Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 52, No 3, Autumn 2021 (11-24)
DOI: 10.22059/IJFCS.2020.295770.654683

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۳، پائیز ۱۴۰۰ (ص۲۴-۱۱)

بررسی اثر ۲۴- اپی براسینواستروئید بر بیان برخی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تنش دمای بالا

شهلا شیخی[۱]، امین ابراهیمی*[۲]، پرویز حیدری[۲]، محمد رضا عامریان[۳]، سجاد رشیدی منفرد[٤]

۱و۲و۳- به‌ترتیب کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود،

٤- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۳)

چکیده

استفاده از تحریک‌کننده‌های مختلف از قبیل تنش‌های غیرزنده، تشعشعات و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف به‌منظور افزایش کمیت متابولیت‌های ثانویه، یکی از زمینه‌های تحقیقاتی جالب توجه به‌شمار می‌رود. این تحقیق با هدف بررسی اثر ۲٤-اپی براسینواستروئید بر تغییرات بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله تحت تنش دمای بالا، به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصافی انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن (Cycloartenol synthase) *CAS* در تیمار دمای بالا و سطح دو ppm از هورمون ۲٤- اپی‌براسینواستروئید در زمان ۲٤ ساعت پس از تنش (۲۷ برابر) به‌دست آمد. همچنین بیشترین میزان بیان ژن *SSR* در تیمار دمای نرمال و سطح پنج ppm در زمان ۲٤ ساعت به میزان ۳/۵ برابر مشاهده شد. کاربرد سطوح دو و پنج ppm از هورمون ۲٤-اپی‌براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا، به‌صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان ژن *SSR* شد. بیان ژن *SEP* (Squalene epoxidase) نسبت به شرایط دمای نرمال در سطوح دو و پنج ppm، به‌ترتیب ۲۰ و ۱۰ برابر افزایش یافت. کاربرد ۲٤-اپی‌براسینواستروئید بعد از گذشت ۲٤ ساعت، موجب افزایش بسیار معنی‌دار بیان ژن *SMT* (Sterol methyltransferase) به میزان شش برابر (نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و عدم کاربرد ۲٤-اپی‌براسینواستروئید) شد. بیان ژن *SQS* (Squalene synthase) با اعمال تیمار دمای بالا و سطوح مختلف ۲٤-اپی‌براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت. نتایج نشان داد که می‌توان از ۲٤-اپی-براسینواستروئید و تنش دمای بالا، به‌عنوان یک محرک مناسب به‌منظور افزایش بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و افزایش محتوی دایوسجنین استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش غیرزنده، دایوسجنین، شنبلیله، متابولیت‌های ثانویه.

The effect of 24-epi-brassinosteroid on the expression of some genes involved in the diosgenin biosynthetic pathway of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) under high temperature stress

Shahlla Sheikhi[1], Amin Ebrahimi*[2], Parviz Heidari[2], Mohamad Reza Amerian[3], Sajad Rashidi Monfared[4]

1,2,3. Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology,
4. Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: January 25, 2020 - Accepted: June 2, 2020)

ABSTRACT

The application of various stimulants, such as abiotic stress, radiation, and growth regulators to increase the quantity of secondary metabolites is one of the interesting research areas. The aim of this study was to investigate the effect of 24-epi-brassinosteroid on the expression of some genes involved in the diosgenin biosynthetic pathway of fenugreek under high temperature stress. The highest expression of cycloartenol synthase (27-fold) was observed at high temperature treatment and 2 ppm of 24-epi-brassinosteroid (at 24 h after heat stress), while the highest expression of *SSR* gene was 3.5 fold at normal temperature and 5 ppm 24-epi-brassinosteroid. Application of 2 and 5 ppm of 24-epi-brassinosteroid significantly increased squalene epoxidase expression during high temperature stress. Compared to normal condition, squalene epoxidase expression increased 20 and 10 fold at 2 and 5 ppm of 24-epi-brassinosteroid, respectively. Application of 24-epi-brassinosteroid (2 ppm) after 24 hours significantly increased the expression of sterol methyltransferase by 6-fold (Compared to 23°C and non-application of 24-epi-brassinosteroid). Interestingly, compared to normal condition, squalene synthase expression was decreased at high temperature treatment and different levels of 24-epi-brassinosteroid. The results showed that 24-epi-brassinosteroid (2 and 5 ppm) could be used as a suitable stimulus to enhance the expression of some genes involved in the biosynthesis pathway and subsequently to increase the content of the diosgenin.

Keywords: Abiotic stress, Diosgenin, Fenugreek, Gene expression, Secondary metabolites.

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

مقدمه

شنبلیله گیاهی علفی و یک‌ساله، متعلق به تیره بقولات[۱]، راسته گلسرخ[۲] و جنس *Trigonella L* می‌باشد. تاکنون ۷۰ گونه از این جنس شناسایی شده است که شامل گیاهان یک‌ساله تا چند ساله هستند (Dini, 2006). مهم‌ترین ویژگی دارویی در این گیاه، وجود مقادیر قابل توجهی دایوسجنین (Diosgenin) است که از آن برای تولید داروهای استروئیدی و هورمون‌هایی مانند تستوسترون[۳]، گلوکوکورتیکوئیدها[۴] و پروژسترون[۵] استفاده می‌شود (Joanna *et al.*, 2015). دایوسجنین یک ساپوژنین استروئیدی دارای خاصیت ضد کلسترولی و توموری است و برای درمان بیماری‌هایی همچون سرطان خون و روده کاربرد دارد. این ماده پیش‌ساز سنتز داروهایی مانند قرص‌های ضدبارداری، هورمون‌های جنسی و ترکیبات استروئیدی است (Ciura *et al.*, 2017).

دایوسجنین از طریق مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها[۶] تولید می‌شود. این مسیر با پیش‌ماده استیل کوآنزیم‌آ به ایزوپنتیل پیروفسفات[۷]می‌رسد (Abbasi *et al.*, 2011). برای تولید دایوسجنین، مسیر لانوسترول (Lanosterol) و کلسترول (Cholesterol) و مسیر سیکلوآرتنول (Cycloartenol) و حدواسط سیتواسترول (Cytosterol) پیشنهاد شده است. سیکلوآرتنول سنتاز (Cycloartenol synthase) و لانوسترول سنتاز (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 دایوسجنین و ژن‌های مهم این مسیر در مهندسی این متابولیت حیاتی به‌نظر می‌رسد. متاسفانه اطلاعات در مورد مسیر بیوسنتزی دایوسجنین در شنبلیله بسیار اندک می‌باشد و بیشتر اطلاعات در مورد این مسیر بیوسنتزی در سایر گیاهان مانند یام (*Dioscorea villosa*) و خانواده سولاناسه[۸] در دسترس است.

