

افزایش تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) با سطوح مختلف ملاتونین تحت تنش شوری

مریم محمدی اسبویی^۱، امین ابراهیمی^{۲*}، محمد رضا عامریان^۳
۱ و ۲- به ترتیب دانشجو، استادیار و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۹)

چکیده

دایوسجنین (Diosgenin) یکی از مهم‌ترین ترکیبات دارویی جهان محسوب می‌شود؛ با این وجود اطلاعات اندکی درباره مسیر بیوسنتز این متابولیت ارزشمند در شنبلیله در دسترس است. با توجه به اهمیت تولید بیشتر دایوسجنین، کاربرد محرک‌های مختلف با هدف افزایش تولید آن، یک موضوع تحقیقاتی جذاب به‌شمار می‌رود. این پژوهش با هدف افزایش تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در گیاهان شنبلیله تیمار شده با تنش شوری و سطوح مختلف ملاتونین انجام شد. تیمارهای این آزمایش شامل سطوح مختلف شوری (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار)، ملاتونین (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) و اثرات متقابل سطوح مختلف تنش شوری و ملاتونین بود. تظاهر ژن‌های Cycloartenol synthase، C4-demethylase و 26-o-Beta glucosidase در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با ۶۰ ppm ملاتونین، به ترتیب هفت، پنج و چهار برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت، در حالی که تظاهر ژن‌های C22-hydroxylase و $\Delta 7$ -reductase تحت تاثیر همه تیمارهای آزمایشی پایین بود (کاهش یافت). در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با تنش شوری و گیاهان شاهد، قادر خواهد بود تا به‌عنوان یک محرک عملکردی مناسب، تظاهر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین را افزایش دهد. نتایج این پژوهش در مهندسی مسیر این متابولیت ارزشمند دارویی کاربرد دارد.

واژه‌های کلیدی: تظاهر ژن، متابولیت ثانویه، محتوای دایوسجنین، ملاتونین، 26-o-Beta glucosidase.

The Expression enhancement of some genes involved in the diosgenin biosynthesis pathway in fenugreek treated with different levels of melatonin under salinity stress

Maryam Mohamadi Esboei¹, Amin Ebrahimi^{2*}, Mohamad Reza Amerian³

1,2,3. Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Iran.
(Received: October 31, 2020 - Accepted: December 19, 2020)

ABSTRACT

Diosgenin is one of the most important medicinal compounds in the world; however, little information is available on the biosynthetic pathway of this valuable metabolite in fenugreek. Given the importance of increasing the production of diosgenin, the application of various stimulants to enhance its production might be an interesting research topic. The aim of this study was to increase the expression of some genes involved in the biosynthesis pathway of diosgenin in fenugreek plants treated with salinity stress and different levels of melatonin. Treatments in this experiment included different salinity levels (0, 150 and 300 mM), different levels of melatonin (0, 30, 60 and 90 ppm) and a combination of different levels of salinity and melatonin. The expression of Cycloartenol synthase, 26-o-Beta glucosidase, C4-demethylase in 150 mM and 60 ppm melatonin salinity treatments increased 7, 5 and 4 times compared to the control treatment (no melatonin application and salinity stress), respectively. The expression of C22-hydroxylase and $\Delta 7$ -reductase genes was less affected by all experimental treatments. Overall, the results of the present study showed that the application of melatonin in fenugreek under salinity stress substantially increases the expression of genes involved in the biosynthesis pathway of diosgenin as a suitable functional stimulus. The results of this research could be used in the pathway engineering of this valuable medicinal metabolite.

Keywords: 26-o-Beta glucosidase, diosgenin content, gene expression, melatonin, secondary metabolite.

* Corresponding author E-mail: Aminebrahimi@shahroodut.ac.ir

مقدمه

، (Lanosterol synthase) دو آنزیم کلیدی متعلق به خانواده‌ی اکسیدواسکوالن سیکلازها (Oxidosqualene cyclase) هستند و در این مسیر دخالت دارند (Chaudhary *et al.*, 2015). شناسایی مسیر بیوسنتزی دیوسجنین و ژن‌های مهم این مسیر، در مهندسی این متابولیت حیاتی به نظر می‌رسد؛ مسیر بیوسنتز دیوسجنین دارای پیچیدگی‌های زیادی است (Zhou *et al.*, 2019) (شکل ۱).

کاربرد گیاهان به‌عنوان دارو، از گذشته‌های دور رایج بوده است. تمایل انسان به استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض کمتر آن نسبت به داروهای شیمیایی، امری اجتناب‌ناپذیر محسوب می‌شود. با توجه به نیاز روزافزون صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی به گیاهان دارویی به‌عنوان مواد اولیه تولیدات صنایع مذکور، کشت گیاهان دارویی در دنیا در حال گسترش است (Kooti *et al.*, 20017). با توجه به این‌که گیاهان قادر به جابجایی نیستند، بنابراین توانایی تطابق با محیط و سازگاری به خوبی در آن‌ها نهادینه شده است. توانایی سنتز انواعی از ترکیبات شیمیایی تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه، از جمله پاسخ‌های تطبیقی گیاهان به تنش‌های محیطی محسوب می‌شود. این ترکیبات بخشی از ساختمان مولکولی پایه سلول محسوب نمی‌شوند و در مقادیر بسیار اندکی در بافت‌ها، اندام‌های خاص یا در مراحل خاصی از رشد تولید می‌شوند (Chaudhary *et al.*, 2018). بیشتر متابولیت‌های ثانویه از اهمیت دارویی برخوردار هستند، زیرا سنتز شیمیایی آن‌ها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست (Oksman and Inze, 2004). این ترکیبات همچنین از گیاهان در برابر آسیب جانوران (مانند حشرات) جلوگیری می‌کنند و یا ممکن است منجر به بروز اختلالات باروری در جانور تغذیه کننده شوند. متابولیت‌های ثانویه، کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند و تولید آن‌ها به میزان قابل توجهی به مراحل رشدی و فیزیولوژیک گیاه وابسته است (Oksman *et al.*, 2004). گیاهان دارویی با انتقال از محیط زندگی خود (محیط بومی)

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graceum* L. گیاهی متعلق به خانواده بقولات، راسته گل‌سرخ و جنس *Trigonella* است (Mozafarin, 1995). شنبلیله سرشار از مواد مغذی از جمله کربوهیدرات، پروتئین، فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد و. بذره‌های این گیاه، حاوی موادی از قبیل آلکالوئید (Alkaloid)، تریگونلین (Trigonelline)، کولین (Choline) و ساپوجنین‌های استروئیدی با اثرات دارویی ویژه‌ای است (Vasanthi *et al.*, 2017). اهمیت این گیاه به دلیل تولید دیوسجنین است که جزء ساپوجنین‌های استروئیدی محسوب می‌شود (Joanna *et al.*, 2015). این متابولیت ارزشمند برای اولین بار در سال ۱۹۳۶ از گیاه *Dioscorea tokoro* جداسازی شد (Fujii and Matsukawa, 1936). از دیوسجنین در درمان بیماری‌های متابولیکی مانند چاقی، دیابت، کلسترول و چربی خون بالا، التهاب و سرطان استفاده می‌شود (Upadhyay *et al.*, 2014). در حال حاضر، ابهامات زیادی در مورد مسیر بیوسنتزی دیوسجنین وجود دارد و بیشترین اطلاعات موجود در مورد این مسیر بیوسنتزی، متعلق به سایر گیاهان مانند یام (*Dioscorea villosa*) و خانواده سولاناسه (Solanaceae) است (Mandegari, 2012). نیاز مبرم به مواد موثره این گیاه به‌عنوان مواد اولیه در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، باعث شده است تا شنبلیله بیش از پیش از ارزش و اهمیت خاصی برخوردار شود (Dini, 2006).

