ ، نسبت فلورسانس لحظه‌ای به بیشینه در تاریکی  $(Fv/Fm)$ ، فلورسانس متغیر به پایه در شرایط  $(F'v/F'm)$ ، خاموش شدگی فتوشیمیایی  $(qP)$ ، غیرفتوشیمیایی  $(qNP)$  و عملکرد کوانتومی  $(PSII^o)$  قندهای محلول، آنتوسیانین، ترکیبات فنل کل و وزن خشک بوته بود. نتایج نشان داد، آثار اصلی تنش خشکی و محلول‌پاشی بر صفات مورد بررسی معنی‌دار بودند. تنش موجب کاهش شاخص‌های فلورسانس (به جزء  $Fv/F$  و  $qP$ ) و کاهش وزن خشک بوته (۲۵ درصد) شد. محلول‌پاشی هیدروژن پراکسید نیز موجب افزایش صفات نام‌برده به جزء آنتوسیانین‌ها،  $Fv/F0$  و  $qP$  گردید. نتایج نشان داد که، تنش موجب کاهش توان فتوسنتزی گیاه و کاهش میزان بیوماس تولید شده می‌شود، محلول‌پاشی غلظت‌های ملایم هیدروژن پراکسید نیز می‌تواند به‌عنوان یک سیگنال جهت بهبود سیستم‌های فتوسنتزی گیاه و تولید متابولیت‌های سازگاری عمل نماید.

در یک تحقیق، آثار کاربرد اتیلن بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیان برخی ژن‌های مسیر دایوسجنین و همچنین محتوی آن بررسی شد. در این تحقیق از چهار غلظت مختلف اتفن ( $10^{-1}$  تا  $10^{-4}$ ) استفاده گردید. نتایج آنها

نشان داد که غلظت‌های بالای اتفن مانع از رشد گیاه یام (*Dioscorea zingiberensis*) می‌گردد، درحالی‌که غلظت‌های پایین تحریک کننده رشد بود. محتوی دایوسجنین در غلظت  $10^{-3}$  به صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین پروتئین کل و محتوی کلروفیل به ترتیب در غلظت‌های  $10^{-2}$  و  $10^{-3}$  به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. نتایج آنها در بخش بیان ژن نشان داد که کاربرد اتفن منجر به افزایش بیان ژن *QS* و کاهش بیان *CAS* گردید (Diarra et al., 2013).

وو و همکاران در سال ۲۰۱۹ عکس العمل آرابیدوپسیس را در مواجهه با عنصر شیمیایی آنتیموان در تیمار با اپی براسینواستروئید بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که کاربرد اپی براسینواستروئید منجر به افزایش محتوی پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پرولین و افزایش طول ریشه می‌گردد. در ضمن محتوی مالون‌دی‌آلدهید در نمونه‌های تیمار شده با اپی براسینواستروئید کاهش یافت. آنها نتیجه گرفتند که کاربرد براسینواستروئید می‌تواند بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید آنتی‌اکسیدانت‌ها را افزایش داده و به عنوان یک محرک مناسب جهت بهبود مقاومت گیاه به سمیت ناشی از غلظت عناصر شیمیایی موجود در خاک موثر باشد (Wu et al., 2019).

خان و همکاران (۲۰۱۹) اثر اپی براسینواستروئید را بر روی مقاومت دو رقم گوجه‌فرنگی حساس و مقاوم نسبت به دمای پایین بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که کاربرد اپی براسینواستروئید به صورت اسپری‌پاشی در مراحل مختلف رشد می‌تواند باعث افزایش محتوی پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پرولین در هر دو رقم حساس و مقاوم گردد. در آزمایش آنها غلظت‌های بالای اپی براسینواستروئید دارای آثار معکوسی بود (Khan et al., 2019).

فصل سوم

مواد و روش ها

### ۳-۱- مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر اپی براسینواستروئید بر بیان برخی از ژن‌های مسیر دایوسجنین و همچنین ویژگی‌های فیزیولوژیکی شنبلیله، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. در این آزمایش از هورمون اپی براسینواستروئید در چهار سطح ۰، ۲، ۵ و ۱۰ ppm در دو شرایط دمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد (تنش دمای بالا) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای نرمال) استفاده گردید. در ضمن در دو بازه زمانی ۶ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش از گیاهان نمونه برداری شد. در این آزمایش ابتدا بذور گیاه شنبلیله ضدعفونی و در گلدان‌های ۲۰ سانتی‌متری با ترکیب پیت ماس و پرلیت کشت گردیده، در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد داده شدند. در این تحقیق از دو توده گیاه شنبلیله همدان (محتوی دایوسجنین پایین و بشرویه محتوی دایوسجنین بالا که از دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوتکنولوژی تهیه گردیدند) استفاده شد. این دو توده قبلاً توسط محمدی و همکاران (۲۰۱۹) از بین ۹ توده مختلف انتخاب شدند.

گیاهان شش هفته‌ای با سه سطح هورمون اپی براسینواستروئید اسپری‌پاشی شدند و به منظور اطمینان از اثر این هورمون، اسپری‌پاشی مجدداً در روز بعد انجام شد و گلدان‌ها به دو قسمت تقسیم شدند. تعدادی از گلدان‌ها در شرایط نرمال و تعدادی دیگر به اتاقک رشد به منظور اعمال تنش گرمایی منتقل شدند. سپس در زمان‌های ۶ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تنش دمای بالا از برگ‌های گیاه نمونه‌برداری شد و بلافاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

### ۳-۲- اندازه‌گیری کلروفیل

برای این منظور، ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه برگی با ازت مایع به خوبی پودر شد و در پنج میلی‌لیتر

استون ۸۰ هموژنایز گردید. سپس نمونه‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آنها با استفاده از استون به حجم ده میلی‌لیتر افزایش یافت (آرنون، ۱۹۶۷). سپس میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV 2150) و در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر تعیین گردید و غلظت کلروفیل a، b و مجموع آنها از طریق روابط زیر به دست آمد:

$$a \text{ گرم گرم بافت / میلی گرم کلروفیل} = 12/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{645}) \times V/1000 \times W$$

$$b \text{ گرم بافت / میلی گرم کلروفیل} = 22/9 (A_{645}) - 4/69 (A_{663}) \times V/1000 \times W$$

$$\text{گرم بافت / میلی گرم کلروفیل کل} = 20/2 (A_{645}) + 8/0.2 (A_{663}) \times V/1000 \times W$$

$$227 \text{ (میلی گرم کلروفیل b)} - \text{(میلی گرم کلروفیل a)} \times 3/27 - 100 (A_{480}) = \text{گرم بافت / میلی گرم کارتنوئید}$$

در این فرمول V و W به ترتیب نشان‌دهنده حجم نه‌ای محلول (۱۰ میلی‌لیتر) و وزن نمونه برگی (۵۰۰ میلی‌گرم) هستند.

### ۳-۳- اندازه‌گیری تحمل به گرما بر اساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی

تحمل به سرما بر اساس شاخص هدایت الکتریکی<sup>۱</sup> بافت‌های خسارت دیده شنبلیله پس از اعمال تیمار گرمایی اندازه‌گیری شد (هپ بورن و همکاران، ۱۹۸۶). برای اندازه‌گیری این شاخص از برگ‌های کاملاً سالم

1- Electrolyte Leakage Index

استفاده شد. برای این منظور با استفاده از دستگاه پانچ دیسک‌های از برگ‌های تهیه شد و به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل شدند. بمنظور جذب بهتر آب از پمپ خلا استفاده شد، سپس لوله‌های آزمایش پس از قرار دادن درپوش به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند و میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها ( $EC_1$ ) با استفاده از دستگاه EC متر (انگلیس، جین وی ۱۰۴۰) اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد، لوله‌های آزمایش در حمام آب گرم قرار گرفتند و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر به خوبی همزده شدند و در نهایت میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها ( $EC_2$ ) تعیین شد. مقدار شاخص خسارت بر اساس فرمول  $I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$

محاسبه گردید (Popov et al., 2012).

$$I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100 \text{ محاسبه گردید (Popov et al., 2012).}$$

### ۳-۴- اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون‌دی‌آلدهید (MDA)

میزان اکسیداسیون گیاهچه‌ها براساس تجمع مالون‌دی‌آلدهید برگ بر اساس استفاده از محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA)<sup>۲</sup> تعیین شد. برای این منظور ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه برگ‌ی تازه در دو میلی‌لیتر بافر استخراج (تری کلرواستیک اسید)<sup>۳</sup> یک درصد هم‌وزنه گردید و به مدت پانزده دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت<sup>۴</sup> حاصل با دو میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA نیم درصد) حاوی اسید تری کلرواستیک اسید (TCA بیست درصد) مخلوط و در

1-Jenway

2- Thiobarbituric acid

3- Trichloroacetic acid

4- Supernatant



حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و در نهایت به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ قرار داده شد. پس از سانتریفوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲

نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO) قرائت شدند. غلظت مالون‌دی‌آلدهید براساس فرمول  $C = D/E$

محاسبه شد که D (عدد قرائت شده) و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر  $10^5 \times 1/56$ ) دارد (Health and

Packer., 1968)

### ۳-۵- اندازه‌گیری پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی

#### ۳-۵-۱- استخراج پروتئین کل

در استخراج پروتئین کل، تمامی مراحل استخراج در دمای  $C \pm 1$  بر روی یخ انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع به خوبی پودر شدند و ۰/۲۵ گرم از پودر حاصل به فالكون‌های پانزده میلی‌لیتری منتقل و ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج<sup>۱</sup> به آن‌ها افزوده شد. پس از ورتکس نمونه همراه با بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی داخل فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری به تیوب‌های جدید دیگری منتقل شدند و از این عصاره برای قرائت مقدار پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز استفاده شد.

---

1- Extraction buffer

### ۳-۵-۲- تهیه بافر استخراج

برای تهیه بافر استخراج، ۲/۴ گرم تریس در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل شد و pH آن با استفاده از محلول هیدرو کلریدریک (HCL)، بر روی ۷/۸ تنظیم گردید. پس از ۲۴ ساعت، pH آن مجدداً تنظیم شد و حجم نهایی محلول با استفاده از ۲۰ سی سی گلیسرول و با آب مقطر به ۲۰۰ سی سی افزایش یافت.

### ۳-۵-۳- رسم منحنی استاندارد پروتئین با آلبومین سرم گاوی

#### ۳-۵-۳-۱- تهیه محلول بردفورد

برای این منظور، ابتدا ۰/۱ گرم کوماسی بلو<sup>۱</sup>، ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۱۰۰ میلی لیتر اسید ارتوفسفریک<sup>۲</sup> ۸۵ درصد با یکدیگر مخلوط شدند. کوماسی بلو، اتانول و بخشی از آب مقطر با یکدیگر به خوبی مخلوط و اسید ارتوفسفریک را به تدریج و به صورت قطره قطره به ترکیب اضافه شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری و سپس با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسید. در پایان محلول با استفاده کاغذ صافی فیلتر، در محیط تاریک و خنک (۴ درجه سانتی گراد) تا زمان شروع کار نگهداری گردید.

#### ۳-۵-۳-۲- تهیه محلول استوک

برای تهیه محلول استوک ۵۰ میلی گرم آلبومین سرم گاوی<sup>۳</sup> (BSA) به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد.

---

1- Coomassie blue  
2- Orthophosphoric acid  
3- Bovine serum albumin

### ۳-۵-۳- تهیه محلول کار

۱۰ میلی لیتر از محلول استوک حاصل، به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد، (هر میلی لیتر از محلول حاصل شامل ۲۰۰ میکروگرم پروتئین است) سپس غلظت‌های ۰ تا ۲۵۰ میکروگرمی پروتئین آماده شدند (هر کدام از این ترکیبات شامل مخلوطی از محلول کار، آب مقطر و محلول بردفورد معادل ۳ میلی لیتر بود). نمونه‌های حاصل به منظور اطمینان از مخلوط شدن ورتکس و پس از ۲۰ دقیقه با دستگاه قرائت شدند.

### ۳-۵-۳- اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها

برای این منظور، ۳ سی سی محلول بردفورد<sup>۱</sup> با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی از هر نمونه ورتکس شدند و پس از گذشت ۲۰ دقیقه، غلظت پروتئین هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### ۳-۶- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری<sup>۲</sup> در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با روش ابی (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH = ۷) ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با یکدیگر ترکیب شدند و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه (در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای) ثبت گردید.

---

1 -Bradford

2 - Spectrophotometry

از آنجایی که حداکثر جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر است، با آغاز واکنش به وسیله آنزیم کاتالاز به تدریج از میزان پراکسید هیدروژن در مخلوط واکنش کاسته می‌گردد و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر نیز کاهش می‌یابد.

فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز ( $\Delta OD$ ) بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{240} \times 1 \times V_t \times d_f}{\varepsilon \times l \times t \times V_s}$$

در این فرمول: U: واحد آنزیمی،  $\Delta A_{240}$ : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

1: با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن در معادله (برابر ۲) تعیین می‌گردد.

$V_t$ : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر سه میلی‌لیتر بود)،  $d_f$ : فاکتور رقیق کننده (۵۰).

t: مدت زمان واکنش (۳۰۰ ثانیه)،  $V_s$ : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۱۰۰ میکرولیتر بود).

$\varepsilon$ : ضریب خاموشی برابر  $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ، l: طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است).

### ۳-۷- سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با روش دیونیسو و توبیتا (۱۹۸۴) اندازه گیری شد. نوع و میزان مواد لازم مورد نیاز برای سنجش آنزیم گایاکول

پراکسیداز در جدول ۳-۱- نشان داده شده است. فعالیت آنزیم با فاز تاخیری ۶۰ ثانیه‌ای، به مدت ۵ دقیقه<sup>۱</sup> و در فواصل زمانی ۲<sup>۲</sup> ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید. در این آنزیم میزان جذب با گذشت زمان روند افزایشی دارد. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس مقدار جذب ترکیب نارنجی رنگ تتراگایاکول در میلی گرم غلظت پروتئین محاسبه شد.

**جدول ۳-۱- مواد استفاده شده برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز**

ماده	مولاریته	میزان مورد نیاز (میکرولیتتر)
بافر فسفات پتاسیم (pH=۷)	۵۰ میلی مولار	۳۰۰۰
هیدروژن پراکسید	۴۱/۳ مولار	۵
محلول گایاکول <sup>۳</sup>	۲۰۰ میلی مولار	۳
عصاره آنزیم		۱۰۰
حجم کل		۳۱۰۵

فعالیت ویژه آنزیم گایاکول پراکسیداز ( $\Delta OD$ ) به صورت تعداد میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد.

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{240} \times 1 \times V_t \times d_f}{\epsilon \times l \times t \times V_s}$$

در این فرمول

U : واحد آنزیمی،  $\Delta A_{470}$  : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

1 : با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن (معادل ۴) تعیین میگردد.

- 
- 1- Rate time
  - 2- Interval time
  - 3- Guaiacol

$V_t$  : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر ۳ میلی‌لیتر بود)،  $d_f$  : فاکتور رقیق کننده (۵۰)

$t$  : مدت زمان واکنش (۳۰۰ ثانیه)،  $V_s$  : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۱۰۰ میکرولیتر بود)

$\epsilon$  : ضریب خاموشی برابر  $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ،  $l$  : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است).

### ۳-۸- سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت این آنزیم با استفاده از روش (Ranieri *et al.* 2000) اندازه‌گیری و در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد. مخلوط واکنش حاوی ۵۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۲۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با  $\text{pH}=7$ ، ۳۵۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، ۴ میکرولیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۳۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم در طول ۵ دقیقه ثبت شد.

### ۳-۹- استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX Plus و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به منظور حذف آلودگی‌های DNA، یک میکروگرم از RNA استخراج شده تحت تیمار DNase قرار گرفت (جدول ۳-۳). در ضمن کیفیت و کمیت RNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ تعیین گردید. به منظور حذف آلودگی DNA، محتویات ویال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد و پس از اضافه کردن EDTA، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۲- ترکیبات مورد استفاده به منظور حذف DNA ژنومی

مرحله	ماده	حجم (μl)	غلظت
	RNA	۱	μg
۱	Reaction buffer	۱	10X
	DNase	۱	μl <sup>-1</sup>
	Water nuclease-free	۷	-
	Total	۱۰	-
۲	EDTA	۱	50 mM
	Total	۱۱	-

### ۳-۱۰- ساخت cDNA

به منظور ساخت cDNA، از آغازگر Oligo (dT) برای اتصال به دم پلی آدنین mRNA استفاده شد. برای ساخت cDNA، از کیت HyperScript Reverse transcriptase (GeneALL) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. ترکیبات جدول ۳-۳ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد بافر واکنش، آنزیم Reverse transcriptase، MdTT به ترکیب اضافه شد (جدول ۳-۴). سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

جدول ۳-۳- ترکیبات مورد استفاده برای ساخت cDNA

ماده	حجم (μl)	غلظت
RNA	۴/۵	250 ngμl <sup>-1</sup>
Oligo (dT)	۱	10 pmolμl <sup>-1</sup>
DEPC Water	۷/۵	-
Master 1 total volume	۱۳	-

جدول ۳-۴- ترکیبات مورد استفاده برای ساخت CDNA

ماده	حجم (μl)	غلظت
Buffer reaction	۵	10 X
MdTT	۱	0.1
Reverse transcriptase	۱	200 U/μl
Master 1 total volume	۲۰	-

### ۳-۱۱- طراحی آغازگرها

برای طراحی آغازگرها از برنامه آنلاین Primer 3 Plus و به منظور کنترل صحت آن‌ها از برنامه Analyzer v.3.1 (http://eu.idtdna.com/calc/analyzer) استفاده شد. در این برنامه، پارامترهایی شامل دمای اتصال، درصد بازهای C/G، احتمال تشکیل ساختارهای سنجاق سری و دایمر و همچنین امکان تشابه با سایر ژن‌های نزدیک بررسی می‌شود. آغازگرهای مستقیم و معکوس به گونه‌ای طراحی شدند که اختلاف دمای آن‌ها کمتر از ۲-۱ درجه سانتی‌گراد باشد (جدول ۳-۵).

جدول ۳-۵- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آن‌ها

نام	توالی آغازگر (۳' - ۵')		طول قطعه (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
	Forward	Reverse		
SSR	GGAGGCATCATACTTCTGT	CATCACTTCCTGGATTGTA	۲۱۰	۶۰
SMT	ACGAACAAGTTCAGGTC	GGTGACAGGGATAACAAGAG	۲۳۰	۶۰
SEP	GGGGTTATTCAGATGGGTC	CCACCAGCCATTACTACAC	۲۲۰	۶۰
CAS	CGAGGAGATTGGTGCTGGTG	TCGTGTTGGGTGGAGATAAG	۲۳۰	۶۰
SQS	TTATCACCATTGGTGCTGAG	CGATGTTTCCATACAGATCCTT	۱۶۰	۶۰
GAPDH	ATGTTAAATGATGCAGCCCTT CCACCTCTC	TATGTTTGTGTTGGTGTCAACG AGCAACGAATACAAG	۲۳۰	۶۱



## ۳-۱۲- بررسی صحت سنتز آغازگرها

به منظور اطمینان از سنتز صحیح cDNA و کارکرد آغازگرهای طراحی شده قبل از بررسی بیان ژن‌های مورد نظر، ابتدا سنتز این ژن‌ها توسط PCR معمولی انجام شد (جدول ۳-۶). برنامه زمانی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر آغازگرها در جدول ۳-۷ ارایه گردیده است.

جدول ۳-۶- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR به منظور تایید سنتز cDNA

غلظت	حجم (μl)	ماده
-	۴/۵	H <sub>2</sub> O
5X	۲	HQ buffer
10 mM	۴	dNTP
5X	۵	α-Taq Buffer
2/5 μl <sup>-1</sup>	۰/۵	α-Taq DNA Polymerase
50 ngμl <sup>-1</sup>	۲	cDNA
10 pmolμl <sup>-1</sup>	۱	Forward Primer
10 pmolμl <sup>-1</sup>	۱	Reverse Primer
-	۲۰	Total Volume

جدول ۳-۷- برنامه زمانی ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

زمان	دما (°C)	مرحله
2 min	۹۵	Denaturation
20 sec	۹۵	Denaturation
20 sec	۶۰	Annealing
5 min	۷۲	Elongation

پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری گردید.

### ۳-۱۳- انجام واکنش PCR زمان واقعی

برای واکنش PCR زمان واقعی، از مستر شرکت SYBR®Green PCR Master Mix 2X (Ampliqon) استفاده شد. واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر و با سه تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شدند. در این بخش به منظور اطمینان از عدم آلودگی اجزا از کنترل منفی نیز استفاده شد. واکنش PCR زمان واقعی، با استفاده از دستگاه ABI Step one و مطابق با ترکیبات جدول انجام شد.

جدول ۳-۸- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی

غلظت	حجم (μl)	ماده
-	۳	Nuclease Free Water
50 ngμl <sup>-1</sup>	۱	cDNA
10 pmolμl <sup>-1</sup>	۰/۵	Forward Primer
10 pmolμl <sup>-1</sup>	۰/۵	Reverse Primer
2X	۵	SYBR®Green PCR Master Mix
-	۱۰	Total

این واکنش با شرایط دمایی و زمانی ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

### ۳-۱۴- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها

از تجزیه منحنی‌های ذوب<sup>۱</sup> به منظور ارزیابی اختصاصیت آغازگرها استفاده می‌شود، در حقیقت از مزایای PCR زمان واقعی توانایی ترسیم منحنی ذوب است. دمای ذوب مولکول DNA یک عامل مهم جهت ارزیابی

1-Melt curve analysis

اختصاصیت تکثیر آغازگرها است. منحنی ذوب پس از اتمام فرآیند PCR توسط نرم‌افزار رسم می‌گردد و به عوامل متعددی از جمله درصد بازهای C/G و اختصاصیت تکثیر بستگی دارد. برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص (هر ۵ ثانیه) به مقدار معین (مثلاً ۰/۵ درجه) کاهش می‌دهد و همزمان منحنی تغییرات فلورسنت بر حسب دما را که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌گردد. این منحنی در صورت دارای بودن تنها یک پیک مشخص و بالا بودن دمای جدا شدن دو رشته (دمای ۷۵ درجه به بالا قابل قبول است)، اختصاصی بوده و قابل قبول است.