هورمون‌های گیاهی[۹]، نقش مهمی در تنظیم فعالیت‌های گیاهی بر عهده دارند. براسینواستروئیدها[۱۰] ششمین گروه از هورمون‌های گیاهی هستند که بعد از اکسین[۱۱]، جیبرلین[۱۲]، سیتوکنین[۱۳]، اتیلن[۱۴] و آبسزیک اسید[۱۵] در سال ۱۹۷۰ از دانه گرده گیاه کلزا استخراج شدند. براسینواستروئیدها در رشد گیاهان متعدد و فرآیندهای رشد همچون طویل شدن سلول، نور-ریخت‌زایی (Photomorphogenesis)، کنترل زمان گل‌دهی و واکنش‌ها به تنش نقش دارند (Anwar *et al.*, 2018). خواب بذر یا جوانه‌زنی در گیاهان، تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. جیبرلین‌ها (GAها)، براسینوستروئیدها (BRها)، اسید آبسزیک (ABA)، سیتوکینین (CK)، اتیلن، اسید سالیسیلیک (SA) برای رشد و جوانه زنی گیاهان ضروری هستند (Jager *et al*., 2008).

در یک تحقیق، برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین با روش طراحی آغازگرهای دژنره[۱۶] شناسایی و جداسازی شدند و رابطه بین میزان بیان این ژن‌ها و محتوی دایوسجنین (با استفاده از HPLC[۱۷]) در نه توده شنبلیله با محتوی دایوسجنین متفاوت بررسی شد (Mohammadi *et al*., 2019). در یک پژوهش، تغییرات محتوی دایوسجنین در گیاهچه‌های شش توده شنبلیله تحت تیمار جاسمونیک اسید بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که سطوح مختلف جاسمونیک اسید، منجر به تغییر در میزان بیان ژن‌های 3-hydroxy-3-

[1] *-Legouminosae*
[2] *-Rosaceae*
[3] Testosterone
[4] Glucocorticoids
[5] Progesterone
[6] Isoprenoids
[7] Isopentyl pyrophosphate
[8] *Solanaceae*
[9] Phytohormones
[10] Brassinosteroids
[11] Auxin
[12] Gibberellin
[13] Cytokinin
[14] Ethylene
[15] Abscisic acid
[16] Degeberate
[17] High Performance Liquid Chromatography

HMG (Sterol- و methylglutaryl-CoA reductase) *STRL* (3-β-glucosyl transferase) به‌ترتیب به میزان ۳/۲ و ۲۲/۲ برابر می‌شود. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که جاسمونیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک محرک مناسب در افزایش کمیت دایوسجنین در شنبلیله موثر باشد (Chaudhary *et al*., 2015). اثر کاربرد اتیلن بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیان برخی ژن‌های مسیر دایوسجنین و همچنین محتوی آن بررسی شد. در این تحقیق، از چهار غلظت مختلف اتفن[1] (10^{-1}تا 10^{-4}) استفاده شد و نتایج نشان داد که غلظت‌های بالای اتفن، مانع از رشد گیاه یام (*Dioscorea zingiberensis*) می‌شود، درحالی‌که غلظت‌های پایین، تحریک‌کننده رشد بودند. محتوی دایوسجنین در غلظت 10^{-3} اتفن، به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین محتوی پروتئین کل و کلروفیل به‌ترتیب در غلظت‌های 10^{-2} و 10^{-3} به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافتند. کاربرد اتفن نیز منجر به افزایش بیان ژن *SQS* و کاهش بیان *CAS* شد (Diarra *et al*., 2013).

بیشتر متابولیت‌ها از گیاهان استخراج می‌شوند و ارزش متابولیت‌های ثانویه در درمان بیماری‌ها غیر قابل انکار است. دایوسجنین عموما از غده‌های گیاه یام استخراج می‌شود؛ اگرچه استخراج آن از ریشه گیاه یام به علت بالا بودن نشاسته، دشوار و گرانقیمت است. طول مدت رشد این گیاه دو سال است (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 دوره رشد آن دو الی سه ماه است و با اکثر اقلیم‌ها نیز سازگار است (Acharya *et al*., 2008). گیاهان مخصوصا گیاهان دارویی، با انتقال از محیط زندگی خود (محیط بومی) به محیط زراعی، تحت تاثیر قرار می‌گیرند و میزان متابولیت ثانویه در آن‌ها کاهش می‌یابد (Tetenyi, 2002; Gorelick and Bernstein, 2014).

شنبلیله دارای طبیعت گرم و خشک است و به‌علت زمستانه بودن، نسبت به دماهای پایین مقاوم است، اما در طول رویش، به هوای نسبتا گرم نیاز دارد؛ اگرچه وقوع دماهای بالا (بالاتر از ۳۵ درجه سانتیگراد) (Pant *et al.,* 2013; Osman *et al.,* 2015) به این گیاه آسیب می‌رساند (Helambe and Dandeh, 2012). دمای هوای کره زمین در چند دهه اخیر در حال افزایش است و این افزایش دما در حال تبدیل شدن به یک مشکل جهانی می‌باشد، چرا که گیاهان و عملکرد آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Lamaouie *et al.,* 2018). با توجه به اهمیت دایوسجنین در شنبلیله به‌عنوان یک متابولیت ارزشمند، استفاده از محرک‌های مختلف به‌منظور افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین و متعاقبا محتوی دایوسجنین ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی آثار تنش دمای بالا و هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (به‌عنوان دو محرک افزایش بیوسنتز دایوسجنین) بر بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین انجام شد. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند در مهندسی مسیر بیوسنتز دایوسجنین مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و اعمال تیمار

این آزمایش، به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. تیمارهای این آزمایش شامل هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید در چهار سطح (صفر، دو، پنج و ۱۰ ppm) و دو شرایط دمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد (تنش دمای بالا) و ۲۳ درجه سانتی‌گراد (دمای نرمال) (Pant *et al.,* 2013; Osman *et al.,* 2015) و سه بازه زمانی صفر، شش و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بودند. در این آزمایش، ابتدا بذرهای گیاه شنبلیله (رقم همدان) ضدعفونی و در گلدان‌های ۲۰ سانتی‌متری با ترکیب پیت ماس و پرلیت در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی کشت شدند. گیاهان پنج هفته‌ای با سه سطح هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید اسپری-

[1] Ethephon

پاشی شدند. تعدادی از گلدان‌ها در شرایط نرمال و تعدادی دیگر به اتاقک رشد به‌منظور اعمال تنش گرمایی منتقل شدند. سپس در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت پس از تنش دمای بالا، از برگ‌های گیاه نمونه-برداری شد و نمونه‌ها بلافاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX Plus (شرکت سیناکلون- کد محصول RN7713C) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور حذف آلودگی‌های DNA، یک میکروگرم از RNA استخراج شده تحت تیمار DNAse I قرار گرفت. در ضمن، کیفیت و کمیت RNA با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد.