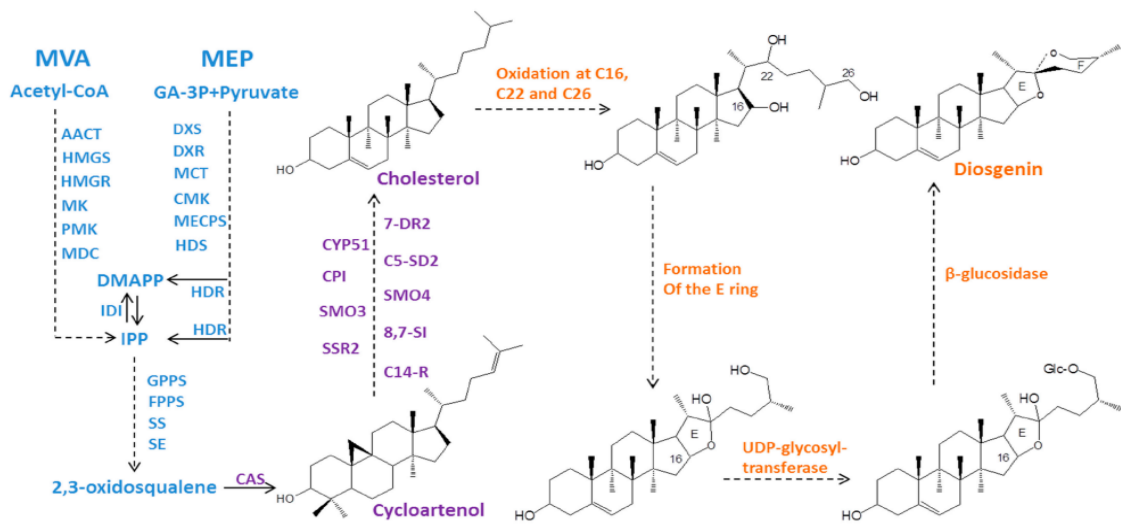
دیوسجنین از طریق مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها^۱ تولید می‌شود؛ این مسیر با پیش‌ماده‌ی استیل کوآنزیم‌آ به ایزوپنتیل پیروفسفات^۲ می‌رسد. برای تولید دیوسجنین، مسیر لانوسترول (Lanosterol) و کلسترول (Cholesterol) و مسیر سیکلوآرتنول (Cycloartenol) و حدواسط سیتواسترول (Cytosterol) پیشنهاد شده است. سیکلوآرتنول سنتاز (Cycloartenol synthase) و لانوسترول سنتاز

^۱- Isoprenoids

^۲- Isopentyl pyrophosphate

قبیل انواع تنش‌های غیرزیستی، هورمون‌ها، اشعه، پلاسمای سرد و نانوذرات، از جمله مهم‌ترین این موارد محسوب می‌شوند (Sheikhi *et al.*, 2019; Babaei *et al.*, 2020; Ebrahimibasabi *et al.*, 2020).

به محیط زراعی، تحت تاثیر قرار می‌گیرند و میزان متابولیت ثانویه در آن‌ها کاهش می‌یابد (Bourgaud *et al.*, 2001). امروزه روش‌های مختلفی برای افزایش کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان عالی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد محرک‌هایی از



شکل ۱- تصویر شماتیک از مسیر بیوسنتز دایوسجنین و برخی از ژن‌های دخیل در این مسیر (Zhou *et al.*, 2019)

Figure 1. Schematic image of the diosgenin biosynthesis pathway and some genes involved in this pathway

داد که ملاتونین منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. در ضمن، ملاتونین، محتوای مالون دی‌آلدئید و نش‌الکترولیت در گیاهان تیمار شده با تنش شوری را کاهش داد. همچنین کاربرد ملاتونین منجر به افزایش قابل توجه تظاهر ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ژن‌های پروتئین کیناز (MAPK 1, MAPK 3, MAPK4, SOS1, SOS2, SOS3) و ژن‌های SOS² (MAPK 6¹) شد. (Zhang *et al.*, 2020)

با توجه به اهمیت دایوسجنین در شنبله به‌عنوان یک متابولیت ارزشمند، استفاده از محرک‌های مختلف به‌منظور افزایش تظاهر ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین و متعاقباً محتوی دایوسجنین ارزشمند به‌نظر می‌رسد؛ بنابراین این تحقیق با هدف بررسی اثرات ملاتونین و تنش شوری (به‌عنوان دو محرک عملکردی) بر افزایش تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین انجام شد. نتایج حاصل از

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) یک آنتی‌اکسیدان طبیعی است، که در همه موجودات زنده از باکتری تا گیاهان و حیوانات یافت می‌شود. ملاتونین گیاهی برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ در گونه‌های مختلف گیاهی و در اندام‌های مختلف مانند ریشه، ساقه، برگ، میوه‌ها و دانه‌ها شناسایی شد (Dubbels *et al.*, 1995). اثرات مثبت ملاتونین در کاهش استرس‌های غیرزیستی و تنظیم رشد در گیاهان به اثبات رسیده است. ملاتونین در گیاهان به‌صورت گسترده در تنظیم گلدهی، جوانه‌زنی بذر، رشد و نمو، فتوسنتز و تحریک پاسخ دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر ملاتونین نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از قبیل آسکوربات (Ascorbate) و توکوفرول‌ها (Tocopherol)، احتمالاً با توانایی ملاتونین برای انتقال کارآمد از طریق محفظه-های مختلف سلول مرتبط است (Martinez *et al.*, 2018).