### ۳-۱۵- تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی

به منظور تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی، بیان نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی<sup>۱</sup> بر پایه فرمول  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen., 2001) محاسبه شد، که مطابق آن میزان ژن (cDNA حاصل از رونوشت) برابر با دو به توان منفی تفاوت آستانه سیکل ژن هدف تحت تنش و ژن مرجع متناظر آن منهای تفاوت میانگین‌های آستانه سیکل ژن هدف بدون تنش و ژن مرجع متناظر آن است. آنالیز داده‌های بخش فیزیولوژیک با استفاده از برنامه R و نمودارهای با استفاده از برنامه اکسل ۲۰۱۳ رسم گردیدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

---

1-Relative standard curve method



## فصل چهارم

### نتیج و بحث

۴-۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی

نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف برای دو توده بوشرویه و همدان در جداول ۴-۱ و ۴-۲ ارائه شده است. در توده بوشرویه بین تیمارهای مختلف از نظر بیشتر صفات اختلاف معنی‌داری وجود دارد (۴-۱). در تیمار دما، به جز صفت نشت الکترولیت تمامی صفات در سطح احتمال ۵ و یا یک درصد معنی‌دار بودند. صفات کلروفیل a و کارتنوئید در تیمار غلظت در سطح احتمال ۵ درصد و سایر صفات در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بودند. در تیمار زمان فقط صفت کلروفیل b اختلاف معنی‌داری نداشت و سایر صفات دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بودند. تمامی صفات در اثر متقابل دما در غلظت، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد را نشان دادند. صفات کلروفیل b و گایاکول پراکسیداز در اثر متقابل دما در زمان اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، در حالی که صفات کلروفیل کل و پروتئین در سطح احتمال ۵ درصد و سایر صفات در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. در اثر متقابل غلظت در زمان، تمامی صفات به جز صفت کارتنوئید فاقد اختلاف معنی‌دار بود، این در حالی است که سایر صفات دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بودند. در اثر متقابل سه‌گانه دما در غلظت در زمان، صفات پروتئین و نشت الکترولیت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند و سایر صفات اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان دادند.

نتایج تجزیه واریانس در توده همدان نشان داد که اثر دما بر روی همه صفات به غیر از کلروفیل b معنی‌دار بود (جدول ۲-۴). همچنین غلظت‌های مختلف اپی براسینوآستروئید نیز دارای اثر معنی‌داری بر تمامی صفات بودند. به جز صفات کلروفیل b و گایاکول پراکسیداز که دارای اختلاف معنی‌داری در فاکتور زمان نبودند، پروتئین در سطح احتمال ۵ درصد و سایر صفات در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. اثر متقابل دما در غلظت نیز بر روی تمامی صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در مورد فاکتور اثر متقابل دما در زمان، صفات آسکورات پراکسیداز، کاتالاز، نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدهید در سطح احتمال یک درصد و پروتئین در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بودند و سایر صفات اختلاف معنی‌داری با یکدیگر

نداشتند. اثر متقابل غلظت در زمان در صفات مالون‌دی‌آلدهید اختلاف معنی‌داری نداشت، در حالی که این فاکتور دارای اثر معنی‌داری بر روی سایر صفات بود. اثر متقابل سه‌گانه دما در غلظت در زمان نیز دارای اختلاف معنی‌دار بر روی صفات کلروفیل b، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدهید بود. همچنین صفات کلروفیل a، کلروفیل کل، گایاکول پراکسیداز و پروتئین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند و کارتنوئید از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

جدول ۴-۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه بر روی توده بوشرویه

مجموع مربعات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز پراکسیداز	نشت الکترولیت	گایاکول پراکسیداز	مالون دی آلدئید	پروتئین	منابع تغییرات
دما	۱	۴۲/۴۶***	۴/۳۶۸***	۱۹/۵۸۸***	۱/۶۰۴*	۱/۹۰***	۹/۳۵***	۳/۸	۳/۱۹***	۳۱/۲۸۳***	۱۸۲۰۰***	
غلظت	۳	۱/۹۸*	۶/۵۶***	۴/۹۲۴***	۱/۱۱۲*	۶/۴***	۱/۶۰***	۳۳۳/۴***	۲/۳۳***	۶۶۸۳***	۵۲۹۱***	
زمان	۱	۲۳/۰۶***	۰/۳۱۵	۲۸/۷۶۴***	۱۴/۲۴***	۷/۴۷***	۲/۲۶۹***	۲۵۹/۰۳***	۸/۷۲***	۱۶/۰۴۳***	۶۱۵۷***	
دما در غلظت	۳	۳/۸۹**	۱۹/۶۲۷***	۲۷/۰۴۰***	۴/۶۴***	۲/۴۴***	۳/۲***	۸۵۱/۰۱***	۲/۶۹***	۸/۰۰۱***	۱۸۲۵***	
دما در زمان	۱	۵/۴۴**	۰/۱۸۹	۳/۵۹۹*	۲/۷۲۹**	۷/۲۳***	۲/۸۵***	۹۳۱/۹***	۲/۸	۵/۱۴۲***	۴۰۲*	
غلظت در زمان	۳	۳/۶۴**	۱/۷۲۲***	۱۰/۱۱۷***	۰/۱۱۷	۴/۵۵***	۲/۳۵**	۳۰۹/۵***	۳/۰۵***	۲/۲۳۰**	۱۲۸۳***	
دما در غلظت در زمان	۳	۳/۱۲**	۱۴/۰۹***	۱۱/۵۳۳***	۳/۲۰۷***	۸/۷***	۵/۱۱***	۲۶/۶*	۱/۸۴**	۷/۱۹۱***	۲۰۱*	
خطا	۳۲	۰/۵۷	۰/۲۰۷	۰/۷۰۹	۰/۳۱۱	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۴۸	۰/۰۰۰۶۹	۰/۰۰۰۳۳	۰/۳۸۵	۰/۰۶	



جدول ۴-۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه بر روی توده همدان

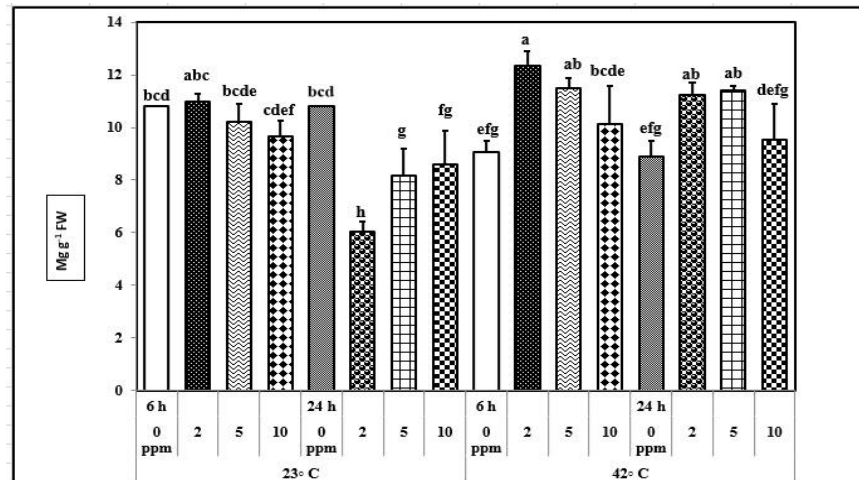
مجموع مربعات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز پراکسیداز	نشت الکترولیت	گیایاکول پراکسیداز	مالون دی آلدئید	پروتئین	منابع تغییرات
دما	۱	۲۶/۸۱۷***	۱/۳	۲۶/۷۴۲***	۲۶/۷۴۲***	۳/۵۶۷***	۵/۶۱***	۹۴/۹***	۲/۶۷۹***	۵۰/۱۴***	۱۰۹۱۶***	
غلظت	۳	۵/۱۱۷***	۲۳/۲۰۹***	۱۰/۸۶۵***	۱۰/۸۶۵***	۸/۶۹۰***	۹/۳۵۲***	۷۲۴/۴***	۳/۶۷۹***	۳/۰۲***	۶۴۳۷***	
زمان	۱	۳/۷۸۰**	۱/۴۹۴	۱۰/۰۲۶***	۱۰/۰۲۶***	۸/۴۰***	۵/۳۵۳***	۵۳۶/۷***	۲/۴۰	۳۶/۳۳***	۱۵۴۳*	
دما در غلظت	۳	۷/۱۱۳***	۳/۰۲۷***	۳/۲۳۹**	۳/۲۳۹**	۱/۳۳***	۱/۲۷***	۶۴۶/۹***	۸/۲۷۰***	۵/۲۱***	۳۱۴۷***	
دما در زمان	۱	۰/۰۷۳	۱/۰۷۴	۰/۵۷۴	۰/۵۷۴	۳/۲۰***	۹/۱۶***	۳۹۹/۶***	۱/۲۸۰	۷/۰۸***	۶۱۵*	
غلظت در زمان	۳	۱/۷۰۹*	۳/۲۴۴***	۹/۴۶***	۹/۴۴۶***	۶/۵۰***	۹/۹۳***	۷۵۲/۴***	۳/۰۵۰*	۰/۰۷	۴۵۳*	
دما در غلظت	۳	۱/۴۶۲*	۳/۶۶۷***	۳/۹۱*	۱/۳۰۵	۲/۵۰***	۸/۴۷***	۶۵/۷***	۳/۳۶*	۱/۶۸**	۲۴۱*	
در زمان												
خطا	۳۲	۰/۴۶	۰/۳۷۵	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۶۸	۰/۰۰۸۹	۰/۰۰۲۹	۰/۰۳۵۶	

## ۴-۲- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی

### ۴-۲-۱- کلروفیل a

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت کلروفیل a در توده بوشرویه در شکل ۴-۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوی کلروفیل a در زمان اعمال تنش دمای بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری کاهش یافت، همچنین محتوی کلروفیل a در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش نیز به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمای بالا) کاهش یافت. محتوی کلروفیل a در ۲۴ ساعت پس از تنش نسبت به ۶ ساعت کاهش بیشتری نشان داد، اگرچه این اختلاف معنی‌دار نبود.

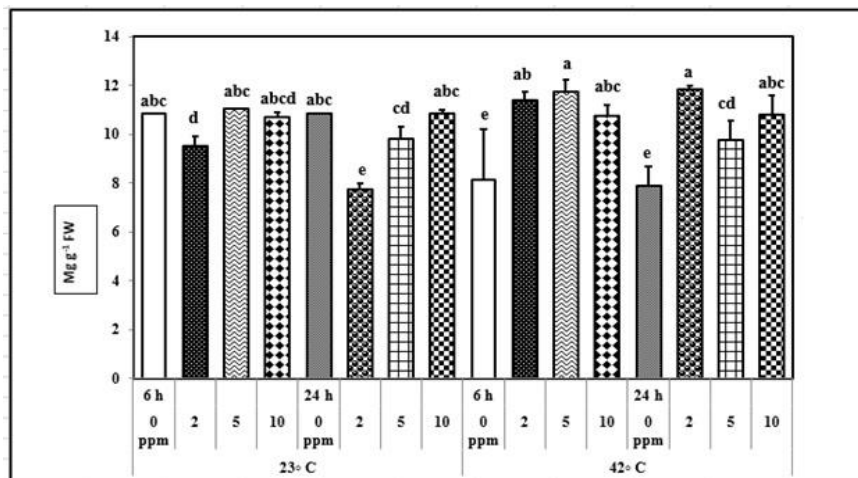
محتوی کلروفیل a با کاربرد اپی براسینواستروئید در تمامی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید محتوی کلروفیل a به بالاترین مقدار خود رسید، این در حالی‌ست که محتوی کلروفیل a در تیمار دمای بالا در هر دو زمان ۶ دو ۲۴ ساعت و در غلظت‌های ۵ و ۱۰ ppm نسبت به غلظت ۲ ppm به تدریج کاهش یافت.



شکل ۴-۱- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کلروفیل a توده بوشرویه

نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما (۲۳ و ۴۲ درجه سانتی گراد)، زمان (۶ و ۲۴ ساعت) و غلظت‌های مختلف اپی براسینواستروئید (صفر، ۲، ۵ و ۱۰ ppm) بر روی کلروفیل a در توده همدان در شکل ۴-۲ نمایش داده شده است. مقدار کلروفیل a در زمان‌های ۶ ساعت و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش در شرایط دمایی بالا نسبت به شرایط دمای نرمال بدون کاربرد اپی براسینواستروئید بصورت معنی داری کاهش یافت. همچنین محتوی کلروفیل a در ۲۴ ساعت پس از تنش نسبت به ۶ ساعت در زمان اعمال تنش دمای بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید کاهش یافت اگرچه این کاهش مشابه با توده بشرویه از لحاظ آماری معنی دار نبود.

مقادیر کلروفیل a در زمان اعمال تنش دمایی و با کاربرد اپی براسینواستروئید نسبت به همین شرایط دمایی و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید به صورت معنی داری افزایش یافت. بیشترین محتوی کلروفیل a در شرایط دمای بالا (شش ساعت) و غلظت ۵ ppm و همچنین در زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۲ ppm مشاهده شد، اگرچه سایر تیمارها نیز به صورت موثری محتوی کلروفیل a را افزایش دادند.



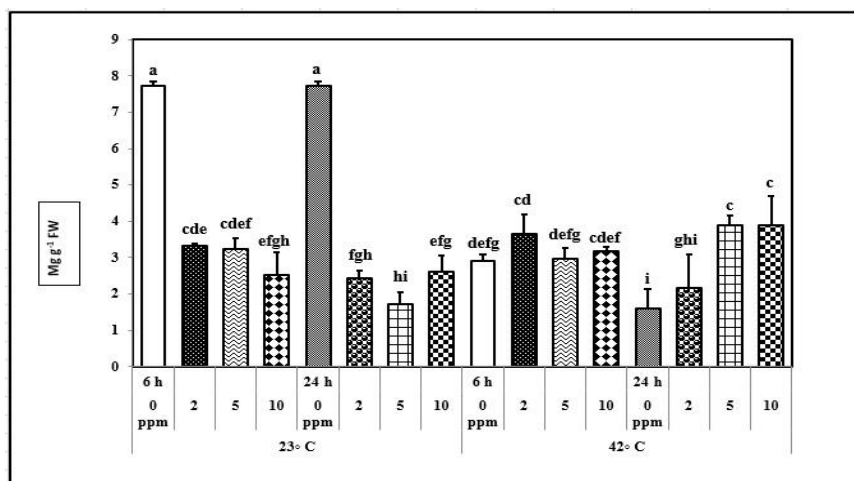
شکل ۴-۲- نتایج مقایسه میانگین سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی محتوی کلروفیل a توده همدان

## ۴-۲-۲- کلروفیل b

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه گانه بر صفت کلروفیل b در توده بوشرویه در شکل ۴-۳ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوی کلروفیل b در زمان اعمال تنش دمای بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی گراد) به صورت معنی داری کاهش یافت، همچنین محتوی کلروفیل b در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش نیز به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمای بالا) کاهش یافت. در حقیقت محتوی کلروفیل b با تداوم تنش دمایی تجزیه شده و کاهش معنی داری را از خود نشان داد.

محتوی کلروفیل b با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید محتوی کلروفیل b افزایش یافت و دارای اختلاف معنی داری با

تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید بود. محتوی کلروفیل b در تیمار دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در غلظت‌های ۵ و ۱۰ ppm نسبت به غلظت ۲ ppm افزایش یافت.



شکل ۳-۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کلروفیل b توده بوشرویه

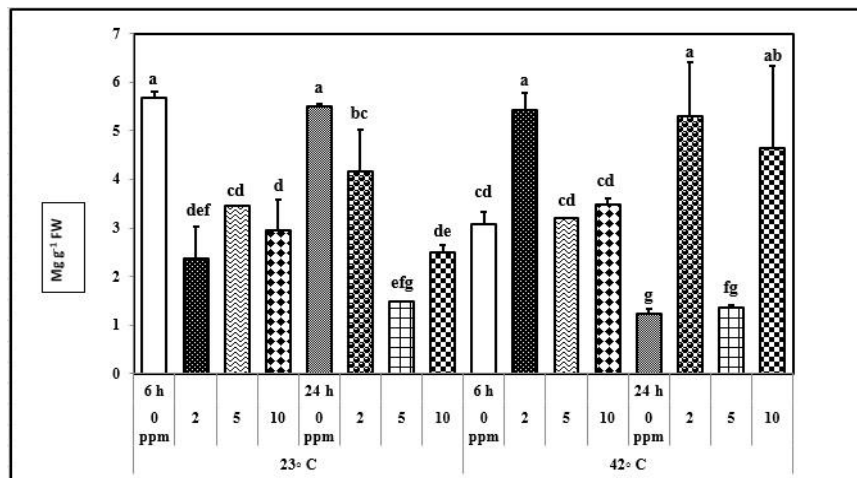
نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت کلروفیل b در توده همدان در شکل ۴-۴ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوی کلروفیل b در زمان اعمال تنش دمای بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری کاهش یافت، همچنین محتوی کلروفیل b در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش نیز به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمای بالا) کاهش یافت. در حقیقت محتوی کلروفیل b با تداوم تنش دمایی تجزیه شده و کاهش معنی‌داری را از خود نشان داد.

محتوی کلروفیل b با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید محتوی کلروفیل b افزایش یافت و دارای اختلاف معنی‌داری با

تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید بود. محتوی کلروفیل b در تیمار دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در غلظت‌های ۵ و ۱۰ ppm نسبت به غلظت ۲ ppm افزایش یافت.

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت کلروفیل b در توده همدان در شکل ۴-۴ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوی کلروفیل b در زمان اعمال تنش دمای بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری کاهش یافت. همچنین محتوی کلروفیل b در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش نیز به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمای بالا) کاهش یافت. محتوی کلروفیل b با تداوم تنش دمایی از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری کاهش یافت و دما منجر به تجزیه کلروفیل b گردید.

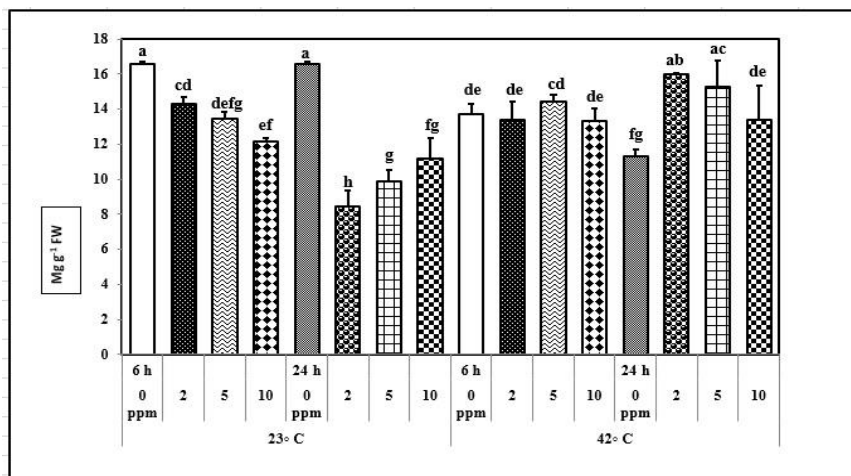
محتوی کلروفیل b با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید محتوی کلروفیل b افزایش یافت و دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید بود. محتوی کلروفیل b در تیمار دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در غلظت‌های ۲ و ۱۰ ppm نسبت به غلظت ۵ ppm افزایش یافت. در حقیقت کاربرد اپی براسینواستروئید به صورت موثری محتوی کلروفیل را در این توده در زمان اعمال تنش دمایی افزایش داده است.



شکل ۴-۴- نتایج مقایسه میانگین سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی محتوی کلروفیل b توده همدان

#### ۴-۲-۳- کلروفیل کل

نتایج مقایسه میانگین کلروفیل کل در توده بوشرویه نشان داد که در شرایط دمایی نرمال و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار، اعمال تیمار اپی براسینواستروئید موجب کاهش مقدار کلروفیل کل شد و تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار کلروفیل کل بود. ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار و در شرایط دمایی نرمال غلظت ۲ ppm موجب کاهش مقدار کلروفیل کل در مقایسه با شاهد شد اما در غلظت‌های ۵ و ۱۰ ppm مقدار کلروفیل کل به ترتیب افزایش پیدا کرد. اعمال تیمار تنش دمایی بدون وجود اپی براسینواستروئید موجب کاهش مقدار کلروفیل کل در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار شد. اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار، ابتدا تغییری در مقایسه با شاهد نداشت اما غلظت ۵ ppm موجب افزایش ناچیزی در مقدار کلروفیل کل شد و غلظت ppm ۱۰ مجدداً موجب کاهش مقدار کلروفیل کل شد. در شرایط تنش دمایی، غلظت ۲ ppm بعد از ۲۴ ساعت اعمال تیمار موجب افزایش مقدار کلروفیل کل در مقایسه با شاهد شد اما این مقدار در غلظت‌های بالاتر به ترتیب کاهش پیدا کرد به طوری که غلظت ۱۰ ppm دارای کمترین مقدار کلروفیل کل در مقایسه با دو غلظت دیگر بود (شکل ۴-۵).

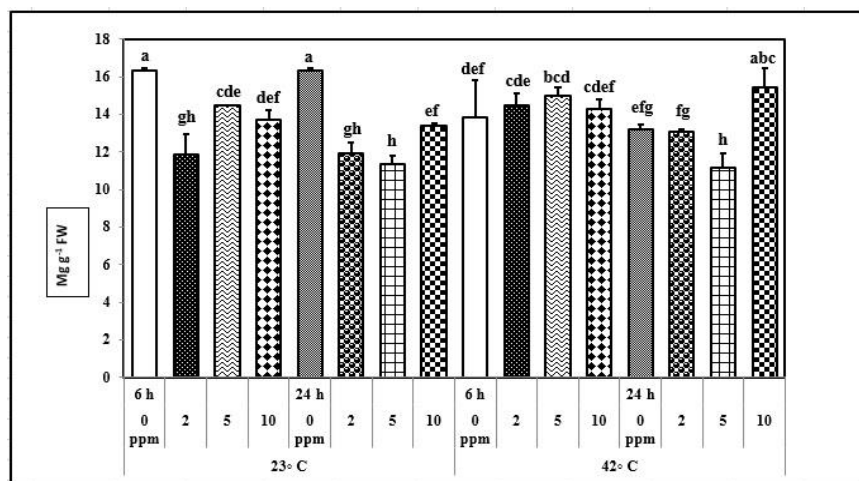


شکل ۴-۵- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کلروفیل کل توده بوشرویه

تغییرات محتوی کلروفیل کل در دما، زمان و غلظت‌های مختلف اپی براسینواستروئید در توده همدان در شکل ۴-۶ نشان داده شده است. محتوی کلروفیل کل در زمان ۲۴ ساعت و شرایط دمایی نرمال اگرچه بیشتر از زمان ۶ ساعت بود اما این اختلاف از نظر آماری چندان معنی‌دار نبود. اعمال تنش دمایی موجب افزایش محتوی کلروفیل کل در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار شد اما در زمان ۲۴ ساعت، از مقدار کلروفیل کل کاسته شد اما همچنان بیشتر از شرایط دمایی نرمال بود. در شرایط دمایی نرمال، اعمال تیمار اپی براسینواستروئید (۲ ppm) در زمان ۶ ساعت موجب کاهش محتوی کلروفیل کل نسبت به شاهد شد و این کاهش در زمان ۲۴ ساعت نیز مشاهده شد. غلظت ۵ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت مقدار کلروفیل کل را افزایش داد اما در زمان ۲۴ ساعت موجب کاهش مقدار کلروفیل کل گردید. غلظت ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت اگرچه موجب افزایش محتوی کلروفیل کل در مقایسه با شاهد شد اما در مقایسه با غلظت ۵ ppm روند کاهشی نشان داد. در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، محتوی کلروفیل کل در غلظت ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید بیشتر از غلظت‌های ۲ ppm و ۵ ppm بود. در شرایط تنش دمایی، اعمال تیمار اپی براسینواستروئید در مجموع موجب کاهش محتوی کلروفیل کل نسبت به تیمار تنش دمایی و بدون حضور اپی



براسینواستروئید گردید. غلظت ۵ ppm اپی براسینواستروئید و ۶ ساعت پس از اعمال تیمار محتوی کلروفیل کل را در مقایسه با دو غلظت دیگر کمتر کاهش داد. در زمان ۲۴ ساعت، میزان کاهش در غلظت ۵ ppm بسیار بیشتر از غلظت‌های ۲ ppm و ۱۰ ppm بود و تفاوت محتوی کلروفیل بین تیمارهای ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید و تنش دمایی بدون حضور اپی براسینواستروئید معنی‌دار نبود.

