

A large, bold, black Arabic calligraphic phrase, 'Allahu Akbar' (God is Great), rendered in a highly stylized, cursive script. The text is slanted diagonally upwards from left to right. It features thick, expressive strokes and includes various diacritical marks (vowels) written in smaller characters above and below the main letters. The overall style is dynamic and powerful, typical of religious art or protest slogans.



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی

پاسخ فیزیولوژیک و تغییرات بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز

دایوسجنین در گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

تیمار شده با ملاتونین تحت شرایط تنش شوری

نگارنده: مریم محمدی اسبویی

استاد راهنما:

دکتر امین ابراهیمی

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا عامریان

اردیبهشت ۱۴۰۰

تقدیرنامه

خدای را بسی شاکرم که از روی لطف، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسایم و از ریشه آن‌ها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم.

از جناب آقای دکتر امین ابراهیمی که مدیون همکاری‌ها و راهنمایی‌های بی‌دریغ ایشان هستم و نمی‌دانم که با چه زبانی و با کدامین واژگان محبتشان را ارج نهم صمیمانه سپاسگذارم که به راستی انجام این رساله بدون نظرهای صائب، پیگیری‌های دلسوزانه و تشویق‌های امیدبخش ایشان میسر نبود. لطف و مهربانی بی‌شائبه‌شان همیشه در خاطر من خواهد ماند.

از جناب آقای دکتر محمدرضا عامریان که در امر مشاوره این رساله مساعدت نمودند و در این امر نهایت مراقبت، توجه و دقت خود را مبذول فرموده‌اند کمال تشکر و امتنان را دارم.

در پایان بر خود لازم می‌دانم از همکاری تمامی دوستان عزیزی که در انجام این امر مرا یاری کردند صمیمانه تشکر نمایم.

مریم محمدی

اردیبهشت ۱۴۰۰

تعهدنامه

اینجانب **مریم محمدی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **بیوتکنولوژی کشاورزی** دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه پاسخ فیزیولوژیک و تغییرات بیان برخی از ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در گیاه شنبليله (*Trigonella foenum-graecum L.*) تیمار شده با ملاتونین تحت شرایط تنش شوری به راهنمایی دکتر امین ابراهیمی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش های 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 تاثیرگذار 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 بافت های آن ها) 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 ۱۴۰۰/۲/۲۲

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

تنش شوری، یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است، که عملکرد گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در حال حاضر در حال تبدیل شدن به یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت گیاهان زراعی در جهان است. شناسایی پاسخ‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان نسبت به تنش شوری، در افزایش دانش بشر و شناسایی مکانیسم‌های گیاهان نسبت به تنش شوری تاثیرگذار است. این پژوهش با هدف ارزیابی پاسخ گیاه شنبلیله تیمار شده با سطوح مختلف ملاتونین تحت تاثیر تنش شوری انجام شد. همچنین در این پژوهش، اثرات ملاتونین به‌عنوان یک محرک کاربردی بر محتوای دایوسجنین بررسی گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به‌صورت موثری از تخریب رنگدانه‌های گیاهان جلوگیری می‌کند. در ضمن، ملاتونین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد و از این طریق منجر به کاهش محتوای گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد شد. نتیجه کاهش رادیکال‌های آزاد، کاهش نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید و در نهایت افزایش تحمل گیاهان شنبلیله تحت تنش شوری بود. در ضمن، کاربرد سطوح مختلف ملاتونین از طریق افزایش فعالیت کانال‌های حمل‌کننده پتاسیم منجر به حفظ هموستازی یونی و افزایش محتوای آب درون‌سلولی تحت شرایط تنش شوری گردید. در این پژوهش اثرات متقابل ملاتونین، اکسین و آبسزیک اسید در شنبلیله‌های تیمار شده با سطوح مختلف شوری برای اولین بار بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ملاتونین از طریق مسیرهای وابسته به آبسزیک اسید و نیتریک اکسید منجر به فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی دفاعی در گیاه شنبلیله می‌گردد. یافته‌های ما نشان داد که ملاتونین بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و متعاقباً محتوای دایوسجنین را به‌صورت موثری افزایش می‌دهد. در حقیقت، ترکیب همزمان تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ملاتونین ۶۰ ppm محتوای دایوسجنین را نسبت به حالت نرمال بیش از شش برابر افزایش داد. نتایج حاصل از این پژوهش دانش ما را درباره‌ی اثرات ملاتونین بر شنبلیله تحت تنش شوری و همچنین بر تغییرات محتوای دایوسجنین در شنبلیله افزایش داد. در نهایت،

یافته‌های ما ثابت کرد که ملاتونین به‌عنوان یک محرک عملکردی مهم قادر است تا تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی (متابولیت اولیه و ثانویه) و مولکولی در شبلیله‌های تیمار شده با شوری را با هدف افزایش تحمل آن‌ها تحریک نماید.

کلمات کلیدی: تنش شوری، ملاتونین، دایوسجنین، تغییرات بیوشیمیایی و شبلیله.

مقاله مستخرج از پایان نامه

افزایش تظاهر برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله-*Trigonella foenum*
(*graecum* L.) تیمار شده با سطوح مختلف ملاتونین تحت تنش شوری. مجله علوم گیاهان زراعی دانشگاه تهران

فهرست مطالب

فصل اول	۱
مقدمه	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- هدف	۵
فصل دوم	۷
کلیات و مرور منابع	۷
۱-۲- گیاهان دارویی	۸
۲-۲- اهمیت گیاهان دارویی	۸
۳-۲- پتانسیل اقتصادی گیاهان دارویی	۹
۴-۲- متابولیت‌های ثانویه	۱۰
۵-۲- گیاه‌شناسی شنبلیله	۱۲
۱-۵-۲- پراکنش شنبلیله	۱۳
۲-۵-۲- موارد مصرف شنبلیله	۱۳
۶-۲- مسیر بیوسنتز دایوسجنین	۱۴
۷-۲- تنش	۱۵
۱-۷-۲- تنش شوری	۱۶
۸-۲- هورمون‌های گیاهی	۱۹
۱-۸-۲- ملاتونین	۲۰
۹-۲- تجزیه کمی رونوشت	۲۲
۱-۹-۲- واکنش زنجیرهای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی	۲۳
۲-۹-۲- واکنش زنجیرهای پلیمرز کمی با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی (QRT-PCR)	۲۳
۳-۹-۲- منحنی‌های ذوب	۲۴
۴-۹-۲- نرمال‌سازی	۲۴
۵-۹-۲- ژن‌های کنترل	۲۵
۱۰-۲- مرور منابع	۲۵
فصل سوم	۳۳
مواد و روش‌ها	۳۳
۳- مواد و روش‌ها	۳۴
۱-۳- شرایط رشد و نحوه اعمال تیمارها	۳۴
۲-۳- اندازه‌گیری کلروفیل	۳۵

۳-۳- محتوای آب نسبی	۳۵
۴-۳- اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی	۳۵
۵-۳- تهیه بافر استخراج	۳۶
۶-۳- تهیه محلول بردفورد	۳۶
۸-۳- اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها	۳۶
۸-۳- سنجش فعالیت کاتالاز	۳۷
۹-۳- سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز	۳۷
۱۰-۳- سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	۳۷
۱۱-۳- سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز	۳۸
۱۲-۳- سنجش فعالیت آنزیم پلیفنول اکسیداز	۳۹
۱۳-۳- اندازه‌گیری تحمل به شوری بر اساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی	۳۹
۱۴-۳- اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون دی‌آلدئید (MDA)	۳۹
۱۵-۳- محتوای فنول کل	۴۰
۱۶-۳- محتوای فلاونوئید کل	۴۱
۱۷-۳- محتوای قند کل	۴۱
۱۸-۳- عناصر معدنی	۴۱
۱-۱۸-۳- محتوای کلر	۴۱
۲-۱۸-۳- محتوای پتاسیم و سدیم	۴۲
۱۹-۳- محتوای اکسین	۴۲
۲۰-۳- محتوای آبسزیک اسید	۴۳
۲۱-۳- محتوای H_2O_2	۴۴
۲۲-۳- محتوای نیتربیک اکسید	۴۴
۲۳-۳- محتوای ملاتونین درونی	۴۴
۲۴-۳- محتوای دایوسجنین	۴۵
۲۵-۳- بررسی بیان ژن	۴۶
۱-۲۵-۳- استخراج RNA و ساخت CDNA	۴۶
۲-۲۵-۳- طراحی آغازگرها	۴۶
۳-۲۵-۳- انجام واکنش PCR زمان واقعی	۴۷
۲۶-۳- تجزیه داده‌ها	۴۸
فصل چهارم	۴۹
نتایج و بحث	۴۹
۴- نتایج	۵۰
۱-۴- جدول تجزیه واریانس	۵۰

۵۰	۲-۴- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی
۵۰	۱-۲-۴- محتوای کلروفیل و کاروتنوئید
۵۵	۲-۲-۴- محتوای آب نسبی
۵۶	۳-۲-۴- محتوای پروتئین کل
۵۷	۴-۲-۴- فعالیت کاتالاز
۵۸	۵-۲-۴- فعالیت پلیفنول اکسیداز
۵۹	۶-۲-۴- فعالیت گایاکول پراکسیداز
۶۰	۷-۲-۴- فعالیت آسکوربات پراکسیداز
۶۱	۸-۲-۴- فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز
۶۲	۹-۲-۴- شاخص نشت الکترولیت
۶۳	۱۰-۲-۴- محتوای مالون دی آلدئید
۶۴	۱۱-۲-۴- محتوای فلاونوئید
۶۵	۱۲-۲-۴- محتوای فنول کل
۶۶	۱۳-۲-۴- محتوای قند کل
۶۷	۳-۴- مقایسه میانگین عناصر معدنی
۶۷	۱-۳-۴- محتوای پتاسیم
۶۸	۲-۳-۴- محتوای کلر
۶۹	۳-۳-۴- محتوای سدیم
۷۰	۴-۳-۴- نسبت سدیم به پتاسیم
۷۱	۴-۴- محتوای آبسیزیک اسید
۷۲	۵-۴- محتوای اکسین
۷۳	۶-۴- محتوای نیتریک اکسید
۷۴	۷-۴- محتوای H_2O_2
۷۵	۸-۴- محتوای ملاتونین درونی
۷۶	۴-۴- بررسی بیان ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین
۷۶	۱-۹-۴- بیان ژن Δ_{24} -REDUCTASE (SSR)
۷۷	۲-۹-۴- بیان ژن SQUALENE SYNTHASE (SQS)
۷۸	۳-۹-۴- بیان ژن STEROL METHYLTRANSFERASE (SMT)
۷۹	۴-۹-۴- بیان ژن SQUALENE EPOXIDASE (SEP)
۸۰	۵-۹-۴- بیان ژن CYCLOARTENOL SYNTHASE (CAS)
۸۱	۶-۹-۴- بیان ژن C_{22} -HYDROXYLASE (C22)
۸۲	۷-۹-۴- بیان ژن Δ_7 - REDUCTASE (C7)
۸۳	۸-۹-۴- بیان ژن 26-O-BETA GLUCOSIDASE (BGL)

۸۴	۹-۹-۴- بیان ژن C ₄ -DEMETHYLASE (C4)
۸۵	۱۰-۴- محتوای دایوسجنین
۸۵	۱۱-۴- بحث
۸۶	۱-۱۱-۴- محتوای کلروفیل و کاروتنوئید
۸۸	۲-۱۱-۴- محتوای آب نسبی
۸۹	۳-۱۱-۴- محتوای پروتئین کل و آنزیم‌های آنتیاکسیدان
۹۲	۴-۱۱-۴- شاخص نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید
۹۳	۵-۱۱-۴- محتوای فلاونوئید و فنول کل
۹۴	۶-۱۱-۴- محتوای قند کل
۹۵	۷-۱۱-۴- محتوای پتاسیم، کلر و سدیم
۹۷	۸-۱۱-۴- محتوای آبسیزیک اسید و اکسین
۱۰۰	۹-۱۱-۴- محتوای نیتریک اکسید و H ₂ O ₂
۱۰۲	۱۰-۱۱-۴- محتوای ملاتونین درونی
۱۰۳	۱۱-۱۱-۴- بررسی بیان ژن و محتوای دایوسجنین
۱۱۰	۱۲-۴- نتیجه‌گیری کلی
۱۱۱	۱۳-۴- پیشنهادات
۱۱۲	۵- منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲- تصویری شماتیک از مسیر بیوسنتزی دایوسجین و ژن‌های دخیل در این مسیر بیوسنتزی INOUE AND (EBIZUKA, 1996) ۱۵
- شکل ۲-۲- تصویری شماتیک از مسیر بیوسنتزی ملاتونین (HARDELAND, 2016) ۲۲
- شکل ۱-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای رنگدانه‌های گیاه شنبلیله. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۵۴
- شکل ۲-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای آب نسبی. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۵۵
- شکل ۳-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای پروتئین کل. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۵۶
- شکل ۵-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر فعالیت پلیفنول اکسیداز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۵۸
- شکل ۶-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان فعالیت گایاکول پراکسیداز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۵۹
- شکل ۷-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۰
- شکل ۸-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۱
- شکل ۹-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر شاخص نشت الکترولیت. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۲
- شکل ۱۰-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای مالون دی‌آلدئید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۳
- شکل ۱۱-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای فلاونوئید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۴
- شکل ۱۲-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان محتوای فنول کل. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۵

شکل ۴-۱۳- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای قند کل. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۶

شکل ۴-۱۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای پتاسیم. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۷

شکل ۴-۱۵- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای کلر. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۸

شکل ۴-۱۶- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای سدیم. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۶۹

شکل ۴-۱۷- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر نسبت سدیم به پتاسیم. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۷۰

شکل ۴-۱۸- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای آب‌سوزیک اسید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۷۱

شکل ۴-۱۹- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای اکسین. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۷۲

شکل ۴-۲۰- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای نیتریک اکسید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۷۳

شکل ۴-۲۱- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای هیدروژن پراکسید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۷۴

شکل ۴-۲۲- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای ملاتونین درونی. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۷۵

شکل ۴-۲۳- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SSR. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۷۶

شکل ۴-۲۴- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SQS. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۷۷

شکل ۴-۲۵- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SMT. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۷۸

- شکل ۴-۲۶- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SEP. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2-\Delta\Delta CT$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۷۹
- شکل ۴-۲۷- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن CAS. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2-\Delta\Delta CT$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۸۰
- شکل ۴-۲۸- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن C22. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2-\Delta\Delta CT$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۸۱
- شکل ۴-۲۹- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن C7. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2-\Delta\Delta CT$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۸۲
- شکل ۴-۳۰- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن BGL. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2-\Delta\Delta CT$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۸۳
- شکل ۴-۳۱- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن C4. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2-\Delta\Delta CT$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند. ۸۴
- شکل ۴-۳۲- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان محتوای دایوسجنین. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. ۸۵

فهرست جداول

جدول ۳-۱- مواد استفاده شده برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز.....	۳۷
جدول ۳-۲- میزان مواد مورد استفاده برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز.....	۳۸
جدول ۳-۳- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آنها.....	۴۷
جدول ۳-۴- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی.....	۴۸
جدول ۴-۱- جدول تجزیه واریانس صفات بررسی شده در این پژوهش. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شده است.....	۵۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

کاربرد گیاهان دارویی با هدف درمان، به قدمت طول عمر بشر است. گیاهان دارویی بخشی از صدها هزار گیاه در جهان هستی محسوب می‌شوند، که در طی مدت زمان طولانی از تاریخ زمین‌شناسی تکامل یافته‌اند. این گیاهان در طول تاریخ همواره دارای قرابت ویژه‌ای با انسان بوده‌اند، چرا که بشر از گذشته در زمینه شناخت و استفاده‌های درمانی آن‌ها از دانش قابل قبولی برخوردار بوده است. گیاهان دارویی در جهان دارای تنوع شگفت‌آوری هستند و یک منبع ارزشمند غذایی و دارویی محسوب می‌شوند (Saslis-Lagoudakis *et al.*, 2014). در مناطق روستایی و حاشیه‌نشین، مردم به دلیل عدم دسترسی و هزینه بالای تامین داروهای مصنوعی، اثرات جانبی کمتر گیاهان دارویی و دارا بودن دانش بومی در مورد فواید گیاهان دارویی، از این گیاهان به عنوان مهم-ترین منبع دارو و تامین بهداشت فردی و اجتماعی استفاده می‌کنند. با وجود این که در حال حاضر قسمت بزرگی از داروهای مصرفی شیمیایی هستند، اما بر طبق آمار موجود، در حدود یک سوم تمامی فراورده‌های دارویی به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم از گیاهان تولید می‌شوند (Buhner, 1999). گیاهان دارای طیف وسیعی از ترکیبات فعال زیستی از قبیل آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها، رزین‌ها و غیره هستند (Do *et al.*, 2014 ; Kazemi, 2015 ; Paula-Freire *et al.*, 2013 ; Pendota *et al.*, 2013 ; Singh *et al.*, 2016). این ترکیبات زیستی فعال از جمله مهم‌ترین مواد اولیه در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و پزشکی محسوب می‌شوند.

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. متعلق به راسته‌ی گل سرخ، تیره‌ی نخود، تیره‌ی فرعی پروانه‌داران از گروه *Trifolia* است (Mozafarian, 1995; Dini, 2006). نام این گیاه از کلمه‌ی یونانی *Trigonou* به معنای مثلث (به علت مثلثی بودن شکل برگچه‌ها) نشأت گرفته شده است. شنبلیله گیاهی یکساله با ارتفاع تقریباً ۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. ریشه‌ی اصلی این گیاه به صورت عمودی و طویل و ریشه‌های خزنده‌ی آن شاخه-دار و با انشعاب‌های متعدد است (Ahmad *et al.*, 2016). یکی از مهم‌ترین ترکیبات دارویی در شنبلیله که ارزش و اهمیت این گیاه را دو چندان کرده است دایوسجنین نام دارد (McAnuff MA *et al.*, 2005). این ماده

در درمان کلسترول، چربی خون بالا، دیابت و بیماری‌های متابولیکی موثر است (Upadhyay *et al.*, 2016). در حقیقت، دایوسجنین یک ترکیب زیستی فعال است که در درمان سرطان و پیری بسیار موثر می‌باشد (Raju and Mehta., 2008). علاوه بر این، دایوسجنین در صنعت داروسازی به عنوان یک جزء جدایی‌ناپذیر و ارزشمند در تولید داروهای استروئیدی از قبیل تستوسترون، پروژسترون و گلوکوکورتیکوئیدها کاربرد دارد (Chaudhary *et al.*, 2018; Murlidhar and Goswami., 2012).

گیاهان در طی دوره‌ی رشد و نمو خود با انواعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی مواجهه می‌شوند. این تنش‌ها به صورت کلی کیفیت و کمیت محصولات زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و مانع از رسیدن گیاه به حداکثر پتانسیل ژنتیکی جهت دستیابی به عملکرد بالا می‌شوند. متأسفانه علی‌رغم پیشرفت بشر در زمینه شناسایی تنش‌ها، سالانه بخش بزرگی از عملکرد گیاهان زراعی تحت تاثیر تنش‌های مختلف از بین می‌رود. تنش شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت و کار گیاهان در دنیا محسوب می‌شوند و دارای اثرات بسیار مخربی بر محیط‌زیست است (Kumar and Saddhe., 2018). تنش شوری بر رشد، توسعه و بهره‌وری گیاهان از طریق ایجاد سمیت یونی، اختلال در جذب آب و اختلالات هورمونی تاثیرگذار است (Ahanger *et al.*, 2017; Ashraf and Foolad., 2013). در ضمن، شوری به دلیل القای تنش اکسیداتیو منجر به افزایش تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد (Nxele *et al.*, 2017). در مجموع روش‌های مختلفی به منظور مقابله با تنش شوری وجود دارد، اگرچه تولید و توسعه گیاهان متحمل به تنش شوری یکی از بهترین روش‌ها محسوب می‌شود. تولید و توسعه گیاهان متحمل با استفاده از دانش بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات نیازمند دانش عمیق در زمینه شناسایی مکانیسم‌های مقاومت گیاهان و همچنین بررسی پاسخ عکس‌العمل گیاهان نسبت به تنش شوری است. بنابراین مطالعه عکس‌العمل گیاهان و چگونگی پاسخ آن‌ها نسبت به تنش‌های مختلف یک ضرورت مهم در زمینه تولید گیاهان متحمل مبتنی بر بیوتکنولوژی است.

در گیاهان دو دسته کلی از ترکیبات به نام متابولیت‌های اولیه از قبیل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، آمینواسیدها و متابولیت‌های ثانویه (ترکیباتی با وزن مولکولی پایین) تولید می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه در شرایط طبیعی تولید نمی‌شوند، بلکه تولید آن‌ها در یک شرایط خاص و به‌عنوان یک محصول فرعی از متابولیسم‌های اولیه انجام خواهد شد (Wang *et al.*, 2015). در واقع، تولید این ترکیبات در شرایط تنش و با هدف افزایش تحمل گیاه انجام خواهد شد. از آنجاکه، تولید متابولیت‌های ثانویه دارای کاربردهای ویژه‌ای در صنایع غذایی و پزشکی است، بنابراین استخراج آن‌ها از گیاهان وحشی یا زراعی در حال افزایش است (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004). این ترکیبات در سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاهان تولید، توزیع و گسترش می‌یابند. تولید و توزیع این ترکیبات ارزشمند به‌شدت تحت تاثیر نوع اندام، مرحله رشدی و شرایط محیطی قرار دارد، چراکه شرایط محیطی به‌صورت قابل توجهی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز این ترکیبات را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Bartwal *et al.*, 2013). متابولیت‌های ثانویه به‌صورت چشمگیری رشد، توسعه و بقای گیاهان را تحت تاثیر شرایط نامساعد محیطی بهبود می‌بخشند (Kliebenstein, 2013; Zandalinas *et al.*, 2018). با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه برای بشر و تاثیرپذیری بیوسنتز آن‌ها از شرایط محیطی، افزایش بیوسنتز آن‌ها از طریق اعمال شرایط تنش زیستی از قبیل گرما، خشکی و شوری و یا استفاده از تشعشعاتی از قبیل گاما، UV، پلاسمای سرد و یا استفاده از هورمون‌های مختلف مانند جاسمونات‌ها، سالیسیلیک اسید، براسینواستروئیدها و ملاتونین به یک موضوع تحقیقاتی جذاب در دو دهه گذشته تبدیل شده است.

ملاتونین (N-acetyl-5-methoxytryptamine) یکی از مهم‌ترین مشتقات تریپتوفان است که در سال ۱۹۹۵ در گیاهان شناسایی شد (Dubbels *et al.*, 1995). اثرات بالقوه‌ی این هورمون در گیاهان و فرایندهای متابولیکی مختلف تایید شده است (Hardeland *et al.*, 2011). ملاتونین در تنظیم گلدهی، جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه، فتوسنتز و چرخه شبانه‌روزی نقش دارد. همچنین نقش این هورمون در افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش محیطی از قبیل سرما، خشکی، شوری، گرما، فلزات سنگین و غیره تایید شده است (Wang *et al.*, 2018).

اثرات تنش‌های محیطی در مورد گیاهان دارویی نسبت به سایر گیاهان تا حدودی متفاوت است، چراکه تنش‌های غیرزیستی در گیاهان دارویی همانند یک شمشیر دولبه عمل می‌نماید. در حقیقت تنش غیرزیستی در گیاهان دارویی اگرچه منجر به کاهش عملکرد برگ می‌گردد، اما در نهایت محتوای متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان ترکیبات ارزشمند دارویی افزایش می‌یابد. بنابراین به‌نظر می‌رسد کاربرد تنش‌های غیرزیستی به‌صورت یک محرک در گیاهان دارویی می‌تواند به‌عنوان یک زمینه تحقیقاتی جذاب مدنظر قرار گیرد. نکته مهم در این زمینه شناسایی شدت تنش موردنظر و مرحله رشدی مناسب است، چراکه اعمال شدت تنش نامناسب و مرحله رشدی نادرست می‌تواند منجر به کاهش شدید عملکرد و حتی متابولیت ثانویه گردد. با توجه به اهمیت شبلیله به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند این پژوهش با اهداف زیر انجام شد.

۱-۲- هدف

- بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی شبلیله تحت تاثیر سطوح مختلف شوری.
- مطالعه اثر هورمون ملاتونین در افزایش تحمل شبلیله نسبت به شوری و شناسایی مکانیسم مقاومت القا شده از طریق این هورمون.

فصل دوم

کلیات و مرور منابع

۲-۱- گیاهان دارویی

گیاهان دارویی، به گیاهانی اطلاق می‌گردد که، یک یا برخی از اندام‌های آن‌ها حاوی مواد موثره باشد. در بیشتر موارد درصد این مواد موثره کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه می‌باشد. مواد موثره‌ی گیاهان دارویی به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم دارای اثرات درمانی هستند و به‌عنوان مواد خام در صنایع مختلف دارویی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گیاهان دارای محدوده وسیعی از ترکیبات فعال زیستی مانند آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها و رزین‌ها هستند (Kazemi, 2015; Singh *et al.*, 2016). سنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر ویژگی‌های وراثتی و شرایط محیطی انجام خواهد شد. بنابراین مطالعه و بررسی پروفایل متابولیکی یک گیاه دارویی تحت شرایط خاص و کنترل شده می‌تواند دربردارنده اطلاعات وراثتی و زیست‌شناختی یک گونه خاص باشد.

۲-۲- اهمیت گیاهان دارویی

آمارهای موجود نشان‌دهنده این مطلب است که کاربرد و مصرف گیاهان دارویی به‌ویژه در کشورهای در حال پیشرفت در حال افزایش است، چراکه بخش قابل توجهی از داروهای تولید شده در این کشورها دارای منشأ گیاهی می‌باشند. تولید و توسعه کاشت گیاهان دارویی ضمن کمک به سلامت جامعه می‌تواند از جنبه اقتصادی نیز موثر باشد (Govil and Singh., 2010). متأسفانه برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از محیط‌های طبیعی و یا چرای دام خسارات جبران‌ناپذیری بر طبیعت، این ژرم‌پلاسم ارزشمند، وارد ساخته است. بر طبق آمارهای موجود، در حدود بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاهی در سرتاسر جهان در معرض خطر انقراض قرار دارند. علی‌رغم اهمیت غیرقابل تصور گیاهان دارویی، در حال حاضر در بسیاری از کشورهای در حال توسعه جایگاه واقعی این ذخایر گران‌بها نادیده گرفته شده است، به‌طوری‌که قوانین منسجم برای حفاظت از آن‌ها اجرا و یا در نظر گرفته نشده است (امیدبیگی، ۱۳۸۶).

با توجه به عوارض جانبی کمتر و بعضاً عدم وجود عوارض جانبی حاصل از مصرف گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی، سهم این گیاهان در درمان بشر در حال افزایش است (ضیایی، ۱۳۹۳)، به‌طوری‌که در

سال‌های اخیر تمایل انسان به استفاده از این گیاهان از ۳ تا ۵ درصد به ۵۰ درصد افزایش یافته است (مجله‌ی طب سنتی اسلام و ایران، ۱۳۹۲).

در حال حاضر، تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در طبیعت اطراف ما از نظر خواص دارویی و درمانی شناخته شده نیستند، به طوری که شناسایی خواص درمانی آن‌ها نیازمند سال‌ها مطالعه و بررسی است. تهیه فهرستی از گیاهان دارویی در هر منطقه، گامی در جهت حفاظت و کاربرد گیاهان دارویی با استفاده از علوم و فنون جدید تلقی می‌شود. در حقیقت، شناسایی و معرفی فلور گیاهان دارویی و موارد استفاده سنتی این گیاهان، دربردارنده اطلاعات مفیدی در رابطه با گسترش و استفاده‌ی گیاهان دارویی هر منطقه است (مجله‌ی طب سنتی اسلام و ایران، ۱۳۹۲).

ایران با دارا بودن تنوع عظیم گیاهی و زیستی، دارای ۱۱ اقلیم از ۱۳ اقلیم شناخته شده جهانی است. کشور ایران به‌تنهایی با دارا بودن ۸۰۰۰ گونه گیاهی دربردارنده کل تنوع موجود در کشورهای اروپایی است. در حدود ۲۳۰۰ گونه از گیاهان ایران دارای خواص دارویی، عطری، ادویه‌ای و آرایشی - بهداشتی هستند. در ضمن، در حدود ۱۷۲۸ گونه از این گیاهان صرفاً در ایران رشد می‌کنند و به‌عنوان یک منبع کارآمد و ویژه در اختیار ایران قرار دارند (منتظری و همکاران، ۱۳۸۸).

۲-۳- پتانسیل اقتصادی گیاهان دارویی

اهمیت گیاهان دارویی، به‌ویژه در کشورهای کم درآمد بسیار چشمگیر است، چراکه در این کشورها دسترسی به داروهای شیمیایی به‌علت عدم تامین هزینه‌های خرید بسیار دشوار است. گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از منابع ارزشمند در هر کشوری، در سلامت فردی و اجتماعی، درآمد و اشتغال‌زایی و صادرات غیرنفتی دارای نقش پررنگی هستند (منتظری و همکاران، ۱۳۸۸).

سهم گیاهان دارویی تقریباً یک سوم حجم داروهای مورد استفاده در جوامع انسانی است. سهم تجارت جهانی از محصولات حاصل از گیاهان دارویی در حدود ۱۲۴ میلیارد دلار برآورد شده است، که از این مقدار ۴۴۰

میلیون دلار سهم کشور ایران است. متأسفانه علی‌رغم تنوع گسترده گیاهان دارویی در ایران، سهم کشور ما از تجارت جهانی گیاهان دارویی کمتر از ۰/۴۵ درصد است. بر طبق آمار ارائه شده، سرانه مصرف گیاهان دارویی در کشور ما کمتر از دو کیلوگرم است، در حالی که این میزان در اروپا و آمریکا به ترتیب برابر با ۹۰۰ و ۲۵۰۰ کیلوگرم است (منتظری و همکاران، ۱۳۸۸). تجارت گیاهان دارویی از سال ۱۹۷۶ تا ۲۰۰۳ رشد بسیار چشمگیری داشت، به طوری که این میزان در طی این سال‌ها از ۳۵۵ میلیون دلار به ۵/۵ میلیارد دلار افزایش یافته است. با توجه به آمار منتشرشده، در حال حاضر میزان تجارت گیاهان دارویی بیش از ۶ میلیارد دلار است و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۵ تریلیون دلار برسد (منتظری و همکاران، ۱۳۸۸).

۲-۴- متابولیت‌های ثانویه

تأثیر گیاهان از جمله گیاهان دارویی در زندگی بشر بر کسی پوشیده نیست. در حقیقت، بشر در طی سال‌های متمادی و با اهداف مختلفی از گیاهان به عنوان مهم‌ترین منابع در دسترس بهره برده است. در طی سال‌های اخیر و با گسترش دانش بشری کاربرد گیاهان و به خصوص گیاهان دارویی صرفاً به مصارف تغذیه‌ای محدود نشده است، چراکه دستیابی به تکنولوژی نوین منجر به شناسایی ترکیباتی به نام متابولیت‌های ثانویه در گیاهان گردید (Govil and Singh., 2010).

گیاهان در طی فتوسنتز و با هدف حفظ بقاء خود، ترکیباتی از قبیل سلولز، پکتین، ساکارز، نشاسته، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را تولید می‌کنند. این ترکیبات که متابولیت‌های اولیه نامیده می‌شوند، اصولاً در مقادیر بالا تولید شده و ارزش اقتصادی قابل توجهی ندارند (Irchhaiya et al., 2015). این متابولیت‌های اولیه، ماده خام مورد نیاز در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هستند و بر خلاف متابولیت‌های اولیه نقش اساسی و مهمی در رشد و نمو گیاهان ایفا نمی‌کنند. اصولاً متابولیت‌های ثانویه با مقادیر اندک و در سلول‌های تخصصی، در مراحل رشدی خاص و یا در شرایط محیطی ویژه‌ای (شرایط تنشی) تولید می‌شوند. محصولات منتج از متابولیت‌های ثانویه بسیار گران‌قیمت و ارزشمند هستند. این ترکیبات ارزشمند دارای وزن مولکولی کمی می‌-

باشند و به دلیل اهمیت آن‌ها در صنایع مختلف دارویی، پزشکی و غذایی روز به روز بر اهمیت آن‌ها افزوده می‌شود (Kurepin *et al.*, 2017). در ضمن، وجود این ترکیبات برای گیاهان نیز بسیار حائز اهمیت است، چراکه این ترکیبات دارای وظایف دفاعی مهمی از قبیل دفاع در برابر آفات و بیماری‌ها هستند. در ضمن وجود این ترکیبات در جذب حشرات گرده‌افشان بسیار موثر هستند و منجر به حفظ و بقای گیاهان می‌گردند. همچنین بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در افزایش تحمل گیاه در محیط‌های پر تنش بسیار موثر هستند (Kurepin *et al.*, 2017).

متابولیت‌های ثانویه بر اساس منشا بیوسنتز به سه دسته‌ی ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی و پلی فنولیک، آلکالوئیدهای حاوی نیتروژن و ترکیبات حاوی سولفور تقسیم‌بندی می‌شوند. در این بین، آلکالوئیدها با هدف افزایش تحمل گیاهان به پاتوژن‌ها و دفع آفات و گیاه‌خواران تولید می‌شوند. این ترکیبات خصوصیات هالوسینوژنیک (توهم‌زا) داشته و در صنایع داروسازی و پزشکی نوین دارای کاربرد و موارد استفاده‌ی متعدد هستند (Tsialtas *et al.*, 2018).

علی‌رغم نقش اندک متابولیت‌های ثانویه در فتوسنتز و تنفس گیاهی، این ترکیبات رشد و بقای گیاهان در شرایط تنش‌زای محیطی را تضمین می‌کنند (Zandalinas *et al.*, 2018). در مجموع، مسیرهای استات-مالونات، موالونات و اسیدهای شیکیمیک به‌عنوان مسیرهای اصلی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد شده‌اند (Dewick, 2002)، اگرچه دو مسیر اسید موالونیک و اسید شیکیمیک جزء مسیرهای اصلی محسوب می‌شوند. آلکالوئیدها، ترپن‌ها و فنل‌ها جزء سه گروه اصلی از متابولیت ثانویه محسوب می‌شوند، که به واسطه دارا بودن بنیان‌های ازت و سولفور در ساختارشان توسط گیاه‌خواران مصرف نمی‌شوند. آلکالوئیدها، ترکیباتی با وزن مولکولی کم و واجد نیتروژن هستند، که به‌صورت متوسط در ۲۰ درصد از گیاهان آوندی وجود دارند (Saufi *et al.*, 2007). ترپن‌ها معمولاً در آب غیرمحلول هستند و جزء بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه در

گیاهان محسوب می‌شوند. در ضمن این ترکیبات، جزء اصلی اسانس و یکی از ترکیبات مهم در سیستم دفاعی گیاه محسوب می‌شوند (قاسمی پیربلوطی، ۱۳۸۸).

۲-۵- گیاه‌شناسی شنبلیله

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graceum* L. گیاهی متعلق به تیره لگومینوز، راسته گلسرخ و تیره فرعی پروانه‌داران است (Mozafarian, 1995). شنبلیله گیاهی خودگشن با عادات رشدی نامشخص می‌باشد (Solario, 2014). ارتفاع این گیاه با توجه به شرایط آب‌وهوایی متفاوت، بسیار متغیر و بین ۱۰ تا ۶۰ سانتی‌متر در نوسان است. برگ‌های این گیاه دارای سه برگچه و کم و بیش کرک‌دار می‌باشد و به صورت متناوب به ساقه متصل شده‌اند (Ahmad et al., 2016). میوه‌ی شنبلیله دارای نیام صاف یا هلالی شکل است و حاوی ۴ تا ۷ دانه می‌باشد. در ضمن، طول نیام بین ۱۰ تا ۱۲ سانتی‌متر و پهنای آن بین ۵/۰ تا ۱ سانتی‌متر متغیر است (Acharya et al., 2011).

این گیاه منبع مناسبی از مواد تغذیه‌ای از قبیل کربوهیدرات، پروتئین، فیبر، ویتامین‌ها و مواد معدنی است (Vasanthi et al., 2017). بذرهای این گیاه دربردارنده ترکیباتی از قبیل آلکالوئید، تریگونلین، کولین و ساپوژنین‌های استروئیدی است، که در کاهش قندخون بسیار موثر هستند (Omid-baigi, 2004). از جمله مهم‌ترین ساپوژنین‌های استروئیدی در شنبلیله می‌توان به دایوسجنین، یاموجنین، جیتوجنین، تریگوجنین، سارساپوژنین و یوکاجنین اشاره کرد. از اثرات درمانی آلکالوئیدها و فلاونوئیدهای موجود در دانه شنبلیله می‌توان به اثرات ضد دردی و ضد التهابی اشاره کرد (Mandegari et al., 2012). کاشت شنبلیله به‌عنوان یک محصول زراعی دیم به حفظ آب در مزرعه کمک خواهد کرد. در ضمن از این گیاه به‌عنوان علوفه، کود سبز و در تناوب زراعی با هدف غنی‌سازی خاک استفاده می‌شود (Zandi et al., 2015; Fedacko et al., 2016).

۲-۵-۱- پراکنش شنبلیله

اگرچه منشا شنبلیله متعلق به نواحی آفریقای شمالی و سواحل شرقی است، اما اکثر محققین اعتقاد دارند که این گیاه در ابتدا بومی ایران بوده است و در طول تاریخ به سایر مناطق منتقل شده است. شنبلیله به صورت وسیعی در کشورهای هند، چین، آفریقا، الجزیره، عربستان سعودی، پاکستان، مصر، ترکیه، اوکراین، اسپانیا و ایتالیا کشت می‌شود. در حدود ۱۰۰ گونه وحشی و زراعی از شنبلیله تاکنون در کل دنیا شناسایی شده است. حضور بیش از ۳۲ گونه از این ۱۰۰ گونه در آذربایجان، اصفهان، فارس، خراسان، سمنان، دامغان و نیز مناطق مرکزی گزارش شده است. کشورهای هند، مراکش، چین و ترکیه جزء بزرگترین صادرکننده این گیاه دارویی محسوب می‌شوند (Dini, 2006).

۲-۵-۲- موارد مصرف شنبلیله

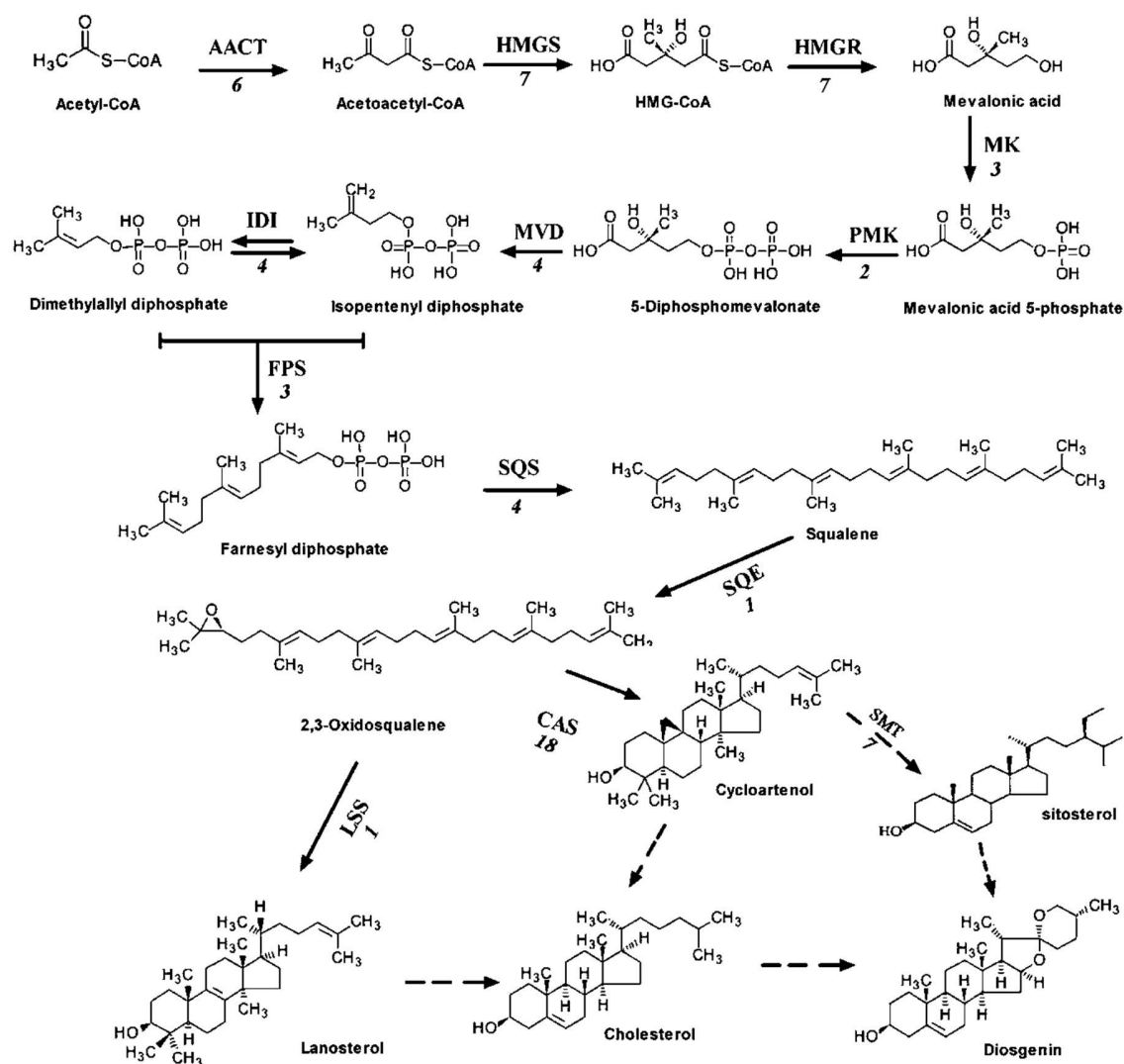
با توجه به وجود مقادیر زیادی پروتئین غذایی در شنبلیله، این گیاه منبع مناسبی برای تغذیه انسان و دام محسوب می‌گردد. شنبلیله دارای طیف گسترده‌ای از خواص درمانی از قبیل اثرات ضد درد، ضد آترواسکلروز، ضد التهاب، ضد نفخ، ضد اسپاسم، ضد سرطان، پایین‌آورنده قندخون، افزایش‌دهنده میل جنسی، قابض، مقوی قلب، صفراآور، ملین، خلط‌آور، کاهش‌دهنده کلسترول خون، کاهش‌دهنده چربی خون، کاهش‌دهنده تری-گلیسرید خون، شیر افزایی، مسهل و ضدکرم می‌باشد، که ارزش و اهمیت آن را دو چندان کرده است. در ضمن، این گیاه تامین‌کننده بخشی از مواد خام صنایع داروسازی آرایشی و بهداشتی است. تریگونلین و اسید نیکوتینیک دو ترکیب دارویی ارزشمند در شنبلیله محسوب می‌شوند که در درمان دیابت و کلسترول خون (کاهنده) بسیار موثر هستند (Joanna et al., 2015).