در یک پژوهش، اثر ملاتونین بر افزایش مقاومت خیار تحت تاثیر تنش شوری بررسی شد. نتایج آن‌ها نشان

¹- Mitogen-activated protein kinase

²- Salt overly sensitive

این تحقیق، از شرکت مرک (CAS number: 7647-) خریداری شد. (EC number: 231-598-3; 14-5) خریداری شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX Plus (شرکت سیناکلون) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به منظور حذف آلودگی‌های DNA، یک میکروگرم از RNA استخراج شده با DNase I (شرکت Thermo Fisher) تیمار شد. در ضمن کیفیت و کمیت RNA با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد. به منظور ساخت cDNA، از آغازگر (dT) Oligo برای اتصال به دم پلی‌آدنین mRNA استفاده شد. ساخت cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از کیت HyperScript Reverse transcriptase (GeneALL) بر طبق به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

طراحی آغازگرها

آغازگرها (جدول ۱) با استفاده از برنامه آنلاین Primer 3 Plus طراحی شدند و به منظور کنترل صحت آن‌ها، از برنامه v.3.1 Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/olygo>) استفاده شد. در این برنامه (Oligo Analyzer)، پارامترهایی شامل دمای اتصال، درصد بازهای C/G، احتمال تشکیل ساختارهای سنجاق سر و دایمر و همچنین امکان تشابه با سایر ژن‌های نزدیک بررسی شد؛ این ژن‌ها با توجه به تحقیقات گذشته محققین این پژوهش انتخاب شدند. در مطالعات گذشته محققین این پژوهش، برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین با روش طراحی آغازگرهای دژنره^۱ شناسایی و جداسازی شدند و رابطه بین میزان تظاهر این ژن‌ها و محتوای دایوسجنین در نه توده بومی شنبلیله با محتوای دایوسجنین متفاوت بررسی شد و شمایی کلی از مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله ارائه شد (Mohammadi *et al.*, 2019). در ضمن در مطالعات گذشته محققین این پژوهش، عکس‌العمل این ژن‌ها نسبت به تنش گرما، براسینواسترئوئید، دی-اکسیدیتانیوم و پلاسمای سرد ارزیابی شد؛ بنابراین با

این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی و مهندسی مسیر دایوسجنین در بیوتکنوژی و اصلاح نباتات مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و اعمال تیمار

بذرهای شنبلیله توده بومی بوشرویه از سازمان جهاد کشاورزی استان اصفهان تهیه شد. با توجه به مطالعات قبلی، این توده دارای بالاترین محتوی دایوسجنین در بین نه توده دیگر بود؛ بنابراین به عنوان یک کاندید مناسب برای این پژوهش انتخاب شد. تیمارهای این آزمایش شامل سطوح مختلف شوری (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار) و هورمون ملاتونین (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) بود. در ضمن گیاهان شاهد نیز با آب فاقد ملاتونین و نمک آبیاری شدند. ملاتونین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما (EC number: 200-) (CAS number: 73-31-4, 797-7) خریداری شد. ملاتونین ابتدا با غلظت ۱۰۰۰ ppm به عنوان محلول ذخیره مادری آماده و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سایر غلظت‌های مورد نظر با استفاده از محلول مادری تهیه شدند.

با توجه به ماهیت تیمارهای آزمایش، این پژوهش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای این منظور، ابتدا بذرهای گیاه شنبلیله ضدعفونی و در گلدان‌های ۲۰×۲۵×۳۰ سانتی-متری با ترکیب پیت ماس، پرلیت و شن با نسبت برابر، در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و رطوبت ۵۵ درصد کشت شدند. پس از اطمینان از استقرار گیاهچه‌ها در مرحله سه برگی (هفت روزه-گی)، ملاتونین به مدت دو هفته با غلظت‌های مختلف، همراه با آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه شد و سپس تیمار شوری در مرحله شش برگی (سه هفتگی) و به مدت دو هفته اعمال شد. در نهایت در مرحله آغاز گلدهی (پنج هفتگی)، نمونه‌های برگی جمع‌آوری و به منظور بررسی تظاهر ژن در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (Varghese *et al.*, 2019).

(Elsayed *et al.*, 2020) کلرید سدیم مورد استفاده در

^۱- Degenerate

استفاده شد. واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر و با سه تکرار بیولوژیکی انجام شدند. واکنش PCR زمان واقعی، با استفاده از دستگاه ABI Step one و مطابق با ترکیبات جدول ۲ انجام شد. در ضمن به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی نمونه‌ها، از کنترل منفی در تمامی مراحل آزمایش استفاده شد.

توجه به نتایج این پژوهش‌ها، ژن‌های کاندید برای این تحقیق انتخاب شدند (Sheikhi *et al.*, 2019; Babaei *et al.*, 2020; Ebrahimibasabi *et al.*, 2020).

واکنش PCR زمان واقعی

برای واکنش PCR زمان واقعی، از مستر شرکت SYBR®Green PCR Master Mix 2X (Ampliqon)

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق و مشخصات آن‌ها

Table 1. The primers used in this study and their characteristics

Name	Primer Sequence (3' - 5')		Product size (bp)	Annealing (C°) temperature
	Forward	Reverse		
C4-demethylase	ATGGAACACAAGGGTT TTCGGT	ACTGCCTACAATGCTTCTG CTCA	210	61
C22-hydroxylase	CTATGGGGTGACGATG CTAAGATG	TGCTATTGCCATCTTTGCTT CCA	230	61
Δ7 reductase	TTGACCGAGCGAAAAG GGATGA	GCACCAAGTGAAGGATTC CAGAC	220	60
26-o-Beta glucosidase	TGGCATTGATGAGTTCA ACGATCC	CACTGTATAACCTGCTGCC CA	230	60
Cycloartenol synthase	AAGAGAGATCCAACAC CACTGC	TACATGACGACGGTATTCT CCC	180	60
GAPDH (Reference)	ATGTTAAATGATGCAG CCCTTCCACCTCTC	TATGTTTGTGTTGGTGTGTC AACGAGCAACGAATACAA G	230	61

نتایج و بحث

تظاهر ژن *Cycloartenol synthase (CAS)*

اثرات اصلی سطوح مختلف تنش شوری، ملاتونین و اثرات متقابل آن‌ها بر تظاهر همه ژن‌های بررسی شده در این تحقیق معنی‌دار بود (جدول ۳، ۴). به‌منظور مقایسه اثرات متقابل سطوح مختلف تنش شوری و ملاتونین، از مقایسه میانگین با روش دانکن در سطح احتمال یک درصد استفاده شد. تظاهر ژن *CAS* تحت تاثیر سطح ۱۵۰ میلی‌مولار شوری (بدون کاربرد ملاتونین)، اختلاف معنی‌داری با شرایط شاهد (بدون اعمال تنش شوری و ملاتونین) نداشت، درحالی‌که در سطح ۳۰۰ میلی‌مولار، به‌صورت معنی‌دار افزایش یافت. افزایش میزان تظاهر این ژن تحت تاثیر سطوح مختلف ملاتونین در تیمار شاهد کاملاً افزایشی بود، به‌طوری‌که تظاهر این ژن در تیمار ۹۰ ppm ملاتونین نسبت به شاهد و بدون کاربرد ملاتونین، به‌صورت معنی‌داری (سه برابر) افزایش یافت.