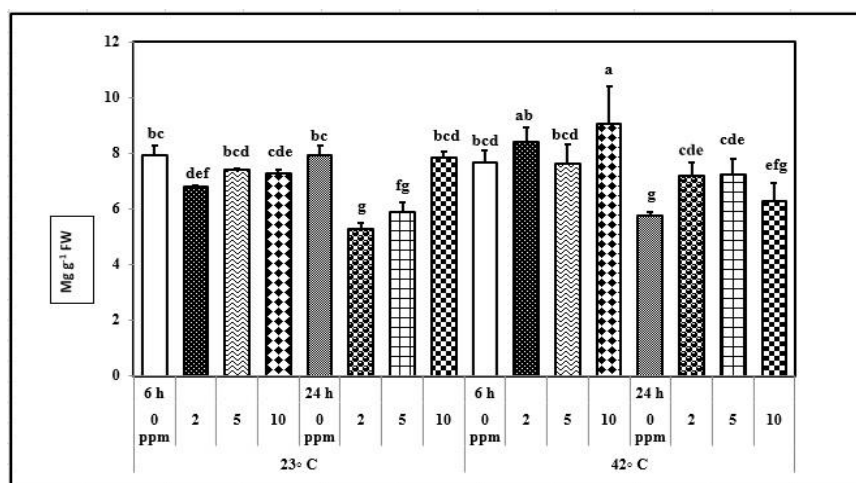


شکل ۴-۶- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی محتوی کلروفیل کل توده همدان

#### ۴-۲-۴- کارت‌نوئید

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت کارت‌نوئید در توده بشرویه در شکل ۴-۷ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوی کارت‌نوئید در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) کاهش یافت، اگرچه این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین محتوی کارت‌نوئید در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمایی بالا) کاهش یافت. محتوی کارت‌نوئید با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶

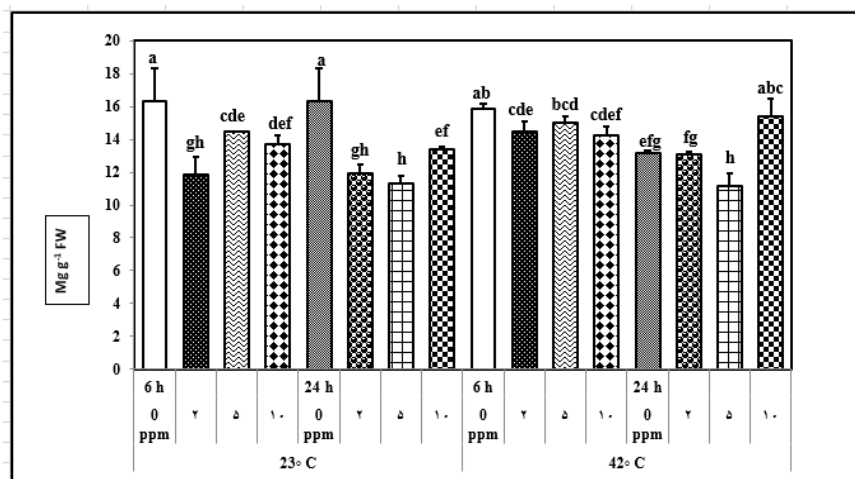
ساعت پس از تنش و در غلظت ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید محتوی کارتنوئید به صورت معنی‌داری افزایش یافت و دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید بود. همچنین محتوی کارتنوئید در تیمار دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در تمامی غلظت‌های افزایش یافت، اگرچه در غلظت ۲ و ۵ ppm دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید بود.



شکل ۴-۷- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کارتنوئید توده بوشویه

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت کارتنوئید در توده همدان در شکل ۴-۸ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که محتوی کارتنوئید در زمان اعمال تنش دمای بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) کاهش یافت، اگرچه این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین محتوی کارتنوئید در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمای بالا) کاهش یافت. محتوی کارتنوئید با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش کاهش چشم‌گیری نداشت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در غلظت ۵ ppm اپی براسینواستروئید، کاهش در محتوی کارتنوئید با تیمار دمای بالا و عدم

کاربرد اپی براسینواستروئید اختلاف معنی‌داری نداشت. این رخداد بدین معنی است که کاربرد ۵ ppm اپی براسینواستروئید به صورت معنی‌داری از کاهش کارتنوئید در شرایط تنش جلوگیری کرده است. همچنین محتوی کارتنوئید در تیمار دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در غلظت ۱۰ ppm به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت.

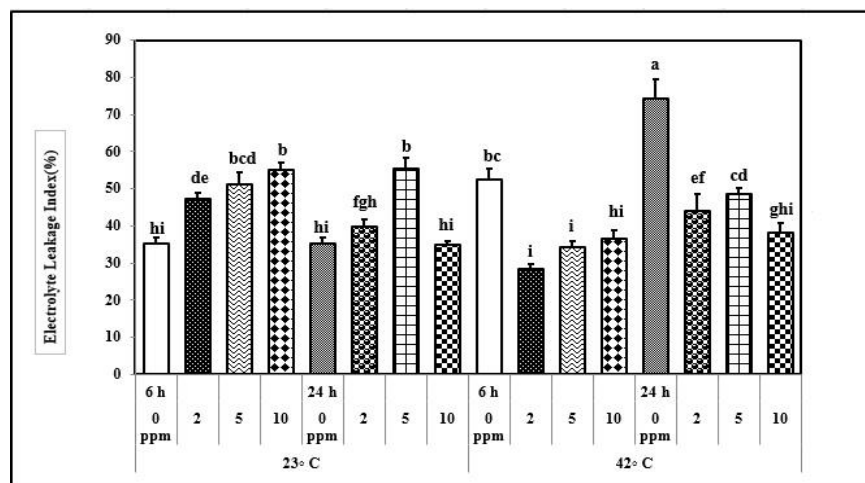


شکل ۴-۸- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان کارتنوئید توده همدان

#### ۴-۲-۵- نشت الکترولیت

نتایج مقایسه میانگین صفت نشت الکترولیت در توده بوشرویه نشان داد (شکل ۴-۹) که تنش دمایی موجب افزایش این صفت می‌گردد. در تیمار تنش دمای بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی) مقدار نشت الکترولیت در مقایسه با سایر تیمارهای به بالاترین میزان خود رسید، همچنین میزان این صفت در تیمار ۶ ساعت پس از اعمال تنش دمایی نسبت به شرایط نرمال دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌داری داشت. کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا و در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری میزان نشت الکترولیت را نسبت به شرایط عدم کاربرد اپی

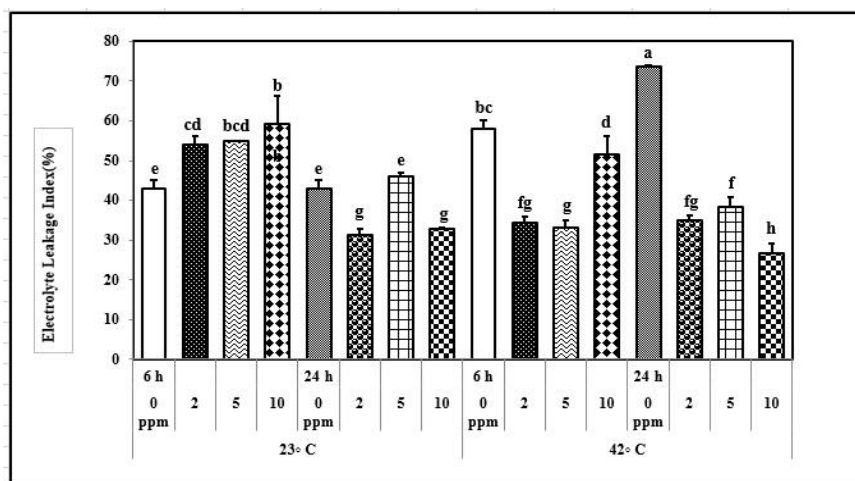
براسینواستروئید کاهش داد. در حقیقت سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش دارای کمترین میزان نشت الکترولیت است، بدین معنی که کاربرد این هورمون در شرایط تنش دمایی به صورت موثری از افزایش این صفت جلوگیری کرده است.



شکل ۴-۹- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار نشت الکترولیت توده بوشرویه

نتایج مقایسه میانگین صفت نشت الکترولیت در توده همدان نشان داد (شکل ۴-۱۰) که تنش دمایی موجب افزایش این صفت می‌گردد. در تیمار تنش دمایی بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی) مقدار نشت الکترولیت در مقایسه با سایر تیمارهای به بالاترین میزان خود رسید، همچنین میزان این صفت در تیمار ۶ ساعت پس از اعمال تنش دمایی نسبت به شرایط نرمال دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌داری داشت. در حقیقت کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمایی بالا و در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری میزان نشت الکترولیت را نسبت به شرایط عدم کاربرد اپی براسینواستروئید کاهش داد. سطوح ۲ و ۵ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش به صورت موثری میزان نشت الکترولیت را کاهش دادند، بدین معنی که کاربرد این هورمون در

شرایط تنش دمایی به صورت موثری از افزایش این صفت جلوگیری کرده است. همچنین کاربرد سطوح مختلف این هورمون به صورت معنی‌داری میزان نشت الکترولیت را در تیمار دمای بالا و زمان ۲۴ ساعت پس از تنش نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید کاهش داده است.

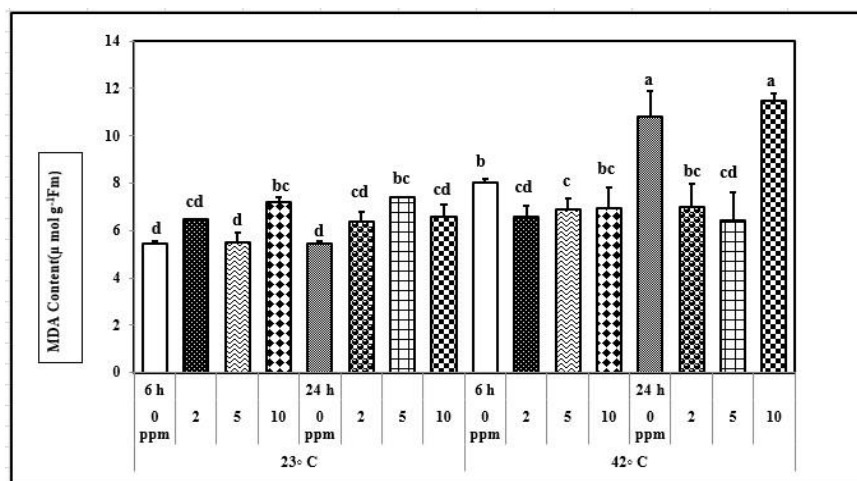


شکل ۴-۱۰- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان نشت الکترولیت توده همدان

#### ۴-۲-۶- محتوی مالون‌دی‌آلدهید

نتایج مقایسه میانگین محتوی مالون‌دی‌آلدهید در توده بوشرویه نشان داد (شکل ۴-۱۱) که تنش دمایی موجب افزایش این صفت می‌گردد. در تیمار تنش دمای بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی) محتوی مالون‌دی‌آلدهید در مقایسه با سایر تیمارهای به بالاترین میزان خود رسید، همچنین میزان این صفت در تیمار ۶ ساعت پس از اعمال تنش دمایی نسبت به شرایط نرمال دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌داری داشت. کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا و در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری مالون‌دی‌آلدهید را نسبت به شرایط عدم کاربرد اپی براسینواستروئید کاهش داد. در حقیقت سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش

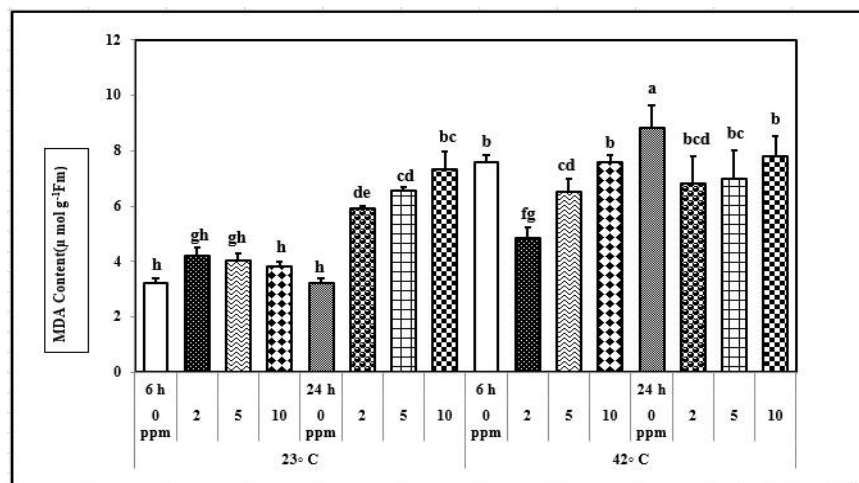
به صورت موثری از افزایش این صفت در مقایسه با تیمار دمایی بالا و عدم کاربرد این هورمون جلوگیری کرد. همچنین سطوح ۲ و ۵ ppm اپی براسینواستروئید نیز به صورت موثری محتوی مالون‌دی‌آلدهید و در نتیجه آسیب پذیری گیاه نسبت به تنش دمایی را کاهش داد.



شکل ۴-۱۱- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی مقدار مالون‌دی‌آلدهید توده بوشویه

نتایج مقایسه میانگین محتوی مالون‌دی‌آلدهید در توده همدان نشان داد (شکل ۴-۱۲) که تنش دمایی موجب افزایش این صفت می‌گردد. در تیمار تنش دمایی بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی) محتوی مالون‌دی‌آلدهید در مقایسه با سایر تیمارهای به بالاترین میزان خود رسید، همچنین میزان این صفت در تیمار ۶ ساعت پس از اعمال تنش دمایی نسبت به شرایط نرمال دمایی (۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌داری داشت. کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمایی بالا و در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری مالون‌دی‌آلدهید را نسبت به شرایط عدم کاربرد اپی براسینواستروئید کاهش داد. در حقیقت سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تنش به صورت موثری از افزایش این صفت در مقایسه با تیمار دمایی بالا و عدم کاربرد این هورمون جلوگیری کرد.

همچنین تمامی سطوح اپی براسینواستروئید نیز به صورت موثری محتوی مالون‌دی‌آلدهید و در نتیجه آسیب پذیری گیاه نسبت به تنش دمایی را کاهش داد. در حقیقت کاربرد تمامی سطوح اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمایی بالا و زمان برداشت ۲۴ ساعت، به صورت معنی‌داری مانع از افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردیده است.

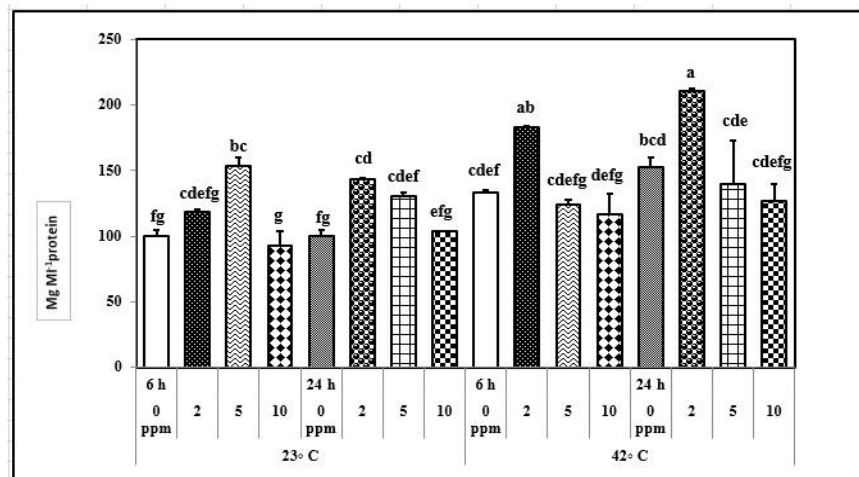


شکل ۴-۱۲- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان مالون‌دی‌آلدهید توده همدان

#### ۴-۲-۷- پروتئین

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر صفت پروتئین در توده بشرویه در شکل ۴-۱۳ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که میزان پروتئین در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین میزان پروتئین در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش نیز به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال (بدون تنش دمایی بالا) افزایش یافت. میزان پروتئین با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در غلظت ۲ ppm اپی

براسینواستروئید میزان پروتئین به صورت معنی‌داری افزایش یافت و دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار دمای بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید بود. همچنین میزان پروتئین در تیمار دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و در تمامی غلظت‌های افزایش یافت و این اختلاف معنی‌دار بود.

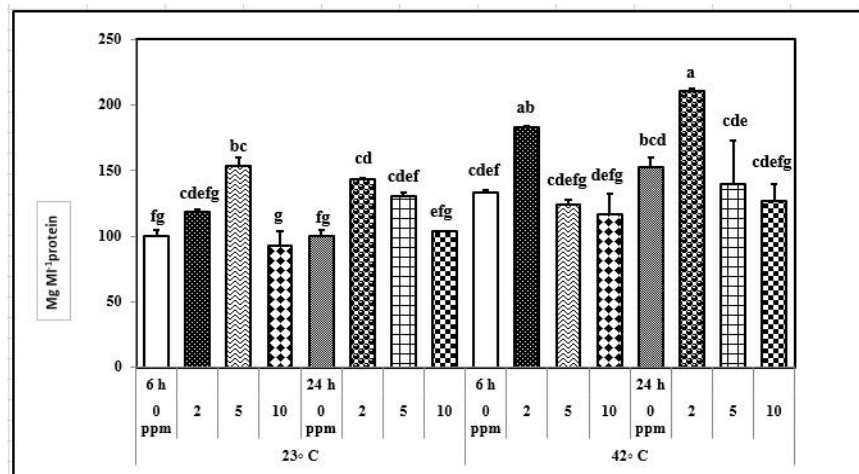


شکل ۴-۱۳- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار پروتئین توده بوشرویه

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل دما، زمان و غلظت‌های اپی براسینواستروئید بر روی میزان پروتئین توده همدان در شکل ۴-۱۴ آمده است. اعمال تنش دمایی موجب افزایش میزان پروتئین شد و مقدار آن در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بیشتر بود. در شرایط دمایی نرمال و ۶ ساعت پس از تیماردهی، غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید موجب افزایش میزان پروتئین نسبت به شاهد شد و این افزایش در غلظت ۵ ppm بیشتر بود. غلظت ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید موجب کاهش میزان پروتئین نسبت به شاهد گردید. روند تغییرات در زمان ۲۴ ساعت پس از تیماردهی متفاوت بود به گونه‌ای که با افزایش غلظت اپی براسینواستروئید از میزان پروتئین کاسته شد. غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید بعد از ۲۴ ساعت موجب افزایش معنی‌دار میزان پروتئین در مقایسه با شاهد شد. تیمار تنش دمایی در زمان ۶ ساعت افزایش معنی‌دار میزان پروتئین در مقایسه



با شاهد را در پی داشت. غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید به مدت ۶ ساعت موجب افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین شد؛ اما غلظت‌های ۵ ppm و ۱۰ ppm موجب کاهش این مقدار شدند. میزان پروتئین در تیمار ۲ ppm اپی براسینواستروئید بعد از زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار ۲ ppm و زمان ۶ ساعت بیشتر بود و بیشترین مقدار پروتئین در مقایسه با سایر تیمارها را داشت. غلظت‌های ۵ ppm و ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید موجب کاهش مقدار پروتئین در مقایسه با غلظت ۲ ppm شدند اما مقدار آنها بیشتر از شاهد (دمای نرمال و بدون حضور اپی براسینواستروئید) بود.

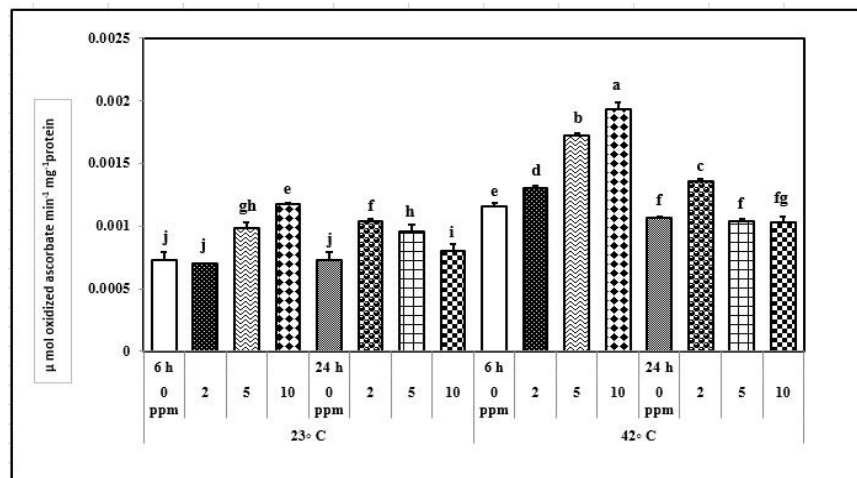


شکل ۴-۱۴- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان پروتئین توده همدان

#### ۴-۲-۸- آسکورات پراکسیداز

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر آسکورات پراکسیداز در توده بشرویه در شکل ۴-۱۵ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت آسکورات پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت و ۲۴ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری افزایش یافت. فعالیت آسکورات پراکسیداز با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی

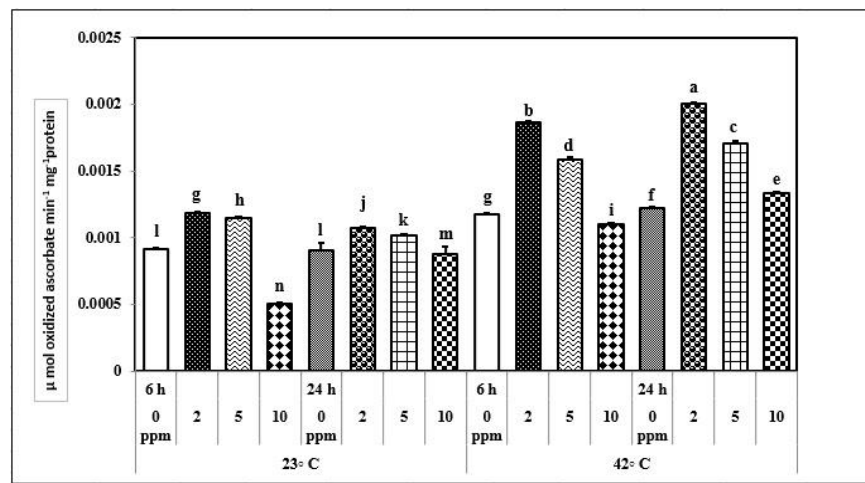
براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در تمامی سطوح فعالیت آسکوربات پراکسیداز به صورت معنی‌داری نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت. همچنین فعالیت آسکوربات پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا و کاربرد غلظت ۲ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش به صورت معنی‌داری نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت.