ساخت cDNA

به‌منظور ساخت cDNA، از آغازگر Oligo (dT) برای اتصال به دم پلی‌آدنین mRNA استفاده شد. برای ساخت cDNA، از کیت HyperScript Reverse transcriptase (GeneALL) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

طراحی آغازگرها

متاسفانه پیچیدگی‌ها و نکات مبهم زیادی در این مسیر وجود دارد و تاکنون مطالعه کاملی بر روی ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در گیاه شنبلیله انجام نشده است. آغازگرها (جدول ۱) با استفاده از برنامه آنلاین Primer 3 Plus طراحی شدند و به‌منظور کنترل صحت آن‌ها، از برنامه Analyzer v.3.1 Oligo (http://eu.idtdna.com/calc/analyzer) استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آن‌ها

Table 1. Primers used in this study and their characteristics

Primer name	Primer Sequence (5′ - 3′)		Accession number	Position on the chromosome	Length (bp)	Annealing temperature
	Forward	Reverse				
SSR	AGGTGGGAGATATGCTAGAATGGG	CATTCTGTGTGTCTCCCTGCC	MK060115.1	1066-1218	152	61
SMT	GAGAAGGCTGCAGAGGGTCTAG	CACAGTAACTCATGACAACAGCAACCT	MK060114.1	806-946	140	62
SEP	CTATTCTCAGAAGGACCGATCTC	CAGATGCACCAGAGAGTAATCG	KX14846	1318-1486	168	60
CAS	AAGAGAGATCCAACACCACTGC	TACATGACGACGGTATTCTCCC	KX148475.1	2080-2259	17	60
SQS	GGCTCAACCATGATTCTCATACTG	TACCCACTGTTCCATTGCTATCC	KX148475.1	1162-1295	133	61
GAPDH (Reference)	ATGTTAAATGATGCAGCCCTTCCACCTCTC	TATGTTTGTTGTTGGTGTCAACGAGCAACGAATACAAG	XM_010679634.2	429-729	230	61

بررسی صحت سنتز آغازگرها و انجام واکنش PCR زمان واقعی

به منظور اطمینان از ساخت صحیح cDNA و کارکرد آغازگرهای طراحی شده قبل از بررسی بیان ژن‌های مورد نظر، ابتدا تکثیر نواحی هدف توسط PCR معمولی انجام شد. 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 زیستی و دو تکرار تکنیکی انجام شدند. به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی اجزا، از کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR زمان واقعی، با استفاده از دستگاه ABI Step one و مطابق با اجزا جدول ۲ انجام شد. 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، ۴۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی

به‌منظور تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی، بیان نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی[1] بر پایهٔ فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) محاسبه شد، که مطابق آن، میزان بیان ژن (cDNA حاصل از رونوشت) برابر با دو به توان منفی تفاوت

[1]Relative standard curve method

آستانه سیکل ژن هدف تحت تنش و ژن مرجع متناظر آن منهای تفاوت میانگین‌های آستانه سیکل ژن هدف بدون تنش و ژن مرجع متناظر (*GAPDH*) آن است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

جدول ۲- اجزای مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی
Table 2. Compounds used in real-time PCR reaction

Materials	Volumes (µl)	Concentration
Nuclease Free Water	3	-
cDNA	1	$ng\mu l^{-1}$ 50
Forward Primer	0.5	$pmol\mu l^{-1}$ 10
Reverse Primer	0.5	$pmol\mu l^{-1}$ 10
SYBR®Green PCR Master Mix	5	2X
Total	10	-