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

تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی

قبل از آنالیز داده‌های تظاهر ژن‌های مورد نظر در این تحقیق، از آنالیز منحنی ذوب و تکثیر به‌منظور تایید صحت داده‌ها استفاده شد. به‌منظور تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی، تظاهر نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی لیر پایه فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (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. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از برنامه R به روش روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

¹- Relative standard curve method

جدول ۲- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی

Table 2. The compounds used in real-time PCR reaction

Materials	Volumes (μ l)	Concentration
Nuclease Free Water	3	-
cDNA	1	50 ng μ l ⁻¹
Forward Primer	0.5	10 pmol μ l ⁻¹
Reverse Primer	0.5	10 pmol μ l ⁻¹
SYBR@Green PCR Master Mix	5	2X
Total	10	-

معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۱A). تظاهر این ژن در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با سطوح ۶۰ ppm و ۳۰ ملاتونین نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود؛ بنابراین به نظر می‌رسد که این تیمار دارای پتانسیل مناسبی جهت افزایش تظاهر این ژن است.

تحت شرایط تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با ملاتونین ۶۰ ppm، میزان تظاهر این ژن نسبت به تیمار شاهد هفت برابر افزایش یافت. تظاهر ژن CAS در تیمار ۳۰۰ میلی‌مولار و ترکیب با سطوح مختلف ملاتونین نسبت به تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار، به صورت

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر تظاهر ژن‌های بررسی شده در این تحقیق

Table 3. Variance analysis of the effects of different levels of salinity and melatonin on the expression of the genes investigated in this study

Sources of variance	Df	MS				
		CAS	C22-hydroxylase	Δ 7- reductase	BGL	C4-demethylase
Salinity	2	8.54 **	0.05 **	0.29 **	2.53**	5.13 **
Melatonin	3	8.98 **	0.49 **	0.12 **	10.61**	8.58 **
Salinity*Melatonin	6	7.18 **	0.19 **	0.13 **	2.76**	0.83 **
Error	24	0.03	0.0007	0.002	0.026	0.02
CV (%)		8.37	4.21	5.83	6	6.32

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات اصلی سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر تظاهر ژن‌های بررسی شده در این تحقیق

Table 4. Mean comparison of the main effects of different levels of salinity and melatonin on the expression of the genes investigated in this study

Treatments	CAS	C22-hydroxylase	Δ 7- reductase	BGL	C4-demethylase
Salinity					
0 mM	1.67 c	0.65 b	0.96 a	2.26 a	1.85 c
150 mM	3.23 a	0.67 a	0.73 b	2.96 b	2.58 b
300 mM	1.88 b	0.54 c	0.66 c	3.13 c	3.15 a
Melatonin					
0 ppm	1.3 d	0.69 b	0.82 b	2.15 c	1.74 c
30 ppm	2.25 b	0.31 d	0.65 d	2.8 b	2.13 b
60 ppm	3.64 a	0.87 a	0.73 c	4.30 a	3.95 a
90 ppm	1.84 c	0.61 c	0.93 a	1.9 d	2.28 b

*میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون‌ها، دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

*Means with the same letters in the same columns are not significantly different.

ترکیب با ۳۰ ppm ملاتونین به پایین‌ترین میزان خورد رسید، در حالی که این ژن بیشترین تظاهر را در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با ۳۰ ppm ملاتونین به خود اختصاص داد.

تظاهر ژن Δ 7- reductase

تظاهر این ژن نیز مشابه ژن C22-hydroxylase تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی کم بود. در حقیقت تمامی تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش تظاهر این ژن نسبت به شرایط شاهد شدند. تظاهر

تظاهر ژن C22-hydroxylase

در مجموع میزان تظاهر این ژن در همه تیمارهای آزمایشی پایین بود. در حقیقت کاربرد سطوح مختلف شوری و ترکیب با ملاتونین در تمامی تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش تظاهر این ژن نسبت به تیمار شاهد شد. تظاهر ژن C22-hydroxylase فقط در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با ۶۰ ppm ملاتونین نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۱B). تظاهر این ژن در تیمار شوری ۳۰۰ میلی‌مولار و

تیمار شاهد به ترتیب چهار و ۵/۲ برابر افزایش یافت (شکل ۲C). بالاترین میزان تظاهر این ژن در تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار (همرا با ملاتونین ۶۰ ppm) ثبت شد. افزایش شدت تنش شوری از ۱۵۰ به ۳۰۰ میلی مولار (همراه با ملاتونین ۶۰ ppm) به صورت معنی داری منجر به افزایش تظاهر این ژن شد. در حقیقت تظاهر این ژن نسبت به شاهد، تحت تاثیر تمامی تیمارهای آزمایشی به صورت معنی داری افزایش یافت.

در این پژوهش پروفایل تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین تحت شرایط تنش شوری در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف ملاتونین بررسی شد. در تحقیق حاضر، تظاهر ژن CAS تحت شرایط تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و همراه با ملاتونین ۶۰ ppm نسبت به تیمار شاهد، هفت برابر افزایش یافت (شکل ۱A). از آنجا که ضرورت فعالیت این ژن در این مسیر بیوسنتزی به خوبی اثبات شده است، پاسخ افزایشی آن نسبت به اثرات متقابل تنش شوری و ملاتونین، نویدبخش شناسایی یک محرک کاربردی مناسب برای افزایش محتوی دایوسجنین در شنبلیله است. با توجه به ابهامات این مسیر بیوسنتزی مهم، شناسایی آن و ژن‌های مهم این مسیر در مهندسی دایوسجنین به عنوان یک متابولیت بسیار ارزشمند حیاتی به نظر می‌رسد. در یک بررسی، برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین شناسایی و جداسازی شدند و رابطه بین میزان تظاهر این ژن‌ها و محتوی دایوسجنین در نه توده شنبلیله با محتوی دایوسجنین متفاوت بررسی شد و شمایی کلی از مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله ارائه شد (Mohammadi *et al.*, 2019).

سه مرحله اکسیداسیون در موقعیت کربن‌های شماره C22، C16 و C26 در ساختار کلسترول به منظور تبدیل کلسترول به ترکیبات پایین‌دستی ضروری می‌باشد. ژن‌های C22-hydroxylase و C26-hydroxylase به ترتیب طی مراحل مختلفی منجر به اکسیداسیون (اضافه شدن گروه OH) کلسترول می‌شوند (Eich, 2008). به عبارت دیگر، برای سنتز

C22-hydroxylase، تحت تاثیر تنش شوری (هر دو سطح) و بدون کاربرد ملاتونین نسبت به شرایط شاهد کاهش یافت. بالاترین میزان تظاهر این ژن در تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۹۰ ppm به میزان ۱/۱۳ برابر تیمار شاهد ثبت شد (شکل ۲A). پایین‌ترین میزان تظاهر ژن مذکور در تیمار شوری ۱۵۰ میلی مولار و ترکیب با ملاتونین ۳۰ ppm مشاهده شد.