دایوسجنین مهم‌ترین ترکیب دارویی موجود در شنبلیله است، که در تولید داروهای استروئیدی و هورمون‌هایی از قبیل تستوسترون، گلوکوکوریکوئیدها و پروژسترون کاربرد دارد (Joanna et al., 2015). عموماً، دایوسجنین توسط گونه‌های *Dioscorea* تولید می‌شود و در تولید بیش از ۳۰ داروی هورمونی در صنعت داروسازی کاربرد

دارد. دایوسجنین، در مقادیر زیاد در شنبلیله، یام و پلی گوناتوم تولید می شود (Tohda *et al.*, 2017). هم اکنون بیش از ۶۰ درصد از داروهای استروئیدی و پیشگیری از بارداری جزء مشتقات دایوسجنین محسوب می شوند (Pang *et al.*, 2015). همانطور که گفته شد گیاه یام نیز سرشار از دایوسجنین است، اما از آنجا که دوره رشد این گیاه سه سال طول می کشد و استخراج دایوسجنین از ریشه ی این گیاه بسیار هزینه بر می باشد، به نظر می رسد شنبلیله می تواند به عنوان یک منبع مناسب و جایگزین برای گیاه یام در نظر گرفته شود (Acharya *et al.*, 2008; Zerbino and Birney, 2008).

۲-۶- مسیر بیوسنتز دایوسجنین

مسیر بیوسنتزی دایوسجنین در شنبلیله دارای ابهامات زیادی است و اطلاعات اندکی درباره این مسیر بیوسنتزی وجود دارد (شکل ۱-۲). دو مسیر لانوسترول (Vaidya *et al.*, 2013) و سیکلوآرتنول (Tomita and Uomori, 1971) برای بیوسنتز دایوسجنین پیشنهاد شده است. اولین ژن در این مسیر اسکوالن سنتاز (SQS) نام دارد، که دو مولکول فرنسیل پیروفسفات را به اسکوالن تبدیل می کند (Nguyen *et al.*, 2013). سپس، در مرحله بعد اسکوالن اپوکسیداز (SEP) اسکوالن را به اکسیدواسکوالن اکسید می کند (He *et al.*, 2008). متعاقباً، سیکلوآرتنول سنتاز (CAS)، وظیفه تبدیل اکسیدواسکوالن را به سیکلوآرتنول برعهده دارد. مهم ترین مرحله در بیوسنتز دایوسجنین از این نقطه آغاز می گردد، جایی که آنزیم دلتا-۲۴-ردوکتاز منجر به تشکیل کلسترول و استرول - متیل ترانسفراز (SMT1) خواهد شد (Diener *et al.*, 2000). این مسیر در حقیقت یک مسیر رقیب برای بیوسنتز دایوسجنین است، چراکه با فعالیت این آنزیم این مسیر به سمت تولید سایر استرول های گیاهی غیر از دایوسجنین متمایل می گردد. در مسیر دیگر، با فعالیت ژن SSR، این مسیر بیوسنتزی به سمت تولید دایوسجنین هدایت می گردد. سپس بعد از گذر از چندین مرحله مختلف، furostanol glycoside 26-O-beta- glucosidase (BGL) مرحله ی نهایی تشکیل دایوسجنین را کنترل می کند (Inoue and Ebizuka, 1996).



شکل ۲-۱- تصویری شماتیک از مسیر بیوسنتزی دیوسجنین و ژن‌های دخیل در این مسیر بیوسنتزی، Inoue and Ebizuka (1996)

۲-۷- تنش

تنش (Stress) در حقیقت در نتیجه عکس‌العمل گیاه نسبت به ناملایمات محیطی بروز می‌کند، که منتج به کاهش یا توقف فعالیت‌های طبیعی گیاه و در نتیجه کاهش کیفیت و کمیت تولیدات گیاهی می‌گردد. تنش‌ها مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر عملکرد محصولات کشاورزی هستند، چراکه دارای گستردگی وسیعی در تمام جهان می‌باشند. گیاهان همواره در طول دوره‌ی زندگی خود با انواعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی مواجه

می‌شوند. تنش‌های زیستی به علت حمله‌ی موجودات زیستی از قبیل آفات و بیماری‌ها بروز می‌یابند. در حالی- که عامل بروز تنش‌های غیرزیستی عواملی از قبیل دمای بالا و پایین، شوری، خشکی، فلزات سنگین، پرتوهای فرابنفش، کمبود و یا زیادبود ناشی از عناصر موجود در خاک است (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

تنش‌ها را می‌توان به دو دسته اولیه و ثانویه نیز تقسیم کرد. مراحل ابتدای بروز تنش، تنش اولیه محسوب می‌شود که منجر به بروز تغییراتی در سیستم زیستی گیاه می‌گردد. اگر تنش ادامه یابد، تنش ثانویه ظاهر می‌گردد، که آسیب حاصل از آن شدید خواهد بود. بنابراین اثرات برخی از تنش‌ها سریع و برخی دیگر ممکن است روزها و هفته‌ها به طول بی‌انجامد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). پیش‌بینی می‌شود که در آینده کشاورزی با دو مشکل تاثیرگذار تامین منابع غذایی و کاهش زمین‌های کشاورزی به دلیل مدیریت ناصحیح و تغییرات آب-وهوایی مواجه گردد (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

گیاهان به منظور سازگاری نسبت به تنش‌های محیطی انواعی از پاسخ از قبیل مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی را از خود نشان می‌دهند (Hardainiyan *et al.*, 2015). یکی از مهم‌ترین تغییرات مورفولوژیکی در پاسخ به تنش در گیاهان، پژمردگی و لوله‌ای شدن برگ‌ها است که منجر به کاهش تعرق و جذب نور در گیاه می‌شود. همچنین، تجمع و افزایش تولید تنظیم‌کننده‌های اسمزی از قبیل پرولین و قند جزء مهم‌ترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاه هستند، که در نهایت منجر به افزایش تحمل سلول در برابر بروز تنش می‌شوند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

۲-۷-۱- تنش شوری

شوری به حالتی در خاک اطلاق می‌گردد، که نمک در لایه‌های بالایی و زیرین تجمع یابد. شوری از مهم‌ترین عوامل محدودکننده‌ی رشد و نمو گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌گردد (موسوی پورناکی و همکاران، ۱۳۹۲). این مناطق دارای تبخیر زیاد و بارندگی اندک و پراکنده‌ای هستند، که منجر به تجمع بیشتر

املاح در خاک می‌گردد (امام و همکاران، ۱۳۹۲). بیش از ۱۵ درصد از زمین‌های زراعی در دنیا (مسعودی و همکاران، ۱۳۸۹) و بیش از ۴۰ میلیون هکتار از اراضی ایران با شدت‌های متفاوتی تحت تاثیر شوری قرار دارند. شوری طبیعی (اولیه)، در مدت زمان‌های طولانی ناشی از تجمع املاح حاصل از رویدادهای طبیعی در خاک یا آب‌های زیرزمینی ایجاد می‌گردد. بدین صورت که در اثر رخدادهای طبیعی، نمک‌ها و املاح آزاد می‌شوند و در طی مدت زمان طولانی در خاک و یا آب‌های زیرزمینی تجمع می‌یابند و در نهایت منجر به شوری خواهند شد. در حالی که، شوری ثانویه به علت انجام فعالیت‌های انسانی شکل می‌گیرد. در این حالت فعالیت‌های بشر منجر به برهم خوردن تعادل هیدرولوژیکی خاک می‌گردد و نتیجه این مورد ایجاد عدم تعادل بین آب ورودی و آب مصرفی گیاه می‌شود. بروز پدیده شوری بیشتر مختص مناطق خشک و نیمه‌خشک است، چراکه در این مناطق میزان بارندگی جهت شستشوی نمک‌های محلول خاک کافی نیست. عواملی از قبیل هوازدگی سنگ مادری، عوامل جغرافیایی، فرسایش بادی می‌تواند منجر به ایجاد شوری در خاک شوند. همچنین مدیریت نامطلوب آب آبیاری، تسطیح ناصحیح اراضی و تخریب پوشش گیاهی نیز در بروز این پدیده موثر هستند. در خاک‌های شور عناصری از جمله سدیم، کلسیم، منیزیم، پتاسیم کلرید، سولفات، بیکربنات، کربنات و نیتрат تجمع می‌یابند (Kant et al., 2008). اگرچه، سدیم کلرید شایع‌ترین و محلول‌ترین عامل شوری در بیشتر مناطق دنیا است (Mahmoudi et al., 2016). وجود املاح زیاد در خاک‌های کشاورزی و یا آب آبیاری منجر به بروز تنش در گیاه می‌شود و یکی از مهم‌ترین معضلات تولید محصولات کشاورزی در دنیا محسوب می‌گردد (Xu and Mou, 2016). در حال حاضر، شوری یکی از فراوان‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که هم رشد و نمو گیاه را محدود می‌کند و هم منجر به کاهش عملکرد گیاهان می‌شود. تنش شوری به غلظتی از املاح محلول در آب یا خاک اطلاق می‌گردد که منجر به ایجاد محدودیت در رشد و نمو گیاه می‌شود. بنابراین، میزان این غلظت با توجه به میزان تحمل گیاه ممکن است متفاوت باشد. تنش اسمزی منتج از تنش شوری، منجر به جذب زیاد یون‌ها و یا کمبود مواد غذایی می‌شود (Talaat et al., 2015). در حقیقت، بسیاری از جنبه‌های رشدی، فیزیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاه تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد (Amirjani,

2010). اگرچه شدت بروز این پاسخ به نوع گیاه، مرحله‌ی رشد آن، غلظت و ترکیب نمک وابسته است (Oliveira *et al.*, 2013). گیاهان برای مقابله با تنش شوری دارای مکانیسم‌های مختلفی به‌منظور جذب و انباشتن یون در اندام‌های خود هستند. یکی از اثرات مخرب شوری بروز تنش اکسیداتیو است که منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد (Nxele *et al.*, 2017). در طی شوری، دسترسی گیاه به انرژی و متابولیت‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه گیاه در طی مدت جوانه‌زنی بذر و استقرار گیاهچه آسیب‌پذیر خواهد بود (Cheng *et al.*, 2016). در طی بروز تنش شوری، تقسیم سلول و بزرگ شدن سلول‌ها و واکنش‌های متابولیکی گیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. شایع‌ترین اثر شوری تاخیر در جوانه‌زنی و رشد است، زیرا تجمع املاح موجود در خاک منجر به کاهش پتانسیل اسمزی و در نتیجه کاهش جذب آب و در نهایت اختلال در جوانه‌زنی گیاهچه می‌شود. در طی تنش شوری قندهای محلول، اسیدهای چرب، محتوای پروتئین و پرولین افزایش می‌یابد، که این تغییرات منجر به بروز عدم تعادل غذایی و سمیت می‌گردند (Said-Alahl and Omer., 2011). وقوع تنش شدید و ممتد، منجر به ایجاد وضعیت ناپایدار و غیرقابل تحمل در گیاه می‌گردد و این تغییرات (با توجه به میزان تحمل متفاوت گیاهان) موجب کاهش رشد و یا مرگ سلول و گیاه می‌شود (Karimi-Afshar *et al.*, 2015).

صفت تحمل به شوری، یک صفت کمی است و توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌گردد. بنابراین بهترین راهکار جهت توسعه گیاهان مقاوم، شناسایی و غربال ژنوتیپ‌های مختلف تحت تنش شوری و گزینش ژنوتیپ‌هایی متحمل است. دسترسی به وجود تنوع ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موفقیت در این گونه روش‌های اصلاحی است، چراکه وجود تنوع کافی امکان گزینش ژنوتیپ‌های متحمل‌تر را فراهم می‌آورد (منیری‌فر و مظلومی، ۱۳۹۳).

در طی بروز تنش شوری مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند (Lin *et al.*, 2018). تولید گونه‌های فعال اکسیژن هم باعث آسیب به سلول‌های گیاهی می‌شوند و هم به‌نوعی منجر به ظهور پاسخ‌های حفاظتی در گیاه می‌گردند (Guo *et al.*, 2018). کاهش هدایت روزنه‌ای و میزان CO_2 درون سلولی، کاهش

محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و تغییرات ساختاری کلروپلاست، کاهش حجم سیتوپلاسم، کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو، مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین، تجمع و تخریب غشا تیلاکوئید به واسطه تولید رادیکال-های آزاد، مهار زنجیره انتقال الکترون به علت افزایش بیش از حد یون سدیم در سیتوزول، مهار انتقال الکترون از آب به فتوسیستم ۲ و تخریب ساختار غشا از جمله مهم‌ترین پاسخ‌های حفاظتی در گیاهان هستند (Jajoo, 2013). همچنین، تنش شوری منجر به کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی، کاهش سرعت جوانه-زنی و سرعت فتوسنتز و در نهایت کاهش تولید انرژی می‌شود (Li et al., 2012). مکانیسم‌های مختلفی برای مقابله با تنش شوری در گیاهان توسعه یافته‌اند (Min et al., 2018). جذب و خروج انتخابی یون‌ها، بیوسنتز و تجمع املاح آلی و تغییر در ترکیب غشا از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های سلولی در گیاهان است (Feng et al., 2015). همچنین کنترل جذب یون توسط ریشه‌ها و انتقال آن به شاخه‌ها، انتقال یون‌ها از شاخه‌ها به اندام‌های مختلف، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر در سطوح هورمون‌های گیاهی جزء مهم‌ترین مکانیسم‌های مرتبط با کل گیاه است (Guo et al., 2018; Liu et al., 2018). اتیلن (Martínez-Medina, 2017)، جاسمونیک اسید (Li et al., 2016)، جیبرلیک اسید (Yoshida et al., 2015)، آبسزیک اسید (Domingos et al., 2015)، نیتریک اکسید (Chen et al., 2016)، سولفید هیدروژن (Ding et al., 2010) و کلسیم (Gilroy et al., 2016) از جمله مهم‌ترین هورمون‌ها و مولکول‌های پاسخ دهنده به تنش شوری هستند که در بحث پیام-رسانی سلولی دخیل هستند.

۲-۸- هورمون‌های گیاهی

هورمون‌های گیاهی ترکیباتی هستند که در مقادیر اندک در گیاهان و در بخش‌های مختلف سنتز می‌شوند و معمولاً اثرات فیزیولوژیکی خود را پس از انتقال به سایر بخش‌های گیاه به‌جای می‌گذارند. هورمون‌های گیاهی در بافت‌های مریستمی یا جوان سنتز می‌شوند (Kagale et al., 2007). این هورمون‌ها در جایگاه‌های هدف و در تنظیم رشد سلول‌ها در بافت‌های گیاهی موثر هستند (Zhao, 2010). این ترکیبات هم به‌صورت طبیعی و هم

به صورت شیمیایی تولید می‌شوند (Jager *et al.*, 2008) و مسئول کنترل و تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی هستند.

علاوه بر تنظیم جنبه‌های رشد و نمو در گیاهان، هورمون‌ها در کنترل پاسخ به تنش‌های محیطی و تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی نیز نقش دارند. با توجه به عملکرد هورمون‌ها در گیاهان، اخیراً کاربرد خارجی آن‌ها جهت افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد توجه قرار گرفته است. در حقیقت کاربرد خارجی آن‌ها بدون اختلال در فرایندهای سلولی منجر به فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی و در نهایت افزایش تحمل گیاهان می‌گردد (عازمی و دهستانی، ۱۳۹۶).

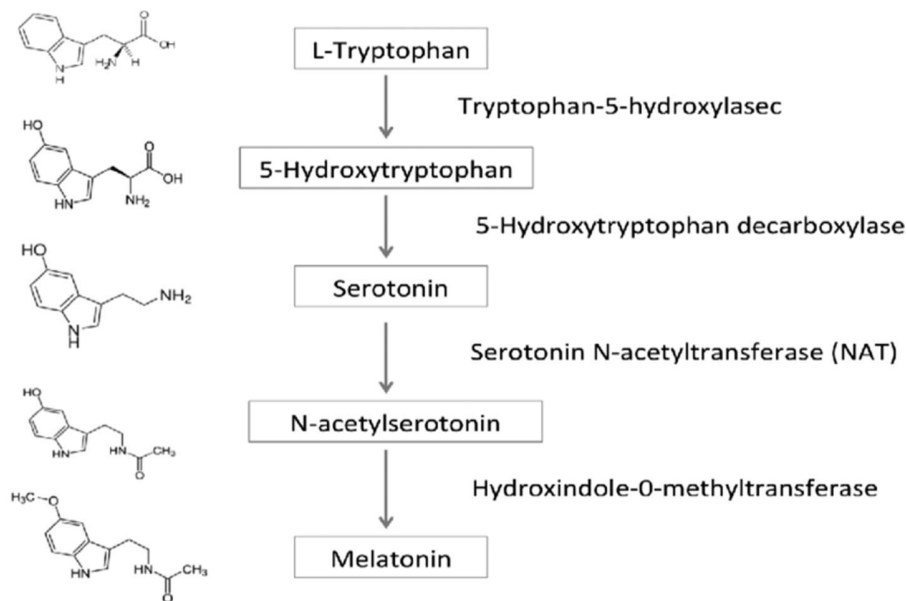
۲-۸-۱- ملاتونین

ملاتونین یا N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در همه‌ی موجودات زنده از باکتری تا گیاهان و حیوانات تولید می‌شود. ملاتونین گیاهی، در سال ۱۹۹۵ در گونه‌های مختلف گیاهان و در اندام‌های مختلف مشاهده شد (Dubbels *et al.*, 1995). میزان بیوسنتز این هورمون در گونه‌های گیاهی متغیر است (Arnao and Hernandez-Ruiz., 2015). اثرات مثبت این هورمون در تعدیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر شده است تا از آن به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی رشدی جدید در گیاهان یاد شود. ملاتونین در گیاهان به صورت ویژه‌ای در تنظیم گلدهی و جوانه‌زنی بذر، رشد و توسعه ریشه، فتوسنتز، چرخه‌های شبانه‌روزی، تنظیم رشد و نمو و افزایش تحمل نسبت به تنش‌ها موثر است. ملاتونین دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بیشتری نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌ها است، که احتمالاً با انتقال کارآمد ملاتونین به واسطه محفظه‌های سلولی مرتبط می‌باشد (Martinez *et al.*, 2018). به غیر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ملاتونین بیان بسیاری از ژن‌های مرتبط با فرایندهای فیزیولوژیکی را نیز تنظیم می‌کند.

یافته‌ها نشان می‌دهند که ملاتونین احتمالاً در میتوکندری و کلروپلاست سنتز می‌شود (Tan *et al.*, 2013) و میزان بیوسنتز آن به شدت با چرخه‌های شبانه‌روزی و فصلی در گیاهان مرتبط است (Beilby *et al.*, 2015). در

ضمن، شرایط محیطی از قبیل تنش و مراحل رشدی گیاه نیز بر محتوای آن موثر هستند. باوجود این که ظرفیت گونه‌های مختلف گیاهی از نظر میزان تولید ملاتونین بسیار متفاوت است، اما پراکنش درون‌زاد آن در اندام‌های مختلف و دوره‌های رشد متفاوت در گیاهان مشابه می‌باشد (Hernández-Ruiz and Arnao., 2008). تریپتوفان، پیش‌ساز ملاتونین است و در طی چهار واکنش آنزیمی به ملاتونین تبدیل می‌شود (شکل ۲-۲). در این مسیر، ابتدا تریپتوفان توسط آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز به تریپتامین تبدیل می‌شود. سپس، در مرحله بعد این ماده با کمک آنزیم تریپتامین-۵-هیدروکسیلاز به سروتونین تبدیل می‌شود (Posmyk and Janas., 2009). سروتونین با حضور N-استیل ترانسفراز در طی یک واکنش کاتالیکی به N-استیل سروتونین تبدیل می‌گردد. در نهایت، N-استیل سروتونین با استفاده از N-استیل سروتونین متیل ترانسفراز به ملاتونین تبدیل می‌شود. غلظت ملاتونین با میزان حضور پیش‌سازهای آن مرتبط است (Hardeland, 2016). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد، که ملاتونین با سایر هورمون‌ها از قبیل زناتین، جاسمونیک اسید، ۲۴-پی براسینواستروئید و آبسزیک اسید در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان دارای ارتباط نزدیکی است (Hardeland, 2016).

ملاتونین در پاسخ گیاهان نسبت به انواع تنش‌های غیرزیستی از قبیل شوری (Jiang *et al.*, 2020)، خشکی (Wang *et al.*, 2013)، فلزات سنگین (Posmyk *et al.*, 2008)، سرما و گرما (Shi *et al.*, 2015) موثر است. این هورمون به واسطه آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش کارایی فتوسنتز، افزایش فعالیت آنزیم‌های غیرآنتی‌اکسیدانی و کنترل فعالیت عوامل رونویسی منجر به افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش می‌گردد. در شرایط تنش انواعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی‌فنول اکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) با هدف تنظیم هموستازی بیان می‌شوند. فعالیت فاکتورهای رونویسی مهمی از قبیل پروتئین انگشت روی و فاکتورهای شوک حرارتی به واسطه فعالیت ملاتونین در طی بروز تنش تنظیم و تعدیل می‌گردد، که این عامل در افزایش تحمل گیاهان موثر است (Liang *et al.*, 2017).



شکل ۲-۲ تصویری شماتیک از مسیر بیوسنتزی ملاتونین (Hardeland, 2016).

۲-۹- تجزیه کمی رونوشت

روش‌های مختلفی برای بررسی سطوح رونوشت‌ها از قبیل بیان افتراقی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Liang *et al.*, 2003)، تجزیه زنجیره‌ای بیان ژن (Velculescu *et al.*, 1995)، نورترن بلات (Parker, 1995)، هیبریداسیون در محل (Parker, 1995) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی (Boucher *et al.*, 1999) وجود دارند. از بین روش‌های مذکور، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی دارای کاربرد و اهمیت بیشتری است. این روش با هدف تکثیر توالی‌های RNA بیان شده مورد استفاده قرار می‌گیرد و در آن مقدار محصولات تولید شده به صورت کمی بررسی می‌شوند. با توجه به حساسیت بالای این روش، از آن برای مقایسه‌ی سطوح مختلف mRNA در تیمارهای مختلف، تشخیص اختلاف بین mRNAهای نزدیک و تعیین پروفایل بیان mRNA استفاده می‌شود (Bustin, 2000).

۲-۹-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی

در این روش از یک ماده فلورسنت جهت تشخیص میزان رونوشت استفاده می‌شود. میزان ماده‌ی فلورسنت آزاد شده در هر چرخه با مقدار محصولات تکثیر شده متناسب است. خوشبختانه این روش بسیار حساس، اختصاصی و تکرارپذیر است و محصول آن علی‌رغم سایر روش‌های بررسی بیان ژن، به پردازش‌های بعدی نیاز ندارد. به‌منظور اطمینان از تکثیر اختصاصی محصولات، از آنالیز منحنی ذوب استفاده می‌شود. با توجه به حساسیت زیاد RNA و تخریب‌پذیری آن نسبت به DNA، در این روش، ابتدا از روی RNA استخراج شده رشته مکمل آن یعنی cDNA سنتز می‌گردد، سپس از cDNA به‌منظور تکثیر و شناسایی محصولات تولید شده استفاده می‌شود (Bustin, 2000).

۲-۹-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی (qRT-PCR)

کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط کری مولیس در سال ۱۹۸۳ منجر به ظهور پیشرفت‌های شگرفی در مهندسی ژنتیک و مخصوصاً روش‌های تشخیص و بررسی تنوع ژنتیکی DNA شد (Mullis *et al.*, 2005). ایراد این تکنیک این است که با آن تنها قادر به تکثیر یک کپی از یک توالی خاص هستیم. با توجه به این‌که در هر چرخه از این واکنش بین مقدار توالی هدف آغازکننده واکنش و مقدار محصول نهایی حاصل از آن یک رابطه‌ی کمی وجود دارد، بنابراین امکان شناسایی این تغییرات در هر چرخه با استفاده از این روش وجود دارد و در نهایت قادر به ارزیابی تعداد نسخه‌های نهایی خواهیم بود (Caldana *et al.*, 2007).

در این روش، برخلاف PCR معمولی نیاز به پردازش داده‌ها با استفاده از ژل الکتروفورز مرتفع خواهد شد. این موضوع منجر به افزایش دقت و کاهش زمان مورد نیاز برای اجرای آزمایش خواهد شد. یکی از معایب ژل آگارز کاهش قدرت تشخیص آن به‌ویژه در مواردی است که اختلاف نمونه‌ها اندک می‌باشد. در ضمن استفاده از ژل آگارز دارای مشکلاتی از جمله دستی بودن فرایند، تمایز فقط بر اساس اندازه باندها، عدم ارائه‌ی نتایج کمی و کاربرد رنگ‌های بسیار سرطان‌زا از قبیل اتیدیوم بروماید است (Caldana *et al.*, 2007). این در حالی است که

در روش qRT-PCR امکان تشخیص کمترین میزان تفاوت نوکلئیک اسید بین نمونه‌ها امکان‌پذیر می‌باشد. در ضمن، در این روش امکان اندازه‌گیری مقدار محصول در هر چرخه وجود دارد. بنابراین کاربرد این روش به سرعت در حال افزایش است (Karbalaie Niya *et al.*, 2015; Sadeghi *et al.*, 2015).

۲-۹-۳- منحنی‌های ذوب

در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با نسخه‌برداری معکوس در زمان واقعی امکان بررسی اختصاصی بودن آغازگرها با استفاده از آنالیز منحنی ذوب در پایان هر واکنش وجود دارد. در ابتدا با توجه به پایین بودن درجه حرارت، سایر گرین به همه محصولات دو رشته‌ای متصل می‌شود و در این حالت میزان فلورسنت بالایی از آن ساطع می‌گردد. با افزایش درجه حرارت و تک رشته شدن محصولات، میزان فلورسنت ساطع شده کاهش می‌یابد. از این ویژگی برای رسم منحنی ذوب استفاده می‌شود. در رسم منحنی ذوب، درجه حرارت به آهستگی از دمای اتصال آغازگر تا حدود ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. در این حالت میزان فلورسنت به‌صورت مداوم و هم‌زمان با افزایش درجه حرارت اندازه‌گیری می‌شود و به‌صورت یک منحنی دو بعدی رسم می‌گردد. در نتیجه، کاهش زیادی در میزان فلورسنت مشاهده خواهد شد. بنابراین، باید فقط یک پیک در محدوده‌ی دمای آغازگر هدف مشاهده گردد که بیانگر اختصاصی بودن تکثیر آغازگر مذکور می‌باشد (Vandesompele *et al.*, 2002).

۲-۹-۴- نرمال‌سازی

در یک آزمایش بررسی بیان ژن، عوامل مختلفی از قبیل مقدار بافت، یکپارچگی یا مقدار RNA، نوع تیمار و دقت اندازه‌گیری متفاوت است. بنابراین جهت اجتناب از بروز اشتباهاتی از قبیل تنوع بین نمونه‌ها و بروز خطاهای رخ داده شده در طی آزمایش، ابتدا باید داده‌ها نرمال شوند. مبنای نرمال‌سازی سطح mRNA در شرایط شاهد، تعداد سلول است که این امر مخصوصاً در مواردی که نمونه‌های بافتی به‌صورت کامل استفاده می‌شوند، غیرممکن خواهد بود (Vandesompele *et al.*, 2002). بنابراین در آزمایشات بررسی بیان ژن، باید از

حداقل یک ژن به عنوان عامل کنترل نرمال ساز استفاده کرد. این ژن کنترل باید دارای یک فرم ثابت و بدون تغییر در شرایط آزمایش باشد، اگرچه دستیابی به چنین ژنی تقریباً غیرممکن است. بنابراین پیشنهاد می-گردد که برای هر آزمایش پایداری بیان ژن یا ژنهای کنترل اختصاصی به منظور تایید صحت آزمایش بررسی شود (Wong and Medrano., 2005).

۲-۹-۵- ژنهای کنترل

تعیین کمیت ژن هدف در یک نمونه خاص و یا مشاهده تغییرات بیان آن در یک شرایط ویژه یکی از اهداف آزمایشات qRT-PCR است. بنابراین تعیین درستی آزمایش در مراحل مختلف از این فرایند بسیار ضروری است. یکی از مشکلات مهم در این گونه آزمایشها، آلودگی DNA است که می تواند نتیجه آزمایش را به صورت کامل تحت تاثیر قرار دهد. جهت شناسایی این معضل از دو روش انجام رونویسی معکوس و طراحی آغازگر PCR بر مبنای محل اتصال دو اگزون استفاده می شود. با توجه به اینکه اختلاف معنی داری بین بازده روش رونویسی معکوس و میزان RNA موجود در واکنش ساخت DNA وجود ندارد، بنابراین باید برای شناسایی این تفاوت با استفاده از یک کنترل داخلی اقدام کرد (Liu and Saint., 2002). در این حالت استفاده از ژنهایی با بیان یکسان یا ژنهای خانه دار از قبیل ACTIN، 18S، GAPDH و β -Actin ضروری است (Banerjee *et al.*, 2000).

۲-۱۰- مرور منابع

زارع و همکاران (۱۳۹۸) در تحقیقی برای بررسی اثر هورمون ملاتونین بر میزان جوانه زنی بذر کلزا در شرایط تنش شوری، از هورمون ملاتونین به عنوان پیش تیمار در غلظت های ۷۰، ۳۵، ۱۰۵ و ۱۴۰ ppm و برای القای تنش شوری از سدیم کلرید در ۴ غلظت ۴۵، ۹۰، ۱۳۵ و ۱۸۰ میلی مولار استفاده کردند. نتیجه ی آزمایش بیانگر تاثیر مثبت پیش تیمار ملاتونین بر کلیه شاخص های جوانه زنی بذر در گیاه کلزا بود. پیش تیمار ملاتونین با غلظت ۱۴۰ ppm بالاترین مقادیر مربوط به شاخص و سرعت جوانه زنی و شاخص بنیه را نشان داد. همچنین

کمترین مقادیر صفات مورد بررسی مربوط به تیمار ۱۸۰ میلی مولار سدیم کلرید در شرایط عدم پیش تیمار بود. آن‌ها نتیجه گرفتند، که استفاده از پیش تیمار ملاتونین راهکار مناسبی برای افزایش تحمل تنش شوری در مرحله‌ی جوانه‌زنی و رشد اولیه‌ی گیاهچه‌های کلزا می‌باشد.

در آزمایشی زارع زینلی و همکاران (۱۳۹۸) به منظور افزایش تحمل گیاهک‌های جعفری آفریقایی در شرایط تنش شوری از دو سطح مختلف ملاتونین با غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار استفاده کردند. برای ایجاد تنش شوری از چهار سطح مختلف سدیم کلرید با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار استفاده شد. در پژوهش آن‌ها تنش شوری منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید و پیش تیمار با ملاتونین با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار سبب افزایش فعالیت کاتالاز شد. به طور کلی نتیجه‌ی این آزمایش نشان داد که تنش شوری منجر به کاهش محتوای پروتئین و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌گردد و کاربرد برون‌زاد ملاتونین سبب افزایش محتوای پروتئین و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهک‌های پیش تیمار شده شد.

به منظور بررسی تاثیر تنش شوری بر محتوای رنگدانه‌های تعدادی از توده‌های گیاه دارویی شنبلیله، معصومیان و همکاران (۱۳۹۶) آزمایشی را بر روی چهار توده از شهرهای نیشابور، شیروان، شیراز و اردکان انجام دادند. برای ایجاد تنش شوری از سدیم کلرید در چهار سطح ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میکرومولار استفاده کردند. با بررسی محتوای کلروفیل a و b، کاروتنوئید و آنتوسیانین مشاهده کردند که میزان کلروفیل a در غلظت نمک ۶۰ و ۹۰ میکرومولار و میزان کلروفیل b در غلظت نمک ۳۰ و ۶۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند. به علاوه محتوای آنتوسیانین نیز در تمامی سطوح شوری با افزایش معنی‌داری همراه بود.

در آزمایش رضانی و موسوی (۱۳۹۵) مشخص شد که تنش خشکی بر صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه و وزن خشک شنبلیله تاثیر چشمگیری دارد. در حالی که درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت تاثیر قرار نگرفتند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش تنش خشکی میانگین طول ریشه‌چه بر خلاف سایر صفات روند افزایشی داشت.

بناکار و همکاران (۱۳۹۸) با اعمال تنش شوری در هفت سطح (۰/۵، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ dS/m) صفات مورفولوژیک گیاه شنبلیله را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد، که شوری اثر قابل توجهی روی صفات وزن تر اندام هوایی و وزن خشک ریشه، قطر و ارتفاع ساقه، ضخامت و سطح برگ و همچنین فاصله میانگره دارد.

در پژوهشی تاثیر سطوح مختلف آبیاری و تنش شوری بر عملکرد و اجزای عملکرد گندم در منطقه‌ی بیرجند بررسی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلف آبیاری ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ درصد نیاز آبی گیاه و تیمار دیم با یک آبیاری تکمیلی و دو سطح آب غیرشور و شور بود. نتیجه‌ی آزمایش نشان داد، که سطوح مختلف آبیاری بر تمامی صفات مورد اندازه‌گیری از قبیل ارتفاع گیاه، سطح برگ، طول سنبله، وزن هزاردانه، وزن تر و خشک تک بوته، تعداد دانه در سنبله، عملکرد دانه و شاخص برداشت به صورت معنی‌دار موثر بوده است. در صورتی که تنش شوری فقط بر ارتفاع گیاه، سطح برگ و وزن هزاردانه موثر بود. نتایج این آزمایش نشان داد، که بیشترین کمترین مقادیر برای صفات مختلف به ترتیب در تیمارهای ۱۲۵ درصد نیاز آبی گیاه و دیم با یک آبیاری تکمیلی مشاهده شد (سعیدی نوقابی و همکاران، ۱۳۹۷).

به منظور بررسی تاثیر شوری بر محتوای رطوبت نسبی، پایداری غشا، محتوای کلروفیل، سدیم، پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار توسط فرهادی و همکاران (۱۳۹۵) اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل هشت توده‌ی بومی شنبلیله از اصفهان، تبریز، همدان، ساری، چالوس، آمل، مشهد و یاسوج و چهار سطح شوری (۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، میلی مولار و آب آشامیدنی به عنوان شاهد) بود. نتایج تجزیه‌های آماری نشان داد که تنش شوری اثر معنی‌داری بر محتوای رطوبت نسبی، پایداری غشا، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، سدیم، پتاسیم و میزان پرولین داشت. با افزایش سطوح شوری آب آبیاری، همه‌ی صفات به جز میزان پرولین، سدیم و نسبت سدیم به پتاسیم کاهش یافت.

Liu و همکاران (۲۰۱۸) در آزمایشی بر روی گیاه کلزا دریافتند که کاربرد ملاتونین با غلظت ۳۰ میلی‌مولار، باعث افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه نسبت به نمونه‌های تحت تنش شوری می‌شود. علاوه بر این با بررسی پارامترهای فیزیولوژیکی اظهار داشتند که محتوای POD, CAT, APX با کاربرد ملاتونین به ترتیب به میزان ۱۶/۵، ۱۹/۳ و ۱۴/۲ درصد افزایش یافت. در حالی که میزان H_2O_2 به نسبت ۱۱/۲ درصد کاهش یافت. همچنین تیمار ملاتونین، تجمع پرولین (۲۶/۸ درصد)، قندهای محلول (۱۵/۱ درصد) و پروتئین‌ها (۵۸/۸ درصد) را بهبود بخشید. آن‌ها نتیجه گرفتند، که کاربرد ملاتونین رشد ریشه را تسهیل می‌کند و از این طریق به طور موثری آسیب‌های ناشی از تنش شوری را در نهال‌های کلزا را کاهش می‌دهد.

در پژوهشی بر روی گیاه چای راندمان حفاظتی هورمون ملاتونین بر این گیاه تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار داده شد. نتایج آن‌ها نشان داد، که استفاده از ملاتونین برون‌زاد رشد گیاه و راندمان فتوسنتز را در شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد و منجر به تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تعدیل گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد. تجمع محلول‌های سازگار مانند قندهای محلول و پرولین نیز به واسطه‌ی استفاده از ملاتونین افزایش یافتند. به علاوه تیمار با ملاتونین مسیرهای کلیدی متابولیک مانند فنیل پروپانوئید، کلروفیل، بیوسنتز کاروتنوئید، تثبیت کربن و متابولیسم قند را تنظیم کرد. برای بررسی بیشتر آن‌ها فاکتورهای بیوشیمیایی و مکانیسم‌های مولکولی را نیز مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها دریافتند، که اعمال ملاتونین سطح بیان ژن‌های کلیدی موجود در فرآیندهای متابولیسم کلروفیل و دفاع آنتی‌اکسیدانی را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Zhang و همکاران (۲۰۲۰) (Sharma et al., 2020). تاثیر ملاتونین برون‌زاد بر گیاه خیار تحت تاثیر تنش شوری را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد، که استفاده از ملاتونین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار گونه‌های فعال اکسیژن زنده‌مانی سلول را تحت تنش شوری افزایش می‌دهد. به علاوه، این تیمار محتوای مالون دی‌آلدئید و هدایت الکتریکی غشاء را کاهش داد. تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که ملاتونین بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ژن‌های پروتئین‌کیناز ($MAPK$, $MAPK3$, $MAPK4$, $MAPK6$) و ژن‌های انتقال دهنده نمک SOS ($SOS1$, $SOS2$, $SOS3$) را تحت تنش شوری به طور قابل توجهی افزایش

می‌دهد. در نهایت آن‌ها بیان کردند، که در واقع ملاتونین با کاهش هیدروژن پراکسید، تیمار موثری بر روی گیاه خیار برای مقابله با تنش شوری است و این اثر احتمالا به واسطه‌ی تعامل ملاتونین با مسیر سیگنالینگ MAPK کنترل می‌شود.

Kaya و همکاران (۲۰۲۰) برای بررسی تاثیر نیتريک اکسید درون‌زاد بر محتوای سالیسیلیک اسید در تحمل تنش شوری در گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) آزمایشی را انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد، که تنش شوری باعث افزایش فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و آسکوربات ردوکتاز شد. علاوه بر این، تنش شوری باعث کاهش قابل توجه صفات فیزیولوژیکی مانند محتوای پتاسیم برگ، نسبت آسکوربات به دهیدروآسکوربیک اسید و نسبت گلوکاتایون به گلوکاتایون اکسید شد. اما در مقابل، افزایش قابل توجهی در محتوای هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدئید، نشت الکترولیت، پرولین برگ و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی رخ داد.

Turk و همکاران (۲۰۲۰) در آزمایشی تاثیر ملاتونین را بر تنفس میتوکندریایی و کارایی انرژی در برگ‌های گیاه ذرت تحت شرایط تنش سرما بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد، که تیمار ملاتونین و تنش سرما به تنهایی و همزمان با هم، باعث افزایش قابل توجهی در بیان ژن پیرووات دهیدروژناز، سترات سنتاز و مالات دهیدروژناز می‌گردد. در ضمن، بیان ژن و سطح پروتئین سیتوکروم اکسیداز افزایش یافت. بالاترین مقادیر برای تمامی این پارامترها در گیاهان تیمار شده با ملاتونین به دست آمد. از سوی دیگر، تنش سرما پارامترهایی از جمله طول ریشه، ارتفاع بوته، سطح برگ و میزان کلروفیل را کاهش و محتوای گونه‌های فعال اکسیژن از جمله آنیون سوپراکسید و هیدروژن پراکسید و محتوای مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت را افزایش داد. در ضمن، ملاتونین به طور قابل توجهی پارامترهای رشد گیاه را افزایش و محتوای گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو را تحت تنش سرما کاهش داد.

در پژوهشی با هدف بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و تحریک سیستم دفاعی شنبلیله، اثر ولتاژهای مختلف پلاسما با در معرض قرار دادن بذور گیاه در زمان‌های مختلف (۵/۰، ۱، ۲ و ۵ دقیقه) برای تعیین بهترین ترکیب از تیمارها مورد آزمایش قرار گرفت. اثر پلاسما بر پروتئین کل، کاروتنوئید، کلروفیل a، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز معنی دار بود. فعالیت کاتالاز به میزان ۲۴ درصد و گلوکاتیون پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به ترتیب به میزان ۵۳ و ۸۶ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش یافتند. علاوه بر این، بیان ژن‌های زنجیره جانبی استرول ردوکتاز، اسکوالن سنتاز، اسکوالن اپوکسیداز، سیکلوآرتنول سنتاز و استرول متیل ترانسفراز نسبت به نمونه‌های شاهد به ترتیب به میزان ۵/۲۶، ۳/۴۲، ۱/۹، ۴/۱۹ و ۳ برابر افزایش یافت. نتایج آن‌ها نشان داد، که می‌توان از پلاسما به عنوان یک روش با هدف افزایش تجمع دایوسجنین در شنبلیله استفاده کرد (Ebrahimi basabi et al., 2020).

در تحقیقی برای افزایش تولید محتوای دایوسجنین در شنبلیله از *Agrobacterium rizizes* به منظور القای ریشه‌های مویین استفاده شد. به همین منظور در این آزمایش از سویه‌های مختلف این باکتری از جمله ATCC15834، R1000، A4 و C58 و ژنوتیپ‌های مختلف شنبلیله با میزان تولید بالای دایوسجنین (رقم بوشرویه با ۲۸/۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و میزان کم تولید دایوسجنین (رقم همدان با ۶/۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک) استفاده شد. محتوای دایوسجنین در ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه A4 در رقم بوشرویه معادل ۱۴۳/۹۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود. مقایسه رونویسی و تجزیه و تحلیل متابولیت نشان داد، که بیان بیشتر ژن Δ_{24} -reductase، دلیل تجمع بیشتر دایوسجنین در ریشه‌های مویین است (Zolfaghari et al., 2020).

قریشی و همکاران (۱۳۹۸) با هدف افزایش محتوای تولید دایوسجنین شنبلیله آزمایشی را با غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در محیط کشت MS به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام دادند و با اندازه‌گیری برخی صفات در گیاهچه‌های نه روزه دریافتند، که میزان طول اندام هوایی و طول

ریشه و میزان وزن خشک اندام‌های هوایی تحت تاثیر غلظت‌های نانوذرات مس کاهش می‌یابند. همچنین محتوای دایوسجینین اندام هوایی تحت تاثیر غلظت ۵۰۰ میکرومولار نانوذرات مس بیشترین افزایش را از خود نشان داد.

در پژوهشی اثر روش‌های مختلف کاربرد ملاتونین بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی چغندر قند در معرض تنش شوری بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ملاتونین باعث بهبود رشد نهال چغندر قند، عملکرد ریشه و محتوای قند، سنتز کلروفیل، فعالیت فوتوسیستم II و پارامترهای تبادل گاز در شرایط تنش شوری می‌شود. علاوه بر این، ملاتونین با افزایش تجمع اسمولیت‌ها (بتائین، پرولین و قند محلول) ظرفیت تنظیم اسمزی را افزایش می‌دهد. همچنین ملاتونین فعالیت پمپ H^+ را در ریشه‌ها افزایش داد، بنابراین جریان هیدروژن و K^+ را بهبود بخشید و در نهایت منجر به حفظ هموستازی یونی و کاهش سمیت سدیم گردید (Zhang et al., 2021).