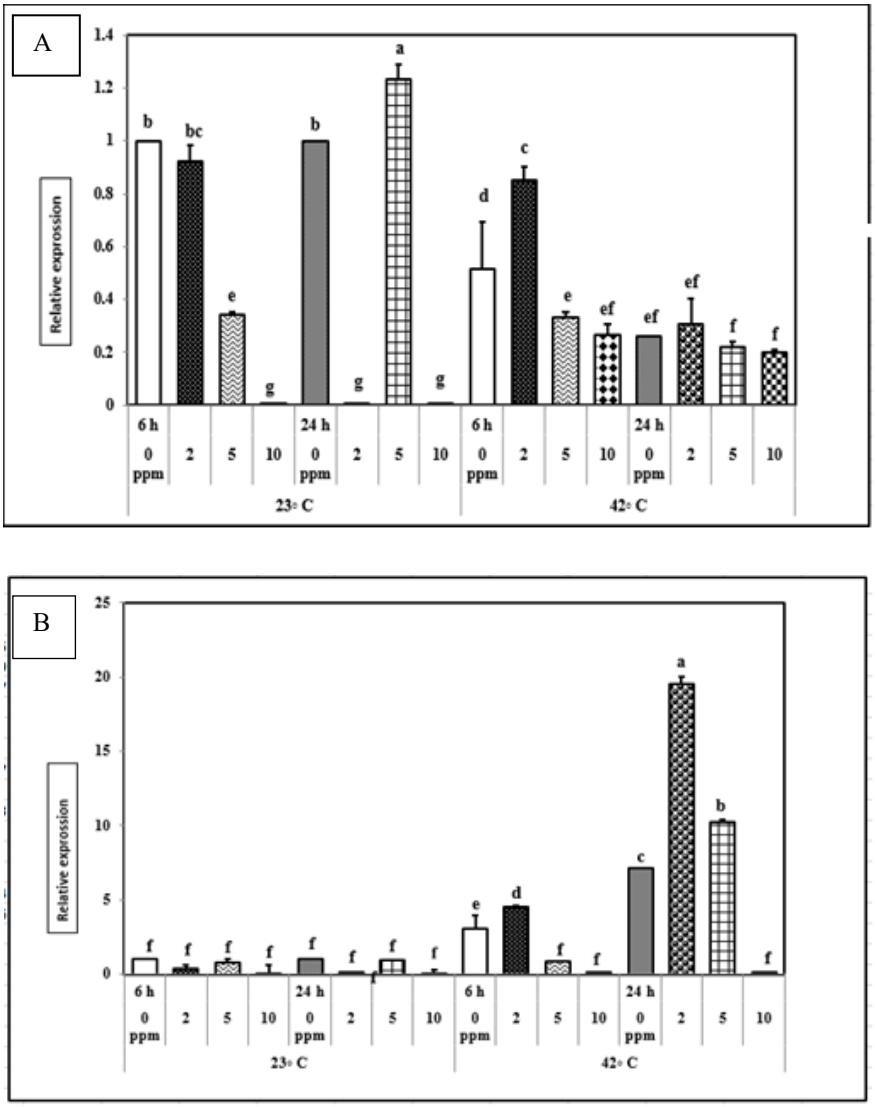
نتایج و بحث

بیان ژن (Squalene synthase) *SQS*

بیان ژن *SQS* در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و در زمان شش ساعت پس از کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، در هر سه سطح هورمون کاهش یافت؛ اگرچه این کاهش در سطح دو ppm معنی‌دار نبود (شکل ۱، A). بیان این ژن در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد)، در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار با سطح پنج ppm هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت معنی‌داری افزایش و در سایر سطوح کاهش یافت. بیان ژن مذکور در شرایط تنش دمای بالا کاهش یافت؛ اگرچه کاربرد سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به شرایط دمای بالا و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید شد. بیان ژن *SQS* در شرایط نرمال دمایی و ۲۴ ساعت پس از تیمار با سطح پنج ppm ۲۴-اپی‌براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال دمایی و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید ۱/۲ برابر افزایش یافت. بیان این ژن در شرایط دمای نرمال و ۲۴ ساعت پس از تیمار با ۲۴-اپی‌براسینواستروئید برابر با یک بود و اختلاف معنی‌داری با تیمار دمای نرمال و شش ساعت پس از تیمار ۲۴-اپی-براسینواستروئید نداشت.

بیان ژن (Squalene epoxidase) *SEP*

بیان ژن *SEP* در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) بدون کاربرد و یا با کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت، تغییر چندانی نداشت (شکل ۱، B)، درحالی‌که اعمال تنش دمای بالا در هر دو زمان شش و ۲۴ ساعت، منجر به افزایش معنی‌دار بیان این ژن شد. در زمان اعمال تنش دمای بالا و دو ppm ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، بیان این ژن به میزان پنج برابر نسبت به شرایط دمای نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) افزایش یافت. کاربرد سطوح دو و پنج ppm از هورمون ۲۴-اپی-براسینواستروئید در زمان اعمال تنش دمای بالا، به-صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان این ژن شد، به‌طوری‌که بیان این ژن در این دو تیمار نسبت به شرایط دمای نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید)، به‌ترتیب ۲۰ و ۱۰ برابر افزایش یافت. همچنین بیان این ژن، شش ساعت پس از شروع دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید نسبت به دمای نرمال، سه برابر افزایش یافت. این در حالی‌است که تیمار دو ppm ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، شش ساعت پس از تنش شروع تنش دمای بالا، منجر به افزایش چهار برابری این ژن نسبت به دمای تیمار دمای نرمال و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید شد.



شکل ۱- اثرات سه‌گانه دما، زمان و غلظت‌های ۲۴- اپی‌براسینواستروئید بر بیان ژن‌های A) *SQS* و B) *SEP*. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌هایی با حروف مشابه، دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) نرمال شده‌اند.

Figure 2. Triple interaction effects of temperature, time and concentration of 24-epi-brossinosteroid on A) *SQS* and B) *SEP* expression (B). (Mean comparison was performed by Duncan test at 1% of probability level. Columns with similar letters are not significantly different). Expression of all treatments was normalized to normal temperature (23°C and Non-application of 24-epi-brassinosteroid) according to the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

بیان ژن *CAS* (Cycloartenol synthase)

بیان این ژن در شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) با کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت در برخی از سطوح به‌صورت معنی‌داری نسبت به همین تیمار دمایی و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید افزایش یافت (شکل ۲A). بیان ژن *CAS* در شرایط دمای نرمال و در زمان شش ساعت و سطوح پنج و ۱۰ ppm به میزان شش برابر و در زمان ۲۴ ساعت و در سطح دو و پنج ppm نیز به میزان ۱۰ برابر افزایش یافت. تنش دمای بالا و کاربرد

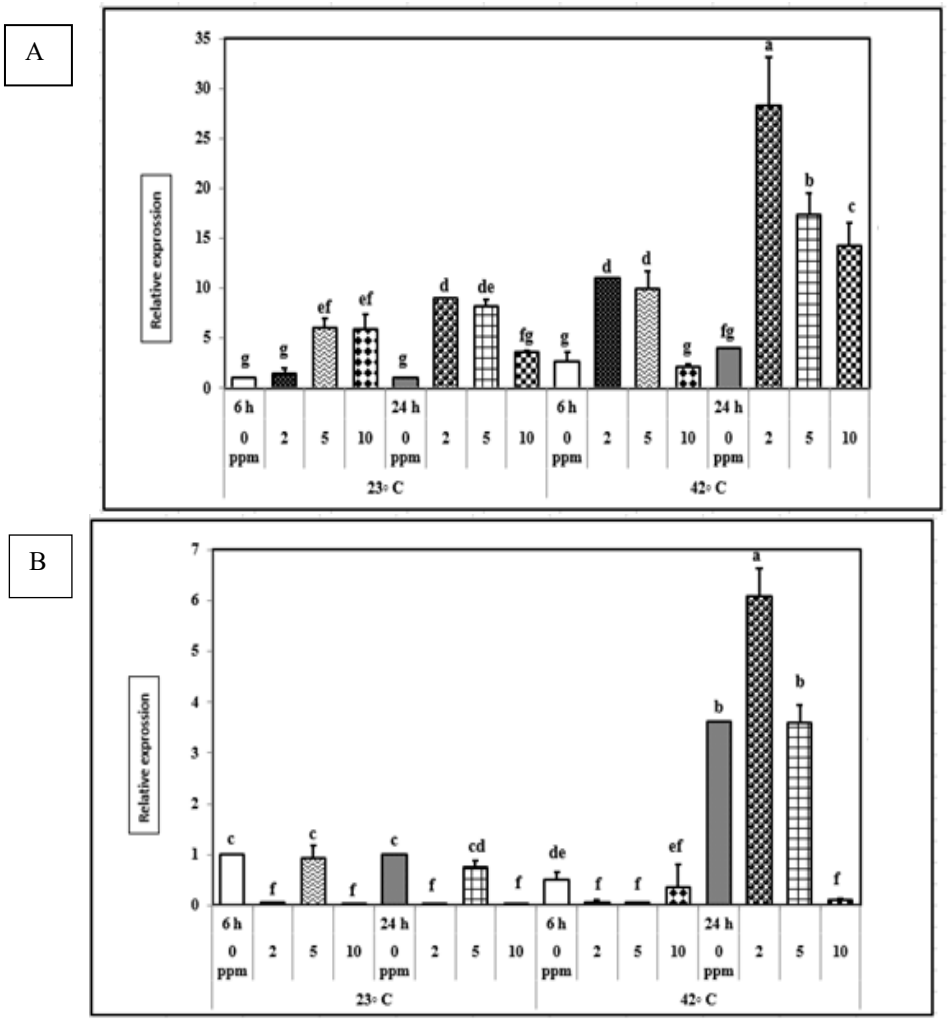
۲۴-اپی‌براسینواستروئید، بیان این ژن را نسبت به شرایط تنش دمای بالا و بدون کاربرد ۲۴-اپی براسینواستروئید افزایش داد. بیشترین میزان بیان این ژن، در تیمار دمای بالا و سطح دو ppm از ۲۴-اپی براسینواستروئید در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش (۲۷ برابر) به‌دست آمد؛ اگرچه در همین تیمار دمایی، سایر سطوح (پنج و ۱۰ ppm) نیز به‌صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان این ژن شدند. بیان این ژن در تیمار دمای بالا (۲۴ ساعت) و پس از کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید با سطوح پنج و ۱۰ ppm نسبت دمای نرمال و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، به‌ترتیب ۱۶ و ۱۳ برابر افزایش یافت.