تظاهر ژن 26-o-Beta glucosidase (BGL)

تظاهر ژن (BGL) تحت تاثیر تنش شوری و بدون کاربرد ملاتونین نسبت به شرایط شاهد به صورت معنی داری افزایش یافت. همچنین تظاهر این ژن در شرایط شاهد (بدون تنش شوری) و صرفاً با کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به میزان ۴/۵ برابر (در سطح ۶۰ ppm ملاتونین) افزایش یافت. بیشترین تظاهر این ژن در تیمار تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و ترکیب با سطح ۶۰ ppm ملاتونین به میزان پنج برابر نسبت به شرایط شاهد ثبت شد. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین همراه با تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار نیز به صورت معنی داری منجر به افزایش تظاهر این ژن نسبت به شرایط شاهد شد (شکل ۲B). نتایج نشان داد که اثرات متقابل تنش شوری همراه با سطوح مختلف ملاتونین، به عنوان یک محرک مناسب تظاهر این ژن را افزایش می‌دهد. با افزایش شدت تنش شوری از ۱۵۰ به ۳۰۰ میلی مولار (در غلظت ۶۰ ppm)، میزان تظاهر این ژن کاهش یافت. در حقیقت افزایش تنش شوری (از ۱۵۰ به ۳۰۰ میلی مولار) و افزایش غلظت ملاتونین (از ۶۰ ppm به ۹۰ ppm)، منجر به کاهش تظاهر این ژن نسبت به تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار شد.

تظاهر ژن C4-demethylase

اثرات متقابل سطوح مختلف تنش شوری و ملاتونین منجر به افزایش معنی داری در میزان تظاهر این ژن نسبت به تیمار شاهد شد و تظاهر این ژن در شرایط بدون تنش شوری همراه با سطوح مختلف ملاتونین، به صورت معنی داری افزایش یافت. همچنین میزان تظاهر این ژن در سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار تنش شوری و ترکیب با سطح ۶۰ ppm از ملاتونین نسبت به

تنش شوری و ملاتونین اندک بود (شکل ۲A). در یک تحقیق *Ciura et al.* (2017) تظاهر این ژن را تحت تاثیر کلاسترول، اسکوالن و متیل جاسمونات (Methyl jasmonate) در شنبليله بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که تظاهر این ژن نسبت به تیمار کلاسترول، بیشترین افزایش را به خود اختصاص داد که احتمالاً نشان‌دهنده نقش این ژن در مسیر بیوسنتز کلاسترول می‌باشد. نتایج این محققان با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی ندارد که این عدم تطابق احتمالاً به علت تفاوت در پاسخ‌دهی ژن‌ها نسبت به تیمارهای (محرک) مختلف است. این عدم هم‌خوانی، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر را با هدف شناسایی بهترین تیمار و مناسب‌ترین غلظت یا سطح از آن را به اثبات می‌رساند.

ژن 26-o-Beta glucosidase (*BGL*) با حذف گلوکز در موقعیت کربن ۲۶ در مرحله پایانی تبدیل کلاسترول به دایوسجینین، باعث سنتز دایوسجینین می‌شود. در یک تحقیق، تظاهر ژن 26-o-beta glucosidase تحت تاثیر سه تیمار کلاسترول، اسکوالن و متیل جاسمونات بررسی شد. در این پژوهش تظاهر ژن 26-o-beta glucosidase در پاسخ به تیمار کلاسترول نسبت به سایر تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافت (*Ciura et al.*, 2017; *Ciura et al.*, 2018). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تظاهر این ژن، صرفاً با کاربرد سطوح مختلف ملاتونین نسبت به شرایط شاهد به میزان ۴/۵ برابر (در سطح ۶۰ ppm ملاتونین) افزایش یافت و کاربرد سطوح مختلف ملاتونین همراه با تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار نیز به صورت معنی‌داری منجر به افزایش تظاهر این ژن نسبت به شرایط شاهد شد (شکل ۲B).

آنزیم C4 demethylase منجر به حذف گروه متیل از کربن شماره چهار در حلقه استرول می‌شود. تحقیقات بسیار اندکی بر روی این آنزیم در گیاهان انجام شده است (Lepesheva and Waterman, 2007)، درحالی‌که این ژن یکی از ژن‌های مهم مسیر بیوسنتز دایوسجینین محسوب می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که تظاهر این ژن در سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌

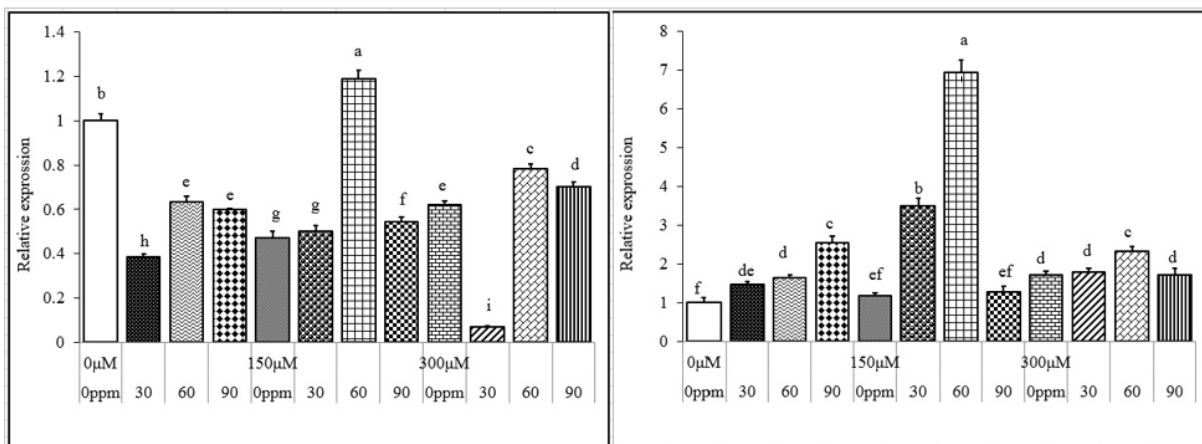
دایوسجینین، کلاسترول به عنوان ماده حد واسط، ابتدا توسط ژن‌های خانواده CYP72A هیدروکسیله می‌شود که این هیدروکسیله شدن، ابتدا در موقعیت کربن ۲۲ و سپس کربن ۲۶، مسیر را به سمت سنتز دایوسجینین هدایت می‌کند. در این تحقیق، تظاهر این ژن تنها در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ۶۰ ppm ملاتونین نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۱B). نتایج یک پژوهش نشان داد که خاموش شدن C22-hydroxylase در سیب‌زمینی، منجر به کاهش قابل توجهی در میزان ترکیبات پایین‌دستی و تجمع کلاسترول خواهد شد، درحالی‌که خاموش کردن C26-hydroxylase در تجمع کلاسترول موثر نبود (*Umemoto et al.*, 2016). در یک پژوهش، ژن‌های C22-hydroxylase و C26-hydroxylase در گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی شناسایی و همچنین نقش C16-hydroxylase در آن‌ها بررسی و مشخص شد که هر سه ژن در بیوسنتز استرول گلیکوآلکالوئیدها (*Glycoalkaloid*) ضروری هستند (*McAdam et al.*, 2017). بررسی تظاهر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجینین تحت تاثیر کلاسترول، اسکوالن و متیل جاسمونات نشان داد که تظاهر ژن‌های C22-hydroxylase و C26-hydroxylase نسبت به تیمار کلاسترول، به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد که احتمالاً بیانگر نقش این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی دایوسجینین از طریق کلاسترول می‌باشد (*Ciura et al.*, 2017; *Ciura et al.*, 2018).