در پژوهشی Yan و همکاران (۲۰۲۱) مکانیسم افزایش کارایی فتوسنتز در برنج تیمار شده با ملاتونین تحت تنش شوری بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار ملاتونین باعث افزایش محتوای آب نسبی، ساکارز و نشاسته برنج تحت تنش شوری می‌شود. این امر عمدتاً به دلیل اثر ملاتونین بر افزایش نرخ فتوسنتز خالص و در نتیجه افزایش جذب و انتقال نور است. آن‌ها بیان کردند که تاثیر ملاتونین بر فتوسنتز برنج در شرایط تنش شوری عمدتاً به دلیل تنظیم سه فرآیند حفظ وضعیت گونه‌های فعال اکسیژن از طریق بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، بهبود چرخه گزانتوفیل، افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی فتوسنتز بود.

در پژوهشی ریشه‌های یونجه تحت شرایط تنش شوری (۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl) در شرایط آزمایشگاهی با غلظت‌های مختلف ملاتونین (۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) پیش تیمار شدند. نتایج نشان داد که استفاده برون‌زا از ملاتونین در ریشه‌های یونجه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش املاح سازگار به ویژه گلیسین بتائین

(GB)، کربوهیدرات‌های محلول و محتوای K^+ می‌شود. تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی نشان داد، که محتوای ایندول استیک اسید (IAA)، فلاونوئیدها، کربوهیدرات و Na^+ بهترین اهداف ملاتونین هستند (Jalili and Ehsanpour, 2021).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳- مواد و روش‌ها

۳-۱- شرایط رشد و نحوه اعمال تیمارها

به منظور بررسی اثر ملاتونین بر بیان برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و همچنین برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله آزمایشی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی انجام شد. بذور شنبلیله توده بومی بوشرویه از سازمان جهاد کشاورزی استان اصفهان تهیه شد. با توجه به مطالعات قبلی (Zolfaghari *et al.*, 2020)، این توده دارای بالاترین محتوای دایوسجنین در بین نه توده دیگر بود، لذا 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: 73-31-4, CAS number: 200-797-7) خریداری شد. ابتدا ملاتونین 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 در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای این منظور، ابتدا بذور گیاه شنبلیله ضدعفونی و در گلدان‌های ۱۵*۲۰ سانتی‌متری با ترکیب پیت‌ماس و پرلیت با نسبت برابر در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. پس از اطمینان از استقرار گیاهچه‌ها در مرحله سه برگی (هفت روزه‌گی)، ملاتونین به مدت دو هفته با غلظت‌های مختلف، همراه با آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه شد. سپس تیمار شوری در مرحله شش برگی (سه هفتگی) و به مدت دو هفته اعمال گردید. در نهایت در مرحله آغاز گلدهی (پنج هفتگی) نمونه‌های برگ‌ی جمع‌آوری و به منظور بررسی بیان ژن و صفات فیزیولوژیک در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. سدیم کلرید مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک (EC number: 231-598-3; CAS number: 7647-14-5) خریداری شد.

۳-۲- اندازه‌گیری کلروفیل

برای این منظور ابتدا ۵۰ میلی گرم بافت برگ با ازت مایع به خوبی پودر شده و در ۵ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید هموژنایز گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت درون حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند. در نهایت میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV 2150) و در طول موج-های ۴۸۰، ۶۴۹ و ۶۶۵ نانومتر تعیین گردید (Arnon, 1967) و محتوای کلروفیل a، b، مجموع آن‌ها و کاروتنوئید از طریق روابط زیر به دست آمد.

$$Chl\ a = (12.47 \times A_{665}) - (3.62 \times A_{649})$$

$$Chl\ b = (25.06 \times A_{649}) - (6.5 \times A_{665})$$

$$Total\ Chl = Chl\ a + Chl\ b$$

$$Carotenoid = ((1000 \times A_{480}) - (1.29\ Chl\ a - 53.78\ Chl\ b)) / 220$$

۳-۳- محتوای آب نسبی

محتوای آب نسبی با استفاده از روش Kirnak و همکاران (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. برای این منظور در پایان اعمال تنش از هر تیمار تعداد سه بوته و از هر بوته پنج برگ انتخاب و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. قطعات برگ به مدت ۲۴ ساعت در داخل آب مقطر در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد با نور کم قرار داده شدند. این عمل به منظور جذب آب و ایجاد حالت تورژسانس انجام شد. سپس، قطعات برگ مجدداً وزن شدند. در نهایت، برگ‌ها به دستگاه آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند و وزن خشک آن‌ها تعیین شد. محتوای آب نسبی برگ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\%RWC = [(W_f - W_d) / (W_t - W_d)] \times 100$$

در این رابطه W_f وزن تازه برگ، W_t وزن تورژسانس برگ و W_d وزن خشک برگ می‌باشد.

۳-۴- اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

در استخراج پروتئین کل ابتدا ۲۵۰ میلی گرم از بافت برگ با ازت مایع به خوبی پودر و به فالدکون‌های حاوی ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج منتقل شد. پس از ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در

دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام این مرحله، مایع رویی فالكون‌ها به تیوپ-های جدید منتقل شدند و به‌منظور قرائت پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در یخچال ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۳-۵- تهیه بافر استخراج

برای تهیه ۲۰۰ میلی لیتر بافر استخراج، ابتدا ۲/۴ گرم تریس در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و pH آن بر روی ۷/۸ تنظیم گردید. این محلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و مجدداً pH آن اندازه‌گیری گردید. در نهایت ۲۰ میلی لیتر گلیسرول به آن اضافه شد و با آب مقطر حجم محلول به ۲۰۰ میلی لیتر افزایش یافت.

۳-۶- تهیه محلول بردفورد

برای تهیه محلول بردفورد، ابتدا ۱ میلی گرم کوماسی بلو و ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد با هم مخلوط شدند. سپس به محلول حاصل ۱۰۰ میلی لیتر اسید ارتوفسفریک ۸۵ درصد (به تدریج و به صورت قطره قطره) اضافه شد. محلول پس از ۲۴ ساعت نگهداری در یخچال با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسید و در نهایت با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد و در محیط تاریک و خنک ذخیره گردید (۴ درجه سانتی گراد).

۳-۸- اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها

سه میلی لیتر از محلول بردفورد با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی درون فالكون مخلوط و برای اطمینان از مخلوط شدن، نمونه‌ها به شدت ورتکس شدند. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، غلظت پروتئین هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۳-۸- سنجش فعالیت کاتالاز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز سه میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با یکدیگر ترکیب شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فعالیت این آنزیم در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه و با فواصل زمانی ۳۰ ثانیه ای اندازه گیری و ثبت گردید. از آنجاکه بیشترین میزان جذب هیدروژن پراکسید در طول موج ۲۴۰ نانومتر است، با آغاز واکنش و با کاهش میزان هیدروژن پراکسید به واسطه ی واکنش با کاتالاز میزان جذب در این طول موج نیز به تدریج کاهش می یابد (Scebba et al., 1998).

۳-۹- سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت این آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت این آنزیم با فاز تاخیری ۶۰ ثانیه ای به مدت ۵ دقیقه با فواصل زمانی ۳۰ ثانیه ای ثبت گردید. در این آنزیم میزان جذب با گذشت زمان روند افزایشی دارد و بر اساس مقدار جذب ترکیب نارنجی رنگ تتراگایاکول در میلی گرم غلظت پروتئین میزان فعالیت آنزیم گایاکول محاسبه گردید. نوع و میزان مواد لازم برای سنجش این آنزیم در جدول ۳-۱ نشان داده شده است (Dionisio and Tobita, 1984).

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

ماده	مولاریته	میزان مورد نیاز (میکرولیتر)
بافر فسفات پتاسیم (pH=7)	۵۰ میلی مولار	۳۰۰۰
هیدروژن پراکسید	۳/۴۱ مولار	۵
محلول گایاکول	۲۰۰ میلی مولار	۳
عصاره آنزیم		۱۰۰
حجم کل		۳۱۰۵

۳-۱۰- سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت این آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط این واکنش حاوی ۶۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7)، ۴۰۰ میکرولیتر

آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار، ۱۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که با استفاده از روش (Ranieri *et al.*, 2000) در طول ۵ دقیقه فعالیت این آنزیم اندازه گیری و ثبت گردید.

۳-۱۱- سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

در این روش ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج که مواد مورد نیاز برای تهیه ی ۱۰۰ میلی لیتر از آن در جدول ۳-۲ نشان داده شده است، با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ی آنزیمی درون فالكون های ۱۵ میلی لیتری مخلوط گردید. سپس فالكون ها تحت تابش نور مصنوعی در فاصله ی ۳۰ سانتی متری به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از این مدت زمان در تاریکی قرار داده شدند. فعالیت این آنزیم نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Winge and Geller, 1984).

$$SOD_{Activity} = \frac{A_{560}(Control) - A_{560}(Sample)}{A_{560}(Control)}$$

جدول ۳-۲- میزان مواد مورد استفاده برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

ماده	میزان مورد نیاز (گرم)
فسفات سدیم آبدار	۱/۷۹
نیتروبلوتترازولیوم	۰/۸۸
متیونین	۰/۷۴۵
EDTA	۰/۳۷۲
ریبوفلاوین	۰/۰۰۷۵

برای تهیه ی نمونه ی کنترل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج با ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم مخلوط گردید و مانند نمونه های مورد آزمایش پس از قرارگیری در تابش مصنوعی به محیط تاریک منتقل شد. همچنین برای نمونه ی اصلی نیز همین میزان مواد از ابتدا در شرایط تاریکی مطلق قرار گرفت.

۳-۱۲- سنجش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز

جهت بررسی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز از عصاره آنزیمی استخراج شده برای فعالیت پراکسیداز استفاده می شود. جهت انجام آزمایش ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار با pH=۷/۶، با ۰/۴ میلی لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و در بن ماری ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه قرار گرفت. سپس تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد (Gauillard *et al.*, 1993).

۳-۱۳- اندازه گیری تحمل به شوری بر اساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی

تحمل به شوری بر اساس شاخص هدایت الکترولیتی بافت های خسارت دیده شنبلیله پس از اعمال تیمار شوری اندازه گیری شد (Hepburn *et al.*, 1968). بدین منظور ابتدا از هر تیمار برگ های کاملاً سالم جدا گردید و با استفاده از دستگاه پانچ دیسک هایی به اندازه ی ۱*۱ سانتی متر از برگ ها تهیه شد. سپس این دیسک ها به فالكون های محتوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر منتقل شدند. برای این که جذب آب توسط بافت ها به خوبی صورت گیرد، فالكون ها توسط پمپ خلا عاری از هوا شدند و پس از ورتکس ۵ ثانیه ای به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار داده شدند و میزان هدایت الکتریکی آن ها با استفاده از دستگاه EC متر اندازه گیری شد. پس از این مرحله، فالكون های محتوی نمونه های مورد آزمایش به مدت ۹۰ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از هم دما شدن محتوای فالكون ها با دمای اتاق، میزان هدایت الکتریکی آن ها مجدداً اندازه گیری گردید. مقدار شاخص خسارت نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$$

۳-۱۴- اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون دی آلدئید (MDA)

در این مرحله با استفاده از محلول تیوباریتوریک میزان اکسیداسیون گیاهچه ها بر اساس تجمع مالون دی آلدئید برگ اندازه گیری شد. به همین منظور ۲۵۰ میلی گرم بافت برگ پس از پودر شدن با نیتروژن مایع با ۴ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار مخلوط گردید و پس از ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت

۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد و با ۲ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک نیم درصد که محتوی تری‌کلرواستیک‌اسید بیست درصد در فالكون دیگر مخلوط گردید. فالكون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بلافاصله پس از اتمام این مرحله به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ انکوبه شدند. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Bewley and Stewart, 1980).

۳-۱۵- محتوای فنول کل

ابتدا نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس پودر شدند. در مرحله بعد، به ازای یک گرم نمونه گیاهی ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی صاف شدند و از این عصاره به منظور محاسبه محتوای فنول و فلاونوئید کل استفاده شد. میزان فنول کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو^۱ اندازه‌گیری شد (McDonald *et al.*, 2001). برای این منظور ابتدا محلول‌های زیر آماده شدند.

الف) محلول معرف فولین سیوکالتیو (غلظت ۱۰ درصد).

ب) محلول کربنات سدیم^۲ (یک مولار).

ج) محلول اسید گالیک^۳ با غلظت‌های مختلف (مقادیر موردنظر از اسید گالیک در حجم معینی از محلول متانول ۵۰ درصد حل شدند).

ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف سیوکالتیو با چهار میلی‌لیتر از محلول Na_2CO_3 یک مولار مخلوط شدند. در مرحله بعد، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی به مخلوط اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

^۱ FolinCiocalteu

^۲ Na_2CO_3

^۳ Gallic acid

۳-۱۶- محتوای فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا به ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره یا محلول استاندارد، ۴۰۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم دو درصد اضافه شد. مواد درون فالكون‌ها به خوبی مخلوط شدند و در مرحله بعد ۱۲۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم پنج درصد به آن‌ها اضافه شد. بعد از گذشت ۴۰ دقیقه (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد (Quettier-Deleu *et al.*, 2000).

۳-۱۷- محتوای قند کل

ابتدا به ۰/۲ گرم از بافت برگ‌ی پودر شده شنبلیله، ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه شد و هر نمونه به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول‌های رویی به منظور خشک شدن کامل الکل در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، به هر نمونه خشک شده ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر باریم هیدروکسید ۰/۳ نرمال و ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات روی ۵ درصد اضافه و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به دو میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل، یک میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۸ درصد (V/V) اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. در نهایت، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Schlegel, 1956).

۳-۱۸- عناصر معدنی

۳-۱۸-۱- محتوای کلر

جهت اندازه‌گیری محتوای عناصر معدنی از روش هضم و عصاره‌گیری استفاده شد. برای این منظور، ابتدا نمونه‌های برگ‌ی خشک و پودر شدند. سپس، ۰/۱ گرم از نمونه‌های پودر شده با استفاده از شش میلی‌لیتر مخلوط دو اسید $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (با نسبت حجمی ۵:۱) به خوبی همگن شدند. نمونه‌های هضم شده در حمام آب

گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند (این مرحله با هدف حذف اسید از محلول انجام شد). سپس، محلول‌های حاصله با کاغذ صافی صاف شدند و به حجم ۵۰ میلی‌لیتری رسانده شدند (در این مرحله از آب دو بار تقطیر بدون یون استفاده شد) (Sagner *et al.*, 1998). در نهایت غلظت کلر با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد.

۳-۱۸-۲- محتوای پتاسیم و سدیم

جهت اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم برگ، در ابتدا بافت برگی گیاهان در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی پودر شده و ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۰/۱ نرمال به آن اضافه گردید و فالكون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها به مدت دو ساعت در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، فیلتر شدند. از عصاره حاصل به منظور اندازه‌گیری محتوای سدیم و پتاسیم استفاده گردید. برای این منظور از دستگاه فلیم فتومتر استفاده شد (Kerber and Isaac, 1971).

۳-۱۹- محتوای اکسین

برای این منظور، ۱/۵ گرم از بافت برگی پودر شده در ۲۰ میلی‌لیتر عصاره استخراج (شامل نسبت مساوی متانول و آب) به خوبی هموژنیزه شد و محلول موردنظر با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول حاصل با استفاده از فریز درایر سرد و تبخیر شد (به مدت ۱۲ ساعت) و در نهایت، یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید. فاز متحرک شامل استونیتریل-آب با نسبت ۹۰:۱۰ بود (Zhou *et al.*, 2003). برای تعیین غلظت اکسین از ستون HPLC (۲۵ * ۴/۶ سانتی‌متر) استفاده شد. نرخ جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد. در ضمن استاندارد اکسین از شرکت سیگما (Sigma, Steinheim, Germany) خریداری گردید.

۳-۲۰- محتوای آبسازیک اسید

برای این منظور، ابتدا دو گرم برگ تر به خوبی پودر و در ۲۰ میلی لیتر محلول شامل ترکیبی از متانول، اتیل استات و اسید استیک به ترتیب با نسبت های (۱:۵۰:۴۹۰) حل شد (توجه: به این محلول ۲۰ میلی گرم Butylated hydroxy toluene به عنوان آنتی اکسیدان اضافه گردید) (Stewart and Hubick and Reid, 1980; Voetberg, 1985). محلول حاصل توسط کاغذ واتمن صاف و حجم نهایی آن به ۱۰۰ میلی لیتر افزایش یافت. به منظور تبخیر حلال از نمونه های گیاهی، از دستگاه روتاری در شرایط خلاء و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد استفاده شد (Zhang and Davies, 1989). سپس، ۱۰ میلی لیتر فسفات هیدروژن پتاسیم ۵۰۰ میلی مولار (pH=۸) به نمونه ها اضافه و مجدداً با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شدند. در نهایت pH محلول حاصل بر روی ۲/۵ تنظیم شد (Dasgupta and Bwley, 1984) و ۱۰ میلی لیتر اتیل استات به آن اضافه شد. به منظور حذف اتیل استات حاوی آبسازیک اسید و محلول فسفات هیدروژن پتاسیم از قیف دکانتور استفاده شد. در ضمن، برای آگیری از محلول اتیل استات حاوی آبسازیک اسید از ۰/۱ گرم سولفات سدیم استفاده گردید (Zhang and Davies, 1989). در مرحله بعد، پنج میلی لیتر متیل کلرید به عصاره خشک حاصل اضافه شد و نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت برای تبخیر متیل کلرید در دمای اتاق و در زیر دستگاه هود انکوبه شدند. سپس، ۳۰۰ میکرولیتر محلول متانول شامل یک درصد اسید استیک به عصاره خشک اضافه شد و محلول حاصله مجدداً توسط کاغذ صافی فیلتر و از این محلول برای تعیین غلظت آبسازیک اسید استفاده گردید. برای تعیین غلظت آبسازیک اسید از ستون HPLC (۲۵ * ۴/۶ سانتی متر) با فاصله زمانی ۴ تا ۵ دقیقه مطابق آبسازیک اسید استاندارد استفاده شد. فاز ثابت ستون شامل استونیتریل، آب و اسید فرمیک به ترتیب با نسبت های حجمی ۲۵: ۷۴/۹: ۰/۱ بود (Ackerson, 1980). نرخ جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد. در ضمن استاندارد آبسازیک اسید از شرکت سیگما (Sigma, Steinheim, Germany) خریداری شد.

۳-۲۱- محتوای H_2O_2

ابتدا، به ۰/۵ گرم بافت برگی (که در ازت مایع به خوبی پودر شده است) ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (TCA) اضافه شد و مخلوط موردنظر به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی، ۷۵۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار و ۱/۵ میلی لیتر از یدید پتاسیم یک مولار به خوبی با یکدیگر مخلوط شدند و میزان جذب آن‌ها در ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. محتوای H_2O_2 با استفاده از منحنی استاندارد رسم و اندازه گیری شد (Loreto and Velikova, 2001). با توجه به حساسیت H_2O_2 ، این آزمایش در تاریکی نسبی و بر روی یخ (دمای ۴ درجه سانتی گراد) انجام شد.

۳-۲۲- محتوای نیتریک اکسید

محتوای نیتریک اکسید، بر طبق دستورالعمل Zhou و همکاران (۲۰۰۵) اندازه گیری شد. برای این منظور، به ۰/۶ بافت برگی پودر شده سه میلی لیتر بافر اسید استیک سرد ۵۰ میلی مولار شامل چهار درصد استات روی با $pH = 4$ اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی-گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی نمونه‌های حاصل با ۱ میلی لیتر بافر استخراج شستشو داده شد و مجدداً با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید. به مایع رویی ۰/۱ گرم زغال فعال اضافه و به خوبی مخلوط شد و در نهایت با استفاده از فیلتر مناسب صاف گردید. ۱ میلی لیتر از محلول فیلتر شده با ۱ میلی لیتر معرف گریس مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت، میزان جذب محلول در ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

۳-۲۳- محتوای ملاتونین درونی

برای اندازه گیری ملاتونین، در ابتدا، به چهار گرم بافت برگی پودر شده ۱۰ میلی لیتر متانول اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۳۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ کردن با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی با استفاده از ازت مایع خشک شد. سپس، پودر حاصل در دو میلی لیتر متانول ۰/۵ درصد حل شدند و از یک ستون

استخراج فاز جامد C₁₈ (که قبلاً با ۱۰ میلی‌لیتر متانول و ۱۰ میلی‌لیتر آب فعال شده بود) عبور داده شد. محلول حاصل با استفاد از فیلتر ۰/۲ میکرومتری (Z290823, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) فیلتر شد و از این محلول برای اندازه‌گیری محتوای ملاتونین درونی استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل ۵۰ میلی‌مولار و بافر Na₂HPO₄/H₃PO₄ (۱۵:۸۵ حجمی با pH= ۴/۵) بود (and Pothinuch, 2011). و نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد. از استاندارد ملاتونین (Sigma, St. Louis, MO, USA) شرکت سیگما برای تعیین کمیت استفاده گردید. دستگاه HPLC دارای ستون C₁₈ با مشخصات ستون 250 × 4.6 mm بود و از طول موج ۲۸۰ نانومتر برای اندازه‌گیری محتوای ملاتونین استفاده شد.

۳-۲۴- محتوای دایوسجنین

برای این منظور، به یک گرم از بافت برگ‌ی پودر شده ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه شد و نمونه به‌صورت کامل هم‌نیزه گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک انکوبه شدند. سپس، به محلول حاصل ۲۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید (دو نرمال) اضافه و به مدت ۱۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کل محلول سه بار توسط n-هگزان دو فاز جداسازی گردید. سپس این محلول توسط n-هگزان و با هدف خنثی‌سازی حالت اسیدی با سدیم هیدروکسید یک مولار شستشو داده شد. محلول حاصل با آب دوبار تقطیر شستشو داده شد و در نهایت، محلول n-هگزان حاوی دایوسجنین پس از آب‌گیری توسط ۰/۲ گرم سولفات سدیم بدون آب، در شرایط خلا از طریق دستگاه روتاری خشک گردید. در پایان، عصاره حاصل در استونیتریل حل و از طریق فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر صاف شد (zhou *et al.*, 2010). فاز متحرک شامل محلول استونیتریل: آب با نسبت ۹۰:۱۰ بود. سرعت جریان در ۰/۵ میلی‌لیتر و طول موج ۲۱۰ نانومتر در نظر گرفته شد. از استاندارد دایوسجنین (Sigma, St. Louis, MO, USA) شرکت سیگما برای تعیین کمیت استفاده گردید.

۳-۲۵- بررسی بیان ژن

۳-۲۵-۱- 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 گردید. به منظور ساخت cDNA، از آغازگر Oligo (dT) 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 دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

۳-۲۵-۲- طراحی آغازگرها

آغازگرها (جدول ۳-۳) با استفاده از برنامه آنالین Primer 3 Plus طراحی شدند و به منظور کنترل صحت آن‌ها از برنامه Oligo Analyzer v.3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) 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^۴ شناسایی و جداسازی شدند و رابطه بین میزان بیان 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 گردید (Mohammadi et al., 2020).

⁴ Degenerate

جدول ۳-۳- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آنها

نام	توالی آغازگر (5'-3')		طول قطعه (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
	Forward	Reverse		
<i>SSR</i>	AGGTGGGAGATATG CTAGAATGGG	CATTCTGTGTGTCTCCCTG CC	۲۱۰	۶۰
<i>SMT</i>	GAGAAGGCTGCAGA GGGTCTAG	CACAGTAACTCATGACAA CAGCAACCT	۲۳۰	۶۰
<i>SEP</i>	CTATTCTCAGAAGGA CCGATCTC	CAGATGCACCAGAGAGTA ATCG	۲۲۰	۶۰
<i>CAS</i>	AAGAGAGATCCAAC ACCACTGC	TACATGACGACGGTATTC TCCC	۲۳۰	۶۰
<i>SQS</i>	GGCTCAACCATGATT CTCATACTG	TACCCACTGTTCCATTGCT ATCC	۱۶۰	۶۰
26-o-Beta glucosidase	TGGCATTGATGAGTT CAACGATCC	CACTGTATAACCTGCTGC CCA	۲۳۰	۶۰
Δ_7 -reductase	TTGACCGAGCGAAA AGGGATGA	GCACCAAGTGAAGGATTC CAGAC	۲۲۰	۶۰
<i>C₂₂</i> -hydroxylase	CTATGGGGTGACGAT GCTAAGATG	TGCTATTGCCATCTTTGCT TCCA	۲۳۰	۶۱
<i>C₄</i> -demethylase	ATGGAACACAAGGG TTTTCGGT	ACTGCCTACAATGCTTCT GCTCA	۲۱۰	۶۱
<i>GAPDH</i>	ATGTTAAATGATGCA GCCCTTC CACCTCTC	TATGTTTGTGTTGGTGTC AACG AGCAA CGAATACAAG	۲۳۰	۶۱

۳-۲۵-۳- 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 انجام شدند. واکنش PCR زمان واقعی، با استفاده از دستگاه ABI Step one و مطابق با ترکیبات جدول ۳-۴ انجام شد. در ضمن به منظور اطمینان از عدم آلودگی نمونه‌ها، از کنترل منفی در تمامی مراحل آزمایش استفاده شد. 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 ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جدول ۳-۴- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی

Materials	Volumes (μl)	Concentration
Nuclease Free Water	3	-
cDNA	1	50 ngμl ⁻¹
Forward Primer	0.5	10 pmolμl ⁻¹
Reverse Primer	0.5	10 pmolμl ⁻¹
SYBR®Green PCR Master Mix	5	2X
Total	10	-

۳-۲۶- تجزیه داده‌ها

با توجه به ماهیت داده‌های آزمایشی، این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در ضمن، آنالیز تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با روش دانکن و با استفاده از نرم افزار R انجام شد. قبل از آنالیز داده‌های بیان ژن‌های موردنظر در این تحقیق، از آنالیز منحنی ذوب و تکثیر به منظور تایید صحت داده‌ها استفاده شد. به منظور تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی، بیان نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی^۵ بر 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.

⁵ Relative standard curve method

فصل چہارم

نتایج و بحث

۴- نتایج

۴-۱- جدول تجزیه واریانس

نتایج جدول تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در جدول ۴-۱ ارائه شده است. اثرات سطوح مختلف شوری، ملاتونین و اثرات متقابل سطوح مختلف شوری در ملاتونین برای صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پلی فنول اکسیداز، گایاکول پراکسیداز، محتوای پروتئین کل، آسکورات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، محتوای فنول، محتوای آب نسبی، محتوای H_2O_2 ، محتوای آبسیزیک اسید، محتوای اکسین، محتوای کلر (Cl^-)، محتوای سدیم، محتوای پتاسیم، نسبت سدیم به پتاسیم، محتوای مالون دی آلدئید، شاخص نشت الکترولیت، محتوای فلاونوئید، محتوای ملاتونین درونی، محتوای نیتریک اکسید و محتوای قند کل در سطح یک درصد معنی دار بود. با توجه به این که اثرات متقابل سطوح مختلف شوری در سطوح مختلف ملاتونین برای تمامی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی معنی دار شده است، بنابراین در ادامه مبحث فقط اثرات متقابل بحث خواهد شد.

۴-۲- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی

۴-۲-۱- محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

اثر سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در شکل ۴-۱ ارائه شده است. نتایج نشان می دهد که محتوای کلروفیل و کاروتنوئید تحت تاثیر سطوح مختلف شوری مخصوصا شوری ۳۰۰ میلی-مولار به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) کاهش یافته است. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در غیاب تنش شوری منجر به افزایش معنی دار محتوای کلروفیل و کاروتنوئید نسبت به شرایط نرمال شد، به طوری که در همه ی صفات کاربرد ۶۰ ppm ملاتونین منجر به بیشترین افزایش گردید. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به همراه غلظت های مختلف شوری در تمامی صفات به صورت

معنی‌داری نه تنها مانع از کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید گردید، بلکه محتوای این صفات را نسبت به سطوح مختلف شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد.

جدول ۴- ۱- جدول تجزیه واریانس صفات بررسی شده در این پژوهش. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شده است.

مجموع مربعات	درجه آزادی	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	محتوای آب نسبی	پروتئین کل	کاتالاز	پلی فنول اکسیداز	گایاکول پراکسیداز
شوری	۲	۲۵۶/۳۴**	۱۰۶/۷۹**	۳۲/۳۷**	۱۸۳/۷۴**	۱۴۱۳**	۱۲۱۳۹۴**	۰/۰۰۳**	۰/۰۲۴**	۰/۰۴**
ملاتونین	۳	۱۰۷/۴۸**	۴۴/۹۲**	۱۳/۷۷**	۵۰/۳۰**	۸۱۰/۱**	۶۹۲۵۰**	۰/۰۰۱**	۰/۰۲۳**	۰/۰۲**
شوری:ملاتونین	۶	۸۲/۱۶**	۳۲/۲۶**	۱۱/۶۱**	۵۶/۴۱**	۴۵۳/۴**	۲۶۴۳۱**	۰/۰۰۰۴**	۰/۰۱۹**	۰/۰۰۷**
خطا	۲۴	۰/۳۷	۰/۲۶	۰/۱۵	۰/۳۹۳	۲	۲۷۷/۹۴	۲/۵۲۶e-۰۵	۷/۲۴e-۰۵	۳/۷۱e-۰۵
ضریب تغییرات		۲/۷۱	۳/۵۸	۴/۷۳	۳/۷۲	۲/۱۲	۵/۳۴	۱۰/۹۴	۱۰/۳۲	۴/۴۱

مجموع مربعات	درجه آزادی	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	نشت الکترولیت	مالون دی آلدئید	فلاونوئید	فنول کل	قند کل	پتاسیم	سدیم
شوری	۲	۰/۰۴**	۰/۰۰۱۲**	۲۲۸/۰۲**	۴۹/۶۲**	۴۳۹/۸**	۵۸۹/۸**	۳۱/۸۲**	۰/۵۴**	۱/۲۶**
ملاتونین	۳	۰/۱۳**	۰/۰۰۱۲**	۱۴۵/۵۲**	۳۶/۳۱**	۲۲۷/۷**	۲۲۸**	۱۵/۷۷**	۰/۴۹**	۰/۵۴**
شوری:ملاتونین	۶	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۰۵**	۱۶۱/۳**	۲۴/۴۸**	۱۲۹/۵**	۱۵۳/۵**	۶/۴۵**	۰/۳۲**	۰/۶۶**
خطا	۲۴	۱/۴۱	۸/۷۱e-۰۶	۰/۹۲	۰/۲۳	۰/۸	۰/۲۵	۰/۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات		۳/۰۰۷	۴/۷۶	۲/۵۱	۵/۳۳	۳/۶۴	۱/۵۶	۲/۶۱	۳/۱۵	۲/۵۴

** معنی داری در سطح ۱ درصد

** معنی داری در سطح ۱ درصد

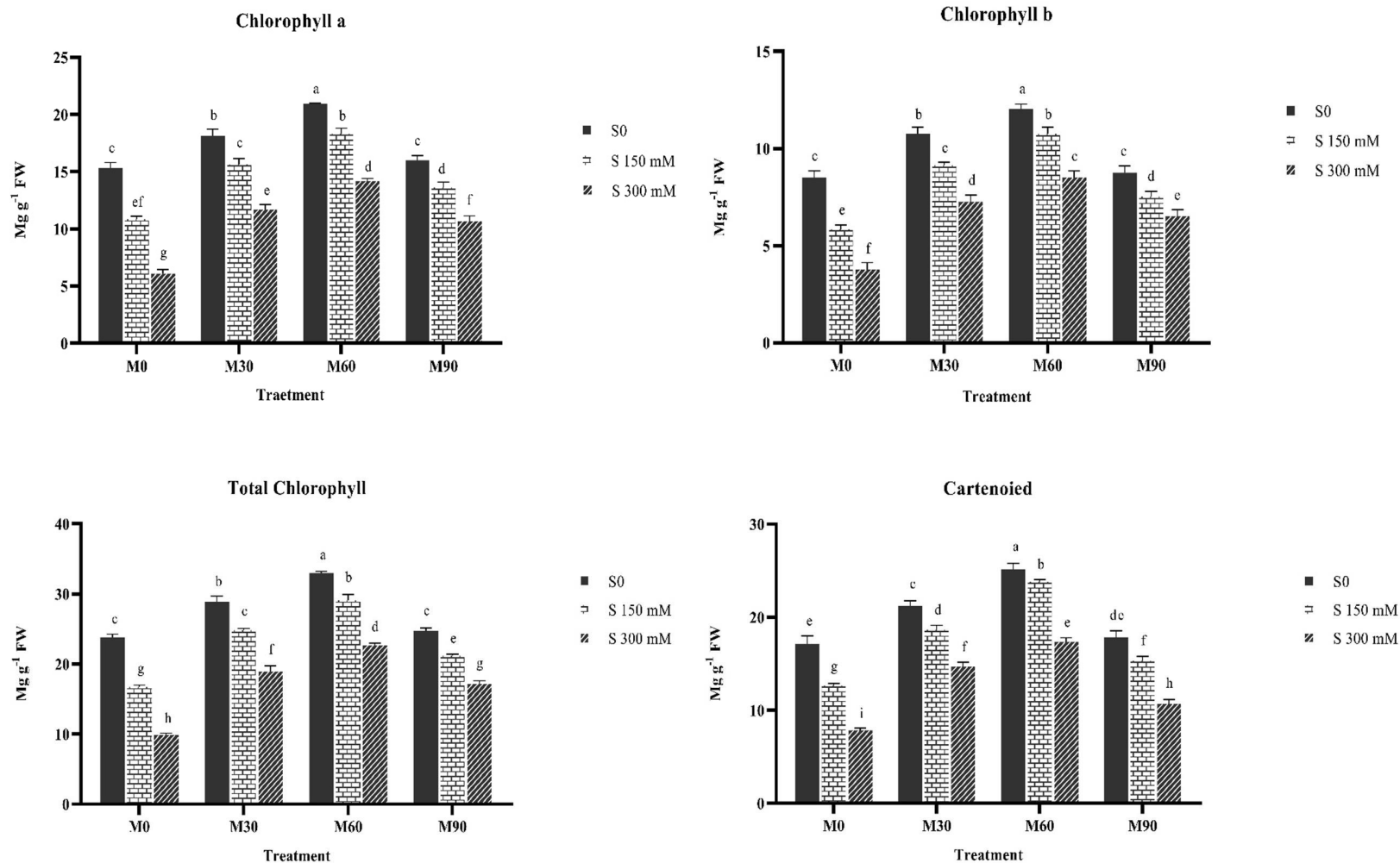
ادامه جدول ۱-۴

ادامه جدول ۱-۴

مجموع مربعات منابع تغییرات	درجه آزادی	کلر	سدیم / پتاسیم	آبسیزیک اسید	اکسین	نیتریک اسید	هیدروژن پراکسید	ملاتونین درونی	دایوسجینین
شوری	۲	۰/۰۸**	۱/۰۵**	۴۵۰/۲**	۳۲۳/۴**	۷۴/۹۷**	۱۰۲/۸۴**	۸۲۹/۱**	۳۴۷۵**
ملاتونین	۳	۰/۰۴**	۰/۶۲**	۲۵۹/۶**	۱۳۶/۷**	۶۱/۸**	۸۸/۲۷**	۱۲۲/۳**	۱۰۲۴**
شوری: ملاتونین	۶	۰/۰۳**	۰/۷۵**	۱۰۹/۱**	۱۰۱/۵**	۴۳/۴۸**	۵۸/۸۳**	۲۶**	۳۵۹۶**
خطا	۲۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۷۱۴	۰/۴۹	۰/۳۳	۰/۴۳	۰/۵۵	۴/۴۴c-۰۵
ضریب تغییرات		۳/۳۷	۵/۴۸	۳/۰۹	۲/۳۲	۴/۲۶	۴/۱۸	۵/۵۷	۳/۴۴

مجموع مربعات منابع تغییرات	درجه آزادی	BGL	C4	C7	C22	CAS	SEP	SMT	SQS	SSR
شوری	۲	۰/۰۶۷**	۵/۱**	۸/۵۳**	۲/۵۲**	۱۵/۱۱**	۳۲/۰۵**	۵/۱**	۲۵/۱**	۳۱/۸۷**
ملاتونین	۳	۰/۴۸۹**	۸/۵۸**	۸/۷۹**	۱۰/۲۳**	۱/۹۶**	۱۰/۶۹**	۱۰/۱۴**	۶/۷**	۱۰/۴۸**
شوری: ملاتونین	۶	۰/۲۰۱**	۰/۸۳**	۷/۱۸۷**	۲/۸۱**	۱۰/۸۸**	۲۱/۱۱**	۵/۰۲**	۱۷/۷**	۲۱/۷۸**
خطا	۲۴	۰/۰۰۶	۰/۱۴	۰/۰۹	۰/۱۰۵	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۲۱	۰/۱۴	۰/۱۷
ضریب تغییرات		۱۲/۸۹	۱۴/۷۷	۱۳/۷۸	۱۱/۶۲	۱۲/۷	۹/۱	۱۴/۴۸	۹/۷۵	۹/۲۴

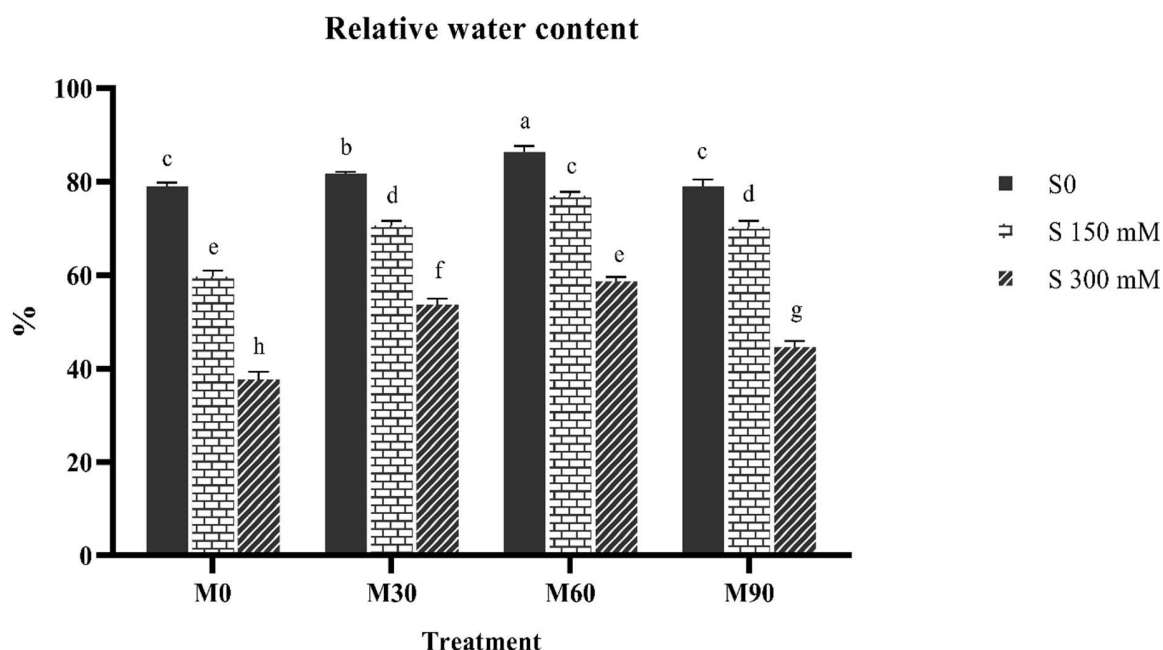
** معنی داری در سطح ۱ درصد



شکل ۴-۱- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای رنگدانه‌های گیاه شنبلیله. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۲- محتوای آب نسبی

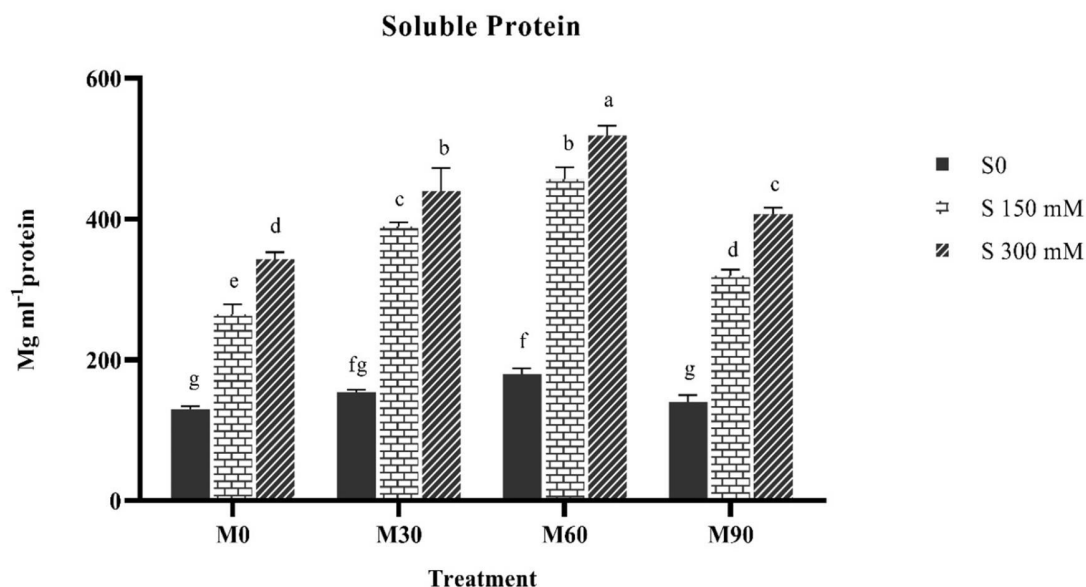
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین برای محتوای آب نسبی در شکل ۴-۲ نمایش داده شده است. کاربرد سطوح مختلف شوری منجر به کاهش معنی‌دار آب نسبی نسبت به شرایط نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) شد. این کاهش در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار نسبت به ۱۵۰ میلی‌مولار بسیار بیشتر بود. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین بدون اعمال تنش شوری منجر به افزایش محتوای آب نسبی نسبت به شرایط نرمال گردید. همچنین، کاربرد سطوح مختلف ملاتونین همراه با سطوح مختلف شوری باعث افزایش معنی‌داری در محتوای آب نسبی نسبت به تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. بالاترین محتوای آب نسبی در تیمار ۶۰ ppm ملاتونین بدون کاربرد تنش شوری ثبت گردید، که نشان‌دهنده اثر مثبت ملاتونین بر حفظ محتوای آب نسبی گیاه شنبلیله است.