بیان ژن (Sterol methyltransferase) *SMT*

میزان بیان ژن *SMT* در شرایط دمایی نرمال در سطوح دو و ۱۰ ppm کاهش و در سطح پنج ppm نسبت به شاهد (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید) تغییری نداشت (شکل ۲، B). به عبارت دیگر، کاربرد سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، منجر به افزایش در میزان بیان این ژن نشد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تنش دمای بالا (بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینواستروئید)، بیان ژن مذکور به‌صورت بسیار معنی‌داری افزایش یافت. بیان ژن *SMT* در شرایط تنش دمای بالا و زمان شش ساعت در سطوح دو و پنج ppm، به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت؛ اگرچه این کاهش در سطح ۱۰ ppm معنی‌دار نبود. کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید (دو ppm) بعد از گذشت ۲۴ ساعت، موجب افزایش بسیار معنی‌دار در بیان ژن *SMT* به میزان شش برابر شد. تیمار ۱۰ ppm هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بعد از گذشت ۲۴ ساعت، بیان ژن *SMT* را به‌صورت معنی‌داری کاهش داد. بیان این ژن در تیمار دمای بالا، ۲۴ ساعت پس از شروع تنش دمای بالا (بدون کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید) و بعد از تیمار با ۲۴-اپی-براسینواستروئید (پنج ppm) و تنش دمای بالا نسبت به تیمار دمای نرمال و بدون کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید، به‌ترتیب ۳/۸ و ۳/۹ برابر افزایش یافت. دو ژن *SSR* و *SMT* در مسیر بیوسنتز دایوسجنین با یکدیگر رقابت می‌کنند، به‌طوری‌که ژن *SSR* مسیر را به سمت بیوسنتز دایوسجنین و ژن *SMT* مسیر را به سمت بیوسنتز براسینواستروئید هدایت می‌کند (Mohammadi 2020 ;Zolfaghari *et al.*, 2020 *et al.*,). در این تحقیق، بیان ژن *SMT* با اعمال تیمار دمای بالا افزایش یافت و احتمالا مسیر به سمت سنتز براسینواستروئید هدایت می‌شود، درحالی-که بیان ژن *SSR* با اعمال تیمار دمای بالا تا حدودی کاهش یافت. احتمالا تنش دمایی بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد) دارای اثر معکوسی بر بیان ژن *SSR* می-باشد و منجر به کاهش بیوسنتز دایوسجنین می‌شود. در تنش دمایی بالا، شنبلیله تمایل بیشتری به سنتز براسینواستروئید نسبت به دایوسجنین دارد تا قادر به تحمل تنش دمای بالا باشد.

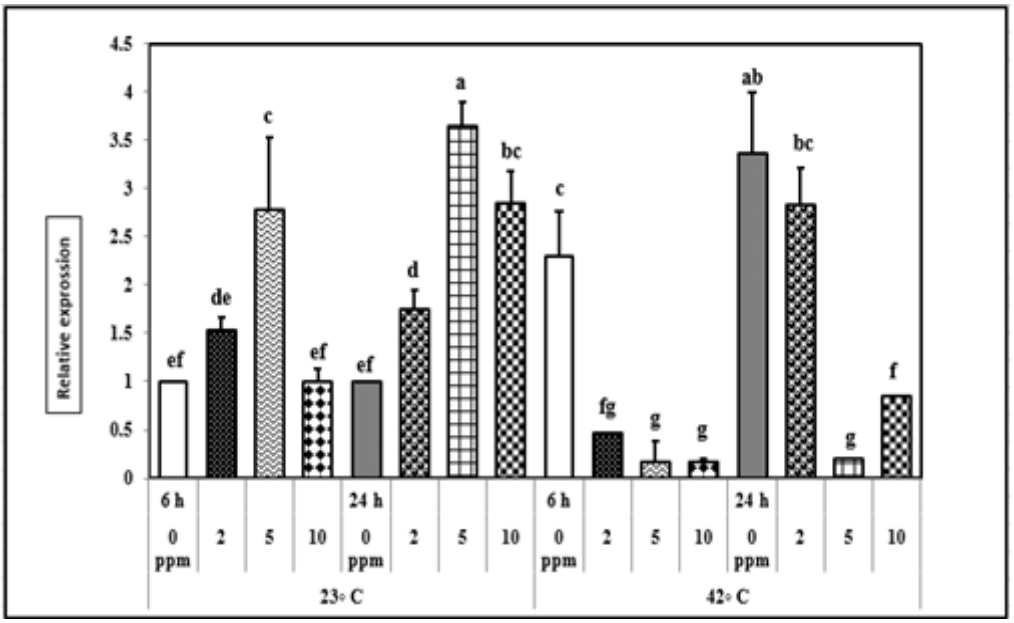
بیان ژن (Sterol side chain reductase) *SSR*

نتایج بیان نسبی ژن *SSR* در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بیان ژن *SSR* تحت شرایط نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) با کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید در زمان‌های شش و ۲۴ ساعت، به-صورت معنی‌داری تغییر یافت (شکل ۳). همچنین در شرایط نرمال، کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در سطح پنج ppm در هر دو زمان ۲۴ و شش ساعت، منجر به افزایش بیان این ژن به میزان ۲/۶ و ۳/۵ برابر شد. بدون کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، بیان ژن *SSR* تحت تنش دمای بالا افزایش یافت. کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در هر دو زمان، بیان این ژن را نسبت به شرایط دمای بالا و بدون تیمار با ۲۴-اپی-براسینواستروئید کاهش داد. بیشترین میزان بیان ژن *SSR* در تیمار دمای نرمال و سطح پنج ppm در زمان ۲۴ ساعت به میزان ۳/۵ برابر به‌دست آمد. بیان این ژن، ۲۴ ساعت پس از شرایط دمای بالا و با کاربرد دو ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید ۲/۹ برابر افزایش یافت.