شکل ۴-۱۵- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر روی مقدار آسکوربات توده بوشرویه

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر آسکوربات پراکسیداز در توده همدان در شکل ۴-۱۶ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت و ۲۴ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری افزایش یافت. فعالیت آسکوربات پراکسیداز با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ و ۲۴ ساعت پس از تنش و در سطوح ۲ و ۵ ppm فعالیت آسکوربات پراکسیداز به صورت معنی‌داری نسبت به تنش دمایی بالا و عدم

کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید و زمان ۲۴ ساعت بدست آمد، که نشان دهنده نقش این آنزیم در افزایش مقاومت گیاه به تنش است.

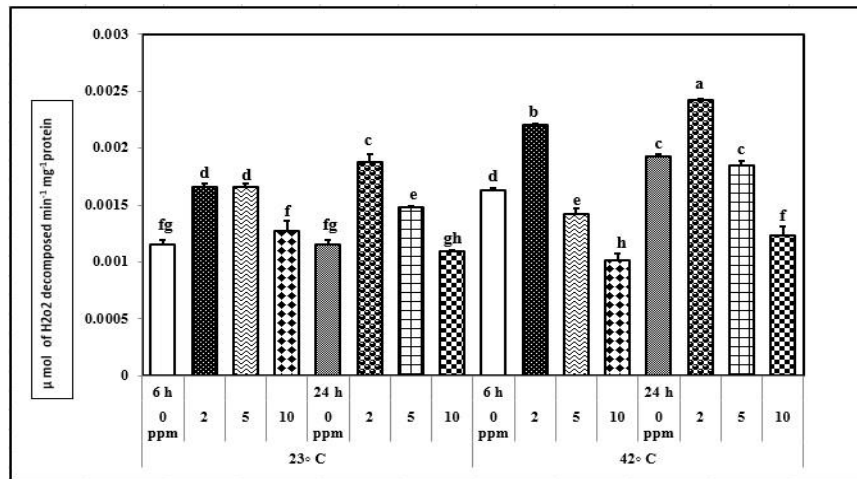


شکل ۴-۱۶- نتایج مقایسه میانگین سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان آسکوربات توده همدان

#### ۴-۲-۹- کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه گانه بر فعالیت کاتالاز در توده بشرویه در شکل ۴-۱۷ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت کاتالاز در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت و ۲۴ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی گراد) به صورت معنی داری افزایش یافت. فعالیت کاتالاز با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی داری افزایش یافت. در زمان ۶ و ۲۴ ساعت پس از تنش و در سطوح ۲ ppm فعالیت کاتالاز به صورت معنی داری نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید و زمان ۲۴ ساعت بدست آمد، که نشان

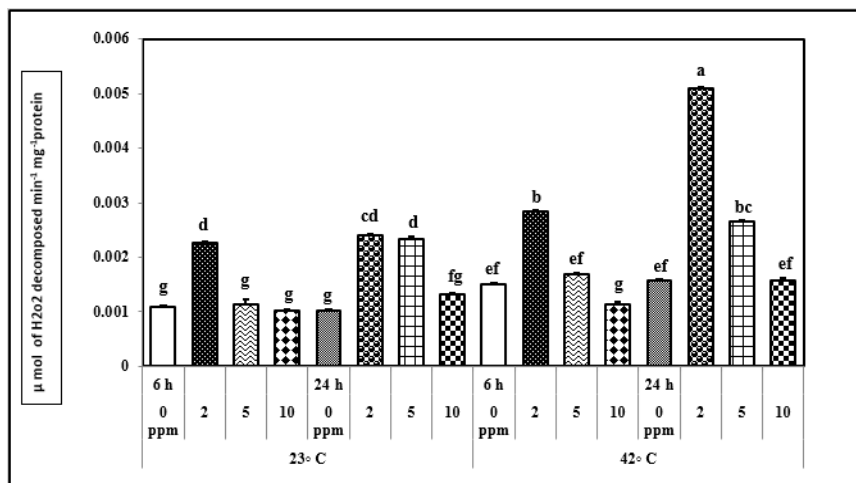
دهنده نقش این آنزیم در افزایش مقاومت گیاه به تنش است. کمترین میزان فعالیت این آنزیم در زمان اعمال تنش دمایی و ۶ ساعت پس از تنش و سطح ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید بدست آمد.



شکل ۴-۱۷- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی مقدار کاتالاز توده بوشرویه

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه گانه بر فعالیت کاتالاز در توده همدان در شکل ۴-۱۸ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت کاتالاز در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی گراد) به صورت معنی داری افزایش یافت. اگرچه فعالیت کاتالاز در زمان اعمال تنش دمایی بالا در ۲۴ ساعت پس از تنش نسبت به ۶ ساعت پس از تنش افزایش یافت، اما این افزایش معنی دار نبود. فعالیت کاتالاز با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در سطوح ۲ ppm و در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش و در سطوح ۲ و ۵ ppm فعالیت کاتالاز به صورت معنی داری نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در

سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید و زمان ۲۴ ساعت بدست آمد، که احتمالاً نشان‌دهنده نقش این آنزیم در افزایش مقاومت گیاه به تنش است.

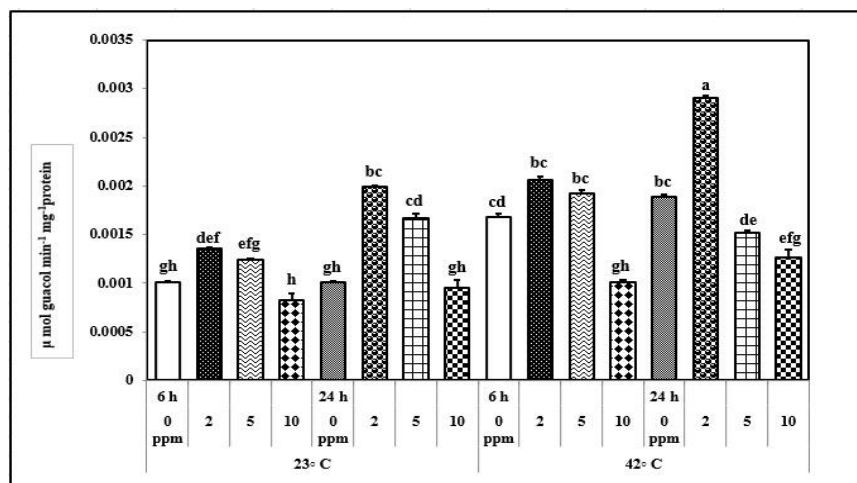


شکل ۴-۱۸- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان کاتالاز توده همدان

#### ۴-۲-۱۰- گایاکول پراکسیداز

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه‌گانه بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در توده بوشرویه در شکل ۴-۱۹ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا در ۲۴ ساعت افزایش یافت. فعالیت گایاکول پراکسیداز با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی‌داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در سطوح ۲ و ۵ ppm فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش یافت، اگرچه این

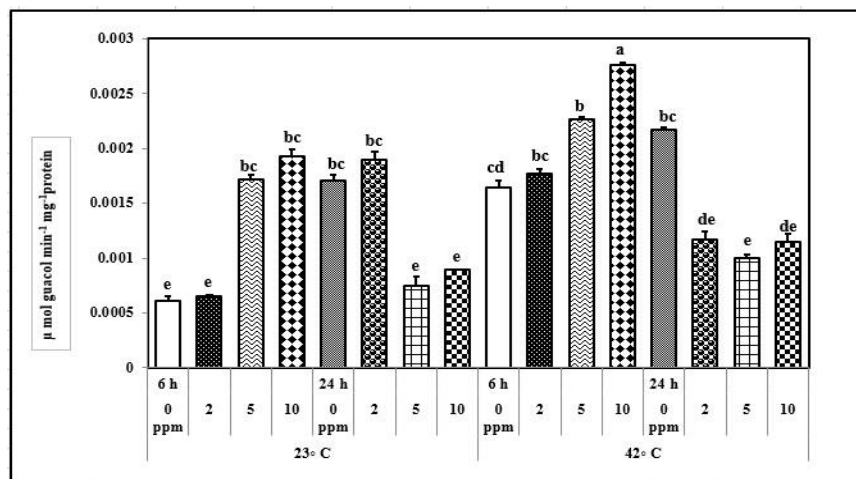
اختلاف معنی دار نبود. بیشترین میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید و زمان ۲۴ ساعت بدست آمد، که این میزان با تمامی تیمارها اختلاف معنی داری داشت.



شکل ۴-۱۹- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی مقدار گایاکول توده بشرویه

نتایج مقایسه میانگین آثار متقابل سه گانه بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در توده بشرویه در شکل ۴-۲۰ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا (۶ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی گراد) به صورت معنی داری افزایش یافت. همچنین فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا در ۲۴ ساعت افزایش یافت. بین میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در زمان اعمال تنش دمایی بالا در زمان های ۶ و ۲۴ ساعت پس از تنش اختلاف معنی داری مشاهده نشد. با کاربرد اپی براسینواستروئید در برخی سطوح در زمان اعمال تنش دمایی نسبت به عدم کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش به صورت معنی داری افزایش یافت. در زمان ۶ ساعت پس از تنش و در سطوح ۵ و ۱۰ ppm فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت به تنش دمایی بالا و عدم کاربرد اپی براسینواستروئید به صورت معنی داری افزایش

یافت. بیشترین میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در سطح ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید و زمان ۶ ساعت بدست آمد، که این میزان با تمامی تیمارها اختلاف معنی داری داشت.

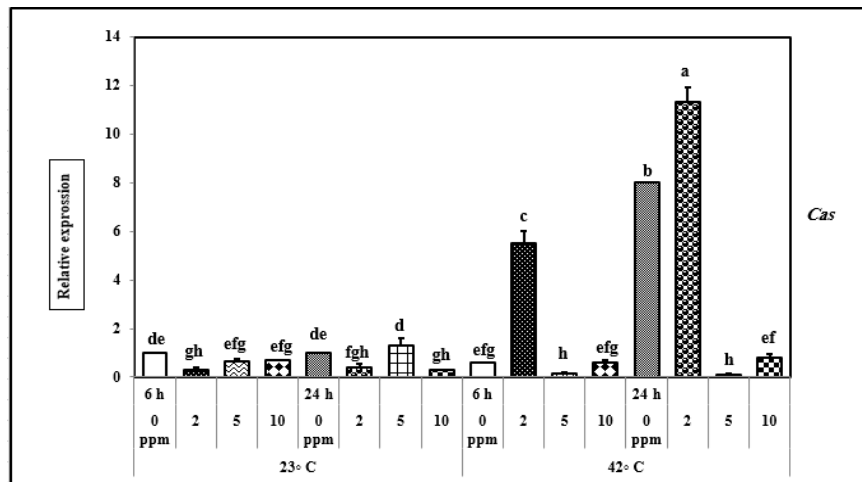


شکل ۴-۲۰- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی میزان گایاکول توده همدان

### ۳-۴- بررسی بیان ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین

#### ۳-۴-۱- بیان ژن CAS

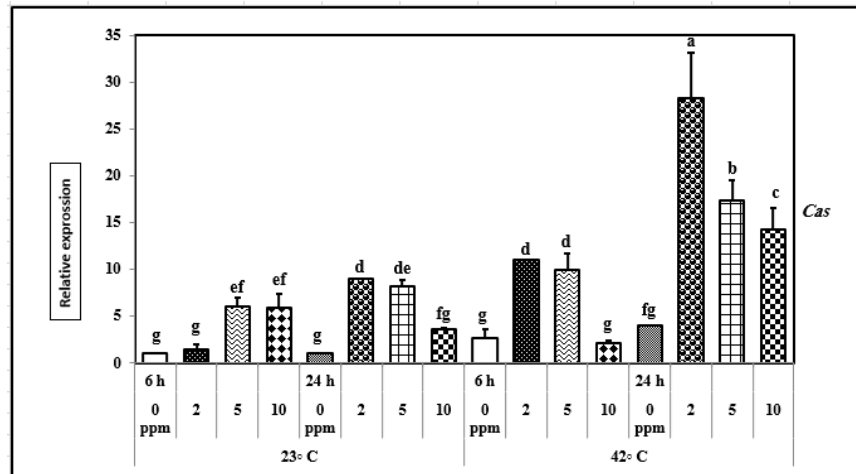
بیان این ژن در توده بشرویه و در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی گراد) با کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان های ۶ و ۲۴ ساعت تغییر چندانی نداشت (شکل ۴-۲۱). بیان ژن CAS در شرایط تنش دمایی بالا و با کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان ۶ ساعت ۵ برابر افزایش یافت، که با تیمار بدون دما اختلاف معنی داری دارد. همچنین بیان این ژن در شرایط دمایی بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید نیز به صورت معنی داری افزایش یافت. تاثیر همزمان دمایی بالا و سطح ۲ ppm هورمون اپی براسینواستروئید منجر به افزایش ۱۱ برابری این ژن گردید. بیان این ژن در شرایط تنش دمایی بالا و سطوح ۵ و ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی گراد) کاهش یافت، اگرچه در سطح ۱۰ ppm این کاهش معنی دار نبود.



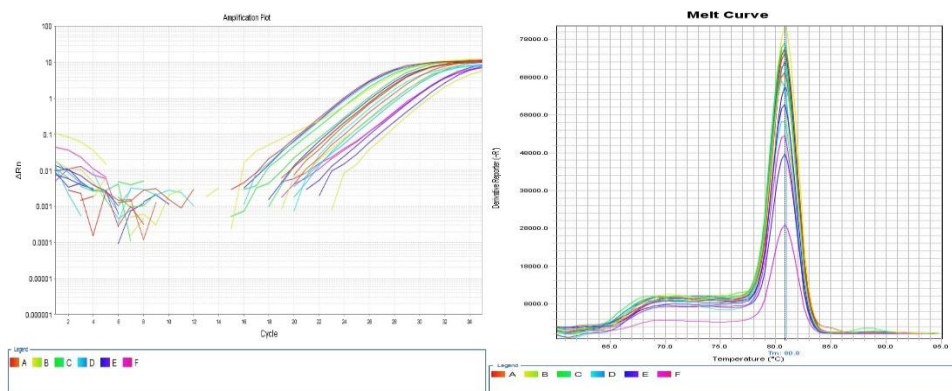
شکل ۴-۲۱- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و غلظت اپی براسینواستروئید بر بیان ژن *CAS* توده بوشرویه

بیان این ژن در توده همدان و در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) با کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت در برخی از سطوح به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۲۲). بیان ژن *CAS* در شرایط دمای نرمال و در زمان ۶ ساعت و سطوح ۵ و ۱۰ ppm به میزان ۶ برابر و در زمان ۲۴ ساعت و در سطح ۲ و ۵ ppm نیز به میزان ۱۰ برابر افزایش یافت. تنش دمای بالا و کاربرد اپی براسینواستروئید بیان این ژن را نسبت به شرایط تنش دمای بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید افزایش داد. بیشترین میزان بیان این ژن در تیمار دمای بالا و سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش (۲۷ برابر) بدست آمد، اگرچه در همین تیمار دمای سایر سطوح (۵ و ۱۰ ppm) نیز به صورت معنی‌داری منجر به افزایش این ژن شدند. در شکل (۴-۲۳) نمودار تکثیر و ذوب مربوط به ژن *CAS* ارائه شده است. در این تصویر منحنی تکثیر کاملاً سیگموئیدی و منحنی ذوب تک پیک و مشابه با منحنی نرمال است، که نشان‌دهنده تکثیر صحیح و بدون عیب ژن مذکور است.





شکل ۴-۲۲- نتایج مقایسه میانگین آثار سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن CAS توده همدان

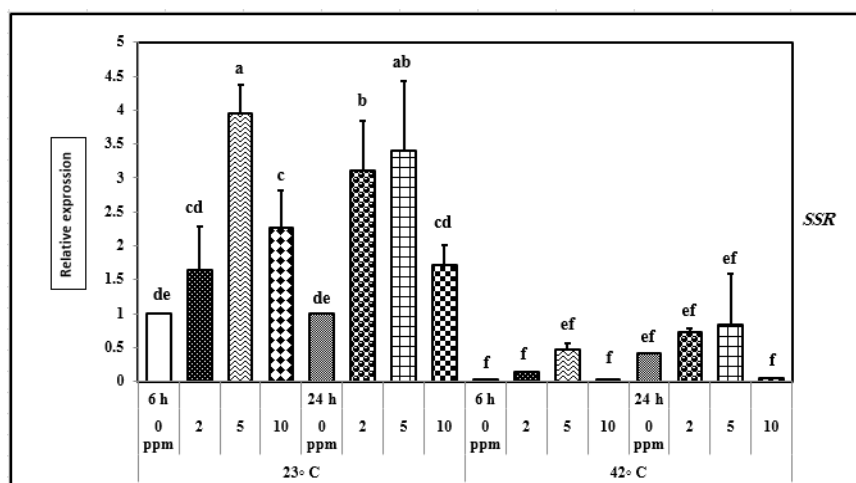


شکل ۴-۲۳- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر (سمت چپ) در ژن CAS

### ۴-۳-۲- بیان ژن SSR

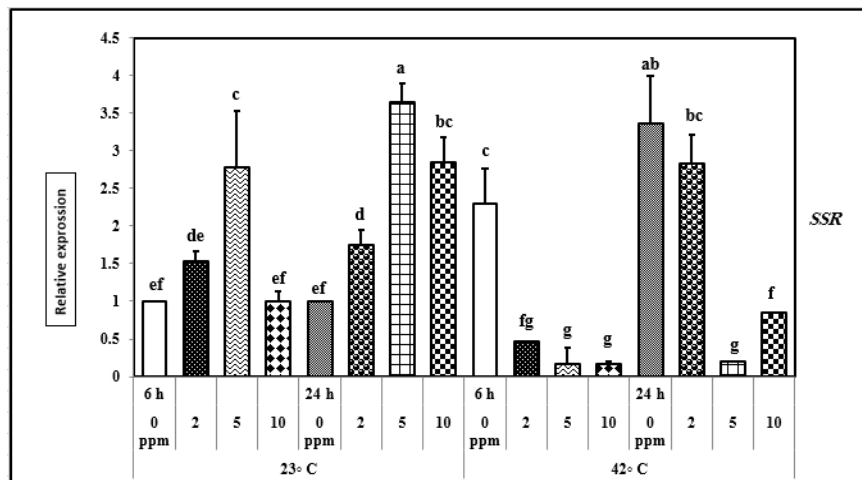
بیان این ژن در توده بشرویه و در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) با کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۲۴). در شرایط نرمال، کاربرد اپی براسینواستروئید مخصوصاً در سطح ۵ ppm در هر دو زمان ۲۴ و ۶ ساعت منجر به افزایش بیان این ژن به میزان

۴ و ۳/۵ برابر گردید. دمای بالا، بیان ژن *SSR* را کاهش داد و کاربرد اپی براسینواستروئید در هر دو زمان بیان این ژن را نسبت به شرایط دمای بالا و بدون تیمار با اپی براسینواستروئید افزایش داد، اگرچه این افزایش معنی‌دار نبود. در مجموع دمای بالا، اپی براسینواستروئید و اثر متقابل این دو تیمار بیان ژن *SSR* را نسبت به شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) کاهش دادند.

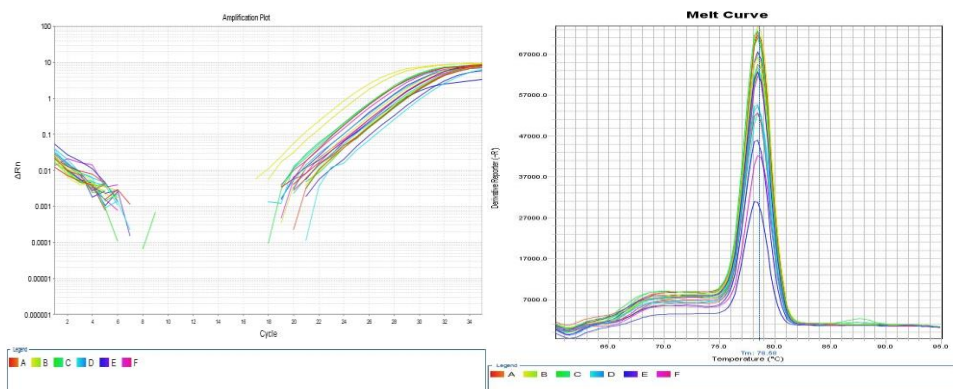


شکل ۴-۲۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SSR* توده بوشویه

بیان این ژن در توده همدان و در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) با کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت در برخی از سطوح به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۲۱). در شرایط نرمال، کاربرد اپی براسینواستروئید مخصوصاً در سطح ۵ ppm در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت منجر به افزایش بیان این ژن به میزان ۲/۶ و ۳/۵ برابر گردید. دمای بالا، (بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) بیان ژن *SSR* را نسبت به (دمای نرمال و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) افزایش داد. کاربرد اپی براسینواستروئید در هر دو زمان بیان این ژن را نسبت به شرایط دمای بالا و بدون تیمار با اپی براسینواستروئید کاهش داد. بیشترین میزان بیان ژن *SSR* در تیمار دمای نرمال و سطح ۵ ppm در زمان ۲۴ ساعت به میزان ۳/۵ برابر بدست آمد.