شکل ۴-۲- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای آب نسبی. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۳- محتوای پروتئین کل

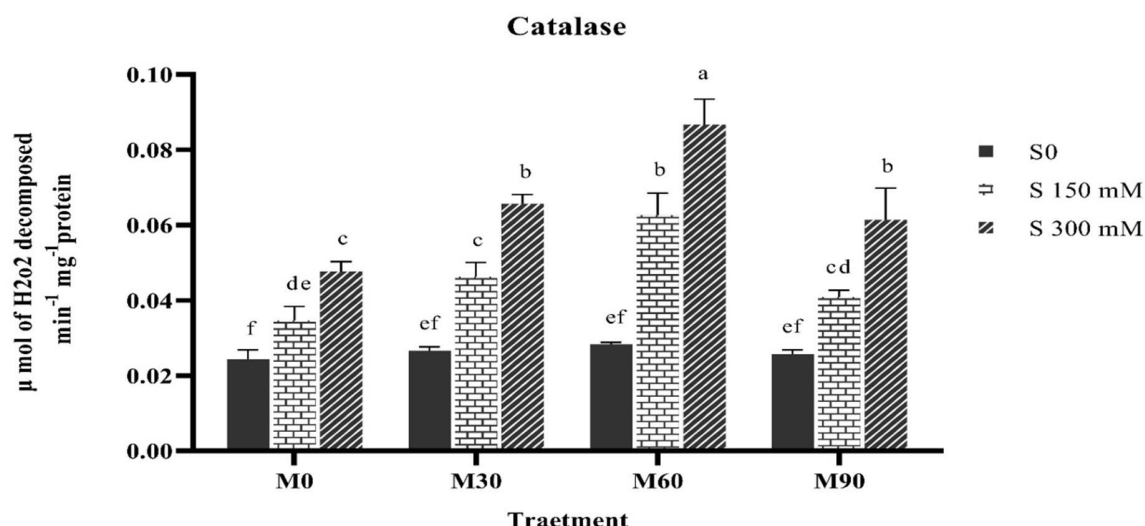
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین برای محتوای پروتئین کل در شکل ۴-۳ ارائه شده است. نتایج این پژوهش نشان داد، که تنش شوری مخصوصاً سطح ۳۰۰ میلی مولار به صورت معنی داری منجر به افزایش محتوای پروتئین کل نسبت به شرایط نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) گردید. همچنین کاربرد ۶۰ ppm ملاتونین در غیاب سطوح مختلف شوری محتوای پروتئین کل را نسبت به تیمار شاهد به صورت معنی داری افزایش داد. اعمال سطوح مختلف شوری به همراه سطوح مختلف ملاتونین باعث افزایش معنی داری در محتوای پروتئین کل نسبت به تیمار تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) گردید. بالاترین محتوای پروتئین کل در سطوح شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm ثبت شد.



شکل ۴-۳- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای پروتئین کل. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۴- فعالیت کاتالاز

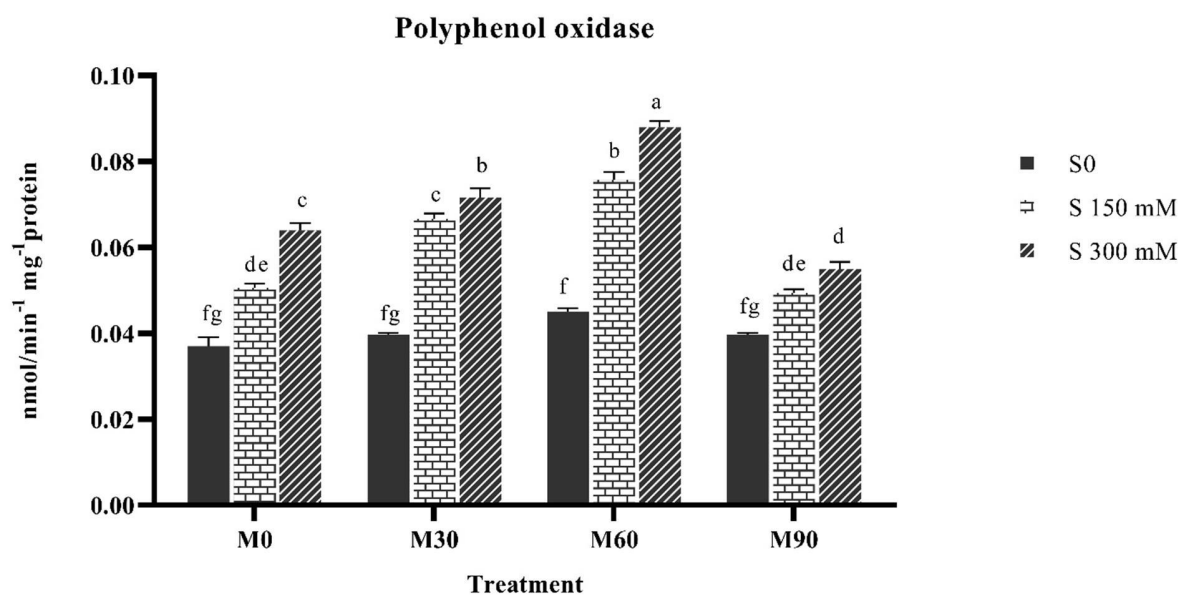
نتایج مقایسه میانگین فعالیت کاتالاز تحت تاثیر سطوح مختلف شوری و ملاتونین در شکل ۴-۴ نمایش داده شده است. فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر سطوح مختلف شوری نسبت به تیمار نرمال به صورت معنی داری افزایش یافت، به طوری که این افزایش در تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار نسبت به تیمار ۱۵۰ میلی مولار بیشتر بود. کاربرد مختلف ملاتونین تاثیر معنی داری در افزایش فعالیت کاتالاز نسبت به تیمار نرمال نداشت. به کارگیری سطوح مختلف ملاتونین همراه با سطوح مختلف شوری باعث افزایش بسیار معنی داری (نسبت به تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) در فعالیت این آنزیم شد، به طوری که بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۶۰ ppm ملاتونین و شوری ۳۰۰ میلی مولار مشاهده شد.



شکل ۴-۴- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر فعالیت کاتالاز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۵- فعالیت پلی فنول اکسیداز

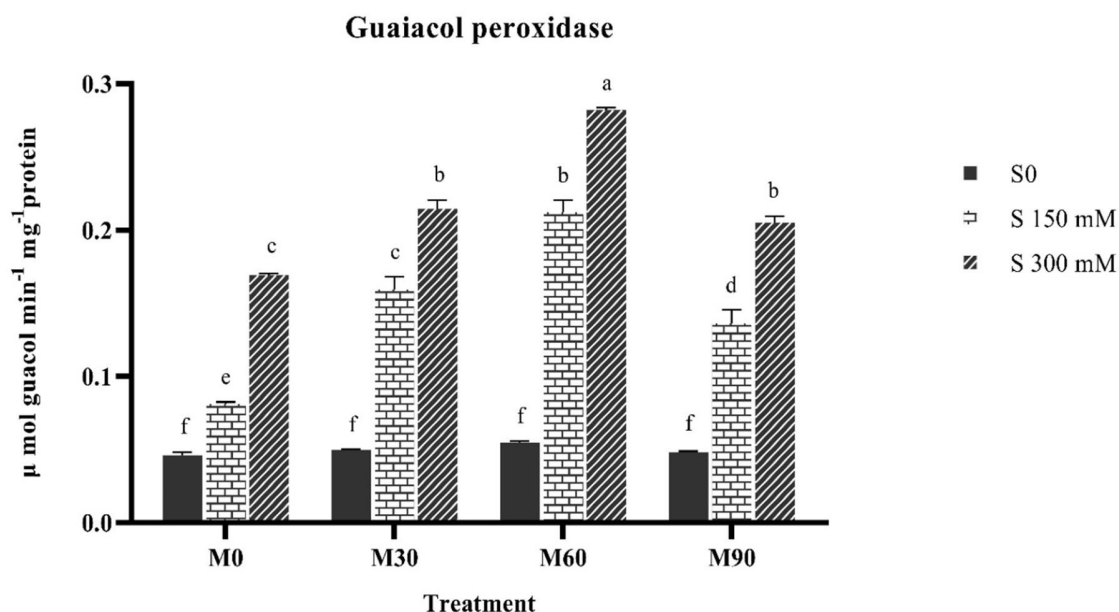
مقایسه میانگین فعالیت پلی فنول اکسیداز تحت تاثیر سطوح مختلف شوری و ملاتونین در شکل ۴-۵ ارائه شده است. تیمار تنش شوری به صورت معنی داری منجر به افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار نرمال شد. کاربرد ملاتونین در غیاب تنش شوری تاثیر معنی داری بر فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط نرمال نداشت. بالاترین فعالیت این آنزیم در تیمار ۶۰ ppm ملاتونین و شوری ۳۰۰ میلی مولار مشاهده شد. در ضمن کاربرد ملاتونین ۳۰ و ۶۰ ppm همراه با سطوح مختلف شوری منجر به افزایش معنی داری در فعالیت پلی فنول اکسیداز نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد.



شکل ۴-۵- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر فعالیت پلی فنول اکسیداز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۶- فعالیت گایاکول پراکسیداز

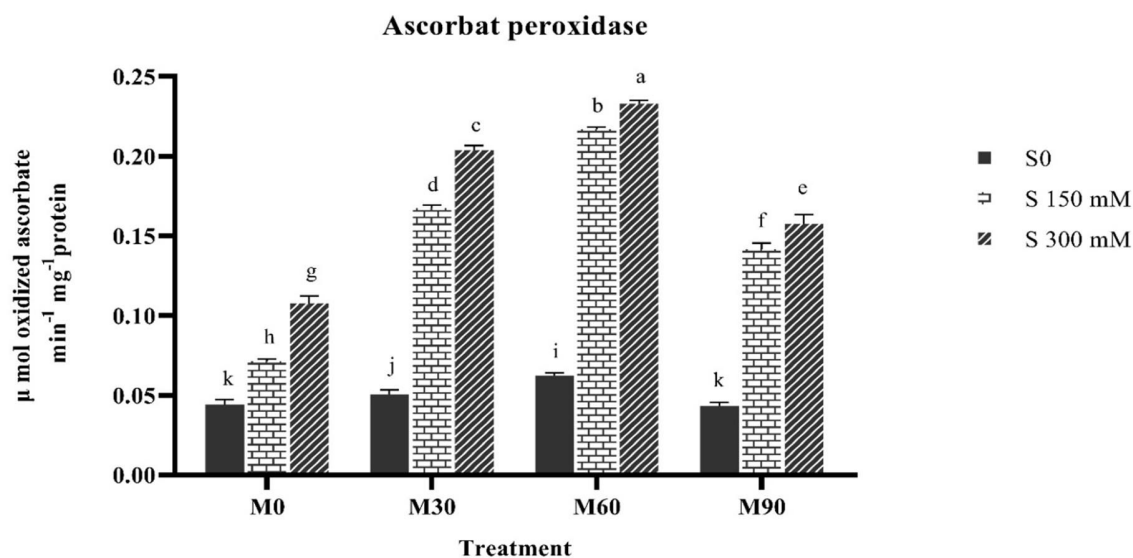
نتایج مقایسه میانگین اثرات سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در شکل ۴-۶ نشان داده شده است. اعمال تنش شوری در هر دو سطح باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) شد. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین تاثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط نرمال نداشت. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف شوری باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. بالاترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار ۶۰ ppm ملاتونین و تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار ثبت گردید.



شکل ۴-۶ اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان فعالیت گایاکول پراکسیداز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۷-۲-۴- فعالیت آسکوربات پراکسیداز

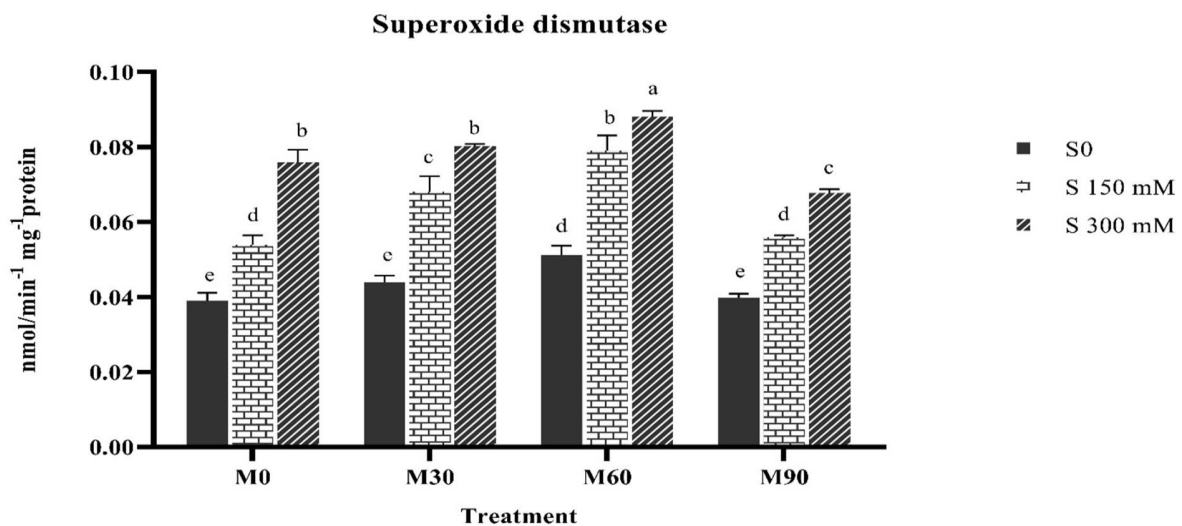
مقایسه میانگین سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شکل ۷-۴ نمایش داده شده است. فعالیت این آنزیم تحت تاثیر سطوح مختلف تنش شوری به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) افزایش یافت، به طوری که این افزایش در سطح ۳۰۰ میلی مولار مشهودتر بود. همچنین کاربرد سطوح ملاتونین ۳۰ و ۶۰ ppm بدون اعمال تنش شوری باعث افزایش فعالیت این صفت نسبت به تیمار نرمال شد. در ضمن به کارگیری همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری نیز به طور معنی داری منجر به افزایش فعالیت این صفت نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد، به طوری که بالاترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm ثبت گردید.



شکل ۷-۴- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۸- فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز

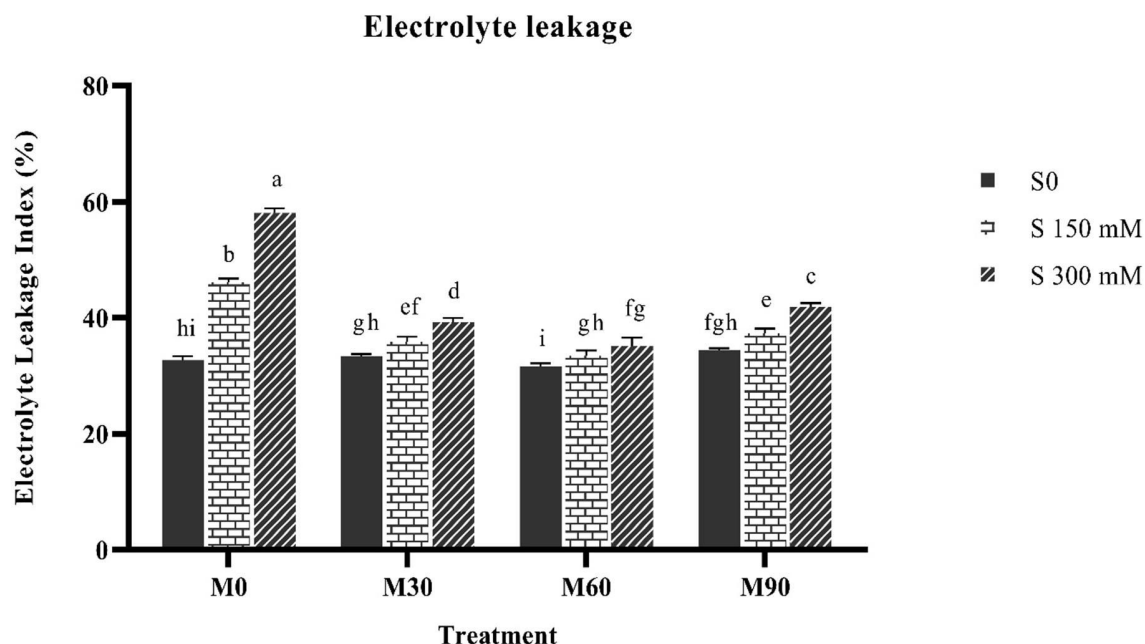
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در شکل ۴-۸ ارائه شده است. اعمال تیمار تنش شوری در هر دو سطح به صورت معنی داری باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به شرایط نرمال شد. میزان این فعالیت در شوری ۳۰۰ میلی مولار بیشتر از ۱۵۰ میلی مولار بود. کاربرد سطح ۶۰ ppm ملاتونین (در غیاب تنش شوری) منجر به افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط نرمال شد. کاربرد همزمان تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۳۰ و ۶۰ ppm به صورت معنی داری باعث افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. همچنین به کارگیری تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm نیز به صورت معنی داری فعالیت این آنزیم را نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد. اعمال تیمار تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۳۰ ppm هیچ اثر معنی داری بر میزان فعالیت این آنزیم نداشت.



شکل ۴-۸- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۹-۲-۴- شاخص نشت الکترولیت

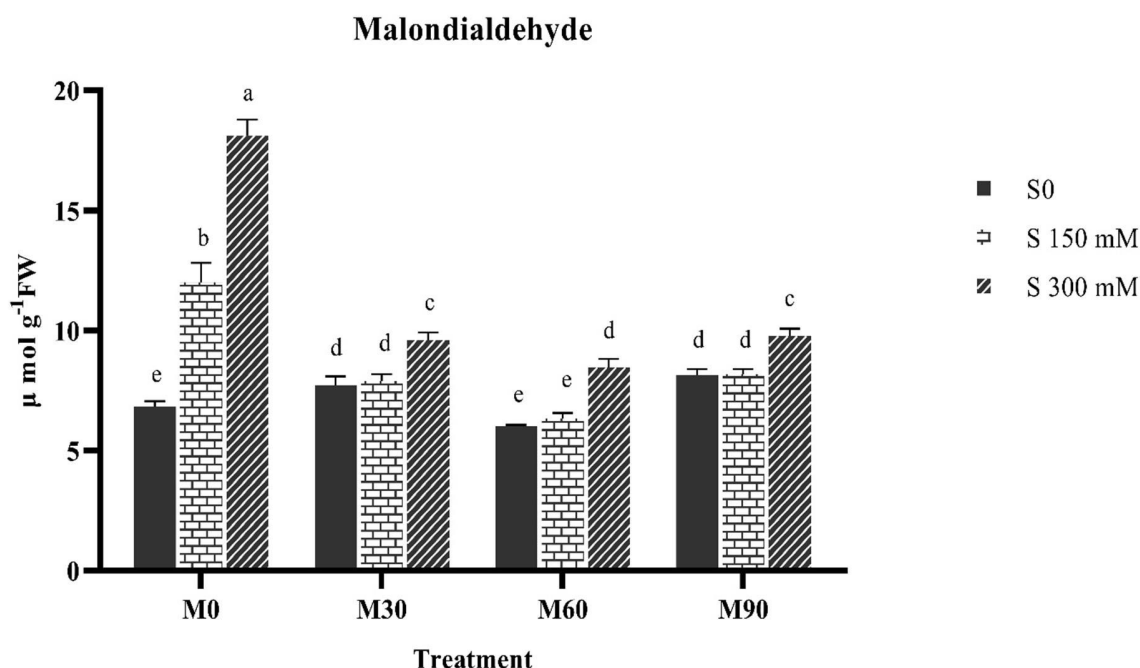
مقایسه میانگین سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری برای صفت نشت الکترولیت (شکل ۹-۴) نشان می‌دهد که این صفت با افزایش سطوح مختلف تنش شوری نسبت به شرایط نرمال به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. شاخص نشت الکترولیت در تنش ۳۰۰ میلی‌مولار دارای بالاترین میزان این صفت بود. در ضمن، کمترین میزان این صفت در تیمار ۶۰ ppm ملاتونین (بدون اعمال تنش شوری) ثبت شد. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در شرایط نرمال (بدون تنش شوری) دارای اثر معنی‌داری بر روی صفت مذکور نسبت به شرایط نرمال نبود. تیمار گیاهان رشدیافته در محیط حاوی تنش شوری با سطوح مختلف ملاتونین به صورت معنی‌داری منجر به کاهش این صفت نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد.



شکل ۹-۴- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر شاخص نشت الکترولیت. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۱۰- محتوای مالون دی آلدئید

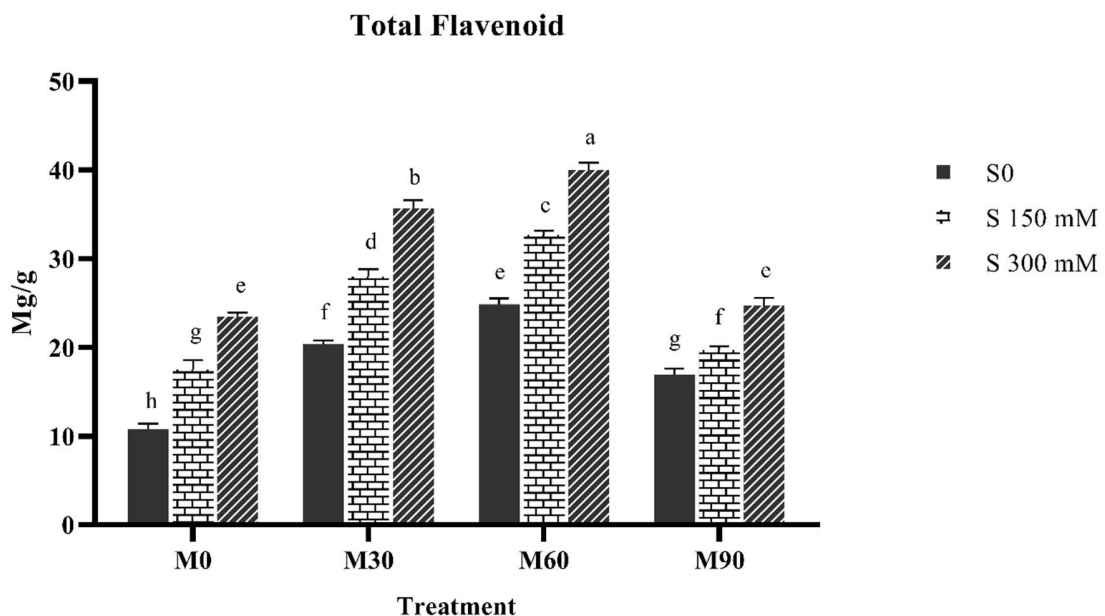
اثرات متقابل سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر روی محتوای مالون دی آلدئید (شکل ۴-۱۰) بیانگر افزایش معنی دار این صفت تحت تاثیر تنش شوری است. محتوای مالون دی آلدئید تحت تاثیر سطوح مختلف تنش شوری به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت. بالاترین میزان این صفت در تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و بدون کاربرد ملاتونین مشاهده شد. کاربرد سطوح ملاتونین ۳۰ و ۹۰ ppm منجر به افزایش محتوای این صفت نسبت به شرایط نرمال شد. در ضمن تیمار گیاهان رشد یافته تحت تنش شوری با سطوح مختلف ملاتونین به صورت معنی داری باعث کاهش محتوای مالون دی آلدئید نسبت به تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. بیشترین کاهش در محتوای این صفت در تیمار تنش شوری ۱۵۰ میلی-مولار و ۶۰ ppm ملاتونین ثبت شد.



شکل ۴-۱۰- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر محتوای مالون دی آلدئید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۱۱- محتوای فلاونوئید

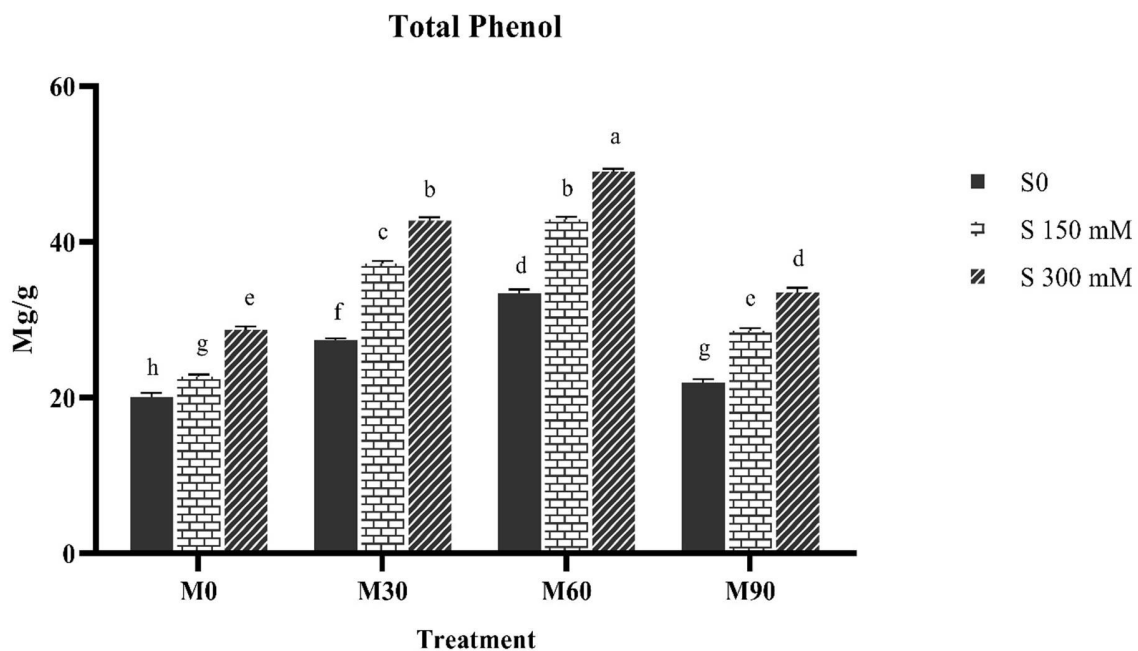
نتیجه مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید تحت تاثیر سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری در شکل ۴-۱۱ ارائه شده است. محتوای فلاونوئید با افزایش سطوح مختلف شوری از ۳۰۰ میلی مولار به ۱۵۰ میلی مولار به صورت معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین بدون اعمال تنش شوری باعث افزایش محتوای فلاونوئید نسبت به شرایط نرمال شد. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف شوری منجر به افزایش فلاونوئید نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) گردید. بالاترین محتوای فلاونوئید با کاربرد همزمان تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm مشاهده شد، این در حالی است که محتوای این صفت با افزایش غلظت ملاتونین به ۹۰ ppm نسبت به ۶۰ ppm به صورت معنی داری کاهش یافت.



شکل ۴-۱۱- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای فلاونوئید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۱۲- محتوای فنول کل

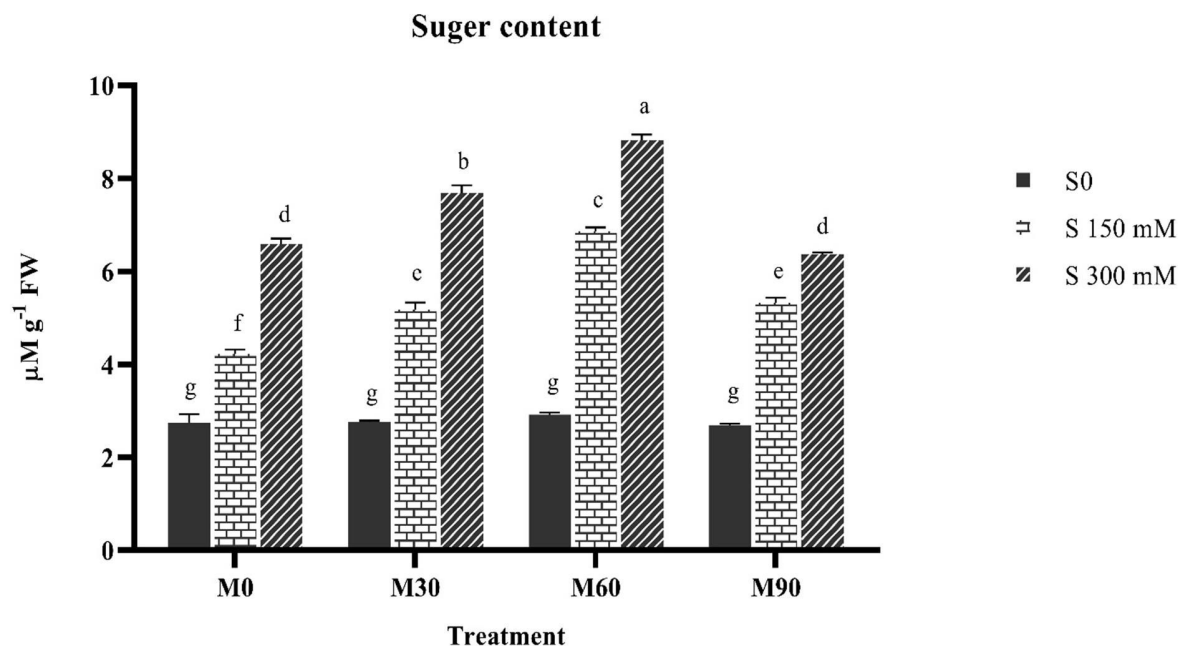
نتایج مقایسه میانگین محتوای فنول کل تحت تاثیر سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری در شکل ۴-۱۲ نمایش داده شده است. کاربرد سطوح مختلف تنش شوری به صورت معنی داری منجر به افزایش محتوای این صفت نسبت به شرایط نرمال شد. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (عدم حضور شوری) به صورت معنی داری موجب افزایش فنول کل نسبت به شرایط نرمال شد. در ضمن کاربرد همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری باعث افزایش معنی دار محتوای فنول کل نسبت به تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) گردید. بالاترین محتوای فنول کل در تیمار ملاتونین ۶۰ ppm و تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار ثبت شد، در حالی که پایین ترین محتوای فنول کل در تیمار شاهد مشاهده گردید.



شکل ۴-۱۲- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر بیان محتوای فنول کل. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۲-۱۳- محتوای قند کل

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین برای محتوای قند کل در شکل ۴-۱۳ ارائه شده است. سطوح مختلف تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار محتوای قند کل نسبت به شرایط نرمال شد، به طوری که این افزایش در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار بیشتر از شوری ۱۵۰ میلی‌مولار بود. تیمار گیاهان شنبلیله با سطوح مختلف ملاتونین تغییر معنی‌داری را در محتوای قند کل نسبت به شرایط نرمال نداشت. کاربرد همزمان سطوح مختلف شوری و ملاتونین باعث افزایش معنی‌داری در محتوای قند کل نسبت به تیمارهای شوری (بدون کاربرد ملاتونین) گردید. بالاترین مقدار این صفت در تیمار شوری ۳۰۰ میلی‌مولار و سطح ملاتونین ۶۰ ppm و کمترین میزان صفت در تیمار نرمال ثبت گردید.

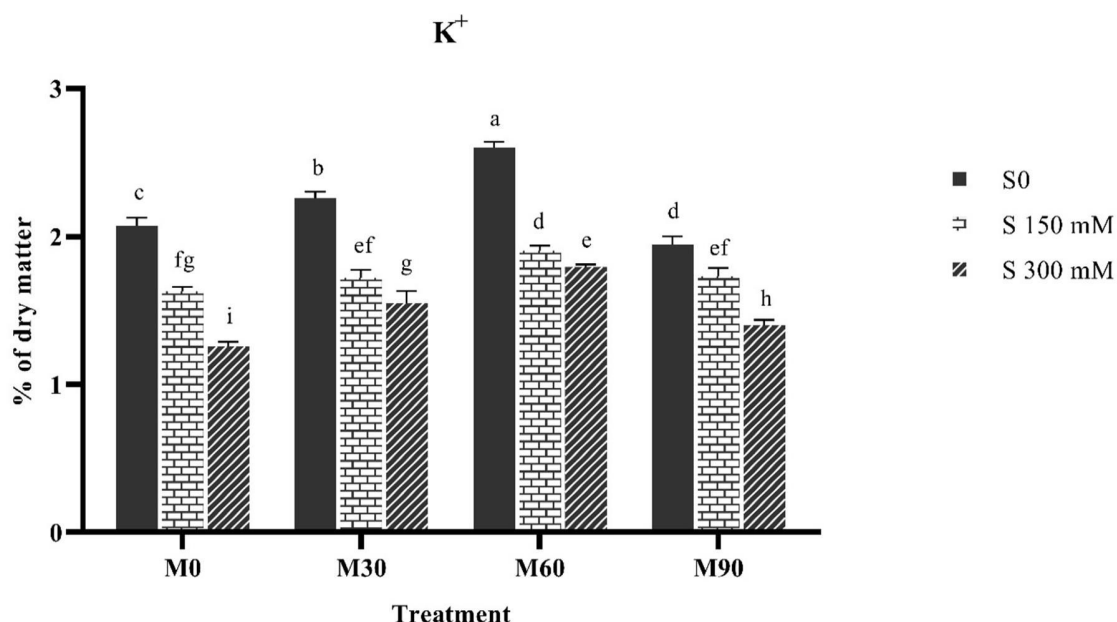


شکل ۴-۱۳- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای قند کل. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۳-۴- مقایسه میانگین عناصر معدنی

۳-۴-۱- محتوای پتاسیم

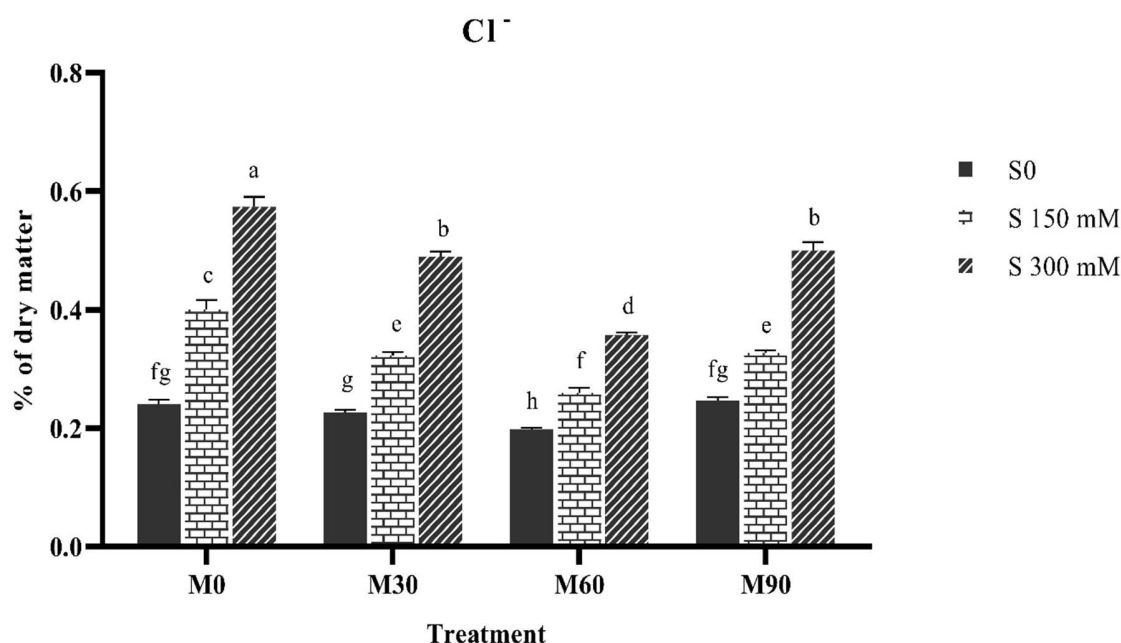
نتیجه مقایسه میانگین سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر محتوای پتاسیم در شکل ۴-۱۴ نمایش داده شده است. اعمال تنش شوری به صورت معنی داری باعث کاهش محتوای پتاسیم نسبت به شرایط نرمال شد، به طوری که با افزایش تنش شوری محتوای این صفت بیشتر کاهش یافت. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در شرایط نرمال (بدون اعمال تنش شوری) باعث افزایش معنی دار محتوای پتاسیم نسبت به شرایط نرمال (بدون کاربرد ملاتونین و تنش شوری) شد. تیمار همزمان تنش شوری و سطوح مختلف ملاتونین منجر به افزایش محتوای پتاسیم نسبت به تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) گردید. بالاترین محتوای پتاسیم در تیمار ملاتونین ۶۰ ppm و عدم اعمال تنش شوری و پایین ترین محتوای این صفت در تنش شوری ۳۰۰ میلی-مولار ثبت شد.



شکل ۴-۱۴ اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای پتاسیم. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۳-۲- محتوای کلر

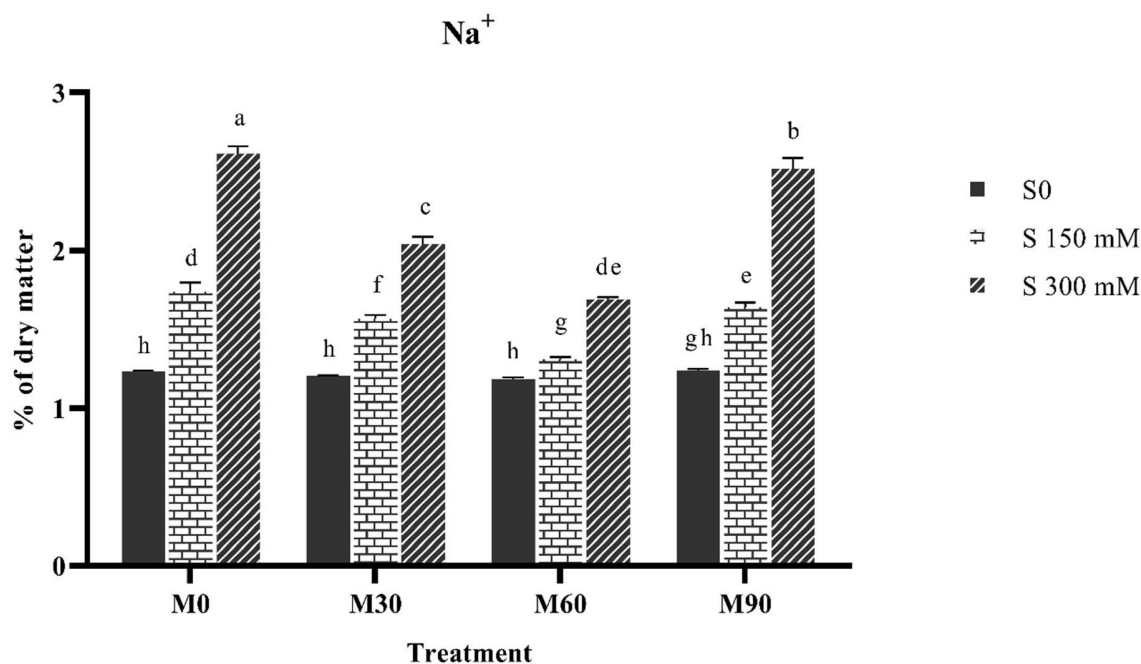
مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر محتوای کلر (شکل ۴-۱۵) نشان داد که محتوای کلر با افزایش تنش شوری به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت. کاربرد ۶۰ ppm ملاتونین بدون به کارگیری تنش شوری به صورت معنی داری منجر به کاهش محتوای کلر نسبت به شرایط نرمال شد، در حالی که سایر سطوح اثر معنی داری بر روی تغییرات این صفت نداشتند. همچنین کاربرد همزمان تنش شوری در سطوح مختلف ملاتونین به صورت معنی داری باعث کاهش محتوای کلر نسبت به تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. کاربرد ملاتونین ۶۰ ppm نسبت به سایر سطوح به طور موثرتری مانع از تجمع کلر در بافت گیاهی تحت تاثیر تنش شوری شد.



شکل ۴-۱۵- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای کلر. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۳-۳- محتوای سدیم

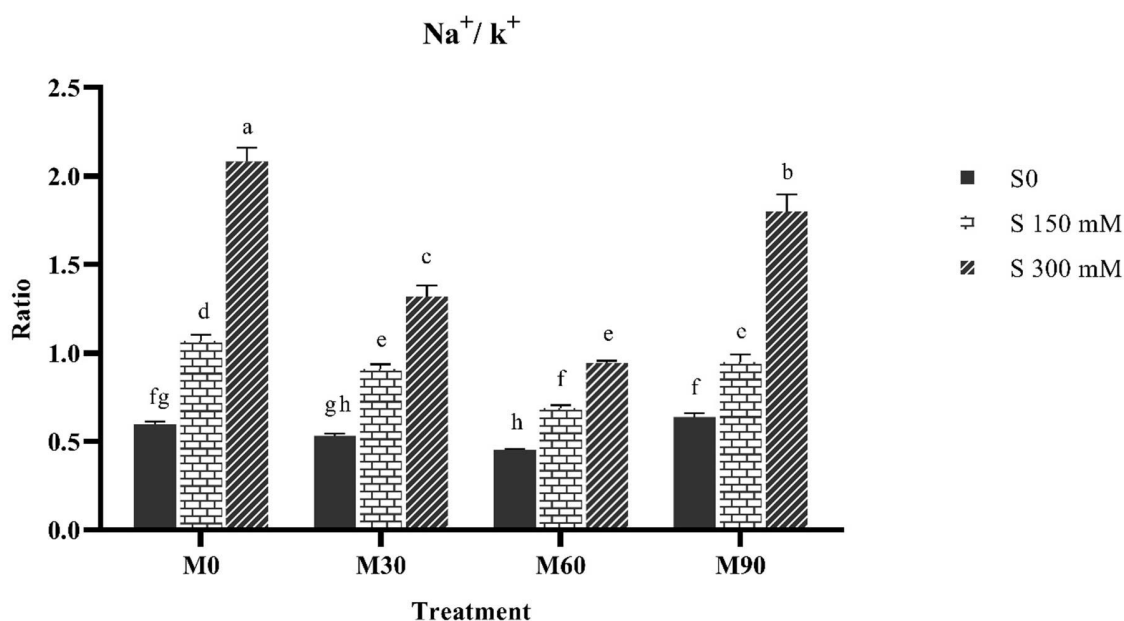
نتایج مقایسه میانگین محتوای سدیم تحت تاثیر کاربرد سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری در شکل ۴-۱۶ ارائه شده است. اعمال سطوح مختلف تنش شوری منجر به افزایش معنی دار محتوای سدیم درون بافتی شد، به طوری که بالاترین میزان این صفت در تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و بدون کاربرد ملاتونین مشاهده گردید. تیمار گیاهان با سطوح مختلف ملاتونین (عدم حضور تنش شوری) دارای اثرات معنی دار بر روی محتوای سدیم نسبت به تیمار نرمال نبود. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری به صورت معنی داری باعث کاهش محتوای سدیم در گیاهان شنبلیله نسبت به تیمار تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) شد.