نقش ژن‌های C4-demethylase و $\Delta 7$ -reductase با استفاده از داده‌های حاصل از RNA-seq در مسیر بیوسنتز کلاسترول که حد واسط سنتز دایوسجینین است، به اثبات رسیده است. آنزیم $\Delta 7$ -reductase با شکستن یک پیوند دوگانه در موقعیت D-7، منجر به تشکیل کلاسترول می‌شود (*Ciura et al.*, 2017). در حقیقت این ژن با شکستن پیوند دوگانه در موقعیت کربن شماره هفت، آخرین مرحله از بیوسنتز کلاسترول را کاتالیز می‌کند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تظاهر ژن $\Delta 7$ -reductase تحت تاثیر سطوح مختلف

سدهای دفاعی از گیاه در برابر شرایط نامساعد محیطی، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی محافظت می‌کند و از این طریق سبب حفظ محتوی کلروفیل و کاروتنوئیدها می‌شود (Dole and Wilkins, 1999). ملاتونین از طریق افزایش سنتز درونی پلی‌آمین‌های اسپرمیدین (Spermidine) و اسپرمین (Spermine) از طریق تحریک تظاهر ژن‌های سنتزکننده آرژنین دکربوکسیلاز (Arginine Decarboxylase) و اورنیتین دکربوکسیلاز (Ornithine Decarboxylase) و تجمع بیشتر γ - بوتیریک اسید (γ -butyric acid) به واسطه تحریک تظاهر ژن‌های سنتزکننده گلوتامات دکربوکسیلاز (Gelotamate Decarboxylase) و پلی-آمین اکسیداز (Polyamine oxidase) و افزایش تجمع بیشتر پرولین از طریق افزایش تظاهر ژن‌های سنتزکننده پرولین - ۵- کربوکسیلات سینتاز (Proline 5-carboxylate synthase) و اورنیتین آمینوترانسفراز (Ornithine aminotransferase) و کاهش تظاهر ژن سنتزکننده پرولین دهیدروژناز (Proline Dehydrogenase)، منجر به افزایش مقاومت نسبت به تنش شوری می‌شود (Cao *et al.*, 2016).

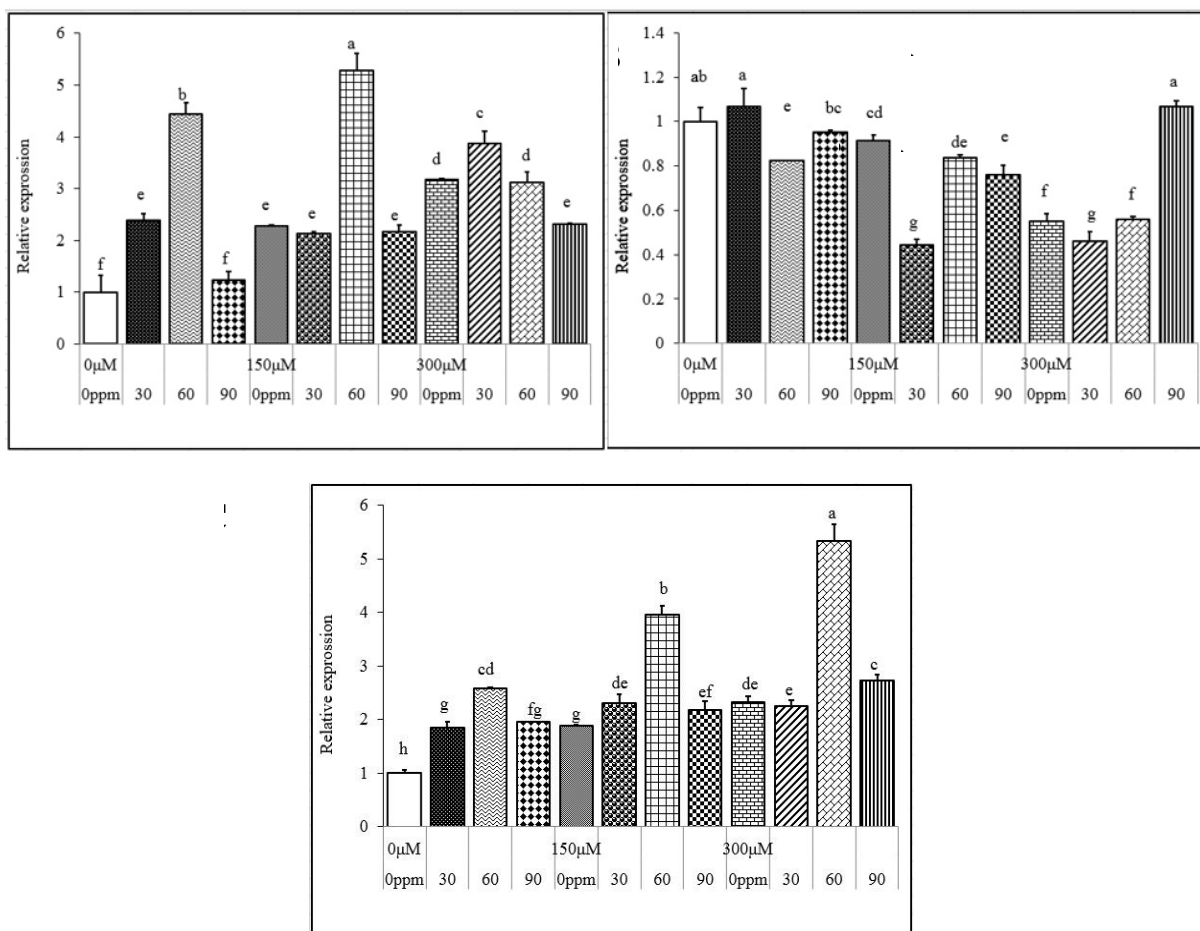
مولار تنش شوری و سطح ۶۰ ppm از ملاتونین نسبت به تیمار شاهد به ترتیب چهار و ۵/۲ برابر افزایش یافت. با توجه به نقش مهم این آنزیم در هدایت این مسیر به سمت تولید دایوسجنین و پاسخ مناسب این ژن به محرک‌های مورد استفاده در این تحقیق، به نظر می‌رسد که این ژن، کاندید مناسبی برای مهندسی کردن مسیر بیوسنتز دایوسجنین باشد (شکل ۲C).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ملاتونین و تنش شوری به‌عنوان تحریک‌کننده‌های عملکردی، تظاهر ژن‌های دخیل در مسیر دایوسجنین را افزایش می‌دهند. ملاتونین بر ترکیب اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌های گیاهان در شرایط شوری تاثیر می‌گذارد و با افزایش مقدار قند قابل احیا، سبب افزایش سنتز ترکیبات ثانویه و مقاومت گیاه در برابر تنش شوری می‌شود (Tavarini *et al.*, 2008; Thomas, 2013). ترکیبات ایندولی از جمله ملاتونین، با تاثیر بر فرآیندهایی مانند فتوسنتز، تنفس، جذب یون، نفوذپذیری غشا، فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌ها و میزان رشد را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Zheng *et al.*, 2013). در حقیقت، ملاتونین به‌عنوان یکی از اولین