شکل ۴-۲۵- نتایج مقایسه میانگین اثر سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SSR* توده همدان

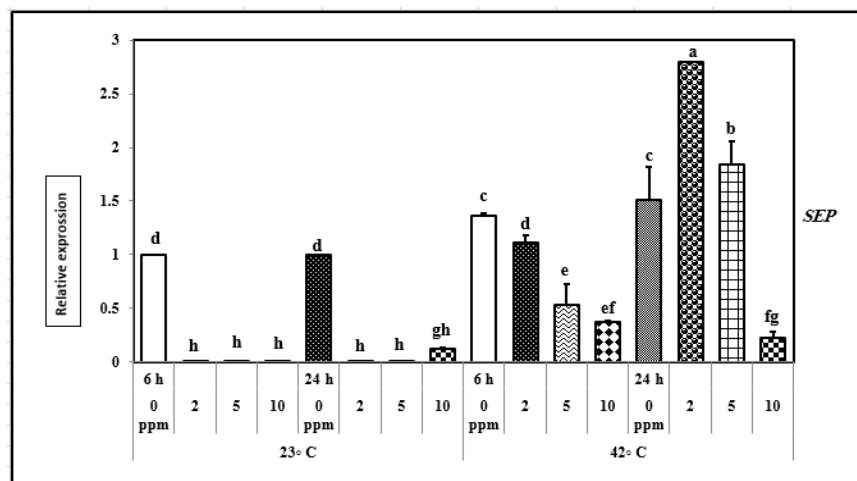


شکل ۴-۲۶- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر (سمت چپ) در ژن *SSR*

### ۴-۳-۳- بیان ژن *SEP*

بیان این ژن در توده بشرویه و در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) با کاربرد سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری کاهش یافت و بیان این ژن در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت در شرایط تنش دمایی و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴-۲۴). در تنش دمایی بالا و در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید بیان این ژن نسبت

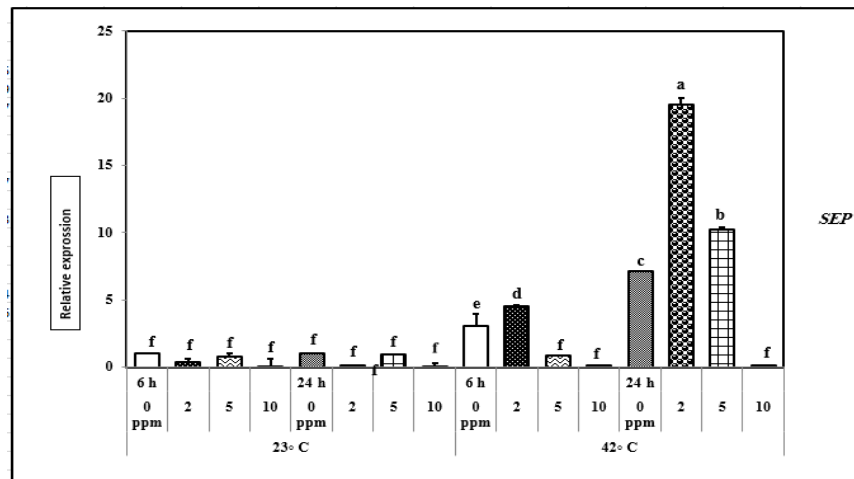
به شرایط زمانی نرمال افزایش یافت. بیان ژن *SEP*، در شرایط تنش دمای بالا، در زمان ۶ ساعت و تیمار ۲ ppm به شرایط زمانی نرمال افزایش یافت. بیان ژن *SEP* به میزان ۱/۲ رسید. همچنین کاربرد اپی براسینواستروئید (۲ ppm) در شرایط دمای بالا در ۲۴ ساعت پس از تنش منجر به افزایش بیان این ژن به میزان ۲/۸ برابر گردید، که با تیمار دمای بالا و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید اختلاف معنی‌داری داشت.



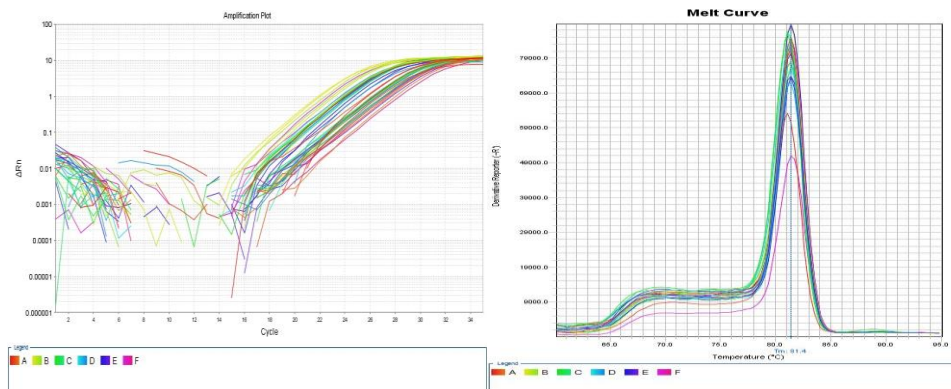
شکل ۴-۲۷- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SEP* توده بوشویه

بیان این ژن در توده همدان و در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) بدون کاربرد و یا با کاربرد اپی براسینواستروئید در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت تغییر چندانی نداشت، در حالی که اعمال تنش دمای بالا در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت منجر به افزایش معنی‌دار بیان این ژن گردید. در زمان اعمال تنش دمای بالا و سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید بیان این ژن به میزان ۵ برابر نسبت به شرایط دمای نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش یافت. کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا به صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان این ژن گردید، به طوری که بیان این ژن در این دو تیمار به ترتیب نسبت به

شرایط دمای نرمال ( دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد اپی براسینوآستروئید) ۲۰ و ۱۰ برابر افزایش یافت.



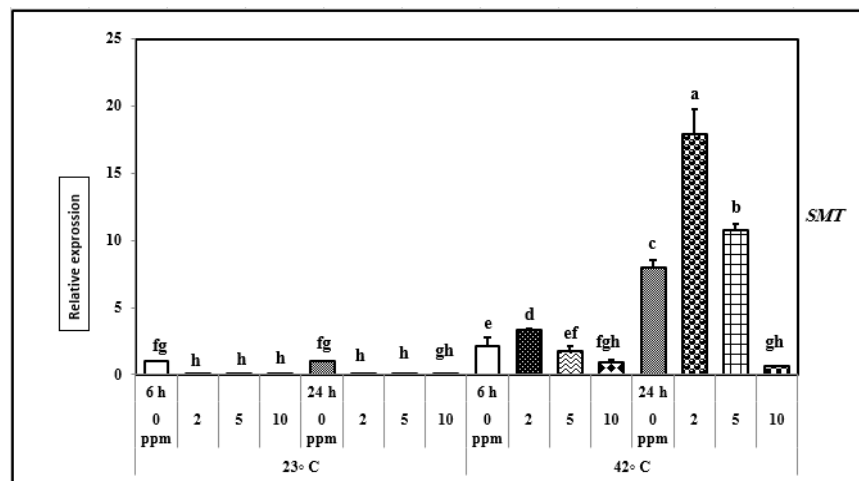
شکل ۴-۲۸- نتایج مقایسه میانگین سه گانه دما، زمان و اپی براسینوآستروئید بر روی بیان ژن SEP توده همدان



شکل ۴-۲۹- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر (سمت چپ) در ژن SEP

#### ۴-۳-۴- بیان ژن *SMT*

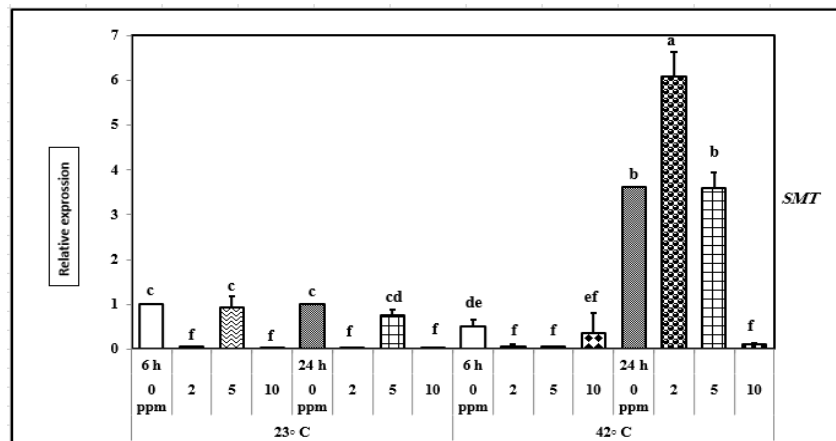
نتایج مقایسه میانگین بیان ژن *SMT* در توده بوشرویه نشان داد که در شرایط دمایی نرمال، میزان بیان این ژن تحت تاثیر زمان و غلظت‌های مختلف اپی براسینواستروئید تغییر معنی‌داری نداشت. در مجموع در شرایط دمایی نرمال میزان بیان این ژن تحت تاثیر اپی براسینواستروئید نسبت به شاهد (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) کاهش یافت. در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی (بدون کاربرد اپی براسینواستروئید)، بیان ژن *SMT* نسبت به شرایط دمایی نرمال افزایش یافت. کاربرد سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمایی (۶ ساعت) منجر به افزایش ۲ برابری ژن مذکور نسبت به شرایط نرمال گردید، این در حالی است که، بیان این ژن در زمان اعمال تنش دمای بالا و در زمان ۲۴ ساعت بعد از تیمار با سطح ۲ و ۵ ppm به صورت معنی‌داری به ترتیب ۱۷ و ۱۰ برابر افزایش یافت.



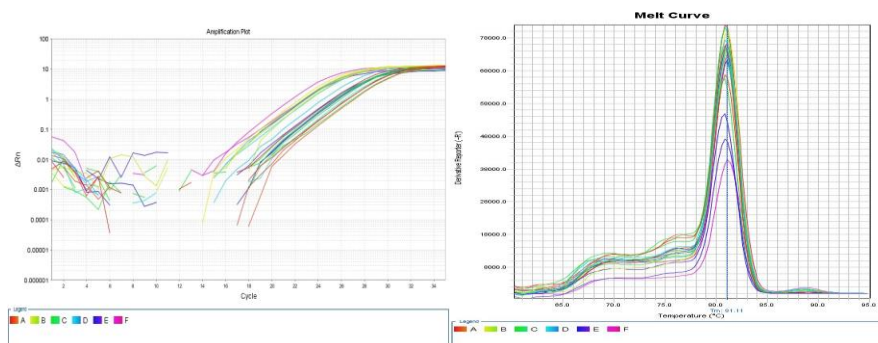
شکل ۴-۳۰- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SMT* توده بوشرویه

میزان بیان ژن *SMT* در شرایط دمایی نرمال در توده همدان در سطوح ۲ و ۱۰ ppm کاهش و در سطح ۵ ppm نسبت به شاهد (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) تغییری نداشت، به عبارت دیگر

کاربرد سطوح مختلف براسینواستروئید منجر به افزایش در میزان بیان این ژن نگردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تنش دمایی (بدون تیمار با اپی براسینواستروئید)، بیان ژن مذکور به صورت بسیار معنی‌داری افزایش یافت. بیان ژن *SMT* در شرایط تنش دمایی و زمان ۶ ساعت در سطوح ۲ و ۵ ppm به صورت معنی‌داری کاهش یافت، اگرچه این کاهش در سطح ۱۰ ppm معنی‌دار نبود. کاربرد اپی براسینواستروئید (۲ ppm) بعد از گذشت ۲۴ ساعت موجب افزایش بسیار معنی‌دار در بیان ژن *SMT* به میزان ۶ برابر گردید. تیمار ۱۰ ppm اپی براسینواستروئید بعد از گذشت ۲۴ ساعت نیز بیان ژن *SMT* را به صورت معنی‌داری کاهش داد.



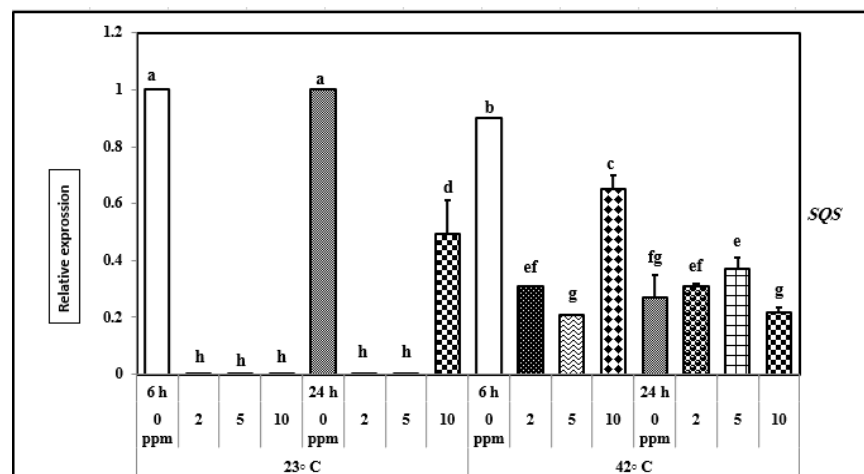
شکل ۴-۳۱- نتایج مقایسه میانگین سه گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SMT* توده همدان



شکل ۴-۳۲- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر (سمت چپ) در ژن *SMT*

#### ۴-۳-۵- بیان ژن *SQS*

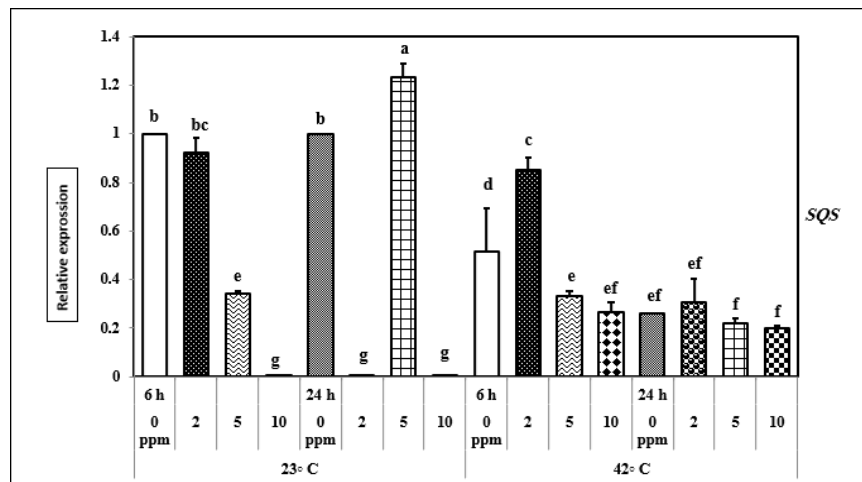
بیان این ژن *SQS* در توده بشرویه و در شرایط دمایی نرمال (زمان ۶ و ۲۴ ساعت) با کاربرد غلظت‌های مختلف اپی براسینواستروئید نسبت به شاهد (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) به صورت معنی‌داری کاهش یافت، در حقیقت در شرایط نرمال اپی براسینواستروئید بیان این ژن را در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت کاهش داد. در شرایط تنش دمای بالا در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت و بدون تیمار با اپی براسینواستروئید، بیان این ژن نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت. تیمار با سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا در (۶ ساعت پس از تنش) بیان این ژن را کاهش داد، در حالی‌که کاربرد سطح ۵ ppm اپی براسینواستروئید منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به شرایط تنش دمای بالا و زمان ۲۴ ساعت پس از تنش گردید.



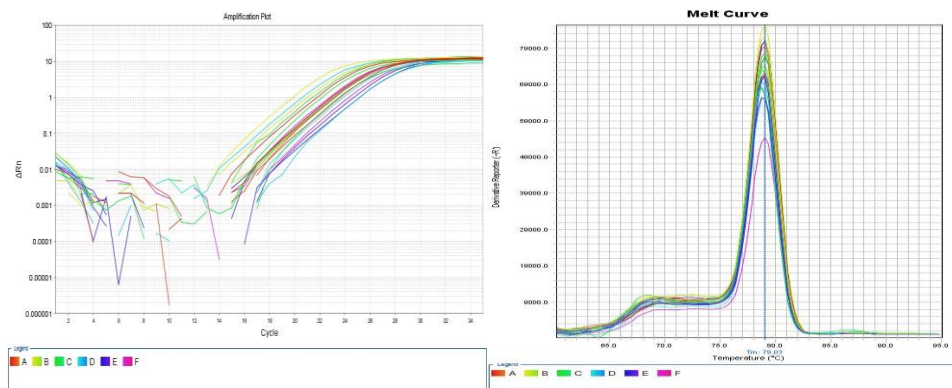
شکل ۴-۳۳- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواستروئید بر روی بیان ژن *SQS* توده بشرویه



بیان ژن *SQS* در توده همدان در شرایط نرمال و در زمان ۶ ساعت پس از کاربرد براسینواسنروئید، در هر سه سطح هورمون کاهش یافت، اگرچه این کاهش در سطح ۲ ppm معنی‌دار نبود. بیان این ژن در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد)، در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال سطح ۵ ppm اپی براسینواسنروئید به صورت معنی‌داری افزایش و در سایر سطوح کاهش یافت. بیان ژن مذکور در شرایط تنش دمایی بالا کاهش یافت، اگرچه کاربرد سطوح مختلف براسینواسنروئید منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به شرایط دمایی بالا و عدم کاربرد اپی براسینواسنروئید گردیدند. بیان ژن *SQS* در شرایط نرمال دمایی و زمان ۲۴ ساعت پس از تنش و با تیمار ۵ ppm اپی براسینواسنروئید به بالاترین میزان (۱/۲) خود رسید.



شکل ۴-۳۴- نتایج مقایسه میانگین آثار سه‌گانه دما، زمان و اپی براسینواسنروئید بر روی بیان ژن *SQS* توده همدان



شکل ۴-۳۵- منحنی ذوب (سمت راست) و منحنی تکثیر (سمت چپ) در ژن *SQS*

## ۴-۴- بحث

### ۴-۴-۱- محتوی کلروفیل و کارتنوئید

محتوی کلروفیل یکی از خصوصیات است که برای درک چگونگی پاسخ گیاه به شرایط محیطی است. تداوم فتوسنتز و عدم تجزیه کلروفیل تحت شرایط تنش یکی از شاخص‌های فیزیولوژیکی مقاومت به تنش در گیاهان محسوب می‌گردد. در حقیقت محتوی کلروفیل در گیاهان یکی از فاکتورهای که حفظ ظرفیت فتوسنتزی است و بنابراین کاهش فتوسنتز به واسطه کاهش کلروفیل رخ می‌دهد (Afzal et al., 2014). اندازه‌گیری محتوی کلروفیل در شرایط تنش، یک معیار مناسب از میزان تحمل گیاه به تنش می‌باشد. در یک تحقیق موحدی و همکاران (۱۳۸۳) محتوی کلروفیل در گلرنگ را به عنوان یک شاخص از میزان تحمل به تنش خشکی اندازه‌گیری کردند. نتایج پژوهش Kholova و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ارقام مختلف ارزن، نشان داد که محتوی کلروفیل برگ در تمامی ارقام در شرایط تنش به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. در این تحقیق محتوی کلروفیل b (شکل ۴-۳ و ۴-۴) و کلروفیل کل (شکل ۴-۵ و ۴-۶) در اثر تنش دمایی کاهش یافتند و با گذشت

مدت زمان تنش، محتوی کلروفیل b نیز بیشتر کاهش یافت. آن‌ها نتیجه گرفتند که، کاهش محتوی کلروفیل در نتیجه کاهش سنتز و افزایش تجزیه آن می‌باشد.

در تحقیق حاضر محتوی کلروفیل a در هر دو توده (شکل‌های ۴-۱ و ۴-۲)، در اثر تنش دمایی نسبت به شرایط نرمال به صورت معنی‌داری کاهش یافت، اگرچه تداوم تنش از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت منجر به کاهش کلروفیل a در هر دو توده گردید، اما این کاهش چندان معنی‌دار نبود. همچنین در این پژوهش محتوی کلروفیل b (شکل‌های ۴-۳ و ۴-۴)، در هر دو توده در شرایط تنش دمایی بالا نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت و تداوم تنش از ۶ به ۲۴ ساعت منجر به کاهش معنی‌داری در محتوی کلروفیل b در هر دو توده گردید. در حقیقت گذشت زمان در شرایط تنش دمایی بالا (از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت) منجر به عدم سنتز و یا تجزیه کلروفیل b گردیده است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که، با افزایش شدت تنش، محتوی رنگدانه‌ها نیز کاهش می‌یابد و احتمال کاهش در کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a محتمل‌تر است (سیروس‌مهر و همکاران، ۲۰۱۴).

در تحقیق حاضر نیز کلروفیل b با شدت بیشتری نسبت به کلروفیل a با گذشت مدت زمان تنش، کاهش یافت. زیرا در اثر تنش، کمپلکس پروتئینی جذب کننده نور (chl a/b) در فتوسیستم II تحت تاثیر قرار گرفته و آسیب می‌بیند، از آنجا که بخش کلروفیل b این کمپلکس پروتئینی در درون غشای کلروپلاست قرار دارد، با افزایش تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست در اثر شرایط تنش، میزان تخریب غشاهای کلروپلاست نیز افزایش می‌یابد و از این رو در اثر تنش، تخریب کمپلکس پروتئینی chl a/b و در نتیجه تخریب کلروفیل b نیز افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه کلروفیل کل از مجموع دو کلروفیل a و b تشکیل می‌گردد، لذا در این پژوهش محتوی کلروفیل کل (شکل ۴-۵ و ۴-۶)، با شروع شرایط تنش کاهش یافت و این کاهش با گذشت زمان

(از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت) محسوس تر گردید. یکی از دلایل کاهش محتوای کلروفیل، احتمالاً به علت افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز است (Kaya, et al., 2001). از دلایل دیگر کاهش غلظت کلروفیل، می‌توان به مشترک بودن مسیر بیوسنتزی کلروفیل و آلفا توکوفرول اشاره کرد، در حقیقت در شرایط تنش، گیاه با متوقف کردن مسیر بیوسنتزی کلروفیل، مسیر بیوسنتزی آنتی‌اکسیدانت آلفا توکوفرول را فعال می‌نماید (Kaya et al., 2001). همچنین تغییر در مسیر متابولیسم نیتروژن به علت ساخت ترکیب‌هایی مانند پرولین دلیل مهمی دیگری است (Kaya et al., 2001). از آنجا که گلوتامین پیش ماده مشترک ساخت کلروفیل و پرولین است، لذا این پیش ماده در شرایط تنش کمتر در مسیر ساخت کلروفیل شرکت می‌کند و بیشتر به سمت تولید پرولین گرایش دارد. از سویی دیگر ذخیره پرولین در پاسخ به تحمل در گیاهان تحت شرایط تنش، در جذب رادیکال‌های آزاد عمل موثر است (Mahajan and Tuteja., 2005).

کارتنوئیدها، (بتاکاروتن، گزانتوفیل‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های چربی دوست با وزن مولکولی کم) در کلروپلاست حضور دارند و از غشاهای کلروپلاستی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از استرهای زیستی و غیر زیستی محافظت می‌کنند. همچنین کارتنوئیدها می‌توانند به صورت مستقیم گونه‌های فعال و آزاد اکسیژن را غیرفعال نمایند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). کارتنوئیدها انرژی را از مولکول‌های تحریک شده و آزاد اکسیژن دریافت کرده و آن را به انرژی گرمایی تبدیل می‌کنند (Kafi et al., 2012 و Edreva, 2005) و در نتیجه مانع از آسیب به دستگاه فتوسنتزی گیاه و شروع پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شوند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). یکی از مهم‌ترین وظایف کارتنوئیدها، جلوگیری از آسیب اکسیداتیو می‌باشد، که این عمل را با تعدیل سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل و حفاظت نوری انجام می‌دهند. نتایج نشان می‌دهد که در شرایط تنش مقدار کارتنوئید کاهش می‌یابد، بنابراین کارتنوئید قادر به ایفای نقش حفاظتی خود نمی‌باشد، اگرچه کاهش آن‌ها نسبت به کلروفیل‌ها کمتر

است. کاهش در محتوی کارتنوئید احتمالا به علت اکسیداسیون توسط گونه‌های فعال اکسیژن و تخریب ساختار آن‌ها است (Wang *et al.*, 2010 و Bruce *et al.*, 2002).