شکل ۴-۱۶- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر محتوای سدیم. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۳-۴- نسبت سدیم به پتاسیم

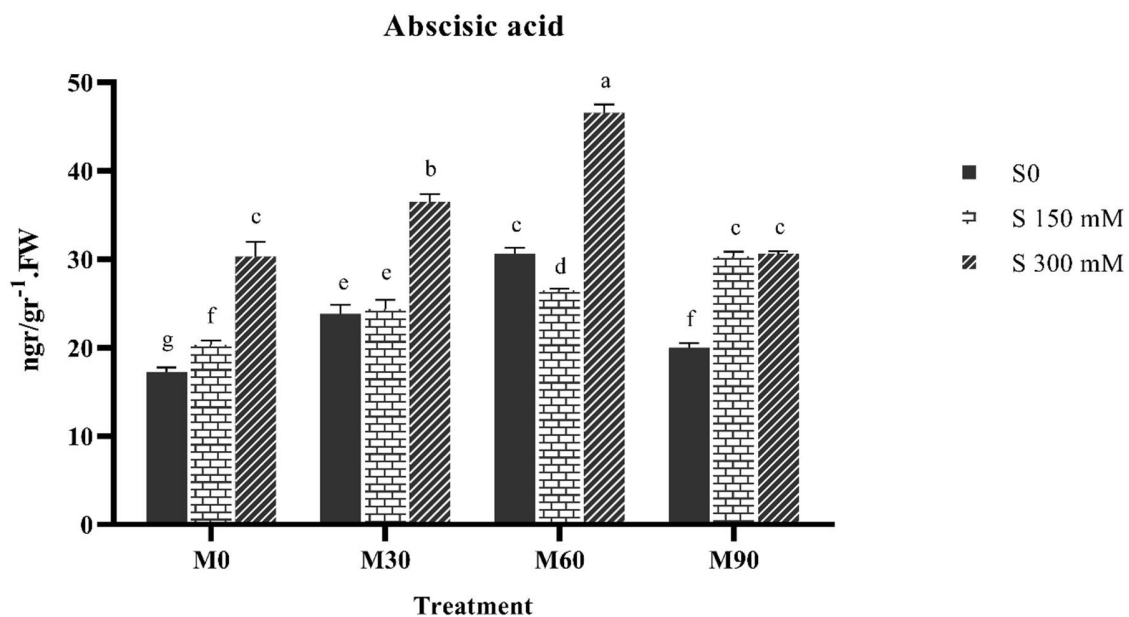
مقایسه میانگین صفت نسبت سدیم به پتاسیم تحت تاثیر کاربرد سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری در شکل ۴-۱۷ نشان داده شده است. اعمال تنش شوری منجر به افزایش معنی‌دار این صفت نسبت به تیمار نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) شد. با افزایش شدت تنش شوری از ۱۵۰ میلی‌مولار به ۳۰۰ میلی‌مولار محتوای این صفت با سرعت بیشتری افزایش یافت و به بالاترین مقدار خود نسبت به سایر تیمارها رسید. همچنین کاربرد ۶۰ ppm ملاتونین باعث کاهش محتوای این صفت نسبت به تیمار شاهد شد، در حالی‌که به کارگیری سایر سطوح ملاتونین تاثیر معنی‌داری بر روی این صفت نداشتند. همچنین کاربرد همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری منجر به کاهش معنی‌دار این صفت نسبت به تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) گردید.



شکل ۴-۱۷- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر نسبت سدیم به پتاسیم. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۴-۴- محتوای آبسیزیک اسید

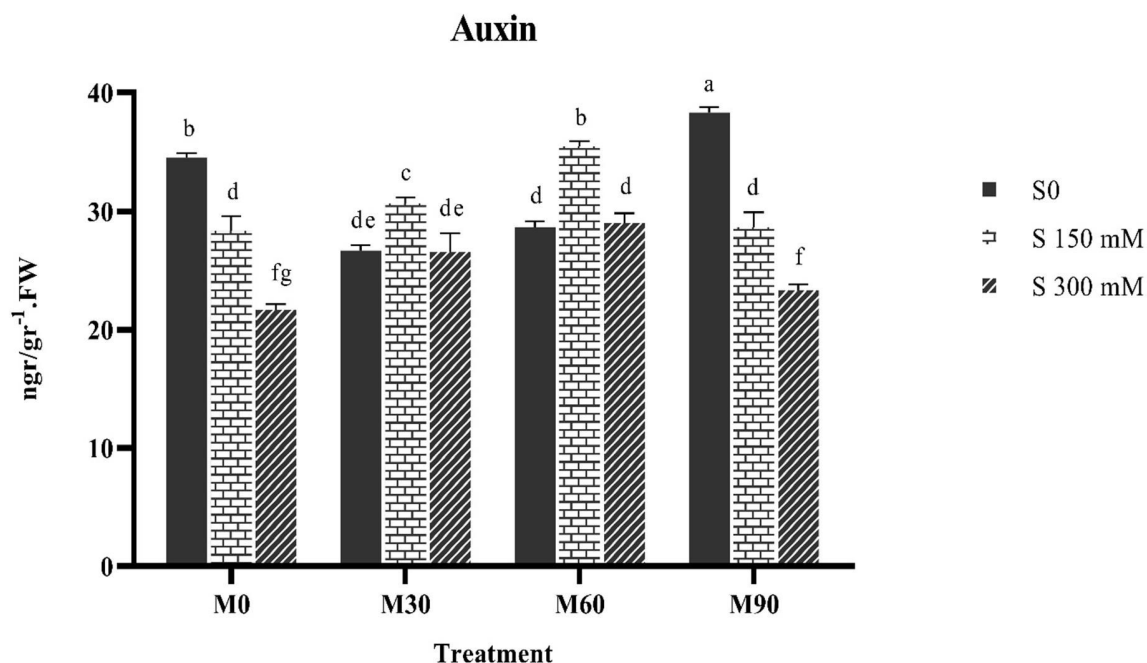
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر محتوای آبسیزیک اسید در شکل ۴-۱۸ ارائه شده است. نتیجه این پژوهش نشان داد که تنش شوری در هر دو سطح منجر افزایش محتوای آبسیزیک اسید (نسبت به شرایط نرمال) شده است، به طوری که این افزایش در سطح ۳۰۰ میلی مولار مشهودتر است. همچنین کاربرد سطوح ملاتونین بدون اعمال تنش شوری باعث افزایش محتوای این صفت نسبت به تیمار نرمال شد. کاربرد همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری مخصوصا در سطح شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm به صورت معنی داری باعث افزایش محتوای این صفت نسبت به تیمار نرمال و تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد.



شکل ۴-۱۸- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر محتوای آبسیزیک اسید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۵- محتوای اکسین

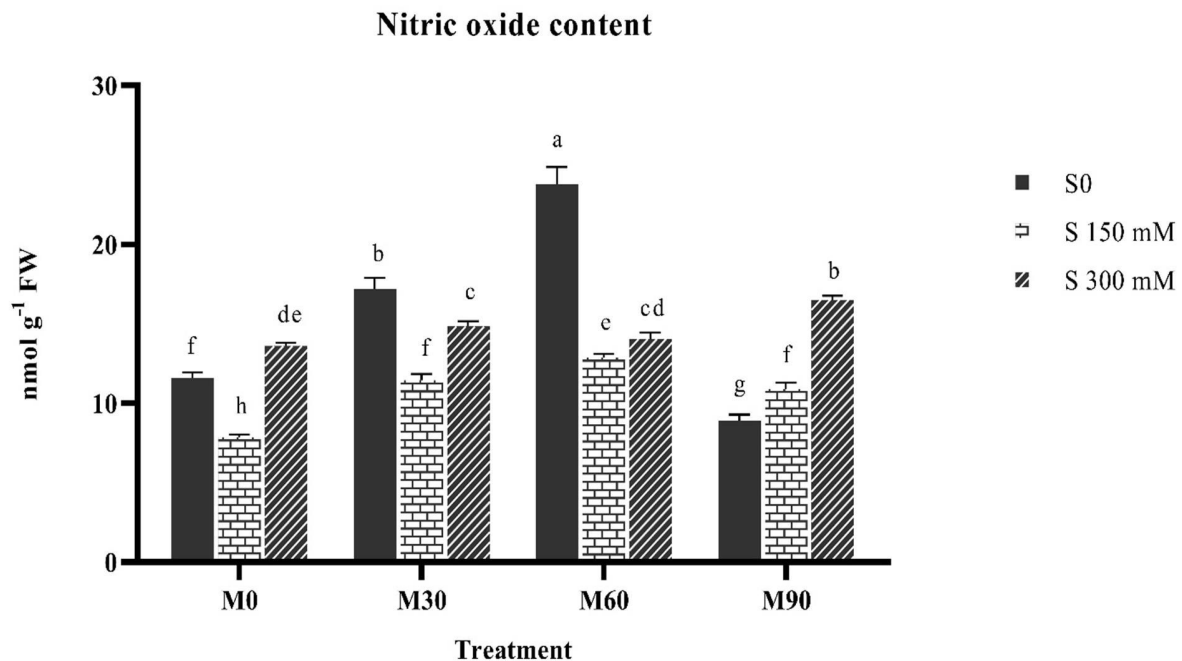
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر محتوای اکسین (شکل ۴-۱۹) بیانگر کاهش معنی‌دار در محتوای اکسین تحت شرایط تنش شوری نسبت به شرایط نرمال بود. کاهش در محتوای اکسین در تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار نسبت به تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار بیشتر بود. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (بدون تنش شوری) منجر به افزایش معنی‌دار محتوای اکسین نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. در ضمن کاربرد همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش محتوای اکسین نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) گردید.



شکل ۴-۱۹- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر محتوای اکسین. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۴-۶- محتوای نیتریک اکسید

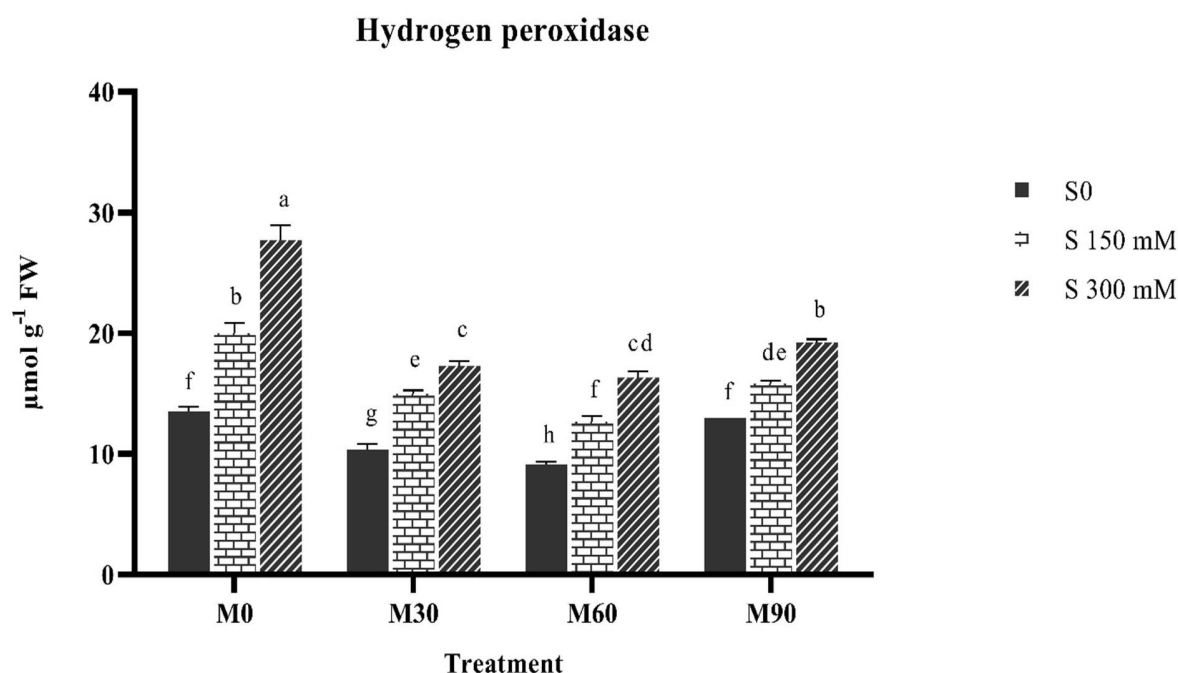
محتوای نیتریک اکسید تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری در شکل ۴-۲۰ ارائه شده است. نتایج این پژوهش بیانگر افزایش معنی دار محتوای نیتریک اکسید تحت تاثیر تنش شوری (۳۰۰ میلی مولار) نسبت به تیمار نرمال بود. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (۳۰ و ۶۰ ppm) (عدم کاربرد شوری) باعث افزایش معنی دار محتوای این صفت نسبت به تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) شد. محتوای این صفت با کاربرد همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری به صورت معنی داری نسبت به تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) افزایش یافت. بالاترین محتوای نیتریک اکسید در تیمار ملاتونین ۶۰ ppm به دست آمد.



شکل ۴-۲۰- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر محتوای نیتریک اکسید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۷-۴- محتوای H_2O_2

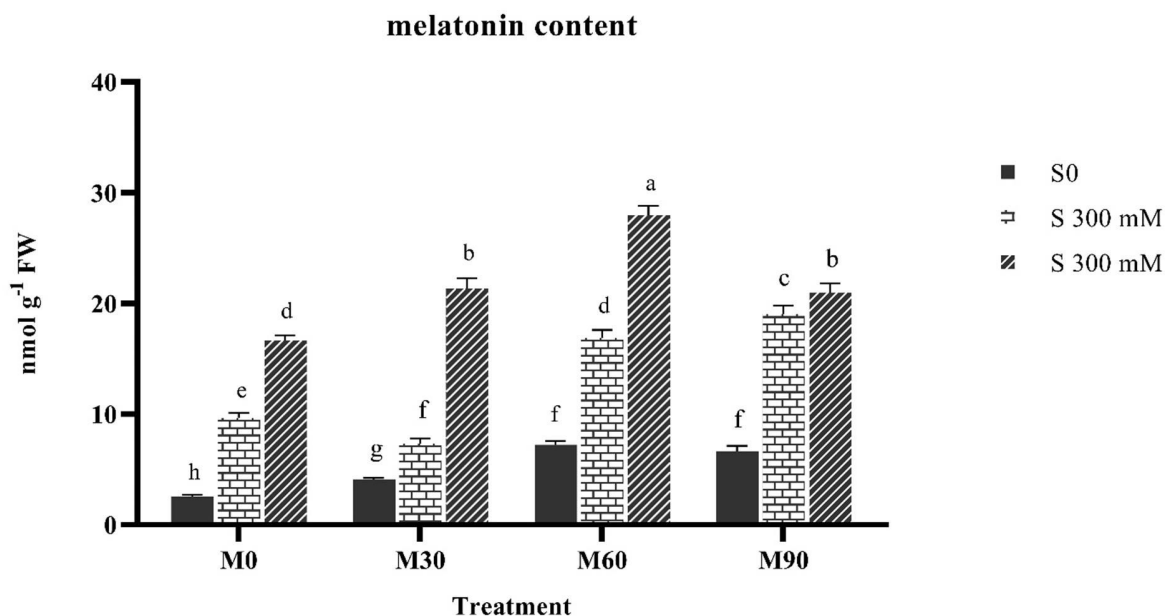
اثر سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر محتوای هیدروژن پراکسید در شکل ۴-۲۱ نمایش داده شده است. محتوای این صفت تحت تاثیر سطوح مختلف تنش شوری نسبت به شرایط نرمال به صورت معنی داری افزایش یافت. کاربرد سطوح مختلف ملاتونین ۳۰ و ۶۰ ppm به صورت معنی داری باعث کاهش محتوای هیدروژن پراکسید نسبت به شرایط نرمال شد. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با شوری به صورت معنی داری باعث کاهش محتوای این صفت نسبت به گیاهان تیمار شده با شوری (عدم کاربرد ملاتونین) شد. بالاترین میزان هیدروژن پراکسید در تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار و بدون کاربرد سطوح مختلف ملاتونین ثبت گردید.



شکل ۴-۲۱- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر محتوای هیدروژن پراکسید. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۸- محتوای ملاتونین درونی

نتیجه مقایسه میانگین سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری بر محتوای ملاتونین درونی در گیاهان شنبلیله در شکل ۴-۲۲ نمایش داده شده است. محتوای ملاتونین درونی تحت تاثیر سطوح مختلف تنش شوری نسبت به تیمار نرمال (عدم کاربرد ملاتونین و شوری) به صورت معنی داری افزایش یافت، به صورتی که این افزایش با افزایش سطح تنش شوری محسوس تر بود. تیمار گیاهان با سطوح مختلف ملاتونین باعث افزایش محتوای ملاتونین درونی در گیاهان نسبت به شرایط نرمال شد. همچنین اعمار تیمار تنش شوری همراه با سطوح مختلف ملاتونین باعث افزایش محتوای ملاتونین درونی نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) گردید. بالاترین میزان محتوای ملاتونین درونی در تنش شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm مشاهده شد.

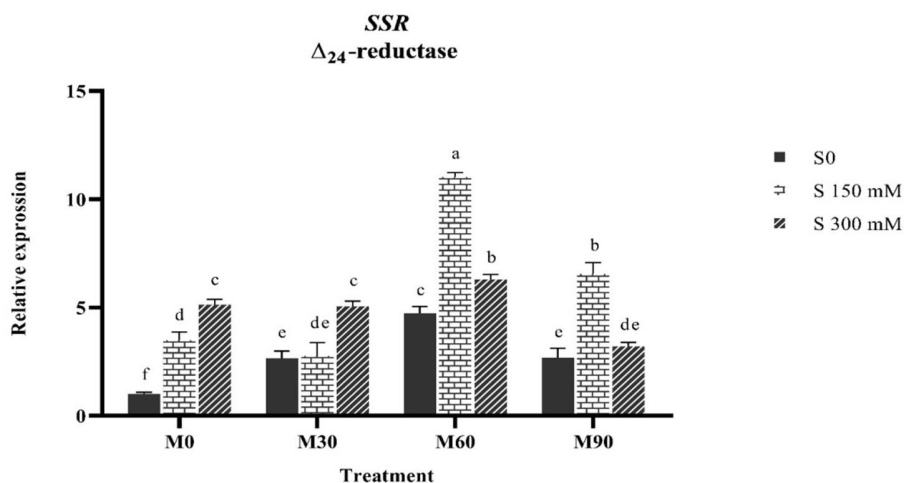


شکل ۴-۲۲- اثر تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر محتوای ملاتونین درونی. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

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

۴-۹-۱- بیان ژن Δ_{24} -reductase (SSR)

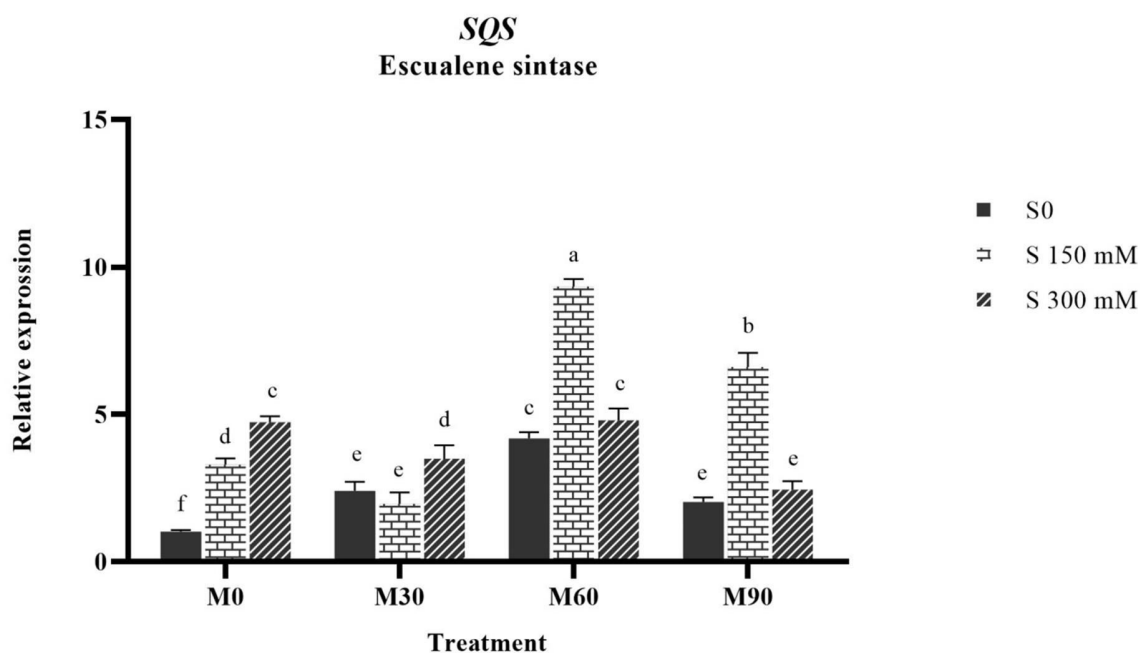
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین برای بیان ژن SSR در شکل ۴-۲۳ نشان شده است. سطوح مختلف شوری منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به تیمار شاهد شدند. تیمار گیاهان شنبلیله با سطوح مختلف ملاتونین باعث افزایش معنی داری در بیان ژن SSR نسبت به تیمار شاهد گردید. بیشترین بیان این ژن با کاربرد ملاتونین ۶۰ ppm (تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار) ثبت شد. رفتار این ژن در کاربرد همزمان سطوح مختلف تنش شوری و ملاتونین متفاوت بود، به طوری که کاربرد شوری ۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۳۰ ppm باعث کاهش بیان این ژن نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد، در حالی که به کارگیری همزمان تنش شوری و ملاتونین (۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ و ۹۰ ppm) منجر به افزایش معنی دار در بیان این ژن نسبت به تنش شوری بدون کاربرد ملاتونین شد. همچنین کاربرد شوری (۳۰۰ میلی مولار) و ملاتونین ۶۰ ppm بیان این ژن را نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) به صورت معنی داری افزایش داد.



شکل ۴-۲۳- اثرات تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SSR. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون ها 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 نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده اند.

۴-۹-۲- بیان ژن Squalene synthase (SQS)

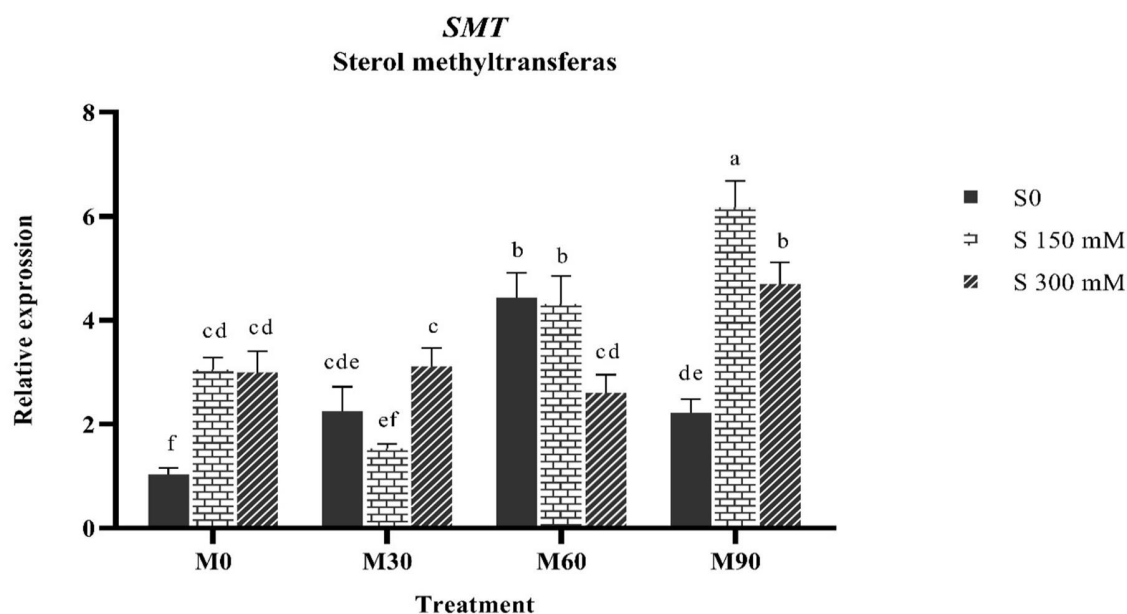
نتایج اثرات متقابل شوری و ملاتونین بر پروفایل بیان ژن SQS شکل ۴-۲۴ ارائه شده است. اعمال تیمار تنش شوری در هر دو سطح ۳۰۰ میلی‌مولار و ۱۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش میزان بیان این ژن نسبت به شرایط نرمال گردید. پروفایل بیان این ژن تحت تاثیر سطوح مختلف ملاتونین (بدون کاربرد تنش شوری) بیانگر افزایش بیان این ژن بعد از تیمار با سطوح مختلف ملاتونین نسبت به تیمار نرمال بود. همچنین کاربرد همزمان شوری (۱۵۰ میلی‌مولار) و ملاتونین ۶۰ و ۹۰ ppm بیان این ژن را به صورت معنی‌داری نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد. همچنین کاربرد همزمان تنش شوری (۳۰۰ میلی‌مولار) و ملاتونین ۶۰ ppm تاثیر معنی‌داری بر بیان این ژن نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) نداشت.



شکل ۴-۲۴ اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SQS. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۹-۳- بیان ژن Sterol methyltransferase (SMT)

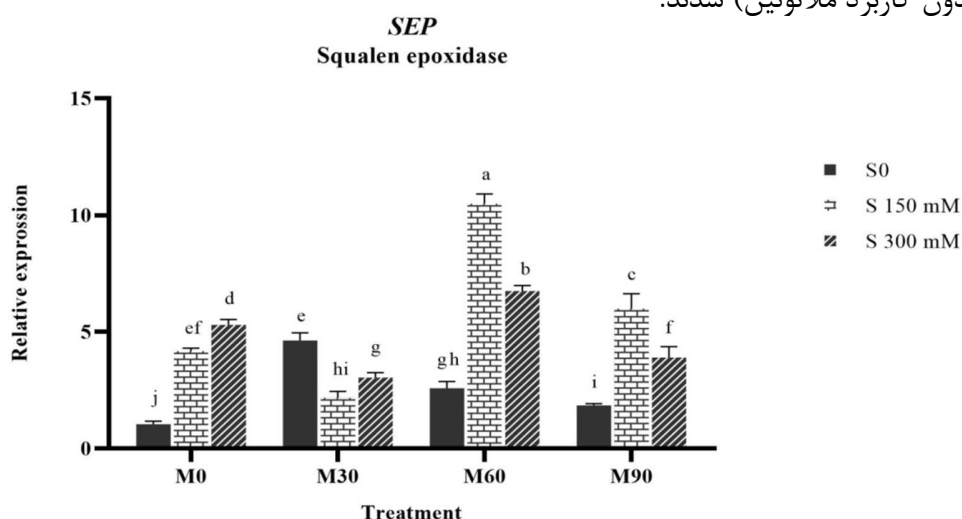
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین برای ژن *SMT* در شکل ۴-۲۵ ارائه شده است. اعمال تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) به صورت معنی داری بیان این ژن را نسبت به شرایط نرمال افزایش داد، اگرچه اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف تنش شوری مشاهده نشد. کاربرد ملاتونین ۶۰ ppm بدون اعمال تنش شوری منجر به افزایش بیان ژن نسبت به شرایط تنش شوری بدون کاربرد ملاتونین شد. همچنین کاربرد همزمان تنش شوری و ملاتونین (شوری ۱۵۰ میلی مولار و ۶۰ و ۹۰ ppm ملاتونین) منجر به افزایش معنی دار بیان این ژن نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. در ضمن به کارگیری شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۹۰ ppm به صورت معنی داری بیان این ژن را نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد.



شکل ۴-۲۵- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن *SMT*. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها 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 نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۹-۴- بیان ژن Squalene epoxidase (SEP)

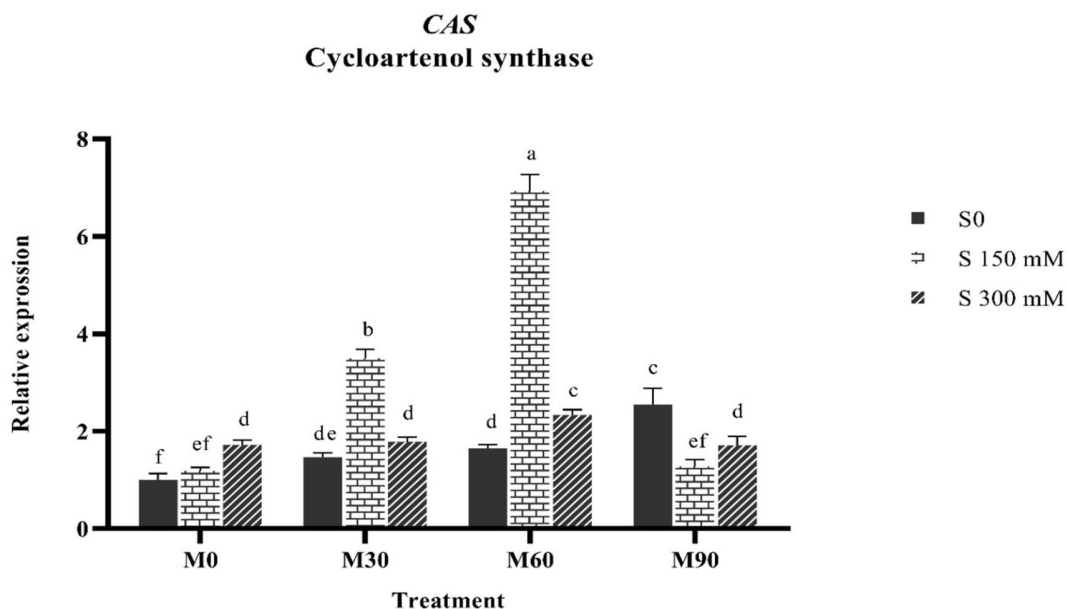
پروفایل بیان ژن SEP تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح مختلف شوری و ملاتونین در شکل ۴-۲۶ نشان داده شده است. اعمال تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) به صورت معنی داری بیان این ژن را نسبت به شرایط نرمال افزایش داد. همچنین اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف تنش از نظر بیان این ژن مشاهده شد. تیمار گیاهان شنبلیله با ملاتونین (۳۰ ppm) دارای اثر معنی داری بر بیان این ژن نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) نبود، در حالی که تیمار گیاهان با ملاتونین ۶۰ و ۹۰ ppm بیان این ژن را به صورت معنی داری نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) کاهش داد. کاربرد همزمان تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ و ۹۰ ppm) بیان این ژن را نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد، در حالی که اعمال همزمان تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۳۰ ppm) منجر به کاهش معنی دار بیان این ژن نسبت به تنش شوری شد. همچنین کاربرد همزمان تنش شوری (۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۳۰ و ۹۰ ppm) و تنش شوری (۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm) به ترتیب باعث کاهش و افزایش بیان این ژن نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شدند.



شکل ۴-۲۶- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن SEP. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها 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 نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۹-۵- بیان ژن *Cycloartenol synthase* (CAS)

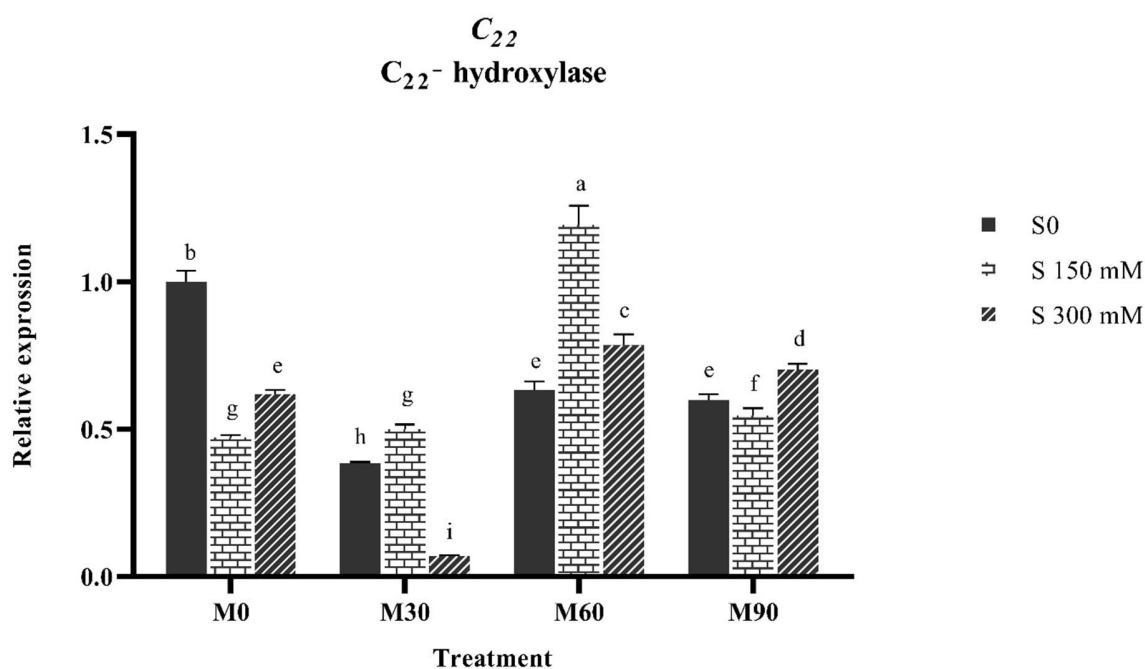
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر بیان ژن *CAS* در شکل ۴-۲۷ نمایش داده شده است. بیان ژن *CAS* تحت تاثیر سطح ۱۵۰ میلی مولار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) اختلاف معنی داری با شرایط شاهد (بدون اعمال تنش شوری و ملاتونین) نداشت، در حالی که در سطح ۳۰۰ میلی مولار به صورت معنی دار افزایش یافت. افزایش میزان بیان این ژن تحت تاثیر سطوح مختلف ملاتونین در تیمار شاهد کاملاً افزایشی بود، به طوری که بیان این ژن در تیمار ۹۰ ppm ملاتونین نسبت به شاهد و بدون کاربرد ملاتونین به صورت معنی داری (سه برابر) افزایش یافت. تحت شرایط تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و ترکیب با ملاتونین ۶۰ ppm میزان بیان این ژن نسبت به تیمار شاهد هفت برابر افزایش یافت. بیان ژن *CAS* در تیمار ۳۰۰ میلی مولار و ترکیب با سطوح مختلف ملاتونین نسبت به تیمار ۱۵۰ میلی مولار به صورت معنی داری کاهش یافت. بیان این ژن در تیمار شوری ۱۵۰ میلی مولار و ترکیب با سطوح ۶۰ و ۳۰ ppm ملاتونین نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود، بنابراین به نظر می رسد این تیمار دارای پتانسیل مناسبی جهت افزایش بیان این ژن است.



شکل ۴-۲۷- اثرات تنش شوری و غلظت های مختلف ملاتونین بر بیان ژن *CAS*. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون ها 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 نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده اند.

۴-۹-۶- بیان ژن C₂₂-hydroxylase (C22)

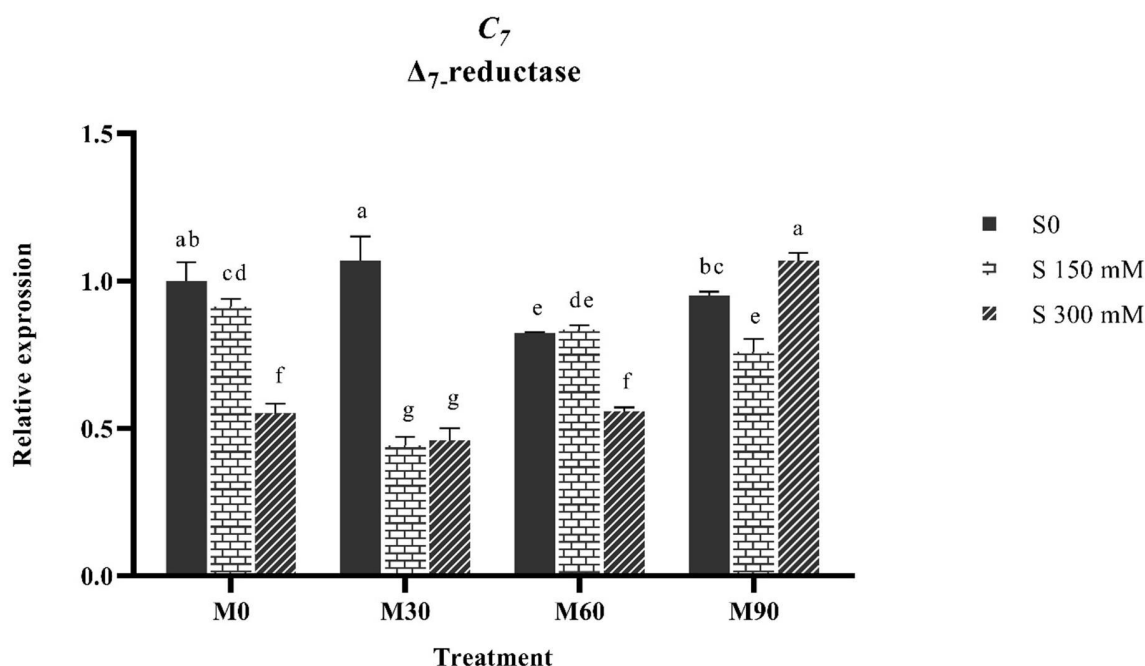
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر بیان ژن C₂₂ در شکل ۴-۲۸ نمایش داده شده است. در مجموع میزان بیان این ژن در همه تیمارهای آزمایشی پایین بود. در حقیقت کاربرد سطوح مختلف شوری و ترکیب با ملاتونین در تمامی تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش بیان این ژن نسبت به تیمار شاهد شد. بیان ژن C₂₂-hydroxylase فقط در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با ۶۰ ppm ملاتونین نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. بیان این ژن در تیمار شوری ۳۰۰ میلی‌مولار و ترکیب با ملاتونین (۳۰ ppm) به پایین‌ترین میزان خود رسید، در حالی‌که این ژن بیشترین بیان را در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ترکیب با ۳۰ ppm ملاتونین به خود اختصاص داد.



شکل ۴-۲۸- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن C₂₂. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۹-۷- بیان ژن Δ_7 - reductase (C7)

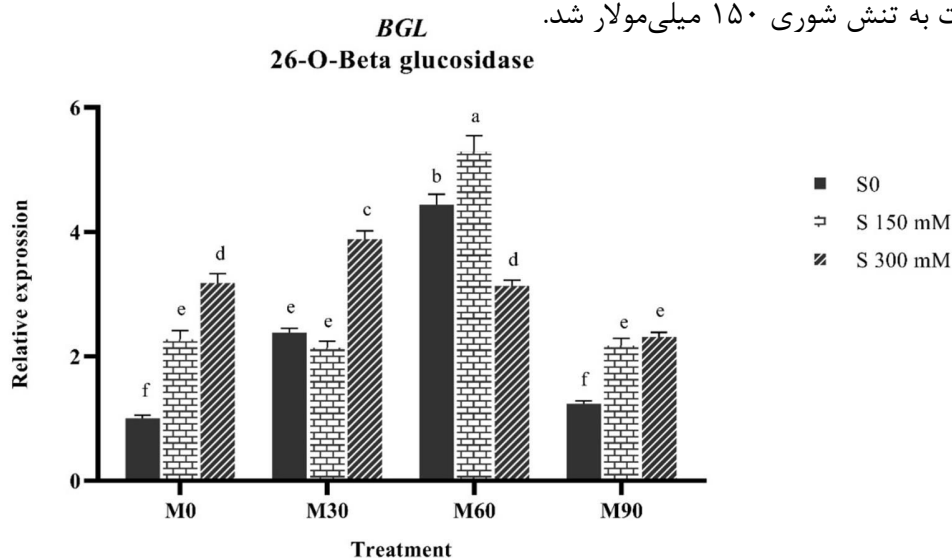
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر بیان ژن Δ_7 - reductase در شکل ۴-۲۹ ارائه شده است. بیان این ژن نیز مشابه ژن C_{22} -hydroxylase تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی کم بود. در حقیقت تمامی تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش بیان این ژن نسبت به شرایط شاهد شدند. بیان C_{22} -hydroxylase، تحت تاثیر تنش شوری (هر دو سطح) و بدون کاربرد ملاتونین نسبت به شرایط شاهد کاهش یافت. بالاترین میزان بیان این ژن در تیمار شوری ۳۰۰ میلی مولار و ملاتونین ۹۰ ppm به میزان ۱/۱۳ برابر تیمار شاهد ثبت شد. پایینترین میزان بیان این ژن مذکور در تیمار شوری ۱۵۰ میلی مولار و ترکیب با ملاتونین ۳۰ ppm مشاهده شد.



شکل ۴-۲۹- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن C_7 . مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۹-۸- بیان ژن 26-o-Beta glucosidase (BGL)

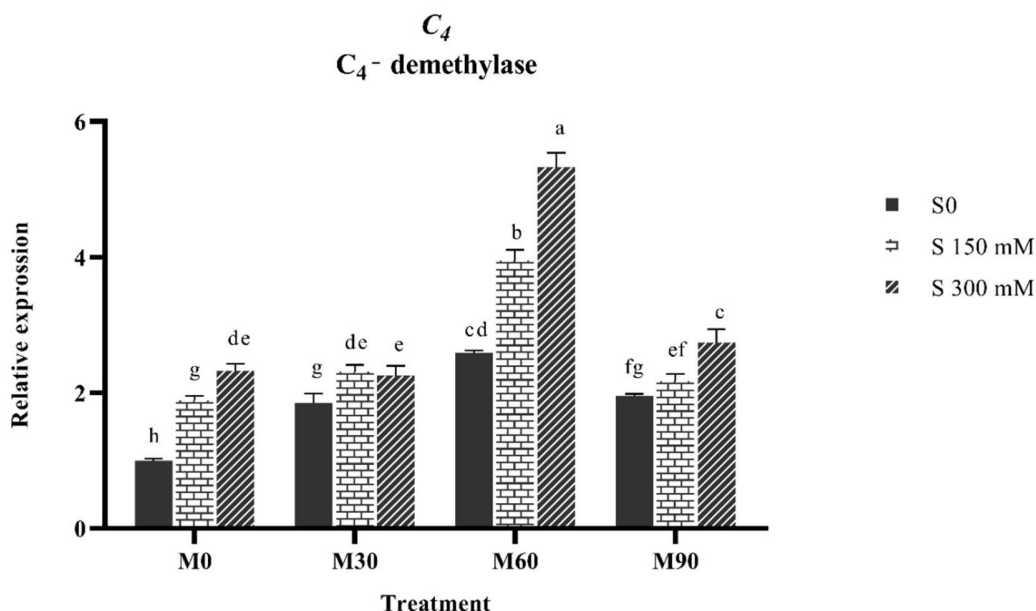
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر بیان ژن *BGL* در شکل ۴-۳۰ ارائه شده است. بیان ژن *BGL* تحت تاثیر تنش شوری و بدون کاربرد ملاتونین نسبت به شرایط شاهد به صورت معنی داری افزایش یافت. همچنین بیان این ژن در شرایط شاهد (بدون تنش شوری) و صرفاً با کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به میزان ۴/۵ برابر (در سطح ۶۰ ppm ملاتونین) نسبت به شرایط شاهد افزایش یافت. بیشترین بیان 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 بیان این ژن نسبت به شرایط شاهد شد. نتایج نشان داد که اثرات متقابل تنش شوری همراه با سطوح مختلف ملاتونین به عنوان یک محرک مناسب بیان این ژن را افزایش دادند. با افزایش شدت تنش شوری از ۱۵۰ به ۳۰۰ میلی مولار (در غلظت ۶۰ ppm) میزان بیان این ژن کاهش یافت. در حقیقت افزایش تنش شوری (از ۱۵۰ به ۳۰۰ میلی مولار) و افزایش غلظت ملاتونین (از ۶۰ به ۹۰ ppm) منجر به کاهش بیان این ژن نسبت به تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار شد.