شکل ۲- اثرات سه‌گانه دما، زمان و غلظت‌های ۲۴- اپی‌براسینواستروئید بر بیان ژن‌های A) *CAS* و B) *SMT*. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌هایی با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد و عدم کاربرد ۲۴- اپی‌براسینواستروئید) نرمال شده‌اند.

Figure 2. Triple interaction effects of temperature, time, and concentration of 24-epi-brossinosteroid on A) *CAS* and B) *SMT* expression. (Mean comparison was performed by Duncan test at 1% of probability level. Columns with similar letters are not significantly different). Expression of all treatments was normalized to normal temperature (23°C and Non-application of 24-epibrassinosteroid) according to the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.



شکل ۳- اثرات سه‌گانه دما، زمان و غلظت‌های ۲۴- اپی‌براسینواستروئید بر بیان ژن *SSR*. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌هایی با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد و عدم کاربرد ۲۴- اپی براسینواستروئید) نرمال شده‌اند.

Figure 2. Triple interaction effects of temperature, time, and concentration of 24-epi-brossinosteroid on *SSR* expression (Mean comparison was performed by Duncan test at 1% of probability level. Columns with similar letters are not significantly different). Expression of all treatments was normalized to normal temperature (23°C and Non-application of 24-epi-brassinosteroid) according to the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

این درحالی‌است که بیان ژن *SSR* در تیمار دمای بالا و کاربرد پنج ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد ۲۴-اپی براسینواستروئید، ۰/۲ بود؛ این بدین معنی است که بیان این ژن پنج برابر کاهش یافت.

ژن اسکوالن سنتاز (*SQS*)، 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[1] و تری‌ترپن‌ها[2] به اثبات رسیده است.

اسکوالن سنتاز، اولین مرحله آنزیمی مسیر ایزپرونوئیدها[3] را در بیوسنتز استرول و تری‌ترپن‌ها کاتالیز می‌کند. نتایج یک تحقیق نشان داد که بیان ژن *CAS* و *SQS* با کاربرد سطوح مختلف اتفن به‌ترتیب کاهش و افزایش می‌یابند (Diarra *et al*., 2013). نتایج تحقیق حاضر با نتیجه پژوهش Diarra *et al*. در هر دو ژن متناقض بود؛ این تناقض احتمالا به علت پاسخ متفاوت دو گیاه شنبلیله و یام به اتفن و ۲۴-اپی‌براسینواستروئید می‌باشد. همچنین این تناقض ممکن است به علت پاسخ متفاوت هر یک از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین به این دو تیمار باشد. مسیر بیوسنتز دایوسجنین، دارای پیچیدگی‌های زیادی است (Mohammadi *et al*., 2019)؛ بنابراین لزوم تحقیقات بیشتر در مورد شناسایی ابهامات این مسیر و شناسایی محرک‌های مناسب به‌منظور افزایش بیان این ژن‌ها و متعاقبا افزایش محتوی دایوسجنین را می‌طلبد. در یک مطالعه، بیان ژن *SQS* تحت تیمار تنش خشکی طی مراحل مختلف رشدی در گیاه شیرین بیان افزایش یافت (Nasrollahi *et al*., 2014). در پژوهش حاضر، بیان این ژن تحت تاثیر تیمارهای دمایی و

[1] Phytosterol
[2] Triterpene
[3] Isopranoids

غلظت‌های مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت.

ژن اسکوالن اپوکسیداز *(SEP)*، اولین مرحله اکسیژناسیون را در مسیر بیوسنتز استرول‌ها با اکسیدکردن مولکول اسکوالن انجام می‌دهد. آنزیم اسکوالن اپوکسیداز با اکسید کردن اسکوالن، منجر به تشکیل دو و سه- اکسیدواسکوالن[1] می‌شود (Han *et al*., 2010). در مطالعه‌ای، با بیش‌بیان[2] دو ژن اسکوالن اپوکسیداز Pg*SEP1* و Pg*SEP2* در گل و ریشه گیاه *Panax ginsing* و همچنین خاموش کردن این ژن‌ها[3] با استفاده از تکنیک RNAi به این نتیجه رسیدند که Pg*SEP1* دارای نقش تنظیمی در بیوسنتز تری‌ترپن‌ها است، درحالی‌که ژن Pg*SEP2* در مسیر بیوسنتز فیتواسترول‌ها مؤثر است (Han *et al*., 2010). در این پژوهش، بیان این ژن در اثر تیمار با تنش دمای بالا افزایش یافت، اما این افزایش فقط در تیمار مدت زمان طولانی تنش دمای بالا مشاهده شد. اعمال تیمار ۲۴- اپی‌براسینواستروئید در شرایط نرمال دمایی، موجب کاهش بیان این ژن *SEP* در مقایسه با شاهد شد. در شرایط تنش دمای بالا، تیمار دو و پنج ppm (در زمان ۲۴ ساعت) از هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن اسکوالن اپوکسیداز نسبت به شرایط نرمال شد. بیان این ژن در تیمار دمای بالا و غلظت دو ppm از ۲۴- اپی- براسینواستروئید، بیش از ۲۰ برابر افزایش یافت که نشان‌دهنده این موضوع است که این ترکیب تیماری، به‌منظور افزایش محتوی دایوسجنین در شنبلیه مفید است. در سطح مولکولی براسینواستروئید، موجب تغییر بیان ژن، متابولیسم و بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شود (Arfan *et al*., 2019). همچنین براسینواستروئیدها، 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 با براسینواستروئید است (Arfan *et al.*, 2019).