در تحقیق حاضر، قرار گرفتن طولانی مدت (۲۴ ساعت) در معرض تنش دمایی منجر به کاهش میزان کارتنوئید (شکل ۴-۷ و ۴-۸) گردید. همچنین، در شرایط کوتاه مدت تنش دمایی (۶ ساعت)، محتوی کارتنوئید در هر دو توده کاهش معنی‌داری نداشت. در این شرایط، عدم تغییر محتوی معنی‌دار کارتنوئید موجب حفاظت گیاه در برابر شرایط تنش می‌گردد و احتمالاً بدین ترتیب گیاه با شرایط تنش مقابله کرده است. اما مدت زمان طولانی تنش (۲۴ ساعت) موجب تخریب کارتنوئید شده است و احتمالاً گیاه از طریق مسیرهای آنتی‌اکسیدانتهی شرایط تنش را تحمل کرده است. نتایج پژوهش امینی و حداد (۱۳۹۲) نشان داد که میزان کارتنوئید در ابتدای دوره تنش افزایش می‌یابد (یا بدون تغییر باقی می‌ماند)، اما با افزایش شدت تنش محتوی آن به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد.

تنش دمایی بالا با کاهش محتوی رنگدانه گیاهی، موجب کاهش فتوسنتز، سرکوب فعالیت‌های آنزیم رابیسکو و کاهش هدایت روزنه ای می‌گردد. در این شرایط دی‌اکسید کربن کمتری در دسترس گیاه قرار می‌گیرد. تنش دمایی بالا همچنین توانایی گیاه را در استفاده از آب را کاهش می‌دهد و موجب کاهش، توقف و یا تغییر در فرآیندهای متابولیکی می‌گردد (Sudhir and Murthy., 2004). تنش دمایی بالا همچنان باعث تخریب کلروپلاست‌ها، عدم پایداری ترکیب‌های رنگیزه، پروتئین و کاهش محتوی کلروفیل می‌گردد (Parida and Das.,2005).

نتایج یک پژوهش نشان داد که تنش شوری توان فتوسنتزی خیار را کاهش می‌دهد، که این کاهش احتمالاً به علت بسته شدن روزنه‌ها، جلوگیری از سنتز کلروفیل، تاثیر بر آنزیم‌های فتوسنتزی، کاهش فعالیت کربوکسیلازی و فعالیت بالای کلروفیلازی است (Stepien and Kłbus., 2006).

Kholova و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه اثر تنش خشکی بر محتوی کلروفیل در ارقام مختلف ارزن، نشان دادن کردند که محتوی کلروفیل برگ در تمام ارقام به صورت معنی‌داری کاهش یافت.

اپی براسینواستروئیدها، گروهی از ترکیبات استروئیدی گیاهی با فعالیتهای گسترده بیولوژیکی می‌باشند، که قادر به افزایش عملکرد گیاهان از طریق تغییر در متابولیسم گیاه و حفاظت آنها در برابر تنش‌های محیطی هستند. در تحقیق حاضر اعمال تیمار اپی براسینواستروئید در سطوح ۲، ۵ و ۱۰ ppm در شرایط تنش دمایی بالا موجب افزایش محتوی کلروفیل و کارتنوئید گردید.

اپی براسینواستروئیدها، موجب بهبود کیفیت و کمیت گیاهان می‌شوند (Vardhini and Anjum., 2015) و با بهبود فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتهی، گیاه را در برابر تنش محافظت می‌کنند (Arora et al., 2010). در تحقیق حاضر کاربرد تیمار براسینواستروئید در توده بشرویه در شرایط تنش دمایی بالا و در زمان‌های ۶ و ۲۴، در توده همدان در زمان ۲۴ ساعت موجب افزایش میزان کارتنوئید گردید. اپی براسینواستروئیدها با افزایش فعالیت آکوپورین‌ها (Morillon et al., 2001) و پمپ پروتونی (Sakurai., 1999; Clouse., 1999) نقش مهمی را در برقراری فشار اسمزی و تداوم توسعه اندامک‌ها ایفا می‌نمایند و بدین ترتیب موجب افزایش مقاومت گیاهان به تنش می‌گردند. همچنین اپی براسینواستروئیدها پایداری غشاء را در برابر آسیب‌های ناشی از تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌دهند. اپی براسینواستروئیدها به طور قابل توجهی آثار تنش بر روی گیاهان کاهش می‌دهند و موجب بهبود سطوح رنگدانه و افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز می‌گردد. یکی از دلایل اثر تیمار اپی

براسینواستروئید در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کارتنوئیدها به احتمال زیاد مربوط به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که تحت تاثیر این تیمارها فعال شده و این آنزیم‌ها از تخریب و یا تجزیه رنگدانه‌ها جلوگیری می‌کنند (Hayat et al., 2010).

#### ۴-۴-۲- نشت الکترولیت و محتوی مالون‌دی‌آلدهید

غشاء پلاسمایی، اولین بخش از گیاه است که تحت شرایط تنش آسیب می‌بیند (Liang et al., 2003). در شرایط تنش، تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد (Foyer et al., 1994)، که به بسیاری از ترکیبات سلولی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه می‌زند و با تغییر ساختمان غشاء در اثر پراکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها (Liang et al., 2003)، تراوایی غشاء سلولی را افزایش و منجر به نشت الکترولیت می‌گردند (Blum et al., 1982). پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، نشان دهنده آسیب تنش در سطح سلولی است. بنابراین سطح مالون‌دی‌آلدهید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، اغلب به عنوان یک شاخص برای آسیب اکسیداتیو به کار می‌رود (Turkan et al., 2005; Antoniou et al., 2017).

در تحقیق حاضر تنش دمای بالا در هر دو توده مجر به افزایش نشت الکترولیت و محتوی مالون‌دی‌آلدهید گردید (شکل‌های ۴-۱۱ و ۴-۱۲). در حقیقت تنش دمای بالا موجب افزایش آسیب به غشاء سلول گردیده است و محتویات درونی سلول به خارج از سلول هدایت شده‌اند. نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد اپی براسینواستروئید در هر دو توده موجب کاهش نشت الکترولیت و مقدار مالون‌دی‌آلدهید نسبت به شرایط تنش دمای بالا (بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) شد. گزارشاتی مبنی بر تاثیر اپی براسینواستروئید در کاهش محتوی مالون‌دی‌آلدهید و نشت الکترولیت به دلیل حفظ لیپیدهای غشاء از خسارت حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن وجود دارد (Turkan et al., 2005; Antoniou et al., 2017).

اپی براسینواستروئیدها مقدار تجمع مالون دی‌آلدهید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را کاهش می‌دهند، زیرا این ترکیبات بر روی ترکیب اسیدهای چرب و نفوذپذیری غشاء اثر می‌گذارند و دارای آثار مثبتی بر تجمع مواد محلول هستند (Aghdam *et al.*, 2012). لذا در این تحقیق کاهش نشت الکترولیت و کاهش تجمع مالون-دی‌آلدئید در نتیجه تیمار اپی براسینواستروئید در شرایط تنش دمایی نشان دهنده کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و حفظ سلامت غشاء تحت تنش دمایی بالا است. از آثار اپی براسینواستروئیدها فعال کردن ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی است که با تولید آنزیم‌های محافظتی، مولکول‌های زیستی و سلول‌ها را در مقابل شرایط نامساعد محافظت می‌کنند.

نتایج پژوهش بروجردنیا و همکاران (۱۳۹۵) در تاثیر تنش خشکی بر لوبیا، نشان داد که تنش خشکی به صورت معنی‌داری منجر به افزایش نشت الکتریکی در مقایسه با شاهد می‌گردد. در شرایط تنش خشکی، اعمال تیمار اپی براسینواستروئید موجب کاهش مقدار نشت الکترولیت در مقایسه با تنش خشکی (بدون کاربرد اپی براسینواستروئید) شد. در واقع اپی براسینواستروئید با کاهش مقدار نشت الکترولیت به حفظ پایداری غشاء و در نتیجه افزایش تحمل گیاه به تنش کمک کرده است.

افزایش سطح مالون دی‌آلدهید، نشان دهنده آسیب به ساختار غشاء و آزاد شدن لیپیدهای آن است، از طرفی با وجود افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش، این لیپیدها پراکسید شده و مالون دی‌آلدهید تولید می‌گردد. وجود سیستم آنتی‌اکسیدانسی با کارایی بالا، منجر به کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد (Zafari *et al.*, 2012).

در این تحقیق اعمال تنش دمایی بالا موجب افزایش نشت الکترولیت و سطح مالون دی‌آلدهید گردید. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تنش دمایی (۲۴ ساعت)، نشت الکترولیت و محتوی مالون دی‌آلدهید را به مقدار



بیشتری در مقایسه با زمان کوتاه مدت (۶ ساعت) تنش افزایش داد. این افزایش در نشت الکترولیت و محتوی مالون دی‌آلدئید، احتمالاً نتیجه تخریب بیشتر ساختار غشاء و آسیب بیشتر به گیاه می‌باشد.

### ۴-۴-۳- پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی

نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که میزان پروتئین کل تحت تاثیر تنش های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌یابد. علت این افزایش در طی تنش، احتمالاً افزایش بیان برخی ژن‌ها از قبیل ژن‌های وابسته به متابولیسم اولیه، تنظیم اسمزی، تغییر ساختمان، رفع سمیت و همچنین افزایش بیان پروتئین‌های LEA می‌باشد (Jiang and Huang., 2002). در تحقیق حاضر تنش دمایی بالا موجب افزایش میزان پروتئین در مقایسه با شرایط دمایی نرمال گردید. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض دمایی بالا موجب افزایش میزان پروتئین در مقایسه با مدت زمان کوتاه تنش شد. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تیمار اپی‌براسینواستروئید (۲ ppm و ۵ ppm) در شرایط دمایی نرمال در هر دو توده موجب افزایش میزان پروتئین نسبت به شاهد شد. در شرایط تنش دمایی بالا، تیمار ۲ ppm در هر دو بازه زمانی ۶ و ۲۴ ساعت و در هر دو توده موجب افزایش میزان پروتئین برگ گردید. اپی‌براسینواستروئیدها باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های گوناگون می‌شوند. این ترکیبات در سطح مولکولی موجب تغییر بیان ژن، متابولیسم و بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شوند (Arfan et al., 2019). همچنین اپی‌براسینواستروئیدها تحمل گیاهان را در محدوده وسیعی از تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری، سرما و گرما افزایش می‌دهند و این افزایش عموماً به تولید و رونوشت ژن‌های ضد تنش از جمله پروتئین شوک گرمایی وابسته است، که نشان‌دهنده افزایش رونوشت ژن‌های مسئول پاسخ به تنش برای بالا بردن تحمل به تنش در درون گیاهان تیمار شده به وسیله اپی‌براسینواستروئید است (Arfan et al., 2019).

در گیاهان مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانتهی آنزیمی و غیر آنزیمی به‌منظور مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن وجود دارد (Alscher *et al.*, 2002; Munne-Bosch and Penuelas, 2003). از آنتی‌اکسیدانتهای غیرآنزیمی می‌توان به ترکیبات آب‌گریزی مانند توکوفرول و کارتنوئید و ترکیبات آب دوست مانند گلوتاتیون و اسید آسکوربیک اشاره کرد (Pinheiro *et al.*, 2004). همچنین مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و پراکسیداز هستند (Mittler, 2002 ; Hsu and Kao., 2003).

نتایج پژوهش زینالی و همکاران (۱۳۸۸) در گیاه سویا نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی از قبیل آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در اثر پیش تیمار سرمایی، منجر به افزایش مقاومت گیاه نسبت تنش سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد می‌گردد. قربانلی و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که تنش شوری موجب افزایش میزان آسکوربات در گیاه زیره در مقایسه با شاهد گردید. در یک پژوهش، مقدار آسکوربات پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش کم آبی کاهش یافت (دانشمند، ۱۳۹۳). در تحقیق حاضر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توده بشرویه در مدت زمان طولانی تنش دمای بالا در مقایسه با مدت زمان کوتاه تنش کاهش یافت. این در حالسیت که فعالیت آسکوربات پراکسیداز با گذشت زمان تنش از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری در توده همدان افزایش یافت. در مجموع کاربرد براسیتواستروئید منجر به افزایش، فعالیت آسکوربات پراکسیداز هم در شرایط نرمال و هم در شرایط تنش دمای بالا گردید. در حقیقت آپی براسینواستروئیدها از طریق تاثیر بر بیان ژن‌های مسئول کنترل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی، باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر خسارت اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش می‌شوند (Ramonell *et al.*, 2001 ; Goda *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2005; Choe *et al.*, 2006). خان و همکاران و (۲۰۱۹) نشان دادند که محتوی پرولین و

سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی در زمان به کارگیری اپی براسینواستروئید تحت شرایط استرس سرما و شرایط کنترل افزایش می‌یابد که این افزایش منجر به افزایش مقاومت گیاه می‌گردد.

تنش‌های محیطی منجر به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (Ashraf and Ali., 2008). تولید این ترکیبات، یکی از اولین واکنش‌های بیوشیمیایی سلول‌های یوکاریوتی نسبت به تنش‌ها محسوب می‌شود (Khanna and Devarshi., 2007). در شرایط نرمال، تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن در حالت تعادل است، اما با آغاز شرایط تنش‌زا، تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد (Gill and Tuteja., 2010). گونه‌های فعال اکسیژن برای موجودات بسیار سمی هستند و بر ساختار و عملکرد مولکول‌های زیستی تاثیر گذاشته و منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های حساس، تخریب کلروفیل، تخریب فعالیت پروتئین‌ها، لیپیدها، نوکلئیک اسیدها، روزه‌ها و غشاء می‌شوند (Nikolaeva *et al.*, 2010).

آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به دو شکل متفاوت انواع گونه‌های فعال اکسیژن را غیرفعال می‌کنند (Yuan and lin., 2008) و منجر به بهبود پایداری غشاء و ادامه فعالیت‌های زیستی گیاه می‌گردد. هر چه سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتهی گیاه کارا تر باشد، توان پاکسازی و در نتیجه مقاومت گیاه نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد (Janda *et al.*, 2005). نتایج پژوهش پیوندی و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌های گیاه گون در مرداد ماه نسبت به اردیبهشت ماه افزایش معنی‌داری دارد.

در تحقیق حاضر فعالیت کاتالاز در اثر تنش دمایی بالا نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش دمای بالا و با تیمار براسینواستروئید (سطح ۲ ppm) در هر دو توده نسبت به تیمار عدم کاربرد اپی براسینواستروئید به صورت معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش احتمالا به دلیل افزایش گونه‌های فعال

اکسیژن در شرایط تنش دمای بالا است، لذا در این شرایط گیاه به منظور مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن نیاز به افزایش فعالیت کاتالاز دارد. گیاهان به منظور حفاظت از غشاء سلولی و سایر اندام‌ها از خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو ناشی، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی قوی را در شرایط تنش توسعه می‌دهد (Maia *et al.*, 2010). نتایج پژوهش‌های متعدد نشان داد است که اپی‌براسینواستروئیدها از طریق تاثیر بر بیان ژن‌های مسئول کنترل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، منجر به افزایش مقاومت گیاهان در برابر خسارت ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش می‌شوند (Ramonell *et al.*, 2001 ; Goda *et al.*, 2002; Choe *et al.*, 2006).

افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعد از کاربرد اپی‌براسینواستروئید ممکن است به علت افزایش بیان ژن *det* اتفاق بی‌افتد، که باعث افزایش مقاومت گیاه به استرس‌های اکسیداتیو می‌گردد. وجود و کارکرد این ژن در آرابیدوپسیس در بافت‌هایی حاوی رادیکال‌های آزاد اثبات شده است (Kaya *et al.*, 2019).

گایاکول پراکسیدازها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در فرآیندهایی از قبیل نمو، سنتز لیگنین، بیوسنتز اتیلن، دفاع و بهبود زخم‌ها در سلول نقش دارند (Verma and Dubey., 2003). دانشمند (۱۳۹۳) نشان داد که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اثر تنش کم آبی در گیاه گوجه‌فرنگی افزایش می‌یابد. در این پژوهش، اعمال تنش دمای بالا به صورت معنی‌داری موجب افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز در هر دو توده و هر دو بازه زمانی در مقایسه با شرایط دمایی نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) گردید. قرار گرفتن طولانی مدت (۲۴ ساعت) در معرض تنش دمای بالا در هر دو توده نسبت به تنش کوتاه مدت (۶ ساعت) موجب افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز گردید، اگر چه این اختلاف معنی‌دار نبود. درحقیقت اپی‌براسینواستروئیدها از طریق تنظیم فعالیت ژن‌های

دفاعی، در رشد و نمو طبیعی گیاه و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی ایفای نقش می‌کنند. علاوه بر این به طور تجربی ثابت شده که اپی‌براسینواستروئید، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان همچون سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش می‌دهد (Khan *et al.*, 2019).

Arfan و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که کاربرد اپی‌براسینواستروئید و براسینولوئید (بازدارنده سنتز اپی‌براسینواستروئید) تحت شرایط استرس دمایی پایین در آرابیدوپسیس به ترتیب منجر به افزایش و کاهش محتوی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پلی‌فنول اکسیداز و اسکوربات پراکسیداز گردید. همچنین مالون‌دی‌آلدهید به ترتیب افزایش و کاهش یافت. نتایج آنها نشان داد که کاربرد اپی‌براسینواستروئید منجر به افزایش  $H_2O_2$  و متعاقباً افزایش مقادیر NO می‌گردد. افزایش  $H_2O_2$  و متعاقباً افزایش NO باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی گیاه می‌شوند (آنتی‌اکسیدانت‌ها) و در نهایت مقاومت گیاه افزایش می‌یابد.

#### ۴-۴-۴-ژن‌های دخیل در مسیر سنتز دایوسجنین

سیکلوآرتنول سنتاز، با تغییر سیکلوآرتنول، ساختارهای استرولی را از قبیل استیگماسترول، سیتواسترول یا کامپسترول را تولید می‌کند. در حقیقت ژن *CAS*، ۳ و ۲-اکسیدواسکوالن را به سیکلوآرتنول تبدیل می‌کند، که این ترکیب سوبسترای مورد نیاز در مسیر تبدیل به فیتواسترول‌ها و دیگر استرول‌های گیاهی محسوب می‌گردد. در یک بررسی اثر تنش خشکی بر بیان ژن *CAS* را در مراحل مختلف رشد بر روی شیرین بیان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن *CAS* در تنش خشکی تغییر نکرد (Nasrollahi *et al.*, 2014). در تحقیق حاضر بیان ژن *CAS* در شرایط تنش دمایی بالا و در مخصوص در مدت زمان طولانی افزایش یافت. همچنین

اعمال تیمار اپی براسینواستروئید در شرایط تنش دمای بالا و هم در کوتاه مدت و هم در بلند مدت موجب (در هر دو توده) افزایش بیان معنی‌دار ژن مذکور در مقایسه با شاهد (شرایط نرمال) گردید. با توجه به شکل‌های (۴-۲۱ و ۴-۲۲)، عکس‌العمل ژن CAS در هر دو توده در شرایط تنش دمای بالا و همراه کاربرد اپی براسینواستروئید مشابه بود. با توجه به اینکه این دو توده از نظر محتوی دایوسجنین متفاوت می‌باشند، احتمالاً این ژن یک ژن محدود کننده در این مسیر نیست. در یک تحقیق، که بر روی گیاه یام انجام شد، بیان ژن CAS با کاربرد سطوح مختلف اتفن کاهش یافت (Diarra et al., 2013). با توجه به اینکه در این تحقیق بیان این ژن در توده همدان (با محتوی کم دایوسجنین)، در زمان اعمال تیمار دمای بالا و کاربرد سطح ۲ ppm به میزان ۲۷ برابر افزایش یافت، به نظر می‌رسد که می‌توان از این محرک‌ها به منظور افزایش محتوی دایوسجنین در این توده استفاده کرد.

ژن اسکوالن سنتاز نقش مهمی در تنظیم کانال کربن در متابولیت اولیه و ثانویه دارد. نقش تنظیمی این ژن در بیوسنتز استرول در گیاهان، مخمرها و جانوران و همچنین نقش آن در بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترین‌ها به اثبات رسیده است. اسکوالن سنتاز اولین مرحله آنزیمی مسیر ایزوپرنوئیدها را در بیوسنتز استرول و تری‌ترین‌ها کاتالیز می‌کند. نتایج تحقیق Diarra و همکاران نشان داد که بیان ژن CAS و SQS با کاربرد سطوح مختلف اتفن به ترتیب کاهش و افزایش یافت (Diarra et al., 2013). نتایج تحقیق حاضر با نتیجه پژوهش Diarra و همکاران در هر دو ژن متناقض بود، این تناقض احتمالاً به علت پاسخ متفاوت دو گیاه شنبلیله و یام به اتفن و براسینواستروئید می‌باشد. همچنین این تناقض ممکن است به علت پاسخ متفاوت هر یک از ژن‌های موجود در مسیر بیوسنتز دایوسجنین باشد. همان‌طور که ذکر گردید این مسیر دارای پیچیدگی‌های زیادی است (et al., 2019, Mohammadi)، بنابراین لزوم تحقیقات بیشتر در مورد شناسایی ابهامات این مسیر و شناسایی محرک‌های مناسب به منظور افزایش بیان این ژن‌ها و متعاقباً افزایش محتوی دایوسجنین را می‌طلبد. در یک

مطالعه، بیان ژن *SQS* تحت تیمار تنش خشکی مراحل مختلف رشد در گیاه شیرین بیان افزایش یافت (Nasrollahi *et al*; 2014). در پژوهش حاضر در شرایط نرمال دمایی، اعمال تیمار اپی براسینواستروئید در تمامی غلظت‌ها موجب کاهش شدید بیان ژن *SQS* در (در توده بشرویه) مقایسه با شاهد شد. در مجموع بیان این ژن تحت تاثیر تیمارهای دمایی و غلظت‌های مختلف اپی براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت. این نتیجه نشان می‌دهد که احتمالاً این ژن در هر دو توده کاندید مناسبی به‌منظور افزایش محتوی دایوسجنین نمی‌باشد (شکل‌های ۴-۳۳ و ۴-۳۴).