شکل ۴-۳۰- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن *BGL*. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها 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 نرمال (بدون کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۹-۹- بیان ژن C₄-demethylase (C4)

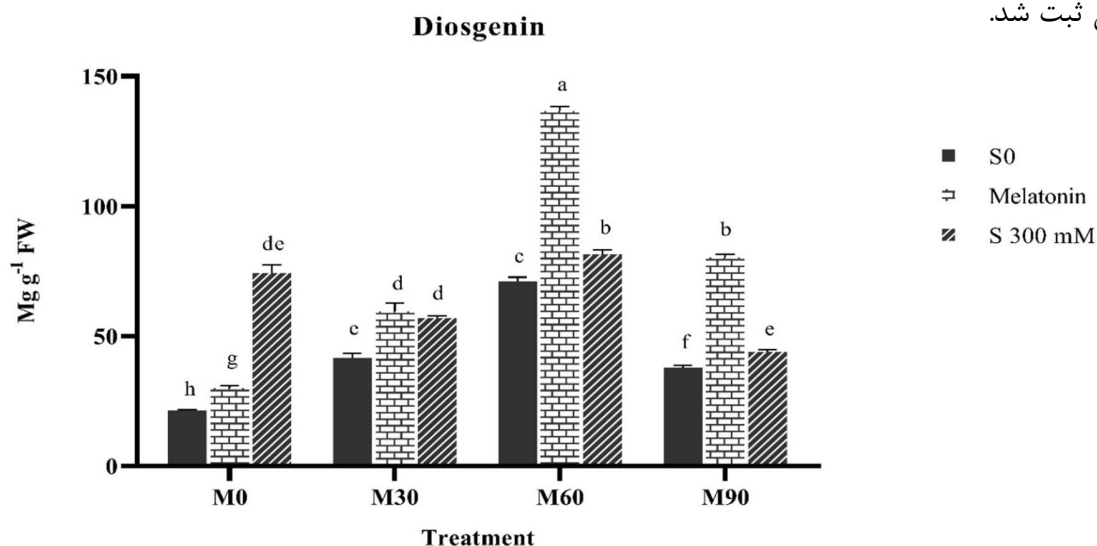
نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین بر بیان ژن C₄ در شکل ۴-۳۱ ارائه شده است. اثرات متقابل سطوح مختلف تنش شوری و ملاتونین منجر به افزایش معنی‌داری در میزان بیان این ژن نسبت به تیمار شاهد شدند. بیان این ژن، در شرایط بدون تنش شوری همراه با سطوح مختلف ملاتونین به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. همچنین میزان بیان این ژن در سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار تنش شوری و ترکیب با سطح ۶۰ ppm از ملاتونین نسبت به تیمار شاهد به ترتیب چهار و ۵/۲ برابر افزایش یافت. بالاترین میزان بیان این ژن در تنش شوری ۳۰۰ میلی‌مولار (همراه با ملاتونین ۶۰ ppm) ثبت شد. افزایش شدت تنش شوری از ۱۵۰ به ۳۰۰ میلی‌مولار (همراه با ملاتونین ۶۰ ppm) به صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان این ژن شد. در حقیقت بیان این ژن تحت تاثیر تمامی تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت.



شکل ۴-۳۱- اثرات تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان ژن C₄. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. بیان تمامی تیمارها با توجه به روش فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به تیمار نرمال (بدون تنش شوری و عدم کاربرد ملاتونین) نرمال شده‌اند.

۴-۱۰- محتوای دایوسجنین

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری و ملاتونین برای محتوای دایوسجنین در شکل ۴-۳۲ ارائه شده است. کاربرد سطوح مختلف تنش شوری باعث افزایش محتوای دایوسجنین در شنبلیله (نسبت به شرایط نرمال) شد، به طوری که اعمال و افزایش شدت شوری از ۱۵۰ میلی مولار به ۳۰۰ میلی مولار باعث افزایش بیشتر محتوای این صفت گردید. در ضمن، به کارگیری سطوح مختلف ملاتونین (بدون اعمال تنش شوری) محتوای دایوسجنین را به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال (مخصوصاً ۶۰ ppm) افزایش داد. کاربرد همزمان سطوح مختلف شوری و ملاتونین (۱۵۰ میلی مولار و تمامی سطوح ملاتونین) به صورت معنی داری باعث افزایش محتوای دایوسجنین نسبت به تیمار شوری ۱۵۰ میلی مولار (بدون کاربرد ملاتونین) شدند. در ضمن کاربرد همزمان سطوح مختلف شوری و ملاتونین (۳۰۰ میلی مولار و ۶۰ ppm) منجر به افزایش محتوای دایوسجنین نسبت به تیمار ۳۰۰ میلی مولار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. بالاترین محتوای دایوسجنین در تیمار تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm به میزان ۱۳۷ میلی گرم بر گرم بافت تر برگ ثبت شد.



شکل ۴-۳۲- اثر تنش شوری و غلظت‌های مختلف ملاتونین بر بیان محتوای دایوسجنین. مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند.

۴-۱۱-۱- محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

تنش‌های غیرزیستی محدودکننده‌ترین عوامل تولید گیاهان زراعی در دنیا محسوب می‌شوند. وجود این عوامل مخصوصاً در نواحی خشک و نیمه‌خشک دنیا که میزان بارندگی کم، درجه حرارت بالا و تبخیر و تعرق زیاد است مشکل‌ساز می‌باشد. تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد و نمو گیاهان را محدود می‌کند و کیفیت و کمیت محصولات زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تنش شوری اثرات مختلفی را بر صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاهان تحمیل می‌کند. گیاهان جهت مقابله با تنش شوری از مکانیزم‌های مختلفی استفاده می‌کنند (Fahad *et al.*, 2015; Parihar *et al.*, 2015). نتایج این پژوهش نشان داد که سطوح مختلف تنش شوری منجر به کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در شبلیله شدند (شکل ۴-۱). در ضمن، با افزایش تنش شوری مقادیر بیشتری از کلروفیل و کاروتنوئید تجزیه گردید. کمترین میزان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار ثبت شد. این نتایج با نتایج سایر محققین همخوانی دارد (Wang *et al.*, 2020). کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در اثر تنش شوری احتمالاً به‌علت تخریب لاملای کلروپلاست و کاهش تعداد کلروپلاست است. همچنین در شرایط تنش شوری به‌علت اکسیداسیون نوری کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش فعالیت کلروفیلاز و انتقال مجدد نیتروژن از برگ به دانه، محتوای کلروفیل کاهش می‌یابد (Sharma *et al.*, 2019). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داد که کاهش محتوای کلروفیل تحت تاثیر تنش شوری (NaCl) به‌علت کاهش سنتز ALA (۵-آمینو لاینولیک اسید) است، که در حقیقت پیش ماده تولید پروتوکلروفیل یک می‌باشد و در اثر تابش نور خورشید به کلروفیل تبدیل خواهد شد (Santus, 2004). نتایج پژوهش Sabra و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که کاربرد NaCl به‌صورت موثری منجر به کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید می‌گردد. نتایج آن‌ها نشان داد که کاهش محتوای رنگدانه با افزایش محتوای سدیم و نه کلسیم مرتبط بود. با توجه به اشتراکات مسیر بیوسنتز کلروفیل و پرولین (گلوتامات) به‌نظر می‌رسد تحت شرایط تنش شوری، محتوای پرولین افزایش یابد که این عامل خود منجر به کاهش بیوسنتز

کلروفیل خواهد شد. حفظ و تداوم فتوسنتز در طی تنش شوری یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک تحمل در گیاهان است (Sharma *et al.*, 2019 ; Gururani *et al.*, 2015). نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (مخصوصاً سطح ۶۰ ppm) در شرایط نرمال (بدون تنش شوری) باعث افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید شد (شکل ۴-۱). ملاتونین با اثرگذاری بر ژن‌های مسیر بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئید سنتز این رنگدانه‌ها را تحریک می‌کند. همچنین تیمار گیاهان شنبلیله با سطوح مختلف ملاتونین در شرایط تنش شوری (هر دو سطح) نه تنها از کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید جلوگیری کرد، بلکه محتوای آن‌ها را نیز افزایش داد. نتایج این پژوهش با نتایج سایر محققین درباره‌ی اثرات مثبت ملاتونین تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی بر گیاهان زراعی مطابقت دارد (Zamani *et al.*, 2020). نقش هورمون ملاتونین به‌عنوان یک عامل محرک در افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی اثبات شده است. همچنین این هورمون در افزایش تحمل گیاهان نسبت به مسمومیت ناشی از فلزات سنگین، مواد سمی، علف‌کش‌ها و تشعشعات ماوراء بنفش خورشید موثر است (Hossain *et al.*, 2020). ملاتونین یک عامل ضد پیری است، که از دستگاه فتوسنتزی گیاهان در برابر تنش حفاظت می‌کند. در حقیقت این هورمون از تخریب کلروفیل به‌وسیله آنزیم‌هایی مانند کلروفیلاز، فنوفیتیناز و پراکسیداز جلوگیری می‌کند و باعث تنظیم آنزیم pheophorbide-a-اکسیژناز (یکی از آنزیم‌های مهم دخیل در بیوسنتز کلروفیل) می‌شود. در ضمن ثابت شده است که ملاتونین، فتوسیستم‌های گیاهی و زنجیره‌ی انتقال الکترون را تنظیم می‌کند و بدین طریق منجر به افزایش نرخ فتوسنتز، هدایت روزنه-ای و سرعت انتقال الکترون می‌شود (Erland *et al.*, 2018; Sharif *et al.*, 2018). نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار گیاهان شنبلیله با سطوح مختلف ملاتونین تحت شرایط تنش شوری منجر به کاهش تخریب کلروفیل می‌گردد، که این عمل احتمالاً به‌دلیل کاهش بیان ژن‌هایی از قبیل کلروفیلاز، فنوفیتیناز و آنزیم -pheophorbide-a اکسیژناز می‌باشد. در این پژوهش ملاتونین باعث افزایش بیوسنتز و کاهش تخریب کاروتنوئید نیز شد.

تحت شرایط تنش شوری گیاهان به منظور کاهش هدر رفت آب روزنه‌های خود را می‌بندند، که این امر باعث کاهش هدایت روزنه‌ای و در نتیجه کاهش فتوسنتز می‌شود. نتایج نشان داده است که در این حالت تیمار گیاهان با غلظت‌های مطلوبی از ملاتونین قادر به بهبود بخشیدن، عملکرد روزنه‌ها است و در نتیجه گیاهان را قادر می‌سازد تا باز و بسته شدن، روزنه‌های خود را به صورت موثری کنترل کنند و در این حالت نرخ فتوسنتز خالص افزایش می‌یابد (Zhang *et al.* 2019; Debnath *et al.*, 2018). در این پژوهش کاربرد ملاتونین منجر به افزایش بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئید و کاهش سرعت تجزیه آن تحت شرایط شوری شد. بنابراین به نظر می‌رسد، که ملاتونین دارای یک نقش مهم در محافظت از سیستم فتوسنتزی از طریق افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی و کاهش بیان ژن‌های تجزیه‌کننده‌ی آن‌ها است (Zhang *et al.* 2019; Debnath *et al.*, 2018).

۴-۱۱-۲- محتوای آب نسبی

محتوای آب نسبی یکی از شاخصه‌های شناسایی و غربال ارقام مقاوم به تنش‌های غیرزیستی است، چرا که محتوای بالاتر این صفت به معنای وجود توانایی بالاتر گیاه در حفظ مقادیر بیشتر آب می‌باشد. بدین معنی که ارقام مقاوم در شرایط تنش، آب کمتری را از دست می‌دهند، در نتیجه سلول‌ها مدت زمان بیشتری شاداب می‌مانند. حفظ محتوای آب نسبی بالاتر از طریق تنظیم فشار اسمزی به واسطه‌ی اسمولیت‌ها در گیاهان کنترل خواهد شد (Keyvan, 2010). نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای آب نسبی در گیاهان شنبلیله‌ی تیمار شده با سطوح مختلف شوری (هر دو سطح) به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۴-۲). این نتیجه با یافته‌های سایر محققین همخوانی دارد (Ren *et al.*, 2020). همچنین در این تحقیق، به کارگیری سطوح مختلف ملاتونین (عدم حضور شوری) به صورت معنی‌داری ظرفیت گیاه را در افزایش محتوای آب نسبی بهبود بخشید. در حقیقت به کارگیری سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان شنبلیله تحت شرایط تنش شوری به صورت موثری قابلیت گیاه را در حفظ محتوای آب نسبی افزایش داد. بهبود محتوای آب نسبی در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف ملاتونین در این تحقیق احتمالاً به علت تنظیم فشار اسمزی به واسطه اسمولیت‌ها و یا بهبود

توانایی جذب آب توسط ریشه شکل گرفته است. در حقیقت کاربرد برون‌زاد ملاتونین فعالیت فتوسنتزی و آب در دسترس گیاه را از طریق تنظیمات اسمزی و کاهش محتوای H_2O_2 در گیاهان افزایش می‌دهد (Moustafa-*et al.*, 2020 ; Ren *et al.*, 2020).

۴-۱۱-۳- محتوای پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

از آنجاکه گیاهان موجوداتی ایستا و ساکن هستند، لذا در طبیعت همواره در معرض عوامل تنش‌زای غیرزیستی و زیستی قرار دارند. این عوامل هر کدام به طریقی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند و منجر به بروز اثرات غیرقابل جبرانی بر گیاهان می‌شوند. بروز هر یک از این عوامل مانع بروز حداکثر ظرفیت ژنتیکی گیاهان شده و کیفیت و کمیت محصولات زراعی را کاهش می‌دهند. مکانیسم‌های دفاعی متعددی در گیاهان برای مقابله با این عوامل در طی تکامل شکل گرفته‌اند، که به‌صورت موثری موجب حفظ و بقای گیاه تحت شرایط تنش‌زای محیطی می‌شوند (Liang *et al.*, 2018 ; Parihar *et al.*, 2015). تولید گونه‌های فعال اکسیژن در طی فرآیندهای طبیعی در گیاهان از قبیل فتوسنتز و تنفس نوری و همچنین بروز انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی رخ می‌دهد. رادیکال‌های آنیون سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و هیدروکسید مهم‌ترین گونه‌های فعال اکسیژن هستند، که باعث بروز تنش‌های اکسیداتیو و ایجاد خسارت در گیاهان و گاهی فعال‌شدن مسیرهای پیام‌رسانی سلولی و بروز پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می‌شوند. سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی از قبیل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، فلاونوئید، آنتوسیانین، ترکیبات فنولی در گیاهان برای مقابله با افزایش بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن توسعه یافته‌اند (Kim *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2017).

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش شوری منجر به افزایش محتوای پروتئین کل در گیاهان تحت تنش می‌گردد (شکل ۴-۳). این نتایج با نتایج سایر محققان مبنی بر افزایش محتوای پروتئین کل تحت شرایط تنش شوری مطابقت دارد (Mahmoudi *et al.*, 2020)، چراکه تحت شرایط تنش شوری متابولیسم و سوخت‌وساز گیاه

و همچنین ژن‌های درگیر در بهبود تحمل افزایش می‌یابد. همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (۶۰ ppm) به صورت موثری باعث افزایش محتوای پروتئین کل (نسبت به شرایط نرمال) شد. در ضمن تیمار گیاهان شنبلیله تحت تاثیر تنش شوری با سطوح مختلف ملاتونین باعث افزایش معنی‌دار در محتوای پروتئین کل (نسبت به شرایط نرمال) در گیاهان شد (شکل ۴-۳). ملاتونین به صورت گسترده با تنظیم و افزایش بیان ژن‌های دخیل در فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی قادر به افزایش سوخت‌وساز گیاه و در نهایت تحمل خواهد شد. افزایش محتوای پروتئین کل بعد از تیمار با ملاتونین تحت شرایط تنش غیرزیستی در منابع مختلف گزارش شده است (Mukherjee, 2019).

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تنش شوری به صورت موثری باعث افزایش فعالیت تمامی آنزیم‌های آنتی-اکسیدان اندازه‌گیری شده (آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) گردید (شکل‌های ۴-۴ تا ۴-۸). افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان بعد از اعمال تنش شوری در منابع مختلف گزارش شده است (Shakeel *et al.*, 2019). بروز تنش شوری منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو به واسطه ظهور گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد، که در این حالت غشا سلولی و همچنین ماکرومولکول‌های سلول دچار آسیب می‌شوند. افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها با هدف حذف گونه‌های فعال اکسیژن یک پاسخ دفاعی در گیاهان محسوب می‌شوند (Parihar *et al.*, 2015). در این پژوهش تیمار گیاهان با سطوح مختلف ملاتونین در شرایط نرمال (بدون تنش شوری) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز شد، در حالی که فعالیت سایر آنزیم‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) نداشت (شکل‌های ۴-۴ تا ۴-۸). در ضمن کاربرد ملاتونین در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف شوری باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت تمامی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد (شکل‌های ۴-۴ تا ۴-۸). نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد برون‌زاد ملاتونین می‌تواند با افزایش حفاظت آنتی‌اکسیدانی از طریق افزایش بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

موجب بهبود تحمل شنبلیله نسبت به تنش شوری گردد. نتایج تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم نشان داد که ملاتونین یک آنتی‌اکسیدان قوی است، که می‌تواند بیوسنتز سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش داده و بدین طریق منجر به فعال شدن مکانیزم‌های دفاعی در گیاهان گردد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعد از کاربرد ملاتونین در سایر گیاهان نیز گزارش شده است (Cen *et al.*, 2020).

یافته‌های این پژوهش نشان داد که سطح ۹۰ ppm از ملاتونین دارای اثرات مضر بر روی فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بود. بنابراین، به نظر می‌رسد که ملاتونین در غلظت‌های غیربهینه منجر به کاهش کارایی یا غیرفعال شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌گردد و به نوعی باعث ایجاد یک مسمومیت در گیاه خواهد شد. استفاده از ملاتونین به عنوان یک محرک سیستم دفاعی نیازمند شناسایی دوز بهینه از آن است، چراکه کاربرد غلظت‌های کمتر یا بیشتر از حد مطلوب می‌تواند باعث بروز اثرات معکوسی گردد. درضمن اثرات ملاتونین می‌تواند بسته به ژنوتیپ گیاه، نوع گیاه و مدت زمان در معرض قرارگیری هورمون ملاتونین متغیر باشد (Arnao and Hernández-Ruiz, 2015; Nawaz *et al.*, 2016). در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد ملاتونین برون‌زاد با تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تعدیل گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین تجمع پروتئین کل به صورت قابل توجهی منجر به افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش شوری می‌گردد. در حقیقت نقش کلیدی ملاتونین برون‌زاد در بیان ژن‌های موثر در فرایندهای دخیل در بیوسنتز آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان ثابت شده است (Jiang *et al.*, 2020). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد، که کاربرد ملاتونین برون‌زاد به صورت سرتاسری در غشا پلاسمایی توزیع می‌شود و از طریق فرایندهای پیام‌رسانی منجر به افزایش محتوای ملاتونین درونی می‌گردد. شکل‌گیری این فرایند پیام‌رسانی منجر به تحریک ژن‌های دخیل در فرایندهای بیوسنتز آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی خواهد شد و بدین طریق سطح گونه‌های فعال اکسیژن و H_2O_2 کاهش یافته و نوعی تعادل در سلول ایجاد می‌گردد (Arnao and Hernández-Ruiz, 2015; Nawaz *et al.*, 2016). اندازه‌گیری محتوای رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن

نشان می‌دهد که کاربرد خارجی ملاتونین اثر قابل توجهی بر تخریب رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش تنش‌های اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد. در حقیقت ملاتونین یک آنتی‌اکسیدان قوی است که سیستم دفاعی گیاه را بهبود و تحمل را افزایش می‌دهد. جالب آن‌که اثرات متقابل ملاتونین با گونه‌های فعال اکسیژن که در برخی از پژوهش‌ها اثبات شده است که منجر به رخداد یکسری واکنش‌های آبشار مانند مبتنی بر ملاتونین می‌شود، تا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه افزایش یافته و حتی در حضور غلظت‌های اندک ملاتونین نیز مکانیزم‌های دفاعی فعال شود (Sharif *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2020). نتیجه‌ی این پژوهش نشان داد که کاربرد همزمان سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری به‌صورت موثری فعالیت تمامی آنتی‌اکسیدان‌ها را نسبت به شرایط تنش شوری (عدم کاربرد ملاتونین) افزایش داد و مکانیزم دفاعی شنبلیله را بهبود بخشید.

۴-۱۱-۴- شاخص نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید

تنش شوری موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و در نتیجه کاهش پایداری غشا سلولی می‌شود. بنابراین یکی از روش‌های ارزیابی مقاومت گیاهان و آسیب‌پذیری غشا سلولی، اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها در آن‌ها است، چراکه تحت تاثیر تنش غشا سلول آسیب می‌بیند و در این حالت مواد سلولی به بیرون نشت می‌کند. یکی دیگر از شاخص‌های مهم آسیب‌پذیری غشا اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید است، که در حقیقت یک محصول سمی ناشی از تخریب غشا محسوب می‌شود (Li *et al.*, 2013; Savicka and Škute, 2010). نتایج این پژوهش نشان داد، که درصد شاخص نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید تحت تاثیر سطوح مختلف شوری به صورت معنی‌داری افزایش یافتند، که این افزایش احتمالا به‌علت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اکسیداسیون غشا پلاسمایی می‌باشد (شکل‌های ۹-۴ و ۱۰-۴). این رادیکال‌های آزاد تولید شده به شدت با ماکرومولکول‌هایی از قبیل DNA، پروتئین و همچنین اسیدهای چرب غشا سلولی وارد واکنش شده و منجر به اکسیداسیون آن‌ها می‌شوند (Baxter *et al.*, 2014). نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف شوری منجر به کاهش معنی‌دار هر دو صفت شد (شکل‌های ۹-۴ و ۱۰-۴). کاهش شاخص نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید تحت تاثیر سطوح

مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با تنش شوری در سایر گیاهان گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2020). کاهش این دو صفت بعد از کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در این تحقیق احتمالاً به علت تاثیر ملاتونین بر روی افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، حذف گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد است. نتایج سایر پژوهش‌ها نیز نشان داد که ملاتونین به صورت موثری می‌تواند از نشت و تجمع مالون دی‌آلدئید به بیرون از غشا جلوگیری کند و باعث افزایش تحمل گیاه گردد (Zhang *et al.*, 2020). کاربرد سطح ۶۰ ppm از ملاتونین به صورت موثری تحمل گیاه را از طریق کاهش شاخص نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید افزایش داد، در حالی که افزایش غلظت ملاتونین از ۶۰ ppm به ۹۰ ppm منجر به افزایش شاخص نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید گردید. این حقیقت نشان می‌دهد که ملاتونین تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عملکرد متفاوتی دارد (وابسته به دوز است) به طوری که غلظت‌های بالاتر از آن می‌تواند برای گیاه اثرات سمی در پی داشته باشد.

۴-۱۱-۵- محتوای فلاونوئید و فنول کل

پلی‌فنول‌ها دارای نقش بسیار مهمی در برابر تنش‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری در گیاهان هستند، مطالعات زیادی بیوسنتز این ترکیبات را در شرایط تنش‌های غیرزیستی گزارش کرده‌اند (Ferrazzano *et al.*, 2011). نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای این دو ترکیب تحت تاثیر تنش شوری به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل‌های ۴-۱۱ و ۴-۱۲). افزایش محتوای فنول کل و فلاونوئید تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Jahan *et al.*, 2020). نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (عدم حضور تنش شوری) منجر به افزایش محتوای فنول کل و فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد گردید (شکل‌های ۴-۱۱ و ۴-۱۲). ملاتونین به عنوان یکی از هورمون‌های مهم نقش بسیار حیاتی در پاسخ گیاهان نسبت به تنش‌های غیرزیستی بازی می‌کند. نتیجه‌ی تجزیه و تحلیل آنالیزهای ترانسکریپتوم نشان داد، که ملاتونین با تنظیم بیان ژن‌های دخیل در مسیر فتوسنتز، متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن، بیوسنتز فنول و فلاونوئید نقش بسیار مهمی در افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش شوری ایفا می‌-

کند (Bose and Howlader, 2020 ; Arnao and Hernández-Ruiz, 2018). همچنین در این پژوهش تیمار گیاهان شنبلیله با سطوح مختلف تحت تاثیر شوری به صورت موثری باعث افزایش محتوای فنول کل و فلاونوئید نسبت به تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد. به نظر می‌رسد که ملاتونین به عنوان یک عامل محرک از طریق تحریک بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه قادر خواهد بود تنش‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری را به صورت موثری کاهش دهد (Bose and Howlader, 2020; Arnao and Hernández-Ruiz, 2018). در حقیقت فنول و فلاونوئید به علت ویژگی‌های احیاکنندگی و حذف رادیکال‌های آزاد جزء آنتی‌اکسیدان‌های بسیار مهم محسوب می‌شوند (Ferrazzano et al., 2011). در این تحقیق اعمال تنش شوری منجر به افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد شده است، که این امر باعث افزایش محتوای فنول و فلاونوئید به عنوان یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم گردیده است. از آنجا که، مولکول‌های فنول و فلاونوئید دارای قابلیت اهدای اتم‌های اکسیژن به رادیکال‌های آزاد هستند، در نتیجه دارای توانایی حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشند. وجود همبستگی مثبت بین محتوای فنول و فلاونوئید با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در منابع مختلف ذکر شده است، لذا افزایش محتوای فنول و فلاونوئید در این تحقیق بعد از اعمال تیمار شوری و ملاتونین منطقی به نظر می‌رسد، چراکه تنش شوری منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد و در این حالت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه فعال خواهد شد (Ferrazzano et al., 2011; Rasouli et al., 2017). کاربرد ملاتونین بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی را فعال کرده و تحمل گیاه را افزایش می‌دهد.

۴-۱۱-۶- محتوای قند کل

در مجموع تنش‌های غیرزیستی منجر به افزایش املاح سازگارکننده‌ی گیاهان می‌شوند. مهم‌ترین املاح سازگارکننده شامل پرولین، گلیسین، بتائین، قندهای محلول، اسیدهای آمینه آزاد و پلی‌آمین‌ها هستند. چنین ترکیباتی از طریق تنظیم فشار اسمزی در سیتوپلاسم منجر به تثبیت پروتئین‌ها، حفظ یکپارچگی غشا و محتوای آب نسبی سلول منجر به افزایش تحمل گیاهان تحت شرایط نامطلوب محیطی می‌شوند (Blum, 2017;)

(Zivcak *et al.*, 2016). نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری به صورت معنی داری منجر به افزایش محتوای قند کل نسبت به شرایط نرمال گردید، همچنین تیمار گیاهان رشد یافته در شرایط تنش شوری با سطوح مختلف ملاتونین به صورت موثری باعث افزایش محتوای قند کل نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد (شکل ۴-۱۳). این نتایج با نتایج سایر محققین مبنی بر اثرات مثبت ملاتونین بر افزایش قند محلول در سلول تطابق دارد (Simlat *et al.*, 2018). افزایش سطح قند (کربوهیدرات‌ها) به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی عمل می کنند و در نتیجه ثبات غشا را به همراه دارند، بنابراین ملاتونین با اثر بر افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها به صورت غیرمستقیم در حذف رادیکال‌های آزاد موثر است. تیمار ملاتونین قادر خواهد بود مسیرهای کلیدی متابولیسمی مانند فنیل پروپانویید، بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئید، تثبیت کربن و متابولیسم قند را تنظیم کند (Arnao and Hernández-Ruiz, 2014; Arnao and Hernández-Ruiz, 2015). نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به ویژه (۶۰ ppm) به صورت موثری تجمع قند محلول را در شنبلیله افزایش داده و موجب بهبود تحمل شنبلیله در برابر تنش شوری می گردد (شکل ۴-۱۳).

۴-۱۱-۷- محتوای پتاسیم، کلر و سدیم

تنش شوری که اصولاً به عنوان سدیم کلرید شناخته می شود، یکی از تنش‌های مهم غیرزیستی است که جوانه زنی و استقرار گیاهچه‌ها را تحت تاثیر قرار می دهد، چراکه غلظت بالای سدیم و کلر در خاک‌های شور منجر به کاهش پتانسیل آب و اختلال در جذب آب می گردد، در ضمن غلظت بالای سدیم و کلر منجر به کاهش انرژی در دسترس در گیاهان شده و بدین طریق بیوسنتز گیاه را با مشکل مواجه می سازد (Kader and Lindberg, 2010). نتایج این تحقیق نشان داد که محتوای سدیم، کلر و نسبت سدیم به پتاسیم در گیاهان شنبلیله تحت تاثیر تنش شوری به صورت معنی داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت (شکل‌های ۴-۱۴ تا ۴-۱۷). افزایش در محتوای سدیم و کلر بافت‌های گیاهی در گیاهان در معرض تنش شوری توسط مطالعات مختلف تایید شده است (Zahedi *et al.*, 2020). در این پژوهش تیمار گیاهان شنبلیله با سطوح مختلف ملاتونین تاثیر معنی داری در افزایش سدیم و کلر درون بافتی نسبت به تیمار شاهد نداشت.

گیاهان در فرایندهای مختلفی از تولید بذر تا جوانه‌زنی و فتوسنتز به عناصر غذایی مختلف نیاز دارند. یکی از این عناصر مهم پتاسیم است که در فرایندهای مختلفی از قبیل بیوسنتز کربوهیدرات‌ها، پروتئین و فعال‌سازی آنزیم‌ها دخیل می‌باشد و در مجموع در حفظ تعادل یونی، انتقال انرژی و فرایندهای دیگری موثر است، همچنین نقش این عنصر در کاهش اثرات مضر ناشی از تنش‌های غیرزیستی به اثبات رسیده است (Zahedi et al., 2020). در این پژوهش محتوای پتاسیم با افزایش سطوح تنش شوری نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت (شکل ۴-۱۴)، این نتیجه توسط سایر پژوهش‌ها نیز تایید شده است (Zahedi et al., 2020). کاهش جذب پتاسیم احتمالاً به دلیل افزایش سدیم درون‌بافتی است. همچنین در شرایط شوری جذب پتاسیم به‌علت عدم تعادل مواد مغذی و وجود بیش از حد سدیم و کلسیم با مشکل مواجه می‌شود (Wang et al., 2013). نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ملاتونین باعث افزایش محتوای پتاسیم درون‌بافتی نسبت به تیمار تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) می‌گردد. همچنین تیمار گیاهان شنبلیله رشد یافته با سطوح مختلف ملاتونین (۶۰ ppm) تحت شرایط تنش شوری به‌صورت موثری محتوای پتاسیم را نسبت به شرایط تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد.

تحت شرایط تنش شوری حفظ هموستازی یونی به‌ویژه نسبت سدیم به پتاسیم یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت گیاهان در برابر تنش شوری است. در این پژوهش اعمال سطوح تنش شوری منجر به افزایش محتوای سدیم و کاهش محتوای پتاسیم گردید (شکل ۴-۱۶) که این عمل به نوعی هموستازی یونی را مختل کرده است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که کاربرد ملاتونین می‌تواند بیان ژن‌های کانال یونی را در شنبلیله تحت تاثیر تنش شوری کنترل کند و در نتیجه این عمل، هموستازی یونی و تحمل شنبلیله نسبت به تنش شوری افزایش یافت. افزایش جذب پتاسیم یا کلسیم و کاهش جذب سدیم در سلول‌های گیاهی بعد از تیمار با ملاتونین به‌علت اثرگذاری ملاتونین بر فعالیت کانال‌های یونی (*NHX1* و *SOS*) رخ می‌دهد (Zhao et al., 2018; Zhao et al., 2016). به‌نظر می‌رسد که ملاتونین از طریق تعدیل فعالیت‌های فاکتورهای رونویسی دخیل در

حفظ هموستازی یونی منجر به برقراری نوعی تعادل یونی در سلول‌های گیاهی در شرایط تنش شوری می‌شود. تحت شرایط تنش شوری کلسیم و سدیم به‌عنوان عناصر حفاظتی در سلول عمل می‌کنند، چراکه حضور آن‌ها برای حفظ یکپارچگی سلول، بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک و فعال‌سازی آنزیم‌ها ضروری است. تحت شرایط تنش شوری بین سدیم و پتاسیم رقابتی بر سر اتصال به گیرنده‌های غشا رخ می‌دهد، که در این حالت منجر به برهم خوردن هموستازی یون و اختلال در فعالیت آنزیم‌های درگیر در تحمل تنش اکسیداتیو می‌شود (Zhao *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016). این امر موجب برهم خوردن تعادل یونی، بی‌ثباتی غشا و اختلال در فعالیت فتوسنتز می‌گردد. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که کاربرد ملاتونین برون‌زاد با افزایش فعالیت کانال‌های حمل‌کننده پتاسیم و تا حدودی کلسیم منجر به افزایش ورود پتاسیم بیشتر به داخل سلول و افزایش نسبت پتاسیم به سدیم می‌گردد، که این عامل موجب افزایش تحمل گیاه می‌شود (Zhao *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). حفظ هموستازی یونی به‌ویژه نسبت سدیم به پتاسیم یکی از روش‌های افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش شوری است. حفظ این هموستازی توسط نیتریک اکسید در گیاهان تحت تنش شوری اثبات شده است. کاهش محتوای سدیم و کلر تحت تاثیر سطوح مختلف ملاتونین ممکن است با افزایش فعالیت Ca^{2+} - ATPase در غشا پلاسمایی همراه باشد، که انرژی لازم برای حذف مقادیر فراوان سدیم را فراهم می‌آورد (Liu *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2018).

۴-۱۱-۸- محتوای آبسیزیک اسید و اکسین

آبسیزیک اسید (ABA) یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهان است، که رشد و نمو گیاهان را در محیط‌های تنش‌زا تنظیم می‌کند. در حقیقت آبسیزیک اسید به‌عنوان یک عامل انتقال‌دهنده‌ی پیام در شرایط تنش عمل می‌کند (Arnao and Hernández-Ruiz, 2018; Arnao and Hernández-Ruiz, 2020). نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای آبسیزیک اسید تحت شرایط تنش شوری به‌صورت معنی‌داری نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت (شکل ۴-۱۸). همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین (سطوح ۳۰ و ۶۰ ppm) به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش محتوای آبسیزیک اسید نسبت به شرایط نرمال (بدون کاربرد ملاتونین) شد. افزایش محتوای آبسیزیک

اسید تحت تاثیر تنش شوری و همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین توسط سایر پژوهشگران نیز تایید شده است (Li *et al.*, 2021). آبسازیک اسید در کنترل فرایندهای فیزیولوژیکی مهمی همانند تنظیم خواب و بیان ژنهای مرتبط با تحمل به تنشهای غیرزیستی نقش دارد. در حقیقت تجمع آبسازیک اسید در گیاهان تحت تاثیر تنشهای زیستی و غیرزیستی به عنوان یک عامل مهم در انتقال پیام موثر است (Arnao and Hernández-Ruiz, 2020; Ruiz, 2018). افزایش معنی دار محتوای آبسازیک اسید در گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف ملاتونین و تنش شوری در این پژوهش تایید شد. در حقیقت یکی از اثرات ملاتونین افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنشهای غیرزیستی مبتنی بر مسیرهای بیوسنتز آبسازیک اسید است. به نظر می رسد که آبسازیک اسید از طریق تنظیم محتوای گونه های فعال اکسیژن در افزایش تحمل گیاه موثر است. در مجموع افزایش غلظت آبسازیک اسید در مواجهه با تنشهای غیرزیستی به واسطه ی رخ دادن مجموعه ای از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان است، که به صورت موثری منجر به حفظ محتوای آب نسبی در گیاهان می شود. هورمون های گیاهی به صورت موثری برای سازگاری با تنشهای غیرزیستی با واسطه ی انتقال پیام موثر هستند (Arnao and Hernández-Ruiz, 2020; Arnao and Hernández-Ruiz, 2018). نتایج این پژوهش نشان داد، که کاربرد ملاتونین برون زاد به صورت موثری منجر به افزایش آبسازیک اسید و محتوای ملاتونین درونی در گیاهان شده است، که این افزایش احتمالاً به دلیل تاثیر مستقیم و غیرمستقیم ملاتونین بر ژنهای دخیل در بیوسنتز ترکیبات درون سلولی است. مرور منابع نشان می دهد، که اثر ملاتونین برون زاد بر محتوای آبسازیک اسید متفاوت است، چراکه نتایج ضد و نقیضی در این مورد گزارش شده است. یافته ها در این مورد نشان می دهد، که پیش تیمار بذر خیار با ملاتونین منجر به کاهش ABA از طریق تنظیم دو ژن دخیل در مسیر بیوسنتز گردید (Arnao and Hernández-Ruiz, 2020; Arnao and Hernández-Ruiz, 2018). Zhang و همکاران (۲۰۱۹) بیانگر افزایش بیوسنتز ABA و متعاقباً افزایش تحمل به تنش شوری شد. در مجموع به منظور درک اثرات پیچیده ملاتونین در پاسخ

گیاهان نسبت به تنش‌های غیرزیستی و رابطه‌ی هورمون‌ها با آن‌ها ضرورت انجام مطالعات مفصل در زمینه‌ی بیوسنتز و کاتابولیسم هورمون‌ها اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد.

اکسین یکی دیگر از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است، که در افزایش اندازه‌ی سلول و رشد طولی سلول موثر می‌باشد. نقش این هورمون در تنش‌های غیرزیستی اثبات شده است (Arnao and Hernández-Ruiz, 2018; Arnao and Hernández-Ruiz, 2020). نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری به صورت معنی‌داری منجر به کاهش سطوح مختلف هورمون اکسین گردید (شکل ۴-۱۹). کاهش محتوای اکسین تحت تاثیر تنش شوری که همراه با کاهش سایر پارامترهای رشد بوده است، به علت مهار بیوسنتز اسید ایندول استیک یا افزایش تخریب آن رخ دهد. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند که کاهش محتوای اکسین تحت تاثیر تنش شوری تا حدودی پیچیده است، زیرا این فرایند تحت تاثیر عوامل رونویسی پاسخ دهنده به تنش و همچنین بیان میکرو RNA قرار می‌گیرد و در نهایت بیوسنتز اکسین را تعدیل می‌کند (Bielach *et al.*, 2017). همچنین در این پژوهش کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در شرایط نرمال باعث افزایش محتوای اکسین شد (شکل ۴-۱۹). تغییرات محتوای اکسین تحت تاثیر تنش شوری و تیمار با ملاتونین در سایر پژوهش‌ها نیز تایید شده است (Pérez-Llorca *et al.*, 2019). همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تیمار شده با تنش شوری به صورت موثری از کاهش محتوای اکسین نسبت به تنش شوری (بدون کاربرد ملاتونین) جلوگیری کرد (شکل ۴-۱۹). رابطه مثبت و معنی‌دار بین محتوای ملاتونین با هورمون‌هایی از قبیل براسینوئاستروئید، آبسزیک اسید، جاسمونیک اسید و اکسین به منظور تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک در شرایط تنش غیرزیستی به اثبات رسیده است (Arnao and Hernández-Ruiz, 2018; Arnao and Hernández-Ruiz, 2020; Arnao and Hernández-Ruiz, 2019). در این پژوهش تیمار گیاهان شنبلیله با سطح مختلف ملاتونین تحت تاثیر تنش شوری منجر به افزایش بیان ژن‌های اصلی در مسیر بیوسنتز اکسین و آبسزیک اسید گردید و بدین ترتیب محتوای این دو هورمون افزایش یافت.

۴-۱۱-۹- محتوای نیتریک اکسید و H_2O_2

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری (غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار) به صورت موثری باعث افزایش محتوای نیتریک اکسید نسبت به تیمار شاهد در شنبلیله شد (شکل ۴-۲۰). همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به صورت موثری باعث افزایش محتوای نیتریک اکسید نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) شد (شکل ۴-۲۰). اثرات مثبت تنش شوری و ملاتونین بر افزایش محتوای نیتریک اکسید در منابع مختلف گزارش شده است (Mukherjee, 2019). در این پژوهش تیمار سطوح مختلف ملاتونین در گیاهان تحت تاثیر تنش شوری به صورت معنی‌داری باعث افزایش محتوای نیتریک اکسید نسبت به تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) گردید (شکل ۴-۲۰). افزایش محتوای ملاتونین درونی و نیتریک اکسید به عنوان یک پاسخ دفاعی در گیاهان در شرایط تنش شوری گزارش شده است (Mukherjee, 2019). در حقیقت افزایش غلظت ملاتونین درونی بعد از کاربرد ملاتونین خارجی و متعاقب آن تحریک بیوسنتز نیتریک اکسید یکی از اولین پاسخ‌های دفاعی گیاه در مبحث انتقال پیام است، که در نهایت منجر به افزایش تحمل گیاه می‌گردد (Lee *et al.*, 2017). نتایج این پژوهش بر نقش مولکول نیتریک اکسید به عنوان یک مولکول گازی مهم با عملکردهای فیزیولوژیک متعدد از جمله تحمل به تنش شوری تاکید می‌کند. اگرچه اثرات متقابل ملاتونین و نیتریک اکسید در شرایط تنش در گیاهان تا حدودی بحث برانگیز است، اما نتایج این تحقیق تا حدودی بینش ما را در رابطه با ارتباط بین محتوای ملاتونین و نیتریک اکسید در شرایط تنش شوری در شنبلیله افزایش داد. اگرچه درک مکانیزم پیام‌رسانی دقیق‌تر نیازمند مطالعات گسترده‌ای از قبیل خاموشی ژن و توالی‌یابی RNA است. در حقیقت کاربرد ملاتونین برون‌زاد باعث افزایش تولید نیتریک اکسید در شرایط تنش غیرزیستی می‌گردد و نیتریک اکسید به عنوان یک پیام پایین‌دستی در افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش همراه با ملاتونین نقش دارد (Lee *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2017). پژوهش‌های مختلفی نشان می‌دهند، که افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش شوری توسط ملاتونین با سطوح نیتریک اکسید درون‌زاد مرتبط است. اگرچه گزارشات ضد و نقیضی در ارتباط با رابطه بین ملاتونین و نیتریک اکسید وجود دارد، اما مطالعات بسیار زیادی، سنتز نیتریک

اکسید وابسته به ملاتونین را در گیاهان تحت تنش غیرزیستی تایید می‌کنند. وجود این گزارشات ضد و نقیض ممکن است تحت تاثیر شدت تنش، زمان در معرض قرارگیری تنش، گونه‌های گیاهی و یا دوز ملاتونین درون-زاد باشد. شواهد مختلف نشان می‌دهد که در اثر بروز تنش شوری و افزایش ملاتونین درونی یک آبشار پیام-رسانی در سلول فعال شده که منجر به القای غلظت نیتریک اکسید می‌شود و در نتیجه تحمل به تنش شوری افزایش خواهد یافت (Lee *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2017).