شکل ۱- مقایسه میانگین اثرات دوگانه تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر تظاهر ژن‌های CAS (A) و C22-hydroxylase (B). ستون‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند. تظاهر تمامی تیمارها با توجه به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار شاهد نرمال شده‌اند.

Figure 1. Mean comparison of the reciprocal effects of salinity and melatonin concentration on A) CAS and B) C22-hydroxylase expression. Columns with the same letters are not significantly different based on Duncan test at 1% of probability level. Expression of all treatments was normalized compared to control based on $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات دوگانه تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر تظاهر ژن‌های A) $\Delta 7$ - reductase, B) BGL و C) $C4$ -demethylase. ستون‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند. تظاهر تمامی تیمارها با توجه به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار شاهد نرمال شده‌اند.

Figure 2. Mean comparison of the reciprocal effects of salinity and melatonin concentration on A) $\Delta 7$ -reductase, B) BGL and C) $C4$ -demethylase. Columns with the same letters are not significantly different based on Duncan test at 1% of probability level. Expression of all treatments was normalized compared to control based on $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula.

پروتئین کینازها و NADPH اکسیدازها، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت تظاهر ژن‌های دفاعی در سلول‌های گیاهی کنترل می‌شود (Jacobo-Velázquez *et al.*, 2015). ژن‌های بررسی شده در این تحقیق، با توجه به پروفایل تظاهرشان، به سه گروه مختلف تقسیم می‌شوند؛ گروه اول شامل ژن‌های $C22$ -hydroxylase و $\Delta 7$ - reductase، که عکس‌العمل اندکی نسبت به تیمارهای آزمایش از خود نشان دادند (تظاهر آن‌ها در برخی از تیمارها نسبت به شرایط شاهد کاهش یافت)، گروه دوم شامل ژن‌ها BGL و CAS ، که تظاهرشان در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار (تنش ملایم) و ترکیب با

در این پژوهش، کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به صورت معنی‌داری منجر به افزایش تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در گیاهان تیمار نشده و تیمار شده با سطوح مختلف تنش شوری شد. با توجه به نقش دفاعی متابولیت‌های ثانویه در تنش‌های زیستی و غیرزیستی، این افزایش تظاهر که با هدف افزایش محتوی متابولیت ثانویه به منظور افزایش تحمل گیاه صورت گرفته است، منطقی به نظر می‌رسد. متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به محرک‌ها، پس از مجموعه‌ای از واکنش‌های فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون پروتئین‌های غشای سلول، شکل‌گیری جریان کلسیمی، فعال شدن

محرك، مرحله رشدی و غلظت‌های مختلف محرك‌ها بسیار متفاوت است؛ بنابراین شناسایی بهترین محرك، حساس‌ترین مرحله رشدی گیاه و مناسب‌ترین غلظت محرك‌ها، از فاکتورهای موثر در افزایش کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاهی محسوب می‌شوند. نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد ملاتونین، تیمار شوری و یا اثرات متقابل آن‌ها به‌صورت موثری منجر به افزایش تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق در مهندسی مسیر بیوسنتز دایوسجنین به‌منظور دست‌ورزی ژن‌ها و افزایش تظاهر آن‌ها با هدف تولید بیشتر این متابولیت ارزشمند موثر خواهد بود.

۶۰ ppm (غلظت متوسط) به‌صورت کاملاً معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت و در گروه سوم، ژن C4-demethylase قرار دارد، زیرا تظاهر این ژن در تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار و ترکیب با ۶۰ ppm ملاتونین به‌صورت کاملاً معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج متناقضی در مورد استفاده از محرك‌های مختلف و تغییرات محتوی متابولیت‌های ثانویه وجود دارد؛ این بدین معنی است که گیاهان مختلف پاسخ‌های متفاوتی نسبت به محرك‌ها از خود نشان می‌دهند. پاسخ گیاهان با توجه به مدت زمان در معرض بودن

REFERENCES

- Babaei, M. J., Heidari, P. & Ebragimi, A. (2020). *The effects of TiO2 nanoparticles on physiological and molecular properties of fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) under cold stress*. M.sc. Thesis. Faculty of Agriculture. Shahrood University of Technology, Iran.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839-851.
- Cao, S., Song, C., Shao, J., Bian, K., Chen, W. & Yang, Z. (2016). Exogenous melatonin treatment increases chilling tolerance and induces defence response in harvested peach fruit during cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(25), 5222-5215.
- Chaudhary, S., Chaudhary, P. S., Chikara, S. K., Sharma, M. C. & Iriti, M. (2018). Review on fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) and its important secondary metabolite diosgenin. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 22-31.
- Chaudhary, S., Chikara, S. K., Sharma, M. C., Chaudhary, A., Alam Syed, B., Chaudhary, P. S., Mehta, A., Patel, M., Ghosh, A. & 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.
- Ciura, J., Bocian, A., Kononiuk, A., Szeliga, M., Jaromin, M. & Tyrka, M. (2017). Proteomic signature of fenugreek treated by methyl jasmonate and cholesterol. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(5), 112.
- Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M. & Tyrka, M. (2018). Changes in fenugreek transcriptome induced by methyl jasmonate and steroid precursors revealed by RNA-Seq. *Genomics*, 110(4), 267-276.
- Dini, M. (2006). *Scientific Name of Medicinal Plants Used in Traditional Medicine*. (pp. 299-300.) Forest and Rangeland Research Institute Publication.
- Dole, J. M. & Wilkins, F. H. (1999). *Floriculture: Principles and Species*. (pp. 356-360.) Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Dubbels, R., Reiter, R. J. & Klenke, E. (1995). Melatonin in edible plants identified by radio immunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18, 28-31.
- Ebrahimibasabi, E., Ebrahimi, A., Momeni, M. & Reza Amerian, M. (2020). Elevated expression of diosgenin-related genes and stimulation of the defense system in *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) by cold plasma treatment. *Scientia Horticulturae*, 271, 109494.
- Eich, E. 2008. Solanaceae and Convolvulaceae: *Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)*. Springer Science & Business Media.
- ElSayed, A. I., Boulila, M., Rafudeen, M. S., Mohamed, A. H., Sengupta, S., Rady, M. & Omar, A. A. (2020). Melatonin regulatory mechanisms and phylogenetic analyses of melatonin biosynthesis related genes extracted from peanut under salinity stress. *Plants*, 9(7), 854.