ژن اسکوالن اپوکسیداز، اولین مرحله اکسیژناسیون را در مسیر بیوسنتز استرول‌ها با اکسیده کردن مولکول اسکوالن انجام می‌دهد. آنزیم اسکوالن اپوکسیداز با کسیده کردن اسکوالن منجر به تشکیل ۳و۲ اکسیدواسکوالن می‌گردد. در یک مطالعه‌ای با بیش بیان دو ژن اسکوالن اپوکسیداز *PgSEP1* و *PgSEP2* در گل و ریشه گیاه *Panax ginseng* و همچنین خاموش کردن این ژن‌ها با استفاده از تکنیک RNAi به این نتیجه رسیدند که *PgSEP1* دارای نقش تنظیمی در بیوسنتز تری‌ترین‌ها است، درحالی‌که ژن *PgSEP2* در مسیر بیوسنتز فیتواسترول‌ها مؤثر است (Han *et al.*, 2010). بیان این ژن در اثر تیمار با تنش دمایی بالا افزایش یافت، اما این افزایش فقط در اثر مدت زمان طولانی تنش دمایی مشاهده گردید. اعمال تیمار اپی براسینواستروئید در شرایط نرمال دمایی موجب کاهش بیان این ژن (در هر دو توده) در مقایسه با شاهد شد. در شرایط تنش دمایی بالا، تیمار ۲ ppm و ۵ ppm (در زمان ۲۴ ساعت) اپی براسینواستروئید موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز نسبت به شرایط نرمال گردید. عکس‌العمل هر دو توده نسبت به تنش دمایی بالا و سطوح مختلف اپی براسینواستروئید در این ژن تقزیا مشابه بود. بیان این ژن در توده همدان در تیمار دمایی بالا و ۲ ppm اپی براسینواستروئید بیش از ۲۰ برابر افزایش یافت، که نشان‌دهنده این موضوع است که این ترکیب تیمار احتمالاً به‌منظور افزایش محتوی دایوسجنین در توده همدان مفید است (شکل‌های ۴-۲۷ و ۴-۲۸).

در گیاهان سیکلوآرتنول ترکیب آغازی برای شروع بیوسنتز استرول‌هاست، که سوبسترای C24-methyltransferase هم می‌باشد، اگر چه برخی بی‌نظمی‌ها میان اختصاصیت سوبسترا در میان *SMT*‌ها وجود دارد (Diener *et al.*, 2000). اخیراً یک مسیر ثانویه که لانسترول را بجای سیکلوآرتنول در مراحل اولیه استفاده می‌کند، شناسایی شده است. این مسیر شاخه کوچکی است، که تخمین زده می‌شود کمتر از ۱/۵ درصد از کل سیتواسترول را تشکیل دهد (Ohyama *et al.*, 2009). مسیر استرول به دو بخش مجزا تبدیل می‌شود: اولاً استات به وسیله چند مرحله در مسیر مولونات به اپوکسی اسکوالن و دوماً در مرحله دیگری از بیوسنتز استرول، اپوکسی اسکوالن به سیکلوآرتنول تبدیل می‌شود، که در نهایت به محصولات دیگری از استرول‌ها تبدیل می‌گردد. عقیده بر این است که متیلاسیون C24 سیکلوآرتنول یک جایگاه اصلی تنظیمی در بیوسنتز استرول‌هاست (Nes *et al.*, 1999). تبدیل سیکلوآرتنول به ۲۴-متیلن سیکلوآرتنول عمدتاً به وسیله یک نوع استرول C24-methyltransferase وابسته به *SMT1* (S-adenosyl-Met 1) صورت می‌گیرد (Schaeffer *et al.*, 2001). C24-methyltransferase یک گروه متیل را به سیکلوآرتنول اضافه می‌کند و همچنین می‌تواند مرحله دوم متیلاسیون یعنی تبدیل ۲۴-متیلن لوفنول به ۲۴-اتیلیدن لوفنول البته با کارایی پایین‌تر را نیز کاتالیز کند (Benveniste P., 1986). در تحقیق حاضر بیان ژن *SMT* در شرایط تنش دمای بالا نسبت به شرایط نرمال دمایی افزایش یافت و این افزایش در مدت زمان طولانی تنش نسبت به مدت زمان کوتاه بیشتر بود. اعمال تیمار اپی براسینواستروئید در شرایط دمایی نرمال موجب کاهش بیان ژن مذکور گردید. در شرایط تنش دمای بالا، تیمار ۲ ppm اپی براسینواستروئید بیان ژن *SMT* را در هر دو توده و به صورت معنی‌داری افزایش داد. با توجه به اینکه بیان این ژن در توده بشرویه در سطح ۲ ppm اپی براسینواستروئید و مدت زمان ۲۴ ساعت به میزان ۱۷ برابر افزایش یافت، بنابراین احتمالاً می‌توان از این ترکیب تیماری به عنوان یک محرک مناسب برای افزایش محتوی دایوسجنین استفاده کرد (شکل‌های ۴-۳۰ و ۴-۳۱).



مسیر دایوسجنین در شنبلیله در ابتدا با Acetyl-CoA شروع می‌شود و اسکوالن از طریق مسیر موالونات سنتز می‌گردد. سپس، بیوسنتز کلسترول از ۳ و ۲ اکسیدواسکولن شروع و تا سیکلوآرتنول ادامه می‌یابد. پس از این مرحله سیکلوآرتنول به عنوان سوبسترا برای دو ژن  $\Delta 24$ -reductase و C24-methyltransferase مورد استفاده قرار می‌گیرد. C24-methyltransferase با متیله کربن کربن ۲۴، مسیر را به سمت تولید فیتواسترول‌ها پیش می‌برد و در مقابل ژن  $\Delta 24$ -reductase که به عنوان آنزیم کلیدی و تعیین کننده مسیر شناخته شده است، با شکستن پیوند دو گانه مسیر را به سمت سنتز کلسترول هدایت می‌کند (Sonawane et al., 2017). در یک پژوهش سوناوانه و همکاران (۲۰۱۷) با تراریخت کردن گیاه آرابیدوپسیس و افزایش بیان ۱۱ ژن از جمله ژن SSR2 ( $\Delta 24$ -reductase)، افزایش ۱۵ برابری در میزان کلسترول را گزارش کردند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان این ژن در توده بوشرویه با اعمال تیمار دمایی بالا و سطوح براسینواسنروئید کاهش و در توده همدان نسبت به تیمار نرمال افزایش یافت. این تغییر رفتار در بیان ژن در دو توده متفاوت تحت تاثیر دمای بالا و سطوح مختلف اپی براسینواستروئید احتمالاً نشان‌دهنده این موضوع است که این ژن یک عامل محدودکننده در مسیر بیوسنتز دایوسجنین است. در توده بوشرویه با توجه به بالا بودن محتوی دایوسجنین، افزایشی در میزان بیان این ژن با کاربرد تیمارهای مختلف حاصل نشد، در حالی که با توجه به پایین بودن محتوی دایوسجنین در توده همدان نیاز به افزایش بیان در این ژن توسط این توده احساس شده است و گیاه بیان این ژن را افزایش داده است (نسبت به دمای نرمال و بدون کاربرد براسینواستروئید). کاهش سطوح کلسترول و عملکرد آن‌ها در دو گیاه سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی با خاموش کردن ژن ( $\Delta 24$ -reductase)

SSR2 با کمک روش RNAi و TALEN از این فرضیه که  $\Delta 24$ -reductase به عنوان آنزیم کلیدی در بیوستنز آنهاست، حمایت کرد (Sawai *et al.*, 2014) (شکل‌های ۴-۲۴ و ۴-۲۵).

## ۴-۵- نتیجه‌گیری کلی

ارزش متابولیت‌های ثانویه در درمان بیماری‌ها غیر قابل انکار است. بیشتر از متابولیت‌ها از گیاهان استخراج می‌شوند. دایوسجینین عموماً از غده‌های گیاه یام استخراج می‌شود، اگرچه استخراج آن از ریشه گیاه یام به علت بالا بودن نشاسته دشوار و گرانبه است. در ضمن طول مدت رشد این گیاه دو سال بطول می‌انجامد (Diarra *et al.*, 2013). درحالی‌که این متابولیت در گیاه شنبلیله نیز به فراوانی یافت می‌شود. با افزایش این متابولیت در شنبلیله، این گیاه می‌تواند جایگزینی برای گیاه یام باشد، چرا که طول دوره‌ی رشد آن دو الی سه ماه می‌باشد و با اکثر اقلیم‌ها نیز سازگار است. گیاهان مخصوصاً گیاهان دارویی با انتقال از محیط زندگی خود (محیط بومی) به محیط زراعی تحت تاثیر قرار گرفته و میزان متابولیت ثانویه در آنها کاهش می‌یابد. لذا با توجه به اهمیت دایوسجینین در شنبلیله به عنوان یک متابولیت ارزشمند، استفاده از محرک‌های مختلف به منظور افزایش بیان ژن‌های مسیر دایوسجینین و متعاقباً محتوی دایوسجینین ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق به منظور مطالعه الگوی بیان ژن‌های مرتبط با دایوسجینین و کاربرد دو محرک مناسب از تیمار دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد در مقابل ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و سطوح مختلف براسینواستروئید در دو زمان برداشت مختلف (۶ و ۳۴ ساعت) استفاده شد. در ضمن به منظور درک بهتر عکس‌العمل این ژن‌ها نسبت به این تیمارها از دو توده متفاوت همدان (با دایوسجینین کم) و بوشرویه (با دایوسجینین زیاد) استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که این ژن‌ها

در دو توده دارای عکس العمل‌های متفاوتی نسبت به تیمار دمای بالا و سطوح مختلف براسینواستروئید و همچنین ترکیب این تیمارها هستند. الگوی بیان ژن *CAS* در هر دو توده مشابه بود و تیمار دمای بالا و سطح هورمونی ۲ ppm به خوبی بیان این ژن را نسبت به تیمار نرمال افزایش داد. الگوی بیان ژن *SSR* در تیمار دمای بالا و کاربرد سطوح مختلف براسینواستروئید در دو توده متفاوت بود، طوری که بیان این ژن در توده همودان در سطح ۲ ppm افزایش یافت. این نتیجه نشان می‌دهد که احتمالاً این ژن یکی از ژن‌های متفاوت در مسیر بیوستنز دایوسجنین در این دو توده می‌باشد. بیان ژن *SEP* نیز در دو توده مشابه ژن *CAS* تا حدودی شبیه بود، اگرچه افزایش بیان این ژن در توده همدان بسیار بالاتر از توده بوشرویه بود، بنابراین می‌توان از این ژن به منظور افزایش محتوی دایوسجنین در توده همدان تحت تیمار ترکیبی دمای بالا و براسینواستروئید استفاده کرد. الگوی بیان ژن *SMT* نیز در هر دو توده تقریباً مشابه بود با این تفاوت که بیان این ژن در توده بوشرویه در زمان اعمال تنش دمای بالا و سطح ۲ ppm براسینواستروئید تقریباً ۱۷ برابر افزایش یافت و می‌توان از این ژن به عنوان یک کاندید مناسب به منظور افزایش محتوی دایوسجنین استفاده کرد. بیان ژن *SQS* در هر دو توده با کاربرد تیمار دمای بالا و سطوح مختلف براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت، این موضوع بدین معنی است که این ژن احتمالاً کاندید مناسبی برای افزایش محتوی دایوسجنین نمی‌باشد.

در بخش دیگری از این تحقیق اثر براسینواستروئید بر برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی شنبلیله بررسی گردید. نتایج نشان داد که کاربرد براسینواستروئید به صورت محلول‌پاشی (۲ و ۵ ppm) تا حدود زیادی توانست از پراکسیداسیون اسیدهای چرب جلوگیری به عمل آورد و در نتیجه منجر به کاهش میزان نشت الکترولیت و محتوی مالون‌دی‌آلدهید گردید. وقایع فوق منجر به افزایش مقاومت شنبلیله به تنش گرما شد. کاربرد

براسینواستروئید به صورت محلول پاشی (۵۲ ppm) از طریق تحریک سیستم دفاعی گیاه منجر به افزایش فعالیت ژن‌های دفاعی و افزایش محتوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی از قبیل آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز گردید. نتایج تحقیقات نشان داده است که کاربرد براسینواستروئید منجر به افزایش  $H_2O_2$  می‌گردد، که این افزایش منجر به افزایش مقادیر NO خواهد شد. افزایش  $H_2O_2$  و متعاقباً NO منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی گیاه می‌شوند (آنتی‌اکسیدانت‌ها) و در نهایت مقاومت گیاه افزایش می‌یابد. اگر چه مشخص شده است که  $H_2O_2$  و NO در استرس‌های محیطی افزایش می‌یابند و مطالعات متعدد ارتباط آنها را با اپی‌براسینواستروئید به اثبات رسانده است اما چگونگی این ارتباط تا حدود زیادی نامشخص باقی مانده است.

#### ۴-۶- پیشنهادات:

- ۱- بررسی واکنش گیاه شنبلیله نسبت سایر تنش‌های غیر زیستی همراه با کاربرد اپی براسینواستروئید
- ۲- اندازه‌گیری محتوی دایوسجنین از طریق HPLC
- ۳- کاربرد سایر الیسیتورهای از قبیل متیل جاسمونات‌ها و سالیسیلیک اسید.

## ۵- منابع

۱. احمدی، م. میرحاجی، ه. (۱۳۹۱). ارزیابی تاثیرات تنش‌های گرمایی در کشت ذرت. علوم محیطی، سال نهم، شماره سوم، ص ۱۱۹-۱۲۸.
۲. اسمعیل زاده به‌آبادی، ص. رضایی‌نوده‌ی، آ. (۱۳۹۳). افزایش تولید تریگونلین تحت تاثیر سالیسیلیک اسید در کشت سلولی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*). مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی). جلد ۵، شماره ۲، ۱۷۲-۱۶۵.
۳. امیدبگی، ر. (۱۳۹۲). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم، چاپ هفتم، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد.
۴. امینی، ز. و حداد، ر. (۱۳۹۲). نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۶ (۳): ۲۶۵-۲۵۱.
۵. بروجرندیا مریم، بی همتا محمدرضا، عالمی سعید خلیل، عبدوسی وحید (۱۳۹۵). اثر تنش خشکی بر میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، نش‌الکترولیت‌ها و محتوای آب نسبی لوبیا (*Phaseolus vulgaris L.*)
۶. بیگناه ر، رضوانی‌مقدم پ و جهان م، (۱۳۹۳). تأثیر کشت مخلوط بر عملکرد بیولوژیک، درصد نیتروژن و خصوصیات مورفولوژیک گشنیز (*Coriandrum sativum L.*) و شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum L.*). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، ۱۲ (۳): ۳۶۹-۳۷۷.
۷. پیوندی مریم، جانجانی نیره، اربابیان صدیقه. (۱۳۹۵). تاثیر تنش دما بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ساختمان تشریحی گیاه گون گچی (*Astragalus fridae Rech. f.*) در منطقه شمال غرب سمنان (روستای افتر).
۸. پرتقوی، مهدی و ایمان‌خان، نیلوفر (۱۳۸۴). "ارزیابی متغیرهای کلان اقتصادی بر صادرات گیاهان دارویی ایران". فصل‌نامه علمی تخصصی مدیریت، سال دوم، شماره ۵.
۹. جعفرزاده، ل. امیددی، ح. و جعفری، ن. (۱۳۹۳). بررسی اثر تنش خشکی بر جوانه زنی، رشد، مقدار اسانس و پرولین گیاه دارویی همیشه بهار. چهارمین کنفرانس بین‌المللی بیولوژی ۱۲-۱۶ اردیبهشت. همدان.
۱۰. ZI حبیبی‌خانینانی، بهنام، معینی‌عبدالهی. (۱۳۸۴). تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول‌های گیاهی. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی ۶-۱، ۱۴ (۲).
۱۱. حسن‌زاده ا. رضازاده‌ش. ع. شمس‌س. ف. دولت‌آبادی ر. و زرین‌قلم ج. (۱۳۸۹). مروری بر خواص درمانی و فیتوشیمیایی شنبلیله (*fenugreek*). فصل‌نامه گیاهان دارویی. شماره ۳۴. صفحات ۱ تا ۱۷.
۱۲. حسینی، س. س. نیاکان، م. قربانلی، م. (۱۳۹۴). بررسی تأثیر اپی‌براسینواستروئید بر مورفولوژی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین گیاه بادمجان (*Solanum melongena L.*) در سطوح مختلف خشکی. همایش بین‌المللی پژوهش‌های کاربردی در کشاورزی.
۱۳. دلنواز هاشملویبیان، ب. و عطایی‌عظیمی، ع. (۱۳۸۶). خواص دارویی و خوراکی گیاهان. موسسه انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه.

۱۴. زارع زاده ع. میکروکیلی س.م. و عربزاده، ر. (۱۳۸۶). بررسی فنولوژیکی و سازگاری گیاهان دارویی کشت شده در کلکسیون استان یزد. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی معطر ایران. جلد ۲۱. صفحات ۲۲۱ تا ۲۱۱.
۱۵. زارعی، م. عزیزی، م. راحمی، م. تهرانی‌فر، ع. (۱۳۹۵). ارزیابی تحمل به شوری سه رقم انجیر بر اساس ویژگی‌های رشدی، فیزیولوژیکی و توزیع یون‌ها در گیاه. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. جلد ۱۷. شماره ۲. ص ۲۴۷ تا ۲۶۰.
۱۶. زینالی یادگاری لیلا، حیدری رضا، کاراپتیان ژیرایر. (۱۳۸۸). تغییر نفوذپذیری غشاهای زیستی و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی گیاه سویا در پاسخ به دمای پایین.
۱۷. دانشمند، ف. (۱۳۹۳). پاسخ سیستم دفاع آنتی اکسیدان گیاه گوجه فرنگی به تنش کم آبی و برهم کنش آن با آسکوربیک اسید، زیست شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره نوزدهم، ص ۵۷-۷۲.
۱۸. ستایش‌مهر، ز. گنجعلی، ع. (۱۳۹۲). بررسی آثار تنش خشکی بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه شوید (*Anethum graveolens L.*). نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی). جلد ۲۷، شماره ۱۱، ص ۳۵-۲۷. شایا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸.
۱۹. سرتیپ، ح. سیروس‌مهر، ع. (۱۳۹۶). ارزیابی آثار مصرف اسید سالیسیلیک بر رشد، عملکرد و برخی خصوصیات بیوشیمیایی زیره سبز (*Cuminum cyminum L.*) تحت سه رژیم آبیاری مختلف. تنش‌های محیطی در علوم زارعی. جلد دهم. شماره چهارم. ۵۴۷-۵۵۸.
۲۰. سلطانی پور، م. (۱۳۸۴). گیاهان دارویی منطقه حفاظت شده و پژوهش وسازندگی. ۱۸(۳):۳۷-۲۷.
۲۱. ضیایی، ع.، عسگرپور، ب. شبستری، الف. و فرسام، ح. (۱۳۸۴). احتیاط مصرف و تداخلات دارویی براساس شواهد و مستندات. چاپ اول. انتشارات تیمورزاده- نشر طبیب.
۲۲. عازمی، م. دهستانی، م. (۱۳۹۶). مروری بر آثار تنش بخصوص خشکی در گیاهان و نقش اسمولیت‌ها وهورمون‌های خارجی در افزایش مقاومت به تنش در گیاهان مختلف.
۲۳. عباسی، ع. رحمانی، م و وفایی، ی. (۱۳۹۰). بیوشیمی گیاهی (تالیف Haldet) چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران، ۷۸۶ ص.
۲۴. فتاحی، م و ب، فتاحی، (۱۳۹۲). مبانی گیاهان دارویی، چاپ اول، تهران: انتشارات جهاد دانشگاهی تهران.
۲۵. فتاحی، م، فتاحی، ب، مبانی گیاهان دارویی (۱۳۸۹)، چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد تهران، ۴۸۲ ص.
۲۶. فتحی‌رضایی، پ. راکعی، ا. (۱۳۹۶). بررسی اثر ساکارز بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها و چندین پارامتر بیوشیمیایی گیاه تاتوره (*Datura stramonium*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۳۰، شماره ۴.
۲۷. قاسمی پیربلوطی ع. (۱۳۸۸). گیاهان دارویی و معطر، بررسی و شناخت آثار آنها. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد. ۵۱۱ صفحه.
۲۸. قاسمی پیربلوطی ع. (۱۳۸۸). گیاهان دارویی و معطر (شناخت و آثار آنها). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۶۰ صفحه.
۲۹. قاسمی، م و همکاران. (۱۳۹۱). بررسی اثر سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر روی صفات رویشی بابونه آلمانی در شرایط تنش گرما، سومین همایش علوم کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا.

۳۰. قربانلی، م. احمدی، ف. منفرد، ا. بخشی‌خانیکی، غ. (۱۳۹۱). اثر تنش شوری و برهم کنش آن با آسکوربات بر میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پرولین و مالون‌دی‌آلدهید در گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum L*) چهار هفته بعد از جوانه زنی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۲۷-۱۴.
۳۱. کافی، م. زند، ا. مهدوی‌دامغانی، ع. عباسی، ف. (۱۳۸۸). فیزیولوژی گیاهی ۱ (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۶۷۶ صفحه.
۳۲. کشفی‌بناب، ع.ر. (۱۳۹۲). مزیت نسبی اقتصادی کشت و تجارت گیاهان دارویی در ایران و ارزش آن در بازارهای جهانی. بررسی‌های بازرگانی، شماره ۴.
۳۳. گلشادی، الف.، ر.، عسگری، ص.، صراف زادگان. و بشتام، م. (۱۳۸۱). اعتقاد و عملکرد نسبت به داروهای گیاهی در مردم شهر اصفهان، فصل‌نامه گیاهان دارویی، ۲: ۲۸-۲۱.
۳۴. مرادی، پ. حسندخت، م. ر. کاشی، ع. (۱۳۸۹). تنوع ژنتیکی در برخی صفات توده های بومی شنبليله ایرانی. مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی و علفهای هرز، سال چهارم، شماره ۱۶، صفحه ۷۰-۵۵.
۳۵. منتظری ف. امیدی م. و ایمانی ن. (۱۳۸۸). مقایسه روش‌های کشت بذر و جنین و بررسی اثر زغال فعال در بهینه سازی کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa Bioss*). فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۶. صفحات ۵۱۱ تا ۵۹۵.
۳۶. موحدی دهنوی، م.، مدرس ثانوی، س.ع. م.، سروش‌زاده، ع. و جلالی جواران، م. (۱۳۸۳). تغییرات میزان پرولین، قندهای محلول کل، کلروفیل و فلورسانس کلروفیل در ارقام گلرنگ پاییزه تحت تنش خشکی و محلول پاشی روی و منگنز. مجله بیابان. ۹ (۱): ۱۰۸-۹۴.
۳۷. مهرآفرین، ع. نقدی‌بادی، ح. قادری، ا. لبافی، ا. زند، ا. نورمحمدی، ق. قوامی، ن. سیف‌سهندی، م. (۱۳۹۴). تغییرات عملکرد دانه و موسیلاژ شنبليله در پاسخ به محلول پاشی متانول به عنوان یک محرک زیستی. فصل‌نامه گیاهان دارویی. سال چهاردهم، دوره دوم، ۵۴.
۳۸. میر محمدی میبیدی، س.ع.، قره‌یاضی، ب. (۱۳۸۱). جنبه های فیزیولوژیک و به‌نژادی تنش شوری گیاهان. مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان. ۲۷۸ ص.
۳۹. ناصری، م. (۱۳۸۳). ضرورت احیای طب سنتی ایران، نشریه تخصصی سنتی و مکمل درمانگر، ۲.
۴۰. نقی‌زاده، م. کبیری، ر. (۱۳۹۵). اثر برگ‌پاشی با سالیسیلیک اسید بر برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی ذرت (*Zea mays L*) در شرایط تنش خشکی. تنش‌های محیطی در علوم زارعی. جلد نهم. شماره چهارم. ۳۱۵-۳۲۷.
۴۱. نوبخت، پ. عبادی، ع. پرمون، ق. نیکخواه‌بهرامی، ر. (۱۳۹۴). تاثیر هیدروژن پراکسید بر فلورسانس رنگدانه‌های فتوسنتزی، ماده خشک و برخی متابولیت ثانویه نعنای فلفلی در شرایط تنش کم آبی. انجمن توسعه و ترویج علوم و فنون بنیادین.



43. Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press.
44. Afzal, A., Gulzar, I., Shahbaz, M., & Ashraf, M. (2014). Water deficit-induced regulation of growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, inorganic nutrient accumulation and antioxidative defense mechanism in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.
45. Aghdam, R. M., Najarian, S., Shakhesi, S., Khanlari, S., Shaabani, K., & Sharifi, S. (2012). Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(1), 123-131.
46. Ahmad A, Alghamdi SS, Mahmood K, Afzal M.(2016). Fenugreek a multipurpose crop: Potentialities and improvements. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23:300-310.
47. Ahmad, F., S.N. Acharya, and Z. Mir. (1999). Localization and activity of rRNA genes on fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) chromosomes by fluorescent in situ hybridization and silver staining. *Theor. App. Genet.* 98: 179-185.
48. Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
49. Antoniou, P. F., Attikis, A., Constantinou, M. G., Costa, M. E., Hadjiyiannakou, K. A., Konstantinou, G. N., ... & Tsokkou, D. (2017). Controlling electron and exciton transfer paths in molecular systems.
50. Arfan, M., Zhang, D. W., Zou, L. J., Luo, S. S., Tan, W. R., Zhu, T., & Lin, H. H. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide crosstalk mediates brassinosteroids induced cold stress tolerance in *Medicago truncatula*. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 144.
51. Arnon, D. I. (1967). Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. *Physiological reviews*, 47(3), 317-358.
52. Arora, P., Bhardwaj, R. & Kanwar, M. K. (2010). 24-Epibrassinolide induced antioxidative defense system of *Brassica juncea* L. under Zn metal stress. *Physiology & Molecular Biology of Plants*, 16: 285–293.
53. Ashraf, M. and Q. Ali. (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany* 63: 266–273.
54. Bach, T. J., & Rohmer, M. (Eds.). (2012). *Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: New concepts and experimental approaches*. Springer Science & Business Media.
55. Banerjee, S., An, S., Zhou, A., Silverman, R. H., & Makino, S. (2000). RNase L-independent specific 28S rRNA cleavage in murine coronavirus-infected cells. *Journal of virology*, 74(19), 8793-8802.
56. Bellard, C., C. Bertelsmeier, P. Leadley, W. Thuiller and F. Courchamp. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecol. Letter.* 15(4): 365-377.
57. Benveniste, P. (1986). Sterol biosynthesis. *Annual review of plant physiology*, 37(1): 275-308.
58. Bindi, M. and J. E. Olesen. (2011). The responses of agriculture in Europe to climate change. *Region. Environ. Change.* 11(1): 151-158.
59. Blum, A., Mayer, J., & Gozlan, G. (1982). Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat. *Field Crops Research*, 5, 137-146.
60. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
61. Boucher, J. M., Barbillon, E., & Cliquet, F. (1999). Borna disease: a possible emerging zoonosis.
62. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
63. Bruce, W. B., Edmeades, G. O., & Barker, T. C. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 13-25.
64. Buchner, O., M. Stoll, M. Karadar, L. Kranner and G. Neuner. (2015). Application of heat stress in situ demonstrates a protective role of irradiation on photosynthetic performance in alpine plants. *Plant Cell Environ.* 38(4): 812-826.

65. Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.
66. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601..
67. Caldana, C., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., & Ruzicic, S. (2007). A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods*, 3(1), 7.
68. Cao, S., Xu, Q., Cao, Y., Qian, K., An, K., Zhu, Y., ... & Kuai, B. (2005). Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum*, 123(1), 57-66.
69. Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2012). Antifungal properties of bioactive compounds from plants. In *Fungicides for plant and animal diseases*. IntechOpen.
70. Chaudhary, S., Chikara, S.K., Sharma, M.C., Chaudhary, A., Alam Syed, B., Chaudhary, P.S., Mehta, A., Patel, M., Ghosh, A. and Iriti, M. (2015). Elicitation of Diosgenin Production in *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seedlings by Methyl Jasmonate. *International journal of molecular sciences*, 16(12): 29889-29899.
71. Chen Chen, X., Kanokporn, T., Zeng, Q., Wilkins, T. A., & Wood, A. J. (2002). Characterization of the V-type H (+)-ATPase in the resurrection plant *Tortula ruralis*: accumulation and polysomal recruitment of the proteolipid c subunit in response to salt-stress. *Journal of experimental botany*, 53(367), 225-232.
72. Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186.
73. Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M., & Tyrka, M. (2017). Next-generation sequencing of representational difference analysis products for identification of genes involved in diosgenin biosynthesis in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *Planta*, 245(5), 977-991.
74. Clouse, S. D. (1999). Molecular genetics of brassinosteroid action. *Brassinosteroid: Steroidal Plant Hormones*, 163-190.
75. DesMarais, D. L., K. M. Hernandez and T. E. Juenger. (2013). Genotype-by-environment interaction and plasticity: exploring genomic responses of plants to the abiotic environ. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44: 5-29.
76. Diarra, S. T., He, J., Wang, J., & Li, J. (2013). Ethylene treatment improves diosgenin accumulation in in vitro cultures of *Dioscorea zingiberensis* via up-regulation of CAS and HMGR gene expression. *Electronic journal of biotechnology*, 16(5), 6-6.
77. Diener, A. C., Li, H., Zhou, W. X., Whoriskey, W. J., Nes, W. D., & Fink, G. R. (2000). Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *The Plant Cell*, 12(6), 853-870.
78. Dierig, D. A., Grieve, C. M., & Shannon, M. C. (2003). Selection for salt tolerance in *Lesquerella fendleri* (Gray) S. Wats. *Industrial Crops and Products*, 17(1), 15-22.
79. Dini, M. (2006). Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine. *Forest and Rangeland Research Institute Publication, Iran*, 299-300.
80. Dionisio-Sese, M. L., & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1), 1-9.
81. Edreva, A. (2005). The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(2-3), 135-146.
82. Edwards, P. A., & Ericsson, J. (1999). Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 157-185.
83. Falsetto, S. (2009). Medicinal properties of aromatic plant families. Therapeutic properties in the same scented plant family. Available on Internet at:[http://medicinal.plants.suite101.com/article.cfm/medicinal\\_properties\\_of\\_aromatic\\_plant\\_families](http://medicinal.plants.suite101.com/article.cfm/medicinal_properties_of_aromatic_plant_families).
84. Feng, C. G, Zhang , L. X. and Liu, X. (2005). Progress in research of aldose reductase inhibitor in traditional medicinal herbs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 30: 1496 - 1500 (In Chinensis).
85. Foyer, C.H. Leadis, M. and Kunert, K.J. (1994). Photo oxidative stress in plants. *Plant physiology*, 92: 696-717.

86. Fujii, K. and Matsukawa, T. (1936). Saponins and sterols. 8. Saponin of *Dioscorea tokoro* Makino. *J pharm Soc Japan*, 56: 408-414.
87. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
88. Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., & Yoshida, S. (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 130(3), 1319-1334.
89. Gorelick, J., & Bernstein, N. (2014). Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. In *Advances in agronomy* (Vol. 124, pp. 201-230). Academic Press.
90. Han, J. Y., In, J. G., Kwon, Y. S., & Choi, Y. E. (2010). Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*. *Phytochemistry*, 71(1), 36-46.
91. Hardainiyan, S., Nandy, B. C., & Kumar, K. (2015). *Elaeocarpus Ganitrus* (Rudraksha): A Reservoir Plant with their Pharmacological Effects. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 34(1), 55-64.
92. Hasanuzzaman. M, Nahar. K, Alam. Md.M , Roychowdhury. R and Fujita. M. (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:9643-9684.
93. Hayat, S., Hasan, S. A., Yusuf, M., Hayat, Q., & Ahmad, A. (2010). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Experimental Botany*, 69(2), 105-112.
94. Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
95. Helambe s. and Dande R. (2012). Fenugreek (*Trigonella foenum- graecum* L.): An Overview. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research* 4: 169 – 187.
96. Hepburn, H. A., Naylor, R. E., & Stokes, D. T. (1986). ELECTROLYTE LEAKAGE FROM WINTER BARLEY TISSUE AS AN INDICATOR OF WINTER-HARDINESS. *Annals of applied biology*, 108(S1), 164-165.
97. Hsu, Y. T., & Kao, C. H. (2003). Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, cell & environment*, 26(6), 867-874.
98. Hua, W., Kong, W., Cao, X., Chen, C., Liu, Q., Li, X., & Wang, Z. (2017). Transcriptome analysis of *Dioscorea zingiberensis* identifies genes involved in diosgenin biosynthesis. *Genes & Genomics*, 39(5), 509-520.
99. Huang, S. T. and Chen, A. P. (2008). Traditional Chinese medicine and infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 20: 211-215.
100. Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., Saeed, M., (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1): 10-20.
101. Irchhaiya, R., Kumar, A., Yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., ... & Gurjar, H. (2015). Metabolites in plants and its classification. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4(1), 287-305.
102. Jager C. E., Symons G. M., Ross J. J., and Reid J. B. (2008), Do brassinosteroids mediate the water stress response? *Physiol. Plant*. 133, 417 – 425.
103. Janda, T., Kósa, E., Pintér, J., Szalai, G., Marton, C., & Páldi, E. (2005). Antioxidant activity and chilling tolerance of young maize inbred lines and their hybrids. *Cereal research communications*, 33(2-3), 541-548.
104. Jha, U. C., A. Bohra and N. P. Singh. (2014). Heat stress in crop plants: its nature, impacts and integrated breeding strategies to improve heat tolerance. *Plant Breed*. 133(6): 679-701.
105. Jiang Y, Huang B (2002). Protein alternations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. *Crop Sci*. 42: 202-207.
106. Joanna Ciura, Magdalena Szeliga and Tyrka, M. 2015. Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek. *Medicinal Plants Studies*, 3(3): 22-25.

107. Kafi, M., Borzooee, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A. and Nabati, J. (2012). Physiology of environmental stresses in plants. Ferdowsi university, Mashhad, Iran, 502 pp.
108. Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E., Keller W. A., and Krishna P. (2007), Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225, 353 – 364.
109. Kawaura, K., Mochida, K., & Ogihara, Y. (2008). Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Functional & integrative genomics*, 8(3), 277-286..
110. Kaya, C., Kirnak, H., & Higgs, D. (2001). Enhancement of growth and normal growth parameters by foliar application of potassium and phosphorus in tomato cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 24(2), 357-367.
111. Khan, T. A., Yusuf, M., Ahmad, A., Bashir, Z., Saeed, T., Fariduddin, Q., ... & Wu, T. (2019). Proteomic and physiological assessment of stress sensitive and tolerant variety of tomato treated with brassinosteroids and hydrogen peroxide under low-temperature stress. *Food chemistry*, 289, 500-511.
112. Khanna-Chopra, R., & Selote, D. S. (2007). Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2), 276-283.
113. Kholová, J., Hash, C. T., Kočová, M., & Vadez, V. (2011). Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought?. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 99-106.
114. Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., and Bačkor, M. (2009). Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of *Matricaria chamomilla* plants. *Ecotoxicology*, 18(5), 544-554.
115. Krishna P. (2003), Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* 22, 289 – 297.
116. Liang, Y., Chen, Q. I. N., Liu, Q., Zhang, W., & Ding, R. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare*L.). *Journal of plant physiology*, 160(10), 1157-1164.
117. Liu, W., & Saint, D. A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical biochemistry*, 302(1), 52-59.
118. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
119. Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
120. Maia, J. M., de Macedo, C. C., Voigt, E. L., Freitas, J. B. S., & Silveira, J. A. G. (2010). Antioxidative enzymatic protection in leaves of two contrasting cowpea cultivars under salinity. *Biologia Plantarum*, 54(1), 159-163.
121. McAnuff, M. A., Omoruyi, F. O., Morrison, E. Y., & Asemota, H. N. (2002). Plasma and liver lipid distributions in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract of the Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). *Nutrition Research*, 22(12), 1427-1434.
122. Mehrafarin, A., Rezazadeh, S., Naghdi, B.H., Noormohammadi, G., Zand, E. and Qaderi, A. 2011. A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *Journal of Medicinal Plants*, 10(37): 6-24.
123. Merah, O. (2001). Potential importance of water status traits for durum wheat improvement under Mediterranean conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 137(2), 139-145.
124. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Science.*, 7, 405-415.
125. Mohammadi, M., Mashayekh, T., Rashidi-Monfared, S., Ebrahimi, A., & Abedini, D. (2019). New insights into diosgenin biosynthesis pathway and its regulation in *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytochemical Analysis*.

126. Morillon, R., Catterou, M., Sangwan, R. S., Sangwan, B. S., & Lassalles, J. P. (2001). Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 212(2), 199-204.
127. Mozafarian V. (1995) Plants Names Dictionary of Iran. Farhang Moaser Publication, Iran., 558p.
128. Munne-Bosch, S., & Penuelas, J. (2003). Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, 217(5), 758-766.
129. Nasrollahi, V., Mirzaie-asl, A., Piri, K., Nazeri, S., & Mehrabi, R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Phytochemistry*, 103, 32-37.
130. Nes, W. D., McCourt, B. S., Marshall, J. A., Ma, J., Dennis, A. L., Lopez, M., ... & He, L. (1999). Site-Directed Mutagenesis of the Sterol Methyl Transferase Active Site from *Saccharomyces cerevisiae* Results in Formation of Novel 24-Ethyl Sterols. *The Journal of organic chemistry*, 64(5), 1535-1542.
131. Newall, C.A., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D. (1996). Herbal medicines. A guide for health-care professionals: The pharmaceutical press.
132. Nikolaeva, M. K., Maevskaya, S. N., Shugaev, A. G., & Bukhov, N. G. (2010). Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(1), 87-95.
133. Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., & Muranaka, T. (2009). Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 725-730.
134. Oksman-Caldentey, K.M. and Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the postgenomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science*. 9(9): 433-440.
135. Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
136. Parker, J. S. (1995). Chromosome structure. *Chromosome Res*, 3: 39-40.
137. Patel, H., Krishnamurthy, R., (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2): 60-65.
138. Pereira, A. (2016). Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Fron. Plant Sci*. 7: 1123.
139. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.
140. Pinheiro, H. M., Touraud, E., & Thomas, O. (2004). Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and pigments*, 61(2), 121-139.
141. Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M., & Caño-Delgado, A. I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*, 146(5), dev151894.
142. Popov VN, Antipina OV, Pchelkin VP, Tsydendambaev VD (2012) Changes in the content and composition of lipid fatty acids in tobacco leaves and roots at low-temperature hardening. *Russ J Plant Physiol* 59:177-182.
143. Pribitkin, E. D. and Boger, G. (2001). Herbal therapy: what every facial plastic surgeon must
144. Proestos, C., Boziaris, I. S., Kapsokefalou, M., & Komaitis, M. (2008). Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 151-156.
145. Rajabian, M. J., Asghari, M. R., and Rabiee, M. (2008). Effect of plant density on Critical period of weed control in oilseed rape. *Iranian Journal of Weed Science* 5: 13-30. (in Persian with English abstract).
146. Raju, J., Patlolla, J. M., Swamy, M. V., & Rao, C. V. (2004). Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces

- apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(8), 1392-1398.
147. Ramonell, K. M., Kuang, A., Porterfield, D. M., Crispi, M. L., Xiao, Y., McClure, G., & Musgrave, M. E. (2001). Influence of atmospheric oxygen on leaf structure and starch deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 24(4), 419-428.
148. Ranieri, A., Castagna, A., & Soldatini, G. F. (2000). Differential stimulation of ascorbate peroxidase isoforms by ozone exposure in sunflower plants. *Journal of Plant Physiology*, 156(2), 266-271.
149. Rizhsky, L., H. Liang and R. Mittler. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130(3): 1143-1151.
150. Russell, J. S., & Tofilon, P. J. (2002). Radiation-induced activation of nuclear factor- $\kappa$ B involves selective degradation of plasma membrane-associated I $\kappa$ B $\alpha$ . *Molecular biology of the cell*, 13(10), 3431-3440.
151. Sakurai, A. (1999). Brassinosteroids. *Steroid Plant Hormones*.
152. Sawai, S., Ohyama, K., Yasumoto, S., Seki, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., ... & Muranaka, T. (2014). Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *The Plant Cell*, 26(9), 3763-3774.
153. Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., & Schaller, H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2; 1. *The Plant Journal*, 25(6), 605-615.
154. Schaller, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant physiology and biochemistry*, 42(6), 465-476.
155. Schaller, H., Bouvier-Navé, P., & Benveniste, P. (1998). Overexpression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a sterol-C241-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction. *Plant physiology*, 118(2), 461-469.
156. Sheikhlar, A. (2013). *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugreek) as a Medicinal Herb in Animals Growth and Health. *Science International*, 1: 194-198.
157. Sonawane, P. D., Pollier, J., Panda, S., Szymanski, J., Massalha, H., Yona, M., ... & Almekias-Siegl, E. (2017). Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature plants*, 3(1), 16205.
158. Stępień, P., & Kłbus, G. (2006). Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biologia Plantarum*, 50(4), 610.
159. Sudhir, P., & Murthy, S. D. S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42(2), 481-486.
160. Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F., & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
161. Upadhyay, S., Phukan, U.J., Mishra, S. and Shukla, R.K. 2014. De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal sapogenin biosynthesis in *Asparagus racemosus*. *BMC genomics*, 15(1): 746.
162. Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current opinion in plant biology*, 9(2), 189-195.
163. Vandesompele, J., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical biochemistry*, 303(1), 95-98..
164. Vardhini, B. V., & Anjum, N. A. (2015). Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 67.
165. Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270(5235), 484-487.

166. Wang, J., Wan, Y. G., Sun, W., Zhang, H. L., Chen, P. and Yao, J. (2008). Progress in Japanese herbal medicine in treatment of chronic kidney disease. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 11: 1348-1352 (In Chinensis).
167. Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S., ... & Li, S. H. (2010). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC plant biology*, 10(1), 34.
168. Wink, M. (2010). Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Second edition. Inc. New Delhi, India. 2010: 20-30.
169. Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75.
170. Wu, C., Li, F., Xu, H., Zeng, W., Yu, R., Wu, X., ... & Li, J. (2019). The potential role of brassinosteroids (BRs) in alleviating antimony (Sb) stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 51-59.
171. Yuan S. and Lin H. H. (2008), Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Z. Naturforsch.* 63c, 313 – 320.
172. Zafari, S., Niknam, V., Musetti, R., & Noorbakhsh, S. N. (2012). Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). *Acta physiologiae plantarum*, 34(2), 561-568.
173. Zandalinas, S. I., R. Mittler, D. Balfagón, V. Arbona and A. Gómez-Cadenas. (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.* 162(1): 2-12.
174. Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.
175. Żuk-Gołaszewska K, Wierzbowska J, Bieńkowski T. (2015). Effect of potassium fertilization, rhizobium inoculation and water deficit on the yield and quality of fenugreek seeds *J Elem.*; 20(2): 513-524

## Abstract

Fenugreek is a medicinal and winter herbal that contains a large amount of the active ingredient diosgenin. Diosgenin is one of the most important quality factors in fenugreek, which is widely used in the pharmaceutical industry as a raw material for the production of steroid drugs. The aim of this study was to investigate the effect of epi-brassinosteroid on expression of Diosgenin-related genes and some of the physiological properties of Fenugreek under high temperature stress. The treatments of this study consisted of epi-ebrosinosteroid (0, 2, 5 and 10 ppm) as well as Different harvest times (6 and 24 h) and High temperature stress (42° C) in two populations of Boshroyeh and Hamadan. The results showed that the pattern of *CAS* gene expression was similar in both populations. Gene expression of *SEP* was similar to *CAS* in both populations, although the expression of *SEP* gene in Hamadan was much higher compared to Boshroyeh. The expression of *SMT* gene was also similar in both populations, except that the expression of this gene in Boshroyeh increased almost 17-fold when applied to high temperature stress and 2 ppm level of brassinosteroid. The expression pattern of *SSR* in high temperature treatment and application of different levels of brassinosteroid was different between the studied populations, so that the expression of this gene in Hamadan at 2 ppm level was increased 3-fold compared to normal temperature. *SQS* gene expression was decreased in both populations after using high temperature treatment and different levels of brassinosteroid compared to normal conditions. Prolonged heat treatment (24 hours) increased the expression of the genes studied in this research more effectively than short-term heat treatment (6 hours). In the other part of the study, high temperature stress reduced the content of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid and increased malondialdehyde. Application of epi-ebrosinosteroid during stress not only prevented the reduction of the above-mentioned traits but also increased them. Applying different levels of epi-ebrosinosteroid (2 and 5 ppm) at high temperatures resulted in decreased malondialdehyde and increased resistance to fenugreek, possibly due to the reduced free radical production and non-fatty acid peroxidation. The activity of Catalase, Guaiacol peroxidase and Ascorbate peroxidase enzymes increased in stress condition and application of 2 and 5 ppm epi-ebrosinosteroid, resulted in further increase of these enzymes activity under stress conditions. Overall, the results of this study showed that epi-ebrosinosteroid (2 and 5 ppm) might be used as a suitable stimulus to increase the resistance of fenugreek to heat stress. High temperature treatments, especially for 24 hours, and different levels of epi-ebrosinosteroid (2 and 5 ppm) can also be applied to increase the expression of some genes involved in the biosynthesis pathway and subsequently to increase the content of the biosynthesis.

**Keywords:** Epi-ebrosinosteroid, High Temperature, Fenugreek, Malondialdehyde, Diosgenin and Chlorophyll Content





Shahrood University of  
Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc Thesis in Biotechnology

**The Study of Brassinosteroid Effect on Diosgenin  
Biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum L.* under  
High Temperature Condition**

By:Shahla Sheikhi

Supervisor:

Dr Amin Ebrahimi

Dr Parviz Heydari

Advisor:

Dr Mohammadreza Amerian

September 2019