سیکلوآرتنول‌سنتاز (*CAS*)، با تغییر سیکلوآرتنول، ساختارهای استرولی از قبیل استیگمااسترول[4]، سیتواسترول[5] یا کامپسترول[6] را تولید می‌کند. در حقیقت، ژن *CAS*، ۲و۳- اکسیدواسکوالن را به سیکلوآرتنول تبدیل می‌کند که این ترکیب، پیش ماده مورد نیاز در مسیر تبدیل به دیگر استرول‌های گیاهی محسوب می‌شود (Chen *et al.,* 2009). در یک بررسی، اثر تنش خشکی بر بیان ژن *CAS* در مراحل مختلف رشد در گیاه شیرین بیان مورد مطالعه قرارگرفت و نتایج نشان داد که تنش خشکی بر بیان ژن *CAS* موثر نیست (Nasrollahi *et al.,* 2014). در تحقیق حاضر، بیان ژن *CAS* در شرایط تنش دمای بالا و در مدت زمان طولانی (۲۴ ساعت پس از اعمال تنش دمایی بالا) افزایش یافت. همچنین اعمال تیمار ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در شرایط تنش دمای بالا (هم در کوتاه مدت و هم در بلند مدت)، موجب افزایش بیان معنی‌دار ژن مذکور در مقایسه با شاهد (شرایط نرمال) شد. عکس‌العمل ژن *CAS* در شرایط تنش دمای بالا و همراه با کاربرد ۲۴- اپی براسینواستروئید مشابه بود.

در یک تحقیق، تأثیر ۲۴-اپی‌براسینواستروئید بر افزایش ژرانیول[7] و کاهش سیترونلول[8] را در اسانس گیاه *Pelargonium graveolens* تائید شد (Mohamadi Farsani *et al.,* 2016).

اپی‌براسینواستروئید، دارای دو فاکتور رونویسی مهم به نام‌های BES1 و BZR1 در گیاهان است. در زمان عدم وجود پیام اپی‌براسینواستروئید، این دو عامل رونویسی توسط پروتئینی به نام 3-3-14 احاطه می‌شوند؛ بنابراین فسفریله نمی‌شوند. در این حالت، عامل BKI1 به گیرنده اپی‌براسینواستروئید متصل می‌شود و در نتیجه، کل مجموعه خاموش می‌شود

[1] 2, 3- oxidosqualene
[2] Overexpressing
[3] Gene silencing

[4] Stigmasterol
[5] Cytosterol
[6] Campesterol
[7] Geraniol
8 Citronellal

(Planas *et al.,* 2019). به‌محض اتصال اپی-براسینواستروئید (کاربرد خارجی) به گیرنده، آبشاری از فسفریلاسیون اتفاق می‌افتد. در این حالت، پروتئین 3-3-14 از دو فاکتور رونویسی BES1 و BZR1 جدا می‌شود و امکان فسفریلاسیون این دو فاکتور رونویسی فراهم می‌شود (در ضمن پروتئین 3-3-14 به BKI1 متصل می‌شود و مانع از اتصال BKI1 به گیرنده می‌شود). مجموعه این رخدادها، منجر به بیان و رونویسی ژن‌های پاسخ دهنده به اپی-براسینواستروئید می‌شود (Planas *et al.,* 2019).

در گیاهان، سیکلوآرتنول ترکیب آغازی برای شروع بیوسنتز استرول‌هاست که سوبسترای C24-methyltransferase هم می‌باشد (Diener *et al.*, 2000). متیلاسیون C24 سیکلوآرتنول، یک جایگاه اصلی تنظیمی در بیوسنتز استرول‌هاست (Nes *et al.,* 1999). تبدیل سیکلوآرتنول به ۲۴-متیلن سیکلوآرتنول، عمدتا به‌وسیله یک نوع استرول C24-methyltransferase وابسته به (*SMT1*) S-adenosyll-Met 1 صورت می‌گیرد (Schaeffer *et al*., 2001). در تحقیق حاضر، بیان ژن *SMT* (Sterol methyltransferase) 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 ۲۴-اپی-براسینواستروئید در شرایط دمایی نرمال، موجب کاهش بیان ژن مذکور شد. در شرایط تنش دمای بالا، تیمار دو ppm از ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، بیان ژن *SMT* را به‌صورت معنی‌داری افزایش داد.

متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به محرک‌ها پس از مجموعه‌ای از واکنش‌های فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون پروتئین‌های غشای سلول، ایجاد جریان کلسیمی، فعال شدن پروتئین کینازها و NADPH اکسیدازها، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت بیان ژن‌های دفاعی در سلول های گیاهی تولید می‌شوند (Zhao *el al.,* 2006) . Arfan *et al.* (2019) نشان دادند که کاربرد اپی‌براسینواستروئید تحت شرایط استرس دمای پایین در آرابیدوپسیس، منجر به افزایش فعالیت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پلی فنول اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شد. نتایج آن‌ها نشان داد که کاربرد اپی‌براسینواستروئید، منجر به افزایش H_2O_2 و متعاقبا افزایش مقادیر NO می‌شود. این افزایش‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی گیاه می‌شوند (آنتی اکسیدان ها) و در نهایت مقاومت گیاه افزایش می‌یابد. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تحریک‌کننده‌هایی از قبیل سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات‌ها، براسینواستروئیدها، منجر به تغییر و تنظیم میزان بیوسنتز، تجمع و تبادل مواد ذخیره شده در واکوئل، تبدیل و یا تجزیه متابولیت‌های گیاهی می‌شوند و در نهایت میزان متابولیت‌های اولیه و ثانویه تغییر می-یابند (Odjakova and Hadjiivanova., 2001).

در این تحقیق سطوح دو و پنج ppm هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید در برخی از ژن‌ها، بیان ژن‌ها را به‌صورت موثری افزایش داد، در صورتی‌که اثر سطح ۱۰ ppm تقریبا در تمامی ژن‌های مورد مطالعه به-صورت معنی‌داری کمتر از سطوح دو و پنج ppm بود. با توجه به این‌که براسینواستروئیدها در تمامی اندام-های گیاهی و در مقادیر بسیار ناچیز حضور دارند، بنابراین به‌نظر می‌رسد که سطح ۱۰ ppm موجب مسمومیت گیاه شده است. در این تحقیق، تیمار شنبلیله تحت شرایط تنش دمای بالا و سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید، احتمالا منجر به افزایش گونه‌های فعال اکسیزن شده است و متعاقب آن، سطوح بیان ژن‌های دخیل در مسیر دایوسجنین به-عنوان یک مکانیسم دفاعی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در حقیقت گیاه شنبلیله به‌منظور مواجه با اثرات تنش دمای بالا و سطوح مختلف۲۴-اپی-براسینواستروئید، بیان ژن‌های بیوسنتز دایوسجنین را افزایش داده است. نتایج متناقصی در مورد استفاده از محرک‌های مختلف و تغییرات میزان متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. این بدین معنی است که گیاهان مختلف، پاسخ‌های متفاوتی نسبت به محرک‌ها از خود نشان می‌دهند. پاسخ گیاهان با توجه به مدت زمان در معرض بودن محرک، مرحله رشدی و غلظت‌های

مختلف محرک‌ها بسیار متفاوت است؛ بنابراین شناسایی بهترین محرک، حساس‌ترین مرحله رشدی گیاه و مناسبترین غلظت محرک‌ها، از فاکتورهای موثر در افزایش کمیت متابولیت‌های گیاهی است (Angelova *et al*., 2006: Parsa *et al*., 2016; Namdeo, 2007).