14. Farhoudi, R., Modhej, A. & Afrouz, A. (2015). Effect of salt stress on physiological and morphological parameters of rapeseed cultivars. *Journal of Scientific Research and Development*, 2 (5), 111-117.
15. Feng, Z. T., Deng, Y. Q., Zhang, S. C., Liang, X., Yuan, F., Hao, J. L., Zhang, J. C., Sun, S. F. & Wang, B. S. (2015). K⁽⁺⁾ accumulation in the cytoplasm and nucleus of the salt gland cells of *Limonium bicolor* accompanies increased rates of salt secretion under NaCl treatment using NanoSIMS. *Plant Science*, 238, 286-296.
16. Guo, J. R., Li, Y. D., Han, G., Song, J. & Wang, B.S. (2018). NaCl markedly improved the reproductive capacity of the euhalophyte *Suaeda salsa*. *Functional Plant Biology*, 45, 350-361.
17. Hasanuzzaman, M., Nahar, K. & Fujita, M. (2013). *Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages*. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV (eds.). New York, USA, Springer.
18. Hawrylak-Nowak, B. (2009). Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. *Biological Trace Element Research*, 132, 259-269.
19. Jacobo-Velázquez, D. A., González-Agüero, M. & Cisneros-Zevallos, L. (2015). Cross-talk between signaling pathways: the link between plant secondary metabolite production and wounding stress response. *Scientific Reports*, 5, 8608.
20. Kooti, W., Servatari, K., Behzadifar, M., Asadi-Samani, M., Sadeghi, F., Nouri, B. & Zare Marzouni, H. (2017). Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: review study. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4), 982-995.
21. Lepesheva, G. I. & Waterman, M. R. (2007). Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(3), 467-477.
22. Liu, Q. Q., Liu, R. R., Ma, Y. C. & Song, J. (2018). Physiological and molecular evidence for Na⁺ and Cl⁻ exclusion in the roots of two *Suaeda salsa* populations. *Aquatic Botany*, 146, 1-7.
23. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods*, 25(4), 402-408.
24. Mandegari, M., Pournamdari, M., Sharififar, F., Pournourmohammadi, S., Fardiar, R. & Sholi, S. (2012). Alkaloid and flavonoid rich fractions of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum L.*) with antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2503-2507.
25. Martinez, V., Nieves-cordones, M., Lopez-delacalle, M., Rodenas, R., Mestre, T. C., Garcia-sanchez, F., Rubio, F., Nortes, P. A., Mittler, R. & Rivero, R. M. (2018). Tolerance to stress combination in tomato plants: New insights in the protective role of melatonin. *Molecules*, 23, 535.
26. McAdam, S. A., Eléouët, M. P., Best, M., Brodribb, T. J., Carins, M., Murphy, S. D., Dalmais, M., Dimitriou, T., Gélinas-Marion, A. & Warwick, M. (2017). Linking auxin with photosynthetic rate via leaf venation. *Plant Physiology*, 175 (1), 351-360.
27. Mohammadi, M., Mashayekh, T., Rashidi-Monfared, S., Ebrahimi, A. & Abe, D. (2019). New insights into diosgenin biosynthesis pathway and its regulation in *Trigonella foenum-graecum L.* *Phytochemical Analysis*, 31 (2), 1-13.
28. Mozafarian, V. (1995). *Plants Names Dictionary of Iran*. (pp.558) Farhang Moaser Publication.
29. Nxele, X., Klein, A. & Ndimba, B. K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, 108, 261-266.
30. Oksman Caldentey, K. M. & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440.
31. Shaha, S., Ebrahimi, A., Heidari, P. & Amerian, M. R. (2019). *The study of brassinosteroeoid effect on diosgenin biosynthesis in trigonella foenum-graecum L. under high temperature codition*. M.sc. Thesis. Faculty of Agriculture. Shahrood university of Technology. Iran.
32. Talaat, N. B., Ghoniem, A. E., Abdelhamid, M. T. & Shawky, B. T. (2015). Effective microorganisms improve growth performance, alter nutrients acquisition and induce compatible solutes accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) plants subjected to salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 75, 281-295.
33. Tavarini, S., Innocenti, E. D., Remorini, D., Massai, R. & Guidi, L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 107, 282-288.
34. Thomas, H. (2013). Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist*, 197, 696-711.

35. Umemoto, N., Nakayasu, M., Ohshima, K., Yotsu-Yamashita, M., Mizutani, M., Seki, H., Saito, K. & Muranaka, T. 2016. Two cytochrome P450 monooxygenases catalyze early hydroxylation steps in the potato steroid glycoalkaloid biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 171(4), 2458-2467.
36. Varghese, N., Alyammahi, O., Nasreddine, S., Alhassani, A. & Gururani, M. A. (2019). Melatonin positively influences the photosynthetic machinery and antioxidant system of *Avena sativa* during salinity stress. *Plants*, 8(12), 610.
37. Vasanthi, R., Greeshma, G., Sowmya, K., Akhila, K., Saikumar, M., Shaistha, Rao K. N. V., Rajeswardutt K. & Ramana, H. (2017). A comparative study on phytochemical and in vitro antioxidant activity of *Trigonella foenum graecum* L. *Pharma Chemica*, 9(16), 22-24.
38. Zhang, J., Wang, L., Xie, W., Hu, S., Zhou, H., Zhu, P. & Zhu, H. (2020). Melatonin attenuates ER stress and mitochondrial damage in septic cardiomyopathy: A new mechanism involving BAP31 upregulation and MAPK-ERK pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2847-2856.
39. Zheng, X. L., Tian, S. P., Meng, X. H., & Li, B. Q. (2013). Physiological and biochemical responses in peach fruit to oxalic acid treatment during storage at room temperature. *Food Chemistry*, 104, 156–162.
- Zhou, C., Li, X., Zhou, Z., Li, C., & Zhang, Y. (2019). Comparative transcriptome analysis identifies genes involved in diosgenin biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. *Molecules*, 24(1), 140.