

## نقش ملاتونین در بهبود فتوسنتز و تحمل شوری زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy*) (Boiss.)

فریناز وفادار<sup>۱</sup>، ریحانه عموآقایی\*<sup>۱</sup> و پرویز احسانزاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

<sup>۲</sup> گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۶/۰۸)

### چکیده

در این مطالعه اثر سطوح شوری بر زرین گیاه (جمعیت فریدون‌شهر اصفهان) و نقش ملاتونین در بهبود فتوسنتز تحت شوری در طی دو آزمایش بررسی شد. در آزمایش اول، اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر رشد و صفات فتوسنتزی گیاهچه‌های زرین گیاه ۶۰ روزه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که با افزایش شوری، شاخص تحمل و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ( $F_v/F_m$ )، و هدایت روزنه‌ای کاهش یافت اما سطح پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت کاتالاز در برگ افزایش یافت. در آزمایش دوم، اثر پیش‌تیمار ریشه با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بر تحمل شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم گیاهچه‌های زرین گیاه بررسی شد. نتایج نشان داد که پیش