با توجه به الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، می‌توان ژن‌ها را به سه گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل ژن‌های *SEP* و *SMT* بود و بیان این دو ژن تحت شرایط دمای نرمال با کاربرد ۲۴-اپی-براسینواستروئید و یا عدم کاربرد این هورمون، تغییرات قابل توجهی نداشت، درحالی‌که اثر تنش دمای بالا و کاربرد ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت موثری موجب افزایش بیان این ژن‌ها شد. ژن *SQS* در گروه دوم قرار گرفت، چراکه بیان این ژن در هیچ‌کدام از تیمارهای آزمایشی به‌صورت موثری تحت تاثیر قرار نگرفت؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که این ژن، کاندید مناسبی برای مهندسی مسیر بیوسنتز دایوسجنین نمی‌باشد. ژن *CAS* نیز در گروه سوم جای گرفت، به‌طوری‌که بیان آن تحت تاثیر تیمار ترکیبی تنش دمای بالا و هورمون ۲۴-اپی‌براسینواستروئید به‌صورت قابل توجهی تغییر کرد.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق، به‌منظور مطالعه الگوی بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز دایوسجنین و کاربرد دو محرک خارجی، از تیمار دمای بالا (۴۲ درجه سانتی‌گراد در مقابل ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و سطوح مختلف ۲۴-اپی‌براسینواستروئید و دو زمان برداشت مختلف (شش و ۲۴ ساعت) استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که این ژن‌ها دارای عکس‌العمل‌های متفاوتی نسبت به تیمار دمای بالا و سطوح مختلف ۲۴-اپی-براسینواستروئید هستند. در ضمن این دو تیمار، به‌صورت موثری موجب افزایش بیان برخی از ژن‌های این مسیر شدند. با توجه به افزایش بیان ژن‌های مذکور، می‌توان از تنش دمایی و هورمون ۲۴-اپی براسینواستروئید در مهندسی مسیر بیوسنتز دایوسجنین استفاده کرد.

REFERENCES

1. Abbasi, A. R., Rahmani, M. S. & Vafaei, Y. (2011). Plant Biochemistry (1st ed). University Tehran Press.
2. Acharya, S. N., Thomas, J. E. & Basu, S. K. (2008). Fenugreek, an alternative crop for semiarid regions of North America. *Crop Science,* 12(2), 149-154.
3. Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2001). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment,* 20, 72-83.
4. Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X. & Li, Y. (2018). The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: A review. *Biological Research*, 51(1), 46.
5. 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- 159.
6. 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.
7. Chen, D., Chen, Y., Yang, Z., Zhang, Y. & Xiao, L. (2009). Molecular cloning and expression of cycloartenol synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*. *Acta Botanica*, 29 (2), 221-228.
8. 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.
9. 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), 6-16.

10. 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.
11. Dini, M. (2006). Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine. *Forest and Rangeland Research Institute Publication, Iran*, 299-300.
12. 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.
13. Helambe, S. & Dande R. (2012). Fenugreek (*Trigonella foenum- graecum* L.): An Overview. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research,* 4, 169 – 187.
14. Jager, C. E., Symons, G. M., Ross, J. J. & Reid, J. B. (2008). Do brassinosteroids mediate the water stress response? *Physiologia Plantarum*, 133, 417– 425.
15. Joanna, C., Magdalena, S. & Tyrka, M. (2015). Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek. *Medicinal Plants Studies*, 3(3), 22-25.
16. Kawatra, M., Kaur, K. & Kaur, G. (2019). Effect of Osmo priming on sucrose metabolism in spring maize, during the period of grain filling, under limited irrigation conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25 (6), 1367-1376.
17. Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R. & Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, 26.
18. 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.
19. Mohamadi farsani, M., Ghasemi pirbalouti, A., Bakheshi khaniki, G. & Momtaz, H. (2016). Effect of Paclobutrazol and Brassinosteroid elicitors on expression gene 1-deoxy xylulose-5-phosphate reductoisomerase and its relationship with the biosynthesis of monoterpene carvacrol and thymol in *Thymus daenenesis* under drought stress. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 11(43), 25-28.
20. 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*, 31 (2), 1-13.
21. Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1). 69-79.
22. 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.
23. 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.
24. Odjakova, M. & Hadjiivanova, C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27(1-2), 101-109.
25. Oksman-Caldentey, K. M. & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the postgenomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science*, 9 (9), 433-440.
26. Osman, M. E., El-Feky, S. S., Abo-Hamad, S. A. & Seliem, H. S. (2015). Improvement of harmful effects induced by temperature stress on *Trgonella foenum-graecum* L. by on putrescine. *The Egyptian Journal of Experimental Biology*, 11(2), 197-205.
27. Pant, G., Hemalatha, S., Arjunan, S., Malla, S. & Sibi, G. (2013). Effect of heat stress in synthesis of heat shock proteins and antioxidative enzyme response in *Trigonella foenum-graceum* L. *Journal of Plant Sciences*, *1*(4), 51-56.
28. Parsa, M. & Zeinali, A. (2016). Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Scientific Journal Management System*, 32(4), 655-666.
29. 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), 151894.
30. Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P. & Schaller, H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by Sterol methtltransferase. *The Plant Journal*, 25(6), 605-615.
31. Tetenyi, P. (2002). Chemical variation (Chemodifferentiation) in medicinal and aromatic plant. *Acta Horticulture*, 76, 15-21.

32. Wink, M. (2010). Functions and biotechnology of plant secondary metabolites *(2th ed.)*. John wiley & Son.
33. Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.
34. Zolfaghari, F., Rashidi-Monfared, S., Moieni, A., Abedini, D. & Ebrahimi, A. (2020). Improving diosgenin production and its biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. hairy root cultures. *Industrial Crops and Products*, *145*, 112075.