بروز و ظهور گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان دارای اثرات دوگانه است. تولید گونه‌های فعال اکسیژن از یک سو در فعالیتهای پیام‌رسانی دخالت دارد و از سوی دیگر چنانچه غلظت آن‌ها از حد مطلوب بالاتر رود می‌تواند منجر به بروز آسیب‌های جدی در گیاه گردد. بنابراین گیاهان دارای مکانیزم‌های متعددی برای تعدیل در غلظت گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Lee *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2017). نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد سطوح مختلف شوری به‌صورت موثری قادر خواهد بود تا محتوای H_2O_2 را نسبت به شرایط نرمال افزایش دهد (شکل ۴-۲۱). افزایش محتوای H_2O_2 تحت شرایط تنش شوری توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Bai *et al.*, 2020). به کارگیری سطوح مختلف ملاتونین (۳۰ و ۶۰ ppm) تحت شرایط نرمال (بدون حضور نمک) منجر به کاهش معنی‌دار محتوای H_2O_2 شد. در ضمن تیمار گیاهان رشد یافته تحت تنش شوری با سطوح مختلف ملاتونین به‌صورت موثری محتوای H_2O_2 نسبت به تیمار شوری (عدم کاربرد ملاتونین) کاهش داد (شکل ۴-۲۰). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که ملاتونین به‌صورت موثری بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و بدین طریق به‌صورت موثری محتوای H_2O_2 را کاهش می‌دهد (Lee *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2017). ملاتونین احتمالاً از دو طریق می‌تواند موجب افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش شوری گردد. یکی از این مسیرها دخالت مستقیم آن در آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن است و راه حل دوم افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش کارایی فتوسنتز و افزایش تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد، که این مکانیزم از طریق تنظیم عوامل

رونویسی مرتبط با ژن‌های دخیل در تحمل گیاه رخ می‌دهد (Kaya *et al.*, 2020). در مجموع نتایج پژوهش‌های پیشین بر نقش ملاتونین در افزایش تحمل به شوری به‌علت وجود خواص آنتی‌اکسیدانی آن و جلوگیری از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن تاکید دارند. ملاتونین با کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون لیپید و القای بیان ژن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف، مقاومت به شوری را در گیاهان القا می‌کند. جالب آن‌که اثرات خنثی‌کنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها توسط ملاتونین در شرایط تنش وابسته به نیتریک اکسید است، بنابراین محتوای درونی نیتریک اکسید پس از تحریک توسط ملاتونین افزایش یافته به واسطه تنش شوری بهبود می‌یابد (Kaya *et al.*, 2020; Gong *et al.*, 2017; He and He, 2020).

۴-۱۱-۱۰- محتوای ملاتونین درونی

ملاتونین یکی از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مهم است، که در فرایندهای حیاتی مهمی در باکتری‌ها، قارچ‌ها، حیوانات و گیاهان نقش دارد. اثرگذاری ملاتونین به‌صورت گسترده در پاسخ‌دهی گیاهان نسبت به انواع تنش‌های غیرزیستی اثبات شده است (Tiwari *et al.*, 2020). ملاتونین به‌صورت موفقیت‌آمیزی در افزایش تحمل گیاهان نسبت به خشکی، شوری، سرما، گرما و فلزات سنگین موثر بوده است (Shi *et al.*, 2016; Back *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای ملاتونین درونی در گیاهان شنبلیله تیمار شده با سطوح مختلف شوری به‌صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت (شکل ۴-۲۲). همچنین کاربرد ملاتونین خارجی به‌صورت موثری منجر به افزایش ملاتونین درونی نسبت به تیمار شاهد (بدون کاربرد ملاتونین) گردید (شکل ۴-۲۲). در ضمن تیمار گیاهان رشد یافته تحت تاثیر تنش شوری با سطوح مختلف ملاتونین به‌صورت موثری محتوای ملاتونین را نسبت به تیمار شاهد و تیمار شوری (بدون کاربرد ملاتونین) افزایش داد. افزایش محتوای ملاتونین درونی تحت تاثیر تنش شوری و یا ملاتونین برون‌زاد در سایر پژوهش‌ها تایید شده است (Tiwari *et al.*, 2020). نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که بیوسنتز درونی ملاتونین تحت شرایط تنش افزایش می‌یابد، که نشان‌دهنده‌ی نقش این هورمون در پاسخ به تنش‌های محیطی است (Erland *et al.*, 2018; Bose and Howlader, 2020). در این پژوهش نیز سطح ملاتونین درونی بعد از تیمار با سطوح

مختلف شوری افزایش یافت. تجمع ملاتونین در گیاه احتمالاً با بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با بیوسنتز ملاتونین ارتباط دارد. ملاتونین برون‌زاد به صورت موثری در سرتاسر غشا پلاسمایی توزیع شده و قابل نفوذ است. نفوذ ملاتونین برون‌زاد منجر به افزایش ملاتونین درونی گیاه می‌گردد و این امر به نوبه خود باعث افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش شوری می‌گردد. تحقیقات نشان داده است، که افزایش محتوای ملاتونین درونی به واسطه تنش یا حضور ملاتونین برون‌زاد به صورت موثری طیف وسیعی از ژن‌ها با عملکردهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را تحت تاثیر قرار داده و بدین طریق تحمل گیاه افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که کاربرد ملاتونین برون‌زاد به صورت موثری منجر به کاهش غلظت سدیم، افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش ملاتونین درونی، افزایش فعالیت برخی از آنتی‌اکسیدان‌های درونی و کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن می‌گردد (Erland *et al.*, 2018; Bose and Howlader, 2020; Yan *et al.*, 2020).

۴-۱۱-۱۱- بررسی بیان ژن و محتوای دایوسجنین

ژن اسکوالن سنتاز (*SQS*) در تنظیم کانال کربن در بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه دخیل است. نقش کلیدی این ژن در سنتز استرول‌های گیاهی و همچنین نقش آن در سنتز تری‌ترین‌ها^۱ تایید شده است. اولین ژن در مسیر بیوسنتز دایوسجنین اسکوالن سنتاز است (Bach and Rohmer, 2012). در یک پژوهش بیان ژن *CAS* و *SQS* پس از تیمار با سطوح مختلف اتفن به ترتیب کاهش و افزایش یافت (Diarra *et al.*, 2019). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش شوری منجر به افزایش معنی‌دار بیان این ژن نسبت به تیمار نرمال گردید (شکل ۴-۲۴). عکس‌العمل این ژن نسبت به سطح مختلف ملاتونین متفاوت بود به طوری که کاربرد سطوح ۶۰ ppm ملاتونین منجر به افزایش بیان آن نسبت به تنش شوری (۱۵۰ میلی‌مولار) (بدون کاربرد ملاتونین) شد. با توجه به پروفایل بیان این ژن به نظر می‌رسد که کاربرد ملاتونین ۶۰ و ۹۰ ppm به صورت موثری بیان این ژن را افزایش داده است. مسیر بیوسنتزی دایوسجنین دارای ابهاماتی است (Mohammadi *et al.*, 2019)، لذا

^۱ Triterpene

ضرورت طراحی مطالعات بیشتر با هدف شناسایی پیچیدگی‌های این مسیر و شناسایی الیستورهای کارکردی با هدف تحریک افزایش بیان این ژن‌ها و در نتیجه بهبود محتوای دایوسجنین ضروری به نظر می‌رسد.

اولین مرحله اکسیژناسیون در مسیر بیوسنتز استرول‌های گیاهی با اکسید کردن اسکوالن توسط ژن اسکوالن اپوکسیداز (*SEP*) انجام می‌شود. این ژن اسکوالن را اکسید کرده و در نتیجه باعث شکل‌گیری ۳و۲ اکسیدواسکوالن^۱ می‌گردد (Han et al., 2010). در این پژوهش تنش شوری مشابه با ژن *SQS* منجر به افزایش بیان ژن *SEP* نسبت به ژن نرمال گردید (شکل ۴-۲۶). همچنین کاربرد سطوح مختلف ملاتونین بیان این ژن را نسبت به شرایط نرمال به‌طور معنی‌داری افزایش داد. عکس‌العمل این ژن نسبت به اثر متقابل تنش شوری و ملاتونین (۶۰ ppm) کاملاً افزایشی بود. به نظر می‌رسد با توجه به عکس‌العمل بسیار مناسب این ژن نسبت به ملاتونین (۶۰ ppm و در شرایط شوری ۱۵۰ میلی‌مولار) کاربرد ملاتونین می‌تواند به‌عنوان یک الیستور مناسب برای مهندسی دایوسجنین مورد استفاده قرار گیرد.

به واسطه‌ی تغییر سیکلوآرتنول بوسیله‌ی سیکلوآرتنول سنتاز (*CAS*)، استیگما استرول^۲، سیتواسترول^۳ یا کامپسترول^۴ تولید می‌شود. این ژن ۳و۲- اکسیدواسکوالن را به سیکلوآرتنول که پیش‌ماده اصلی در مسیر تبدیل به دیگر استرول‌های گیاهی محسوب می‌گردد، تبدیل می‌کند (Chen et al., 2009). پروفایل بیان ژن *CAS* تحت تاثیر سطوح مختلف شوری دقیقاً مشابه با دو ژن قبلی بود، چراکه تنش شوری منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به شرایط نرمال گردید (شکل ۴-۲۷). در ضمن، ملاتونین ۶۰ ppm و در شرایط شوری ۱۵۰ میلی‌مولار به‌صورت موثری بیان این ژن را به میزان هفت برابر نسبت به شرایط نرمال افزایش داد، که این مورد می‌تواند به‌عنوان یک نکته کلیدی در مهندسی مسیر متابولیت دایوسجنین مورد توجه قرار گیرد. از آنجاکه ضرورت فعالیت این ژن در این مسیر بیوسنتزی به خوبی اثبات شده است، پاسخ افزایشی آن نسبت به

¹ 2, 3- oxidosqualene

² Stigmasterol

³ Cytosterol

⁴ Campesterol

اثرات متقابل تنش شوری و ملاتونین نویدبخش شناسایی یک محرک کاربردی مناسب برای افزایش محتوای دایوسجنین در شنبلیله است. با توجه به ابهامات این مسیر بیوسنتزی مهم، شناسایی آن و ژن‌های مهم این مسیر در مهندسی دایوسجنین به‌عنوان یک متابولیت بسیار ارزشمند حیاتی به‌نظر می‌رسد. در یک بررسی، برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین شناسایی و جداسازی شدند و رابطه بین میزان بیان این ژن‌ها و محتوای دایوسجنین در نه توده شنبلیله با محتوای دایوسجنین متفاوت بررسی شد و شمایی کلی از مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله ارائه گردید (Mohammadi *et al.*, 2019).

سیکلوآرتنول (سوبسترای C₂₄-methyltransferase) به‌عنوان ترکیب آغازین برای شروع سنتز استرول‌ها در نظر گرفته می‌شود (Diener *et al.*, 2000). متیلاسیون کربن شماره ۲۴ در سیکلوآرتنول یک مرحله کلیدی تنظیمی در بیوسنتز استرول‌ها محسوب می‌شود (Nes *et al.*, 1999). این تبدیل عموماً به‌وسیله یک استرول C₂₄-methyltransferase وابسته به S-ade (SMT1) نیتریک اکسید 1-Met-syll انجام می‌شود (Schaeffer *et al.*, 2001). بیان ژن SMT تحت تاثیر شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ۳۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۴-۲۵). دو ژن SSR و SMT در مسیر بیوسنتز دایوسجنین با یکدیگر رقابت می‌کنند، به طوری که ژن SSR مسیر را به سمت بیوسنتز دایوسجنین و ژن SMT مسیر را به سمت بیوسنتز براسینواستروئید هدایت می‌کند (Mohammadi *et al.*, 2020; Zolfaghari *et al.*, 2020). بنابراین این نقطه از مسیر بیوسنتزی دایوسجنین یک نقطه بسیار مهم می‌باشد. بیان ژن SSR تحت شرایط تنش شوری به‌صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت (شکل ۴-۲۳). 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 سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند (Zhao *et al.*, 2006).

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تحریک‌کننده‌هایی از قبیل سالیسیلیک اسید، متیل جاسمون‌ها، 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 می‌یابند (Odjakova and Hadjiivava., 2001).

نتایج متناقضی 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 محرک-ها، از فاکتورهای موثر در افزایش کمیت متابولیت‌های گیاهی است (Angelova *et al.*, 2006; Namdeo, 2007). سه مرحله اکسیداسیون در موقعیت کربن‌های شماره C_{22} ، C_{16} و C_{26} در ساختار کلسترول به‌منظور تبدیل کلسترول به ترکیبات پایین‌دستی، ضروری می‌باشد. ژن‌های C_{22} -hydroxylase و C_{26} -hydroxylase به‌ترتیب طی مراحل مختلفی منجر به اکسیداسیون (اضافه شدن گروه OH) کلسترول می‌شوند. به‌عبارت دیگر، برای سنتز دایوسجنین، کلسترول به‌عنوان ماده حدواسط ابتدا توسط ژن‌های خانواده $CYP72A^1$ هیدروکسیله می‌شود، که این هیدروکسیله شدن ابتدا در موقعیت کربن ۲۲ و سپس کربن ۲۶، مسیر را به سمت سنتز دایوسجنین هدایت می‌کند (Eich, 2008). در این تحقیق، بیان این ژن تنها در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ۶۰ ppm ملاتونین نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۴-۲۸). نتایج یک پژوهش نشان داد که خاموش شدن C_{22} -hydroxylase در سیب‌زمینی منجر به کاهش قابل توجهی در میزان ترکیبات پایین‌دستی و تجمع کلسترول خواهد شد، در حالی که خاموش کردن C_{26} -hydroxylase در تجمع کلسترول موثر نبود (Umemoto *et al.*, 2016). در یک پژوهش ژن‌های C_{22} -hydroxylase و C_{26} -hydroxylase در گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی شناسایی و همچنین نقش C_{16} -hydroxylase در آن‌ها بررسی و مشخص شد، که هر سه ژن در بیوسنتز استرول

¹ Cytochrome P450 monooxygenase 72

گلیکوآلکالوئیدها (Glycoalkaloid) ضروری هستند (McAdam *et al.*, 2017). بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین تحت تاثیر کلسترول، اسکوالن و متیل جاسمونات نشان داد که بیان ژن‌های C₂₂-hydroxylase و C₂₆-hydroxylase نسبت به تیمار کلسترول به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد، که احتمالاً بیانگر نقش این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی دایوسجنین از طریق کلسترول می‌باشد (Ciura *et al.*, 2018; Ciura *et al.*, 2017).

نقش ژن‌های C₄-demethylase و Δ ₇-reductase با استفاده از داده‌های حاصل از RNA-seq در مسیر بیوسنتز کلسترول که حدواسط سنتز دایوسجنین است، به اثبات رسیده است. آنزیم Δ ₇-reductase با شکستن یک پیوند دوگانه در موقعیت D-7 منجر به تشکیل کلسترول می‌گردد (Ciura *et al.*, 2017). در حقیقت این ژن با شکستن پیوند دوگانه در موقعیت کربن شماره ۷، آخرین مرحله از بیوسنتز کلسترول را کاتالیز می‌کند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن Δ ₇-reductase تحت تاثیر سطوح مختلف تنش شوری و ملاتونین اندک بود (شکل ۴-۲۹). در یک تحقیق، Ciura و همکاران (۲۰۱۷) بیان این ژن را تحت تاثیر کلسترول، اسکوالن و متیل جاسمونات (Methyl jasmonate) در شنبلیله بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیان این ژن نسبت به تیمار کلسترول بیشترین افزایش را به خود اختصاص داد، که احتمالاً نشان‌دهنده نقش این ژن در مسیر بیوسنتز کلسترول 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 کلسترول به دایوسجنین، باعث سنتز دایوسجنین می‌گردد. در یک تحقیق، بیان ژن 26-o-beta glucosidase تحت تاثیر سه تیمار کلسترول، اسکوالن و متیل جاسمونات بررسی شد. در این پژوهش بیان ژن 26-o-beta glucosidase در

پاسخ به تیمار کلسترول نسبت به سایر تیمارها به صورت معنی داری افزایش یافت (Ciura *et al.*, 2018; Ciura *et al.*, 2017). نتایج تحقیق حاضر، نشان داد که بیان این ژن با کاربرد ملاتونین (۶۰ ppm) و تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار به بالاترین میزان (پنج برابر نسبت به شرایط شاهد) افزایش یافت (شکل ۴-۳۰).

آنزیم C₄-demethylase منجر به حذف گروه متیل از کربن شماره ۴ در حلقه استرول می گردد. تحقیقات بسیار اندکی بر روی این آنزیم در گیاهان انجام شده است (Lepesheva and Waterman, 2007) در حالی که، این ژن یکی از ژن های مهم مسیر بیوسنتز دایوسجنین محسوب می گردد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان این ژن در سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی 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 محرک های مورد استفاده در این تحقیق، به نظر می رسد این ژن کاندید مناسبی برای مهندسی کردن مسیر بیوسنتز دایوسجنین باشد (شکل ۴-۳۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ملاتونین و تنش شوری به عنوان تحریک کننده های عملکردی، بیان ژن های دخیل در مسیر دایوسجنین را افزایش می دهند. ملاتونین بر ترکیب آمینو اسیدها و کربوهیدرات های گیاهان در شرایط شوری تاثیر می گذارد و با افزایش مقدار قند قابل احیا، سبب افزایش سنتز ترکیبات ثانویه و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش شوری می شود (Thomas, 2013; Tavarini *et al.*, 2008). ترکیبات ایندولی از جمله ملاتونین با تاثیر بر فرآیندهایی مانند فتوسنتز، تنفس، جذب یون، نفوذپذیری غشا، فعالیت آنزیم ها و هورمون ها و میزان رشد را تحت تاثیر قرار می دهند (Zheng *et al.*, 2013). در حقیقت، ملاتونین به عنوان یکی از اولین سدهای دفاعی از گیاه در برابر شرایط نامساعد محیطی به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی محافظت می کند و از این طریق سبب حفظ محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها می شود (Dole and Wilkins, 1999). ملاتونین از طریق افزایش سنتز درونی پلی آمین های اسپرمیدین (Spermidine) و اسپرمین (Spermine) از طریق تحریک بیان ژن های سنتز کننده آرژنین دکربوکسیلاز (Arginine Decarboxylase) و اورنیتین دکربوکسیلاز (Ornithine

Decarboxylase) و تجمع بیشتر γ -بوتیریک اسید (γ -butyric acid) به واسطه تحریک بیان ژن‌های سنتزکننده گلوتامات دکربوکسیلاز (Glutamate Decarboxylase) و پلی‌آمین اکسیداز (Polyamine oxidase) و افزایش تجمع بیشتر پرولین از طریق افزایش بیان ژن‌های سنتزکننده پرولین-5-کربوکسیلات سینتاز (Proline-5-carboxylate synthase) و اورنیتین آمینوترانسفراز و کاهش بیان ژن سنتزکننده پرولین دهیدروژناز (Proline Dehydrogenase) منجر به افزایش مقاومت نسبت به تنش شوری می‌گردد (Cao *et al.*, 2016).

در این پژوهش کاربرد سطوح مختلف ملاتونین به صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان 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 بیان که با هدف افزایش محتوای 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 پروتئین کینازها و NADPH اکسیدازها، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت بیان ژن‌های دفاعی در سلول‌های گیاهی کنترل می‌کنند (Jacobo-*et al.*, 2015). اثرات تنش‌های غیرزیستی بر گیاهان ممکن است منجر به بروز اثرات مخربی بر کیفیت و کمیت گیاهان گردد. بروز این گونه تنش‌های غیرزیستی در گیاهان دارویی تا حدودی با سایر گیاهان زراعی متفاوت است، چراکه بروز تنش‌های غیرزیستی در گیاهان دارویی می‌تواند از یک طرف منجر به کاهش ذی توده و از سوی دیگر باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه گردد. بنابراین اعمال تنش غیرزیستی در گیاهان دارویی با توجه به هدف استفاده از آن‌ها (بافت سبز یا متابولیسم ثانویه) نیاز به تخصص خاصی دارد، چراکه شناسایی شدت اعمال این تنش و مرحله‌ی رشدی اعمال این تنش و همچنین کاربرد محرک‌های مختلف (غلظت آن، مدت زمان در معرض قرار گیری محرک و مرحله اعمال محرک) در افزایش کارایی تنش و محرک موردنظر بسیار تاثیرگذار است. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد، که کاربرد ترکیب همزمان تنش شوری

۱۵۰ میلی مولار و ملاتونین ۶۰ ppm به صورت موثری محتوای دایوسجنین را افزایش می دهد، به طوری که این تیمار، محتوای دایوسجنین را نسبت به تیمار شاهد بیش از پنج برابر افزایش داد.

۴-۱۲- نتیجه گیری کلی

در این پژوهش اثر ملاتونین برون زاد بر تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شنبلیله تحت تنش شوری بررسی شد، همچنین اثرات ملاتونین بر بیان ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و محتوای آن مطالعه شد. ملاتونین یک آنتی اکسیدان طبیعی است که دارای قدرت آنتی اکسیدانی بالایی نسبت به سایر آنتی اکسیدان ها می باشد. کاربرد ملاتونین برون زاد به صورت چشم گیری محتوای آب نسبی را تحت تنش شوری افزایش داد و بدین ترتیب اثرات ناشی از تنش شوری را تعدیل کرد. همچنین کاربرد ملاتونین از تخریب کلروفیل و رنگدانه های فتوسنتزی جلوگیری کرد و با اثرگذاری بر ژن های دخیل در بیوسنتز رنگدانه ها منجر به افزایش آن ها تحت شرایط شوری شد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد، که ملاتونین از طریق مسیرهای مبتنی بر H_2O_2 ، NO ، آسبیزیک اسید و اکسین در مسیرهای پیام رسانی مقاومت دخیل است که حاصل این اثر متقابل، افزایش تحمل گیاه تحت تنش شوری است. ملاتونین به صورت معنی داری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را با اثرگذاری بر بیان ژن های درگیر در تولید این آنزیم ها افزایش داد و بدین ترتیب موجب حذف گونه های فعال اکسیژن و رادیکال های آزاد شد.

تیمار گیاهان شنبلیله با ملاتونین تحت تاثیر تنش شوری منجر به افزایش تجمع محلول های سازگار مانند قند کل و فلاونوئید شد و بدین ترتیب تحمل گیاهان شنبلیله تحت تاثیر تنش شوری افزایش داد. در ضمن ملاتونین بر عناصر معدنی موجود در بافت های هوایی گیاه از قبیل سدیم، پتاسیم و کلر اثر معنی داری داشت به طوری که با کاهش جذب سدیم و کلر و افزایش محتوای پتاسیم از طریق تاثیر بر فعالیت کانال های یونی منجر به حفظ هموستازی یونی و در نهایت افزایش تحمل گیاه شد.

نقش ملاتونین و اثرات متقابل آن با هورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین و آبسیزیک اسید در این تحقیق به اثبات رسید و نتایج این تحقیق نشان داد که ملاتونین به صورت موثری منجر به افزایش اکسین و آبسیزیک اسید و متعاقبا افزایش تحمل شنبلیله نسبت به تنش شوری شد. همچنین در این پژوهش اثر ملاتونین بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز دایوسجنین و محتوای آن بررسی شد. نتایج نشان داد که ملاتونین به صورت موثری، بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین را افزایش داده و بدین طریق محتوای دایوسجنین نیز افزایش یافت. یافته‌های ما نشان داد که کاربرد ملاتونین می‌تواند به عنوان یک محرک کارکردی مناسب به منظور تحریک ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین و متعاقبا افزایش محتوای آن عمل کند.

۴-۱۳- پیشنهادات

۱. برداشت بافت‌های گیاهی در زمان‌های مختلف پس از در معرض قرارگیری تنش شوری به منظور فهم بیشتر اثرات ملاتونین و تنش شوری بر تحمل گیاهان شنبلیله.
۲. کاربرد غلظت‌های متفاوت از غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق به منظور شناخت غلظت بهینه ملاتونین.
۳. آنالیز ترانسکریپتوم (توالی‌یابی RNA) گیاهان شنبلیله‌ی تیمار شده با سطوح مختلف ملاتونین تحت تاثیر تنش شوری.
۴. بررسی نقش ملاتونین تحت تاثیر سایر تنش‌های غیرزیستی به منظور مطالعه اثر ملاتونین در افزایش تحمل گیاهان.

۵- منابع

۱. امام، ی.، حسینی، ا.، رفیعی، ن.، و پیرسته انوشه، ه. (۱۳۹۲). رشد اولیه و جذب یون‌های سدیم و پتاسیم در ده رقم جو در شرایط تنش شوری. فیزیولوژی گیاهان زراعی، ۱۵-۱۹.
۲. امید بیگی، ر. (۱۳۸۶). رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد اول، انتشارات آستان قدس رضوی.
۳. بناکار، م.ح.، امیری، ح.، رنجبر، غ.ح.، سرافرازدکانی، م.ر. (۱۳۹۸). تاثیر تنش شوری بر رشد و برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی شنبلیله. ششمین دوره کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران. یکم و دوم آبان ماه. دانشگاه یزد.
۴. رضائی، ح.ر.، و موسوی، غ.ر. (۱۳۹۵). اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر خصوصیات جوانه‌زنی گیاه دارویی شنبلیله. اولین کنفرانس ملی فناوری‌های نوین در علوم مهندسی، ۱۷ تا ۱۸ آذرماه. بیرجند.
۵. زارع زینلی، م.، نصیبی، ف.، منوچهری، خسرو.، احمدی موسوی، ع.ا. (۱۳۹۸). بررسی اثر ملاتونین بر پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه جعفری آفریقایی تحت تنش شوری. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۷۳ صفحه.
۶. زارع، م.، اسماعیلی، م.ع.، حیدرزاده، ا.، عباسیان، ا. (۱۳۹۸). بررسی اثر پیش تیمار غلظت‌های مختلف ملاتونین بر شاخصهای جوانه زنی بذر کلزا (*Brassica napus* L) رقم هایولا ۵۰۴ تحت تنش شوری. تنش-های محیطی در علوم زراعی. جلد دهم. شماره ششم. ۳۲۱-۳۳۴.
۷. سعیدی نوقابی، س.، یعقوب‌زاده، م.، شهیدی، ع.، حمادی، ح. (۱۳۹۹). اثر برهمکنش سطوح مختلف آبیاری و سطوح شوری بر رشد، عملکرد و اجزای عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) رقم آنفارم ۴ در منطقه بیرجند. تنش‌های محیطی در علوم زراعی. جلد سیزدهم، شماره اول. صفحه ۲۱۱ تا ۲۳۳.
۸. ضیائی، م.، شریفی، م.، نقدی بادی، ح.، تحصیلی، ژ.، قربانی نهوجی، م. (۱۳۹۳). مروری بر گیاه دارویی ریحان.
۹. عازمی، م.، دهستانی، م. (۱۳۹۶). مروری بر آثار تنش به خصوص خشکی در گیاهان و نقش اسمولیت‌ها و هورمون‌های خارجی در افزایش مقاومت به تنش در گیاهان مختلف.
۱۰. فرهادی، ح.، عزیزی، م.، و نعمتی، ح. (۱۳۹۵). بررسی تأثیر تنش شوری بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی توده‌های مختلف گیاه دارویی شنبلیله. علوم باغبانی ایران. دوره‌ی ۷۴، شماره‌ی ۳، صفحه ۵۳۱ تا ۵۴۱.
۱۱. قاسمی پیربلوطی، ع.، عبدالله، موسوی هریس، تیرگیر، فرهنگ، و حامدی. (۱۳۸۸). اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در عصاره گل همیشه بهار. مجله گیاهان دارویی، ۳(۳)، ۱۷۵-۱۸۰.
۱۲. قریشی، م.، قلمبران، م.ر.، حسنی، ب.، متولی، ص. (۱۳۹۸). عکس‌العمل میزان تولید دیوسژنین در گیاه شنبلیله تحت تأثیر نانوذرات مس. ششمین دوره کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران. یکم و دوم آبان ماه. دانشگاه یزد.

۱۳. کافی، م. زند، ا. مهدوی دامغانی، ع. عباسی، ف. (۱۳۸۸). فیزیولوژی گیاهی ۱ (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۶۷۶ صفحه.
۱۴. مجله‌ی طب سنتی اسلام و ایران، سال چهارم، شماره‌ی سوم، پاییز (۱۳۹۲)، جمع‌آوری و شناسایی منتخبی از گیاهان خودروی شهرستان بافت (استان کرمان) و بررسی مصارف سنتی آن‌ها.
۱۵. مسعودی، پ.، گزانچیان، ع.، جاجرمی، و.، بزرگمهر، ع. (۱۳۸۹). بررسی اثر پیش تیمار بذر بر بهبود جوانه زنی.
۱۶. معصومیان، ن.، آروین، پ.، ولی زاده، م.، کرمانی، م. (۱۳۹۶). تاثیر تنش شوری بر محتوای رنگدانه‌های تعدادی از توده‌های گیاه دارویی شنبلیله.
۱۷. منتظری، ف.، امیدی، م. و ایمانی، ن. (۱۳۸۸). مقایسه روش های کشت بذر و جنین و بررسی اثر زغال فعال در بهینه سازی کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی باریجه. فصل‌نامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۰ جلد ۲۶. صفحات ۵۱۱ تا ۵۹۵.
۱۸. منیری فر، ح.، مظلومی، ر. (۱۳۹۳). غربالگری مکرر برای گزینش اکوتیپ‌های یونجه متحمل به شوری. پژوهش‌نامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۰۲-۸۹: (۱۳).
۱۹. موسوی پورناکی، س.، عباسپور، ن. (۱۳۹۲). اثر تنش شوری بر برخی صفات فیزیولوژیکی دو رقم انگور قره اوزوم.

20. Acharya, S.N., Thomas, J.E. and Basu, S.K. (2008). Fenugreek, an alternative crop for semiarid regions of North America. Crop Science, 12(2): 149-154 .
21. Acharya, SN., Acharya, K., Paul, S., and Basu, SK. (2011). Antioxidant and antileukemic properties of selected fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) genotypes grown in western Canada. Can J Plant Sci.;91,99-105.
22. Ackerson, R.C. (1980). Stomatal response of cotton to water stress and abscisic acid as affected by water stress history. Plant Physiology, 65(3), 455-459.
23. Ahanger, M.A., Akram, N.A., Ashraf, M., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., Ahmad, P., (2017). Plant responses to environmental stresses from gene to biotechnology. AoB. Plants. 9, plx025.
24. Ahmad, A., Alghamdi, S.S., Mahmood, K., Afzal, M. (2016). Fenugreek a multipurpose crop: Potentialities and improvements. Saudi Journal of Biological Sciences. 23:300-310.
25. Ahmed, A.S., Lyndy, J.M., Eloff, J.N. (2013). Evaluation of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four *Maytenus species* used in Southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. BMC Complement. Altern .Med. 13, 1-15.
26. Amirjani, M.R. (2010). Effect of NaCl on Some Physiological Parameters of Rice, EJBS 3 (1) PP: 06-16.
27. Angelova, Z., Georgiev, S., and Roos, W. (2006). Elicitation of plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 20(2), 72-83.

28. Arnao, M. B., and Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in plant science*, 19(12), 789-797.
29. Arnao, M. B., and Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of pineal research*, 59(2), 133-150.
30. Arnao, M. B., and Hernández-Ruiz, J. (2018). Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of Botany*, 121(2), 195-207.
31. Arnao, M. B., and Hernández-Ruiz, J. (2019). Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator? *Trends in Plant Science*, 24(1), 38-48.
32. Arnao, M. B., and Hernández-Ruiz, J. (2020). Melatonin as a regulatory hub of plant hormone levels and action in stress situations. *Plant Biology*.
33. Arnon, D. I. (1967). Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. *Physiological reviews*, 47(3), 317-358.
34. Ashraf, M., Foolad, M.R. (2013). Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. *Plant. Breed.* 132, 10–20.
35. Bach, T. J., & Rohmer, M. (Eds.). (2012). *Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: New concepts and experimental approaches*. Springer Science & Business Media.
36. Back, K., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2016). Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. *Journal of Pineal Research*, 61(4), 426-437.
37. Bai, Y., Guo, J., Reiter, R. J., Wei, Y., and Shi, H. (2020). Melatonin synthesis enzymes interact with ascorbate peroxidase to protect against oxidative stress in cassava. *Journal of Experimental Botany*, 71(18), 5645-5655.
38. Banerjee, A., Kidd, E. A. M., and Watson, T. F. (2000). In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. *Caries Research*, 34(2), 144-150.
39. Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., and Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *J. Plant Growth Regul.* 32(1), 216–232.
40. Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1229-1240.
41. Beilby, J., Turi, C.E., Baker, T.C., Tymm, F.J.M., Murch, S.J. (2015). Circadian changes in endogenous concentrations of indole-3-acetic acid, melatonin, serotonin, abscisic acid and jasmonic acid in Characeae (*Chara australis* Brown). *Plant Signal Behav.*

42. Bewley Hernández-Ruiz, J., and Arnao, M.B. (2008). Distribution of melatonin in different zones of lupin and barley plants at different ages in the presence and absence of light. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10567–10573
43. Bielach, A., Hrtyan, M., and Tognetti, V.B. (2017). Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1427.
44. Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, cell & environment*, 40(1), 4-10.
45. Bose, S. K., and Howlader, P. (2020). Melatonin plays multifunctional role in horticultural crops against environmental stresses: A review. *Environmental and experimental botany*, 176, 104063.
46. Buhner, S.H. (1999). *Herbal Antibiotics Natural Alternatives for treating Drug-Resistant Bacteria*. 1th ed. Vermont, Store Books;8-20.
47. 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.
48. Caldana, C., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., and Ruzicic, S. (2007). A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods*, 3(1), 7.
49. Cao, S., Song, C., Shao, J., Bian, K., Chen, W., and Yang, Z. (2016). Exogenous melatonin treatment increases chilling tolerance and induces defence response in harvested peach fruit during cold storage. *Journal Agriculture Food Chem*, 64(25), 5222-5215.
50. Cen, H., Wang, T., Liu, H., Tian, D., and Zhang, Y. (2020). Melatonin application improves salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by enhancing antioxidant capacity. *Plants*, 9(2), 220.
51. 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. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj*. 46, 22–31.
52. Chen, D., Chen, Y., Yang, Z., Zhang, Y., and Xiao, L. (2009). Molecular cloning and expression of cycloartenol synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 29(2), 221-228.
53. Chen, T.S., Yuan, F., Song, J., Wang, B.S. (2016). Nitric oxide participates in waterlogging tolerance through enhanced adventitious root formation in the euhalophyte *Suaeda salsa*. *Funct. Plant. Biol.* 43, 244–253.
54. Chen, Z., Gu, Q., Yu, X., Huang, L., Xu, S., Wang, R., and Shen, W. (2018). Hydrogen peroxide acts downstream of melatonin to induce lateral root formation. *Annals of botany*, 121(6), 1127-1136.

55. Cheng, Y., Tian, Q., Zhang, W.H. (2016). Glutamate receptors are involved in mitigating effects of amino acids on seed germination of *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Environ Exp Bot.* 130:68–78.
56. Ciura, J., Bocian, A., Kononiuk, A., Szeliga, M., Jaromin, M., and Tyrka, M. (2017). Proteomic signature of fenugreek treated by methyl jasmonate and cholesterol. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(5), 112.
57. Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M., and Tyrka, M. (2018). Changes in fenugreek transcriptome induced by methyl jasmonate and steroid precursors revealed by RNA-Seq. *Genomics*, 110(4), 267–276.
58. Debnath, B., Hussain, M., Irshad, M., Mitra, S., Li, M., Liu, S., and Qiu, D. (2018). Exogenous melatonin mitigates acid rain stress to tomato plants through modulation of leaf ultrastructure, photosynthesis and antioxidant potential. *Molecules*, 23(2), 388.
59. Dewick, P.M. (2002). *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. Second Edition, Wiley. 7: 121-140.
60. Diarra, S., Nasser, M. M., Konate, I., Dembele, M., Doucoure, D., Doumbia, Y., and Dao, S. (2019). Co-infection VIH/Tuberculose dans le Service de Maladies Infectieuses du Centre Hospitalier Universitaire du Point G: Aspects Épidémiocliniques et Thérapeutiques à propos de 48 Cas. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 20(3).
61. Diener, E., Gohm, C. L., Suh, E., and Oishi, S. (2000). Similarity of the relations between marital status and subjective well-being across cultures. *Journal of cross-cultural psychology*, 31(4), 419–436.
62. Ding, F., Chen, M., Sui, N., Wang, B.S. (2010). Ca^{2+} significantly enhanced development and salt-secretion rate of salt glands of *Limonium bicolor* under NaCl treatment. *S. Afr. J. Bot.* 76, 95–101.
63. Dini, M. (2006). Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine, Forest and Rangeland Research Institute Publication, Iran, pp: 299 – 300.
64. Dionisio-Sese, M. L., and Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1), 1-9.
65. Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* 22, 296-302.
66. Dole, J.M. and Wilkins, F.H. (1999). *Floriculture: Principles and Species*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 356–360.
67. Domingos, P., Prado, A.M., Wong, A., Gehring, C., Feijo, J.A. (2015). Nitric oxide: A multitasked signaling gas in plants. *Mol. Plant.* 8, 506–520.

68. Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W., Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18, 28–31.
69. Ebrahimibasabi, E., Ebrahimi, A., Momeni, M., and Amerian, M.R. (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.
70. Eich, E. (2008). *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)*: Springer Science & Business Media.
71. Erland, L. A., Saxena, P. K., and Murch, S. J. (2018). Melatonin in plant signalling and behaviour. *Functional Plant Biology*, 45(2), 58-69.
72. Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., and Huang, J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant growth regulation*, 75(2), 391-404.
73. Fedacko, J., Singh, R. B., Niaz, M. A., Ghosh, S., Fedackova, P., Tripathi, A. D., and Shastun, S. (2016). Fenugreek seeds decrease blood cholesterol and blood glucose as adjunct to diet therapy in patients with hypercholesterolemia. *World Heart Journal*, 8(3), 239.
74. 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 Sci.* 238, 286–296.
75. Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., and Pollio, A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.
76. Gaillard, F., Richardforget, F., & Nicolas, J. (1993). New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Analytical Biochemistry*, 215(1), 59-65.
77. Geller, B. L., & Winge, D. R. (1984). Subcellular distribution of superoxide dismutases in rat liver. *Methods in enzymology*, 105, 105-114.
78. Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., and Mittler, R. (2016). ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant physiology*, 171(3), 1606-1615.
79. Gong, B., Yan, Y., Wen, D., and Shi, Q. (2017). Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidase: a novel downstream signaling pathway in melatonin-induced stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia plantarum*, 160(4), 396-409.

80. Govil, J. N., and Singh, V. K. (2010). Recent progress in medicinal plants. Vol 1. Studium Press. Texas.
81. 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*. *Funct. Plant. Biol.* 45, 350–361.
82. Gururani, M. A., Venkatesh, J., and Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular plant*, 8(9), 1304-1320.
83. Hamilton, C. E., Gundel, P. E., Helander, M., and Saikkonen, K. (2012). Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*, 54(1), 1-10.
84. Han, J.Y., In, J.G., Kwon, Y.S., and 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.
85. Han, N., Shao, Q., Bao, H., Wang, B.S. (2010). Cloning and Characterization of a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporter from Halophyte *Suaeda salsa* L. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 29, 449–457.
86. Hardainiyan, S., Nandy, B. C., and Kumar, K. (2015). *Elaeocarpus Ganitrus* (Rudraksha): A Reservoir Plant with their Pharmacological Effects. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 34(1), 55-64.
87. Hardeland, R. (2016). Melatonin in plants—Diversity of levels and multiplicity of functions. *Front. PlantSci.* 7, 198.
88. Hardeland, R., Cardinali, D.P., Srinivasan, V., Spence, D.W., Brown, G.M., and Pandi-Perumal, S.R. (2011). Melatonin a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *J. Progress Neurobiol*, 93(3): 350-384.
89. 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.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. New York, USA, Springer.
90. He, F., Zhu, Y., He, M., Zhang, Y.J.D.S. (2008). Molecular cloning and characterization of the gene encoding squalene epoxidase in *Panax notoginseng*. *DNA Seq.* 19(3):270-273.
91. He, H., and He, L. F. (2020). Crosstalk between melatonin and nitric oxide in plant development and stress responses. *Physiologia Plantarum*, 170(2), 218-226.
92. Hepburn, H. A., Naylor, R. E., and Stokes, D. T. (1986). ELECTROLYTE LEAKAGE FROM WINTER BARLEY TISSUE AS AN INDICATOR OF WINTER-HARDINESS. *Annals of applied biology*, 108(S1), 164.
93. Hossain, M., Li, J., Sikdar, A., Hasanuzzaman, M., Uzizerimana, F., Muhammad, I., and Feng, B. (2020). Exogenous Melatonin Modulates the Physiological and Biochemical Mechanisms of Drought Tolerance in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn). *Molecules*, 25(12), 2828.

94. Hubick, K. T., and Reid, D. M. (1980). A rapid method for the extraction and analysis of abscisic acid from plant tissue. *Plant physiology*, 65(3), 523-525.
95. Inoue, K., Ebizuka, Y. (1996). Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. *FEBS Lett.* 378(2):157-160.
96. Irchhaiya, R., Kumar, A., Yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., and Gurjar, H. (2015). Metabolites in plants and its classification. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4(1), 287-305.
97. Isaac, R. A., & Kerber, J. D. (1971). Atomic absorption and flame photometry: Techniques and uses in soil, plant, and water analysis. *Instrumental methods for analysis of soils and plant tissue*, 17-37.
98. Jacobo-Velázquez, D.A., González-Agüero, M., and Cisneros-Zevallos, L. (2015). Cross-talk between signaling pathways: the link between plant secondary metabolite production and wounding stress response. *Scientific reports*, 5, 8608.
99. 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.
100. Jahan, M.S., Guo, S., Baloch, A.R., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., and Roy, R. (2020). Melatonin alleviates nickel phytotoxicity by improving photosynthesis, secondary metabolism and oxidative stress tolerance in tomato seedlings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 197, 110593.
101. Jajoo, A. (2013). Changes in photosystem II heterogeneity in response to high salt stress.p: 149-168. In: P.Ahmad, M.M. Azooz, and M.N.V. Prasad (eds.). *Ecophysiology and responses of plants under salt*.
102. Jalili, S., and Ehsanpour, A.A. (2021). In Vitro Responses of Alfalfa Root (*Medicago Sativa* L.) to salt stress and Melatonin.
103. Jiang, D., Lu, B., Liu, L., Duan, W., Chen, L., Li, J., and Bai, Z. (2020). Exogenous melatonin improves salt stress adaptation of cotton seedlings by regulating active oxygen metabolism. *PeerJ*, 8, e10486.
104. Joanna, C., Magdalena, S., and Tyrka, M. (2015). Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek. *Medicinal Plants Studies*, 3(3): 22-25.
105. Kader, M.A., and Lindberg, S. (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant signaling & behavior*, 5(3), 233-238.
106. 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.

107. Kant, C., Aydin, A., and Turan, M. (2008). Ameliorative effect of hydro gel substrate on growth, inorganic ions, proline and nitrate contents of bean under salinity stress. *Journal of Plant Nutrition*, 31(7), 1420-1439.
108. Karbalaie-Niya, M.H., Mokhtari-Azad, T., Shafiei-Jandaghi, N.Z., Yavarian, J.(2015). Detection of oseltamivir resistant influenza A/H3N2 viruses by Real-time RT-PCR. *Razi J Med Sci* . 22(133): 64-9.
109. Karimi-Afshar, A., Baghizadeh, A., Mohammadi-nejad, Gh. (2015). Physiological assessment of drought tolerance of two ecotypes of cumin (*Cuminum cyminum* L.) under greenhouse conditions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 6(3),175-185.
110. Kaya, C., Higgs, D., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P. (2020). Integrative roles of nitric oxide and hydrogen sulfide in melatonin-induced tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants to iron deficiency and salt stress alone or in combination. *Physiologia plantarum*, 168(2), 256-277.
111. Kazemi, M. (2015). Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and *Carum copticum* L. essential oils. *J. Herb. Med.* 5, 217–222.
112. Keyvan, S. (2010). The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *J. Anim. Plant Sci*, 8(3), 1051-1060.
113. Kim, Y.H., Khan, A.L., Waqas, M., and Lee, I.J. (2017). Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review. *Frontiers in Plant Science*, 8, 510.
114. Kirnak, H., Kaya, C., Tas, I., and Higgs, D. (2001). The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in eggplants. *Bulg. J. Plant Physiol*, 27(3-4), 34-46.
115. Kliebenstein, D.J. (2013). Making new molecules - evolution of structures for novel metabolites in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 16 (1), 112_117.
116. Kumar, K., Saddhe, A.A. (2018). Targeting Aquaporins for Conferring Salinity Tolerance in Crops, in: *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Volume 1, Springer, Cham., pp. 65-84.
117. Kurepin, L.V., Ivanov, A.G., Zaman, M., Pharis, R.P., Hurry, V., Hüner, N.P.A. (2017). Interaction of Glycine betaine and plant hormones: protection of the photosynthetic apparatus during abiotic stress. In: Hou, H.J.M., Najafpour, M.M., Moore, G.F., Allakhverdiev, S.I. (Eds.), *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications*. Springer International Publishing, Cham, pp. 185–202.

118. Lee, K., Choi, G. H., and Back, K. (2017). Cadmium-induced melatonin synthesis in rice requires light, hydrogen peroxide, and nitric oxide: key regulatory roles for tryptophan decarboxylase and caffeic acid O-methyltransferase. *Journal of pineal research*, 63(4), e12441.
119. Lepesheva, G.I., and 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.
120. Li, C., P. Wang, Z. Wei, D. Liang, C. Liu, L. Yin, D. Jia, M. Fu and F. Ma. (2012). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity induced stress in *Mahus hupehensis*. *J. Pineal Res.*, 53(3): 298-306.
121. Li, H., Guo, Y., Lan, Z., Zhang, Z., Ahammed, G. J., Chang, J., and Zhang, X. (2021). Melatonin antagonizes ABA action to promote seed germination by regulating Ca²⁺ efflux and H₂O₂ accumulation. *Plant Science*, 303, 110761.
122. Li, M. Q., Hasan, M. K., Li, C. X., Ahammed, G. J., Xia, X. J., Shi, K., and Zhou, J. (2016). Melatonin mediates selenium-induced tolerance to cadmium stress in tomato plants. *Journal of Pineal Research*, 61(3), 291-302.
123. Li, W., Yamaguchi, S., Khan, M.A., An, P., Liu, X., Tran, L.S.P. (2016). Roles of gibberellins and abscisic acid in regulating germination of *Suaeda salsa* dimorphic seeds under salt stress. *Front. Plant Sci.* 6, 1235.
124. Li, Y., Zhang, S., Jiang, W., and Liu, D. (2013). Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1117-1123.
125. Liang, W., Ma, X., Wan, P., and Liu, L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(1), 286-291.
126. Liang, Y., Chen, Q.I.N., Liu, Q., Zhang, W., and 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.
127. Lin, J., Li, J.P., Yuan, F., Yang, Z., Wang, B.S., Chen, M. (2018). Transcriptome profiling of genes involved in photosynthesis in *Elaeagnus angustifolia* L. under salt stress. *Photosynthetica*. 56, 998–1009.
128. Liu, J., Shabala, S., Zhang, J., Ma, G., Chen, D., Shabala, L., and Zhao, Q. (2020). Melatonin improves rice salinity stress tolerance by NADPH oxidase-dependent control of the plasma membrane K⁺ transporters and K⁺ homeostasis. *Plant, cell & environment*, 43(11), 2591-2605.
129. 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. *Aquat. Bot.* 146, 1–7.

130. Liu, W., and 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.
131. Liu, Z., CAI, J. S., LI, J. J., LU, G. Y., LI, C. S., FU, G. P., and CHENG, Y. (2018). Exogenous application of a low concentration of melatonin enhances salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(2), 328-335.
132. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
133. Loreto, F., and Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127(4), 1781-1787.
134. Mahmoudi, H., Ben-Salah, I., Zaouali, W., Hamrouni, L., Gruber, M., Ouerghi, Z., and Hosni, K. (2020). Priming-induced changes in germination, morpho-physiological and leaf biochemical responses of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) under salt stress. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(5), 601-614.
135. Mahmoudi, S., Mohammadkhani, A., and Rouhi, V. (2016). Effects of sodium chloride and calcium chloride on growth, gel content and concentration of some nutrients in Aloe vera under greenhouse conditions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 7 (2), 85-97.
136. Mandegari, A., Pournamdari, M., Sharififar, F., Pournourmohammadi, Sh., Fardiar, R., and 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.
137. Martinez, V., Nieves-cordones, M., Lopez-delacalle, M., Rodenas, R., Mestre, T.C., Garcia-sanchez, F., Rubio, F., Nortés, 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.
138. Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G.B., Pozo, M.J., Pieterse, C.M., van Wees, S. (2017). Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytol.* 213, 1363–1377.
139. McAnuff, M.A., Harding, W.W., Omoruyi, F.O., Jacobs, H., Morrison, E.Y., Asemota, H.N. (2005). Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from *jamaican bitter yam*, *dioscorea polygonoides*. *Food Chem Toxicol.* 43(11):1667-1672.
140. McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M., and Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*, 73(1), 73-84.

141. Min, C., Zhen, Y., Jing, L., Tingting, Z., Xiaocen, W., Hai, F., Baoshan, W. (2018). Adaptation Mechanism of Salt Excluders under Saline Conditions and Its Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3668.
142. Mohammadi, M., Mashayekh, T., Rashidi-Monfared, S., Ebrahimi, A., and Abedini, D. (2020). New insights into diosgenin biosynthesis pathway and its regulation in *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytochemical Analysis*, 31(2), 229-241.
143. Moustafa-Farag, M., Mahmoud, A., Arnao, M. B., Sheteiwy, M. S., Dafea, M., Soltan, M., and Ai, S. (2020). Melatonin-induced water stress tolerance in plants: Recent advances. *Antioxidants*, 9(9), 809.
144. Mozafarian, V. (1995). *Plants Names Dictionary of Iran*. Farhang Moaser Publication, Iran,, 558p .
145. Mukherjee, S. (2019). Insights into nitric oxide–melatonin crosstalk and N-nitrosomelatonin functioning in plants. *Journal of experimental botany*, 70(21), 6035-6047.
146. Mullis-Kary B. et al. (2005). "Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences" U.S. Patent 4,683,195.
147. Murlidhar, M., Goswami, T. (2012). A review on the functional properties, nutritional content, medicinal utilization and potential application of fenugreek. *J. Food Process. Technol.* 3.
148. Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
149. Nawaz, M.A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M., and Hameed, S. (2016). Melatonin: current status and future perspectives in plant science. *Frontiers in plant science*, 6, 1230.
150. Nes, W.D., McCourt, B.S., Marshall, J. A., Ma, J., Dennis, A. L., Lopez, M., and 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.
151. Nguyen, H.T., Neelakadan, A.K., Quach, T.N. (2013). Molecular characterization of glycine max squalene synthase genes in seed phytosterol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem.* 73:23-32.
152. Nxele, X., Klein, A., Ndimba, B.K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South Afr. J. Bot.* 108, 261–266.
153. Odjakova, M., and Hadjiivanova, C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg. J. Plant Physiol*, 27(1-2), 101-109.
154. 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 .

155. Oliveira, V.P., Marques, E.C., Lacerda, C.F., Prisco, J.T., Gomes Filho, E. (2013). Physiological and biochemical characteristics of *Sorghum bicolor* and *Sorghum sudanense* subjected to salt stress in two stages of development. *African Journal of Agricultu.* (n.d.). *African Journal of Agricultural Research* Vol. 8(8), pp. 660-670.
156. Omid-baigi, R. (2004). Production and processing of medicinal plants. Astane Ghodse Razavi Publication. No: 149 – Vol: 3 – P: 397.
157. Pang, X., Wen, D., Zhao, Y., Xiong, C.Q., Wang, X.Q., Yu, L.Y., Ma, B.P. (2015). Steroidal saponins obtained by biotransformation of total furostanol glycosides from *Dioscorea zingiberensis* with *Absidia coerulea*. *Carbohydr. Res.* 402: 236-240.
158. Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P., and Prasad, S.M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056-4075.
159. Parker, J.S. (1995). Chromosome structure. *Chromosome Res.* 3: 39–40.
160. Paula-Freire, L.I.G., Mendes, F.R., Molska, G.R., Duarte-Almeida, J.M., Carlini, E.A. (2013). Comparison of the chemical composition and biological effects of the roots, branches and leaves of *Heteropterys tomentosa* A. Juss. *J. Ethnopharmacol.* 145, 647-652.
161. Pendota, S.C., Aderogba, M.A., Ndhlala, A.R., Van Staden, J. (2013). Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. leaf extracts and isolated compounds. *J. Ethnopharmacol.* 148, 515-520.
162. Pérez-Llorca, M., Muñoz, P., Müller, M., and Munné-Bosch, S. (2019). Biosynthesis, metabolism and function of auxin, salicylic acid and melatonin in climacteric and non-climacteric fruits. *Frontiers in plant science*, 10, 136.
163. Posmyk, M.M., Janas, K.M. (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1.
164. Posmyk, M.M., Kuran, H., Marciniak, K., Janas, K.M. (2008). Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations. *J. Pineal Res.* 45 (1), 24–31.
165. Pothinuch, P., and Tongchitpakdee, S. (2011). Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. *Food chemistry*, 128(2), 415-419.
166. Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Trotin, F., 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology.* 72(1-2), 35-42.
167. Raju, J., Mehta, R. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr. Cancer* 61, 27–35.

168. Ranieri, A., Castagna, A., and Soldatini, G. F. (2000). Differential stimulation of ascorbate peroxidase isoforms by ozone exposure in sunflower plants. *Journal of plant physiology*, 156(2), 266-271.
169. Rasouli, H., Farzaei, M.H., and Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20 (sup2), 1700-1741.
170. Ren, J., Ye, J., Yin, L., Li, G., Deng, X., and Wang, S. (2020). Exogenous melatonin improves salt tolerance by mitigating osmotic, ion, and oxidative stresses in maize seedlings. *Agronomy*, 10(5), 663.
171. Sabra, A., Daayf, F., and Renault, S. (2012). Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 135, 23-31.
172. Sadeghi, F., Salehi-Vaziri, M., Alizadeh, A., Ghodsi, S.M., Bokharaei-Salim, F., Fateh, A. (2015). Detection of merkel cell polyomavirus large T-antigen sequences in human central nervous system tumors. *J Med Virol* 87(7): 1241-7. doi: 10.1002/jmv.24178.
173. Sagner Shakeel, et al. (2019). "Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings." *PeerJ* 7 e7793.
174. Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J. P., Deus-Neumann, B., & Zenk, M. H. (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry*, 47(3), 339-347.
175. Said-Alahl, H. A. H., and Omer, E. A. (2011). Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review, *Herba Polonica*, 57 (1): 72-86.
176. Santos, C.V. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*, 103(1), 93-99.
177. Saslis-Lagoudakis, C. H., Hawkins, J. A., Greenhill, S. J., Pendry, C. A., Watson, M. F., Tuladhar-Douglas, W. (2014). The evolution of traditional knowledge: Environment shapes medicinal plant use in Nepal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281 (1780), 20132768
178. Saufi, A. (2007). Lignans in *Phaleria macrocarpa* and in *Linum flavum* var. *compactum* L. Doctoral Thesis. Heinrich-Heine-Dusseldorf University, Germany. 300-316.
179. Savicka, M., and Škute, N. (2010). Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*, 56(1), 26-33.

180. Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C., 1998. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*. 104(4), 747-752.
181. Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., and 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.
182. Schlegel, L. (1956). The juice and fasting cure. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 86, 91-93. seedlings. *Acta Physiol. Plantarum* 38 (4), 1–9.
183. Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M. B., Ali, M., Ali, Q., and Li, Y. (2018). Melatonin and its effects on plant systems. *Molecules*, 23(9), 2352.
184. Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., and Zheng, B. (2019). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-23.
185. Sharma, A., Wang, J., Xu, D., Tao, S., Chong, S., Yan, D., and Zheng, B. (2020). Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants. *Science of the Total Environment*, 713, 136675.
186. Shi, H., Chen, K., Wei, Y., and He, C. (2016). Fundamental issues of melatonin-mediated stress signaling in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 1124.
187. Shi, H.T., Jiang, C., Ye, T.T., Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *J. Exp. Bot.* 66 (3), 681–694.
188. Simlat, M., Ptak, A., Skrzypek, E., Warchoń, M., Morańska, E., and Piórkowska, E. (2018). Melatonin significantly influences seed germination and seedling growth of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PeerJ*, 6, e5009.
189. Singh, M., Pandey, N., Agnihotri, V., Singh, K.K., Pandey, A. (2016). Antioxidant, antimicrobial activity and bioactive compounds of *Bergenia ciliata* Sternb.: A valuable medicinal herb of Sikkim Himalaya. *J. Tradit. Complement. Med.*, 1-6.
190. Solorio-Sánchez, F., Solorio-Sánchez, B., Basu, S.K., Casanova-Lugo, F., Sarabia-Salgado, L., Ku-Vera, J. (2014). Opportunities to grow annual forage legume fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under Mexican silvopastoral system. *Am J Soc Issues Hum.* 86_95 Fenugreek Special Issue (March/April)

191. Stewart, C.R., and Voetberg, G. (1985). Relationship between stress-induced ABA and proline accumulations and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiology*, 79(1), 24-27.
192. Stewart, R. R., & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant physiology*, 65(2), 245-248.
193. 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 Regul.* 75, 281–295.
194. Tan, D.X., Manchester, L.C., Liu, X., Rosales-Corral, S.A., Acuna-Castroviejo, D., Reiter, R.J. (2013) Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J. Pineal Res.* 54, 127–138.
195. Tavarini, S., Innocenti, E.D., Remorini, D., Massai, R., and Guidi, L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chem.* 107: 282–288.
196. Thomas, H. (2013). Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytol.* 197: 696–711.
197. Tiwari, R.K., Lal, M.K., Naga, K.C., Kumar, R., Chourasia, K.N., Subhash, S., and Sharma, S. (2020). Emerging roles of melatonin in mitigating abiotic and biotic stresses of horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 272, 109592.
198. Tohda, C., Yang, X., Matsui, M., Inada, Y., Kadomoto, E., Nakada, S., H. Watari, N. (2017). Shibahara, Diosgenin-rich yam extract enhances cognitive function: A placebocontrolled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults, *Nutrients* 9 1160–1172.
199. Tomita, Y., Uomori, A. (1971). Biosynthesis of sapogenins in tissue cultures of *Dioscorea tokoro makino*. *J Chem Soc D.* 7:284-284.
200. Tsialtas, J.T., Kostoglou, E., Lazari, D. and Eleftherohorinos, I.G. (2018). Annual *Datura* accessions as source of alkaloids, oil and protein under Mediterranean conditions. *Industrial Crops and Products*, 121: 187-194.
201. Turk, H., and Genisel, M. (2020). Melatonin-related mitochondrial respiration responses are associated with growth promotion and cold tolerance in plants. *Cryobiology*, 92, 76-85.
202. Umemoto, N., Nakayasu, M., Ohyama, K., Yotsu-Yamashita, M., Mizutani, M., Seki, H., and Muranaka, T. (2016). Two cytochrome P450 monooxygenases catalyze early hydroxylation steps in the potato steroid glycoalkaloid biosynthetic pathway. *Plant physiology*, 171(4), 2458-2467.

203. 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 .
204. Vaidya, K., Ghosh, A., Kumar, V. (2013). De novo transcriptome sequencing in *Trigonella foenum-graecum* L. to identify genes involved in the biosynthesis of diosgenin. *The Plant Genome*. 6(2):1-11.
205. Vandesompele, J., De Paepe, A., and 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.
206. Vasanthi R., Greeshma G., Sowmya Sri 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.. *Der Pharma Chemica*, 9(16), 22-24.
207. Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270(5235), 484-487.
208. Wang, J.S., Wu, Q.F., Lu, Z.F. (2015). Review on plant secondary metabolites and forest tree resistance. *Jiangsu Agr. Sci.* 43, 4–7.
209. Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7370-7390.
210. Wang, P., Sun, X., Li, C., Wei, Z.W., Liang, D., Ma, F.W. (2013). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *J. Pineal Res.* 54 (3), 292–302.
211. Wang, Y., Diao, P., Kong, L., Yu, R., Zhang, M., Zuo, T., and Wuriyanghan, H. (2020). Ethylene Enhances Seed Germination and Seedling Growth Under Salinity by Reducing Oxidative Stress and Promoting Chlorophyll Content via ETR2 Pathway. *Frontiers in plant science*, 11, 1066.
212. Wang, Y., Reiter, R.J., Chan, Z. (2018). Phytomelatonin: a universal abiotic stress regulator. *J. Exp. Bot.* 69, 963–974.
213. Wong, M. L., and Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75.
214. Xu, C., and Mou, B. (2016). Responses of Spinach to Salinity and Nutrient Deficiency in Growth, Physiology, and Nutritional Value. *Journal of American Society Horticulture Science*, 141(1), 12–21.
215. Yan, F., Zhang, J., Li, W., Ding, Y., Zhong, Q., Xu, X., and Li, G. (2021). Exogenous Melatonin Alleviates Salt Stress by Improving Leaf Photosynthesis in Rice Seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*.

216. Yan, Y., Shi, Q., and Gong, B. (2020). Review of melatonin in horticultural crops. In *Melatonin*. IntechOpen.
217. Yoshida, T., Mogami, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. *Plant. Cell Physiol.* 56, 1043–1052.
218. Yu, Y., Wang, A., Li, X., Kou, M., Wang, W., Chen, X., and Sun, J. (2018). Melatonin-stimulated triacylglycerol breakdown and energy turnover under salinity stress contributes to the maintenance of plasma membrane H^+ -ATPase activity and K^+/Na^+ homeostasis in sweet potato. *Frontiers in plant science*, 9, 256.
219. Zahedi, S., Hosseini, M., Abadía, M. S., J., and Marjani, M. (2020). Melatonin foliar sprays elicit salinity stress tolerance and enhance fruit yield and quality in strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 313-323.
220. Zamani, Z., Amiri, H., and Ismaili, A. (2020). Improving drought stress tolerance in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by exogenous melatonin. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(5), 643-655.
221. Zandalinas, S.I., Mittler, R., Balfago'n, D., Arbona, V., Go'mez-Cadenas, A., (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.* 162 (1), 2_12.
222. Zandi, P., Basu, S.K., Bazrkar-Khatibani, L., Balogun, M., Aremu, M.O., Sharma, M. (2015). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed: a review of physiological and biochemical properties and their genetic improvement. *Acta Physiol Plant.* 37:1714.
223. Zargari, A., (1386). *Medicinal plants*, Tehran University Publication, Iran, Volume 1, pp: 637 - 8.
224. Zerbino, D. R., and Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.
225. Zhang, J., and Davies, W. J. (1989). Absciscic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell & Environment*, 12(1), 73-81.
226. Zhang, M., He, S., Zhan, Y., Qin, B., Jin, X., Wang, M., and Wu, Y. (2019). Exogenous melatonin reduces the inhibitory effect of osmotic stress on photosynthesis in soybean. *Plos one*, 14(12), e0226542.
227. Zhang, P., Liu, L., Wang, X., Wang, Z., Zhang, H., Chen, J., and Li, C. (2021). Beneficial Effects of Exogenous Melatonin on Overcoming Salt Stress in Sugar Beets (*Beta vulgaris* L.). *Plants*, 10(5), 886.
228. Zhang, T., Shi, Z., Zhang, X., Zheng, S., Wang, J., and Mo, J. (2020). Alleviating effects of exogenous melatonin on salt stress in cucumber. *Scientia Horticulturae*, 262, 109070.

229. Zhao, G., Zhao, Y., Yu, X., Kiprotich, F., Han, H., Guan, R., and Shen, W. (2018). Nitric oxide is required for melatonin-enhanced tolerance against salinity stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1912.
230. Zhao, H., Ye, L., Wang, Y., Zhou, X., Yang, J., Wang, J., and Zou, Z. (2016). Melatonin increases the chilling tolerance of chloroplast in cucumber seedlings by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate-glutathione cycle. *Frontiers in plant science*, 7, 1814.
231. Zhao, W., Swanson, S. A., Ye, J., Li, X., Shelton, J. M., Zhang, W., and Thomas, G. D. (2006). Reactive oxygen species impair sympathetic vasoregulation in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 48(4), 637-643.
232. Zhao, Y. (2010). "Auxin biosynthesis and its role in plant development". *J. plant biology*, 61: 49-64.
233. Zheng, X.L., Tian, S.P., Meng, X.H., and Li, B.Q. (2013). Physiological and biochemical responses in peach fruit to oxalic acid treatment during storage at room temperature. *Food Chem.*104: 156–162.
234. Zhou, B., Guo, Z., Xing, J., and Huang, B. (2005). Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3223-3228.
235. Zhou, N., Guo, J. F., Yang, L. Y., Xu, P., and Jiang, B. (2010). Determination of Diosgenin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* at Different Collecting Time by HPLC [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 18.
236. Zhou, R., Squires, T. M., Ambrose, S. J., Abrams, S. R., Ross, A. R., and Cutler, A. J. (2003). Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1010(1), 75-85.
237. Zivcak, M., Brestic, M., and Sytar, O. (2000). Osmotic adjustment and plant adaptation to drought stress. In *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1 (pp. 105-143). Springer, Cham.
238. Zolfaghari, F., Rashidi-Monfared, S., Moieni, A., Abedini, D., and Ebrahimi, A. (2020). Improving diosgenin production and its biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. hairy root cultures. *Industrial Crops and Products*, 145, 112075.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف شوری بر صفات بررسی شده در این مطالعه

صفت تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	محتوای آب نسبی	پروتئین کل	کاتالاز	پلی فنول اکسیداز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	نشت الکترولیت	محتوای مالون دی آلدئید
•	۱۲/۶ b	۷/۲۱ b	۱۹/۸۲ b	۱۴/۷۱ b	۶۴/۵ b	۲۲۳/۲۵ c	۰/۰۳ c	۰/۰۴ c	۰/۰۸ c	۰/۰۶ c	۰/۰۵ c	۴۲/۵۶ a	۱۱/۱۷ a
۱۵۰mM شوری	۱۷/۷۳ a	۱۰/۱۶ a	۲۷/۹ a	۲۱/۳۸ a	۷۸/۲۵ a	۲۹۱/۵ b	۰/۰۴ b	۰/۱۳ a	۰/۱۱ b	۰/۱۲ b	۰/۰۵ b	۳۳/۸۵ c	۷/۱۸ c
۳۰۰mM	۱۲/۵۳ b	۷/۴۴ b	۱۹/۹۷ b	۱۴/۵ b	۵۶/۸۳ c	۴۲۱/۲۵ a	۰/۰۶ a	۰/۰۶ b	۰/۲ a	۰/۱۸ a	۰/۰۷ a	۳۸/۳۸ b	۹ b

صفت تیمار	فلانوئوئید	فنول کل	قند کل	پتاسیم	سدیم	کلر	سدیم/پتاسیم	محتوای آبسیزیک اسید	محتوای اکسین	نیتریک اکسید	هیدروژن پراکسید	محتوای ملاتونین	محتوای دایوسجنین	صفت تیمار
•	۱۸/۰۳ c	۲۴/۷ c	۴/۰۷ c	۱/۸ b	۱/۶۹ b	۰/۳۶ b	۱/۰۶ b	۲۲/۹۲ c	۲۹/۷ b	۱۵/۳۷ a	۱۷/۸۷ a	۵/۱۲ c	۴۳ c	
شوری	۱۵۰mM	۲۵/۶۱ b	۳۳/۸۵ b	۴/۴۱ b	۲/۰۴ a	۱/۳۲ c	۰/۶۷ c	۲۴/۶۲ b	۳۵/۸۷ a	۱۰/۷۶ c	۱۲۴۸ c	۱۳/۲۲ b	۷۶/۶۶ a	
	۳۰۰mM	۳۰ a	۳۸/۴۸ a	۷/۰۵ a	۱/۶۱ c	۱/۹۷ a	۰/۴۱ a	۳۴/۲۷ a	۲۲/۵۵ c	۱۴/۷۵ b	۱۷/۱۵ b	۲۱/۷۵ a	۶۴/۱۶ b	

صفت	تیمار	SQS	CAS	SEP	SMT	SSR	C7	C22	C4	BGL
شوری	۰	۲/۴۱ c	۲/۳۴c	۲/۵۲ c	۲/۴۸ c	۲/۷۷ c	۱/۶۷ b	۲/۲۶ b	۱/۸۶ c	۰/۶۵ a
	۱۵۰mM	۵/۳ a	۴/۵۸ a	۵/۷۱ a	۳/۷۶ a	۵/۹۶ a	۳/۲۲ a	۲/۹۷ a	۲/۵۷ b	۰/۶۸ a
	۳۰۰mM	۳/۸۷ b	۳/۴۸ b	۴/۷۴ b	۳/۳۵ b	۴/۹۲ b	۱/۸۷ b	۳/۱۲ a	۳/۱۶ a	۰/۵۴ b

ستون ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند. مقایسات میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف ملاتونین بر صفات بررسی شده در این مطالعه

صفت تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتونوئید	محتوای آب نسبی	پروتئین کل	کاتالاز	پلی فنول اکسیداز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	نشت الکترولیت	محتوای مالون دی آلدئید
•	۱۶/۶۳ a	۹/۳۵ a	۲۵/۹۹a	۱۹/۲۲ a	۷۸/۵۵ a	۲۱۰ d	۰/۰۳ d	۰/۰۴ d	۰/۰۷ d	۰/۰۸ d	۰/۰۴ d	۳۳/۸۸ d	۷/۰۱ d
۳۰ppm ملاتونین	۱۲/۸۴ c	۷/۲۸ b	۲۰/۱۲ c	۱۵/۰۶ c	۶۴/۱۱ c	۲۸۱/۷۷ c	۰/۰۴ c	۰/۱۵ a	۰/۱۱ c	۰/۱ c	۰/۰۵ c	۳۹/۹۳ b	۹/۹۲ b
۶۰ppm	۱۱/۹۷ d	۷/۱۲ b	۱۹/۱ d	۱۴/۶۱ c	۵۵/۶۶ d	۷۱۴ a	۰/۰۶ a	۰/۰۷ b	۰/۲ a	۰/۱۶ a	۰/۰۷ a	۴۳ a	۱۱/۵ a
۹۰ppm	۱۵/۷۱ b	۹/۳۳ a	۲۵/۰۴ b	۱۸/۵۶ b	۶۷/۷۷ b	۳۳۹/۲۲ b	۰/۰۵ b	۰/۰۵ c	۰/۱۵ b	۰/۱۴ b	۰/۰۶ b	۳۶/۲۵ c	۷/۹۴ c

صفت تیمار	فلاونوئید	فنول کل	قند کل	پتاسیم	سدیم	کلر	سدیم/پتاسیم	محتوای آبسزیک اسید	محتوای اکسین	نیتریک اکسید	هیدروژن پراکسید	محتوای ملاتونین	محتوای دایوسجین
•	۱۸/۴۴ d	۲۷/۳۴ d	۳/۶۶ d	۲/۱۳ a	۱/۳۵ c	۰/۲۵ d	۰/۶۶ c	۲۱/۶۸ d	۳۵/۳۵ a	۱۱/۰۲ d	۱۲/۸۲ d	۹/۶۲ d	۵۱/۷۷ c
۳۰ppm ملاتونین	۲۳/۳۶ c	۲۹/۱۲ c	۴/۸۶ c	۱/۷ c	۱/۶۷ b	۰/۳۷ b	۱ b	۲۵/۸۵ c	۲۸/۵ c	۱۴/۵ b	۱۶/۸۱ b	۱۰/۹۲ c	۵۲/۶۶ c
۶۰ppm	۳۰/۵ a	۳۸/۳۰ a	۶/۸۶ a	۱/۵۹ d	۱/۹۵ a	۰/۴۱ a	۱/۳۱ a	۳۴/۵۶ a	۲۶/۳۳ d	۱۶/۹ a	۱۹/۶۵ a	۱۷/۳۶ a	۶۷/۷۷ b
۹۰ppm	۲۵/۸۸ b	۳۴/۶ b	۵/۳۳ b	۱/۸۵ b	۱/۶۷ b	۰/۳۲ c	۱ b	۲۶/۹۹ b	۳۱/۳۳ b	۱۲/۰۹ c	۱۴/۰۶ c	۱۵/۵۵ b	۷۲/۸۹ a

صفت تیمار	SQS	CAS	SEP	SMT	SSR	C7	C22	C4	BGL
•	۳/۰۱ b	۳/۱۱ c	۳/۵ b	۲/۳۵ c	۳/۲۱ d	۱/۳ d	۲/۱۶ c	۱/۷۴ c	۰/۷ b
۳۰ppm ملاتونین	۳/۲۱ b	۳/۰۸ c	۳/۲۸ b	۲/۲۹ c	۴/۱۸ c	۲/۲۵ b	۲/۷۹ b	۲/۱۵ b	۰/۳۱ d
۶۰ppm	۴/۶ a	۳/۶۳ b	۵/۱۱ a	۴/۴۸ a	۵/۱۷ b	۳/۶۲ a	۴/۲۹ a	۳/۹۵ a	۰/۸۷ a
۹۰ppm	۴/۶ a	۴/۰۶ a	۵/۴۱ a	۳/۶۶ b	۵/۶۴ a	۱/۵۸ c	۱/۹۱ c	۲/۲۸ b	۰/۶۱ c

ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. مقایسات میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف ملاتونین و شوری بر صفات بررسی شده در این مطالعه

صفت تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	محتوای آب نسبی	پروتئین کل	کاتالاز	پلی فنول اکسیداز	گاباکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	نشت الکترولیت	محتوای مالون دی آلدئید
•	۱۵/۳۳ d	۸/۵ c	۲۳/۸۳ c	۱۷/۱۶ e	۷۹ c	۱۳۰ g	۰/۰۲ f	۰/۰۳ g	۰/۰۴ f	۰/۰۴ k	۰/۰۳ e	۳۲/۷۱ hi	۶/۸۳ e
•	۲۰/۹۵ a	۱۲/۰۳ a	۳۲/۹۸ a	۲۵/۱۶ a	۸۶/۳۳ a	۱۸۰ f	۰/۰۲ ef	۰/۰۴ fg	۰/۰۵ f	۰/۰۶ i	۰/۰۵ d	۳۱/۶۴ i	۶/۰۳ e
۳۰۰mM	۱۳/۶۳ d	۷/۵۲ d	۲۱/۱۵ e	۱۵/۳۳ f	۷۰/۳۳ d	۳۲۰ d	۰/۰۴ cd	۰/۰۴ efg	۰/۱۳ d	۰/۱۴ f	۰/۰۵ d	۳۷/۲۹ e	۸/۱۸ d
•	۱۰/۸۶ ef	۵/۸۵ e	۱۶/۷۱ g	۱۲/۶۶ g	۵۹/۶۶ e	۲۶۵/۳۳ e	۰/۰۳ de	۰/۰۵ efg	۰/۰۸ e	۰/۰۷ h	۰/۰۵ d	۴۶/۱۲ b	۱۲ b
۳۰ppm	۱۵۰mM	۱۶ c	۲۴/۷۵ c	۱۷/۸۶ de	۷۹ c	۱۴۰ g	۰/۰۲ ef	۰/۳۴ a	۰/۰۴ f	۰/۰۴ k	۰/۰۳ e	۳۴/۴۵ fgh	۸/۱۶ d
۳۰۰mM	۱۱/۶۶ e	۷/۲۵ d	۱۸/۹۱ f	۱۴/۶ f	۵۳/۶۶ f	۴۴۰ b	۰/۰۶ b	۰/۰۷ c	۰/۲۱ b	۰/۲ c	۰/۰۸ b	۳۹/۲۱ d	۹/۶ c
•	۶/۱ g	۳/۷۵ f	۹/۸۵ h	۷/۸۳ i	۳۷/۶۶ h	۳۴۳/۳۳ d	۰/۰۴ c	۰/۰۶ cde	۰/۱۶ c	۰/۱ g	۰/۰۷ b	۵۸/۰۵ a	۱۸/۱۳ a
۶۰ppm	۱۵۰mM	۱۵/۶۶ c	۲۴/۷۹ c	۱۸/۶۶ d	۷۰/۶۶ d	۳۸۹/۳۳ c	۰/۰۴ c	۰/۰۶ cd	۰/۱۵ c	۰/۱۶ d	۰/۰۶ c	۳۵/۸۴ ef	۷/۹ d
۳۰۰mM	۱۴/۱۶ d	۸/۵ c	۲۲/۶۶ d	۱۷/۳۳ e	۵۸/۶۶ e	۵۱۸/۳۳ a	۰/۰۸ a	۰/۰۸ b	۰/۲۸ a	۰/۲۳ a	۰/۰۸ a	۳۵/۱۲ fg	۸/۴۶ d
•	۱۸/۱۳ b	۱۰/۷۵ b	۲۸/۸۸ b	۲۱/۲ c	۸۱/۶۶ b	۱۵۴/۳۳ fg	۰/۰۲ ef	۰/۰۳ fg	۰/۰۴ f	۰/۰۵ j	۰/۰۴ e	۳۳/۳۸ gh	۷/۷۲ d
۹۰ppm	۱۵۰mM	۱۸/۳۳ b	۲۹/۰۸ b	۲۳/۸۳ b	۷۷ c	۴۵۶/۶۶ b	۰/۰۶ b	۰/۰۷ bc	۰/۲۱ b	۰/۲۱ b	۰/۰۷ b	۳۳/۴۷ gh	۶/۳۳ e
۳۰۰mM	۱۰/۶۶ f	۶/۵ e	۱۷/۱۶ g	۱۰/۶۶ h	۴۴/۶۶ g	۴۰۶/۶۶ c	۰/۰۶ b	۰/۰۵ def	۰/۲ b	۰/۱۵ e	۰/۰۶ c	۴۱/۹۱ c	۹/۷۸ c

ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند. مقایسات میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است.

صفت تیما	فلاونوئید	فنول کل	قند کل	پتاسیم	سدیم	کلر	سدیم/پتاسیم	محتوای آبسیزیک اسید	محتوای اکسین	نیتریک اکسید	هیدروژن پراکسید	محتوای ملاتونین	محتوای دایوسجنین
•	۱۰/۸ h	۲۰/۰۶ h	۲/۷۴ g	۲/۰۷ c	۱/۲۳ h	۰/۲۴ fg	۰/۵۹ fg	۱۷/۲۳ g	۳۴/۵ cd	۱۱/۶۱ f	۱۳/۵ f	۲/۵۴ h	۲۱/۳۳ h
•	۱۵۰mM	۲۴/۸۶ e	۳۳/۳۷ d	۲/۶ a	۱/۱۸ h	۰/۱۹ h	۰/۴۵ h	۲۴/۳۵ e	۴۳/۳۳ a	۷/۸۵ h	۹/۱۳ h	۹/۶۶ e	۵۹/۶۶ d
۳۰۰mM	۱۹/۶۶ f	۲۸/۵۸ e	۵/۳۳ e	۱/۷۳ ef	۱/۶۴ e	۰/۳۲ e	۰/۹۴ e	۲۳/۴۶ e	۲۸/۲۳ f	۱۳/۶۱ de	۱۵/۸۳ de	۱۶/۶۶ d	۷۴/۳۳ c
•	۱۷/۵ g	۲۲/۶۸ g	۴/۲۲ f	۱/۶۳ fg	۱/۷۴ d	۰/۴ c	۱/۰۶ d	۲۳/۸۳ e	۲۶/۶۶ g	۱۷/۲ b	۲۰ b	۴/۰۹ g	۷۱ c
۳۰ppm	۱۶/۹۲ g	۲۱/۹۳ g	۲/۶۸ g	۱/۹۴ d	۱/۲۴ gh	۰/۲۴ fg	۰/۶۳ f	۱۷/۲۶ g	۳۵/۵ c	۱۱/۴۵ f	۱۳/۱۷ f	۷/۳۳ f	۳۰ g
۳۰۰mM	۳۵/۶۶ b	۴۲/۷۶ b	۷/۶۹ b	۱/۵۵ g	۲/۰۴ c	۰/۴۹ b	۱/۳۱ c	۳۶/۴۶ b	۲۳/۳۳ h	۱۴/۸۴ c	۱۷/۲۶ c	۲۱/۳۳ b	۵۷ d
•	۲۳/۵ e	۲۸/۶۸ e	۶/۵۸ d	۱/۲۵ i	۲/۶۱ a	۰/۵۷ a	۲/۰۸ a	۳۰/۶۱ c	۱۹/۳۳ j	۲۳/۷۹ a	۲۷/۶۶ a	۷/۰۲ f	۴۱/۶۶ e
۶۰ppm	۱۵۰mM	۲۸ d	۳۷/۲ c	۵/۱۸ e	۱/۵۶ f	۰/۳۲ e	۰/۹ e	۲۶/۵۲ d	۳۰/۶۶ e	۱۲/۸۷ e	۱۴/۹۶ e	۱۶/۹ d	۸۰/۳۳ b
۳۰۰mM	۴۰ a	۴۹/۰۱ a	۸/۸۱ a	۱/۷۹ e	۱/۶۹ de	۰/۳۵ d	۰/۹۴ e	۴۶/۵۶ a	۲۹ f	۱۴/۰۴ cd	۱۶/۳۳ cd	۲۸ a	۸۱/۳۳ b
•	۲۰/۳۳ f	۲۷/۳۷ f	۲/۷۵ g	۲/۲۶ b	۱/۲ h	۰/۲۲ g	۰/۵۳ gh	۲۰ f	۳۸/۳۳ b	۸/۸۸ g	۱۰/۳۳ g	۶/۶۶ f	۳۸ f
۹۰ppm	۱۵۰mM	۳۲/۶۶ c	۴۲/۸۸ b	۶/۸۷ c	۱/۳۱ g	۰/۲۶ f	۰/۶۸ f	۳۰/۳۶ c	۳۴ d	۱۰/۸۹ f	۱۲/۶۶ f	۱۹ c	۱۳۶/۶۶ a
۳۰۰mM	۲۴/۶۶ e	۳۳/۵۶ d	۶/۳۶ d	۱/۴ h	۲/۵۱ b	۰/۵ b	۱/۸ b	۳۰/۶۱ c	۲۱/۶۶ i	۱۶/۵۱ b	۱۹/۲ b	۲۱ b	۴۴ e

ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند. مقایسelt میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است.

صفت تیما	SQS	CAS	SEP	SMT	SSR	C7	C22	C4	BGL
•	۱/۰۲ f	۱/۰۱ f	۱/۰۴ j	۱/۰۳ f	۱/۰۱ f	۱/۰۲ g	۱/۰۲ e	۱/۰۳ f	۱/۰۱ b
•	۳/۳ d	۳/۷۳ c	۴/۱۷ ef	۳/۰۴ cd	۳/۵ d	۱/۱۷ fg	۲/۲۷ d	۱/۸۹ e	۰/۴۷ fg
۳۰۰mM	۴/۷۳ c	۴/۵۹ b	۵/۳ d	۲/۹۹ cd	۵/۱۳ c	۱/۷۱ ef	۳/۱۹ c	۲/۳۱ cde	۰/۶۱ def
•	۴/۱۸ c	۴/۱۳ bc	۴/۶۲ e	۲/۲۵ cde	۴/۷۳ c	۱/۴۸ efg	۲/۳۷ d	۱/۸۶ e	۰/۳۸ g
۱۵۰mM	۱/۹۶ e	۲/۲ de	۲/۱۷ hi	۱/۵۳ ef	۲/۷۸ de	۳/۵ b	۲/۱۲ d	۲/۳۳ cde	۰/۴۹ efg
۳۰۰mM	۳/۵ d	۲/۹۳ d	۳/۰۴ g	۳/۱۱ c	۵/۰۵ c	۱/۷۸ de	۳/۸۷ b	۲/۲۶ cde	۰/۰۶ h
•	۲/۴۱ e	۲/۱۶ de	۲/۵۸ gh	۴/۴۴ b	۲/۶۶ e	۱/۶۴ ef	۴/۴۱ b	۲/۶۱ cd	۰/۶۳ de
۱۵۰mM	۶/۶۱ b	۴/۷۷ b	۶ c	۴/۳۱ b	۶/۵۵ b	۶/۹۳ a	۵/۳۴ a	۳/۹۱ b	۱/۲۱ a
۳۰۰mM	۴/۸ c	۳/۹۶ bc	۶/۷۵ b	۴/۶۹ b	۶/۳ b	۲/۲۹ cd	۳/۱۱ c	۵/۳۵ a	۰/۷۸ c
•	۲/۰۳ e	۲/۰۷ e	۱/۸۵ i	۲/۲۲ de	۲/۶۸ e	۲/۵۳ c	۱/۲۶ e	۱/۹۴ de	۰/۶ def
۱۵۰mM	۹/۳۳ a	۷/۶۵ a	۱۰/۵ a	۶/۱۶ a	۱۱/۰۳ a	۱/۲۹ efg	۲/۱۷ d	۲/۱۸ cde	۰/۵۴ ef
۳۰۰mM	۲/۴۴ e	۲/۴۶ de	۳/۸۹ f	۲/۶ cd	۳/۲۱ de	۱/۷۲ ef	۲/۳۱ d	۲/۷۲ c	۰/۷ cd

ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند. مقایسات میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است.

Abstract

Salinity stress is one of the most important abiotic stresses that affects crop yields and is currently becoming one of the most important limiting factors for crop cultivation in the world. Identification of physiological, biochemical and molecular responses of plants to salinity stress is effective in increasing human knowledge and identifying the mechanisms of plants to salinity stress. The aim of this study was to evaluate the response of fenugreek plants treated with different levels of melatonin under salinity stress. Also in this study, the effects of melatonin as a functional stimulant on diosgenin content were investigated. The results of this study showed that the use of different levels of melatonin effectively prevents the degradation of plant pigments. In addition, melatonin increased the content of antioxidants by stimulating genes involved in the biosynthetic pathway, thereby reducing the content of active oxygen species and free radicals. The result was a reduction in free radicals, a decrease in electrolyte leakage and malondialdehyde content, and finally an increase in the resistance of fenugreek plants under salinity stress. In addition, the application of different levels of melatonin by increasing the activity of potassium-carrying channels led to the maintenance of ionic homeostasis and increased intracellular water content under salinity stress. In this study, the interaction effects of melatonin, auxin and abscisic acid in fenugreek treated with different salinity levels were investigated for the first time. The results of this study showed that melatonin through the pathways dependent on abscisic acid and nitric acid leads to the activation of defense signaling pathways in fenugreek. Our findings showed that melatonin effectively increases the expression of genes involved in the biosynthesis pathway of diosgenin and consequently the diosgenin content. In fact, the combined combination of 150 mM salinity stress and 60 ppm melatonin increased the diosgenin content by more than six times compared to the normal condition. The results of this study increased our knowledge about the melatonin effects on fenugreek under salinity stress and also on changes in the diosgenin content in fenugreek. Finally, our findings demonstrate that melatonin as an important functional stimulant is able to induce physiological, biochemical (primary and secondary metabolites) and molecular changes in salinity-treated fenugreek in order to increase their resistance.

Keywords: Salinity stress, Melatonin, Diosgenin, Biochemical changes and Fenugreek



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

**Physiological response and expression changes of some
genes involved in the diosgenin biosynthetic pathway in
melatonin-treated fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)
under salinity stress conditions**

By: Maryam mohamadi esboei

Supervisor:

Dr. Amin Ebrahimi

Advisor:

Dr. Mohammadreza Amerian

May 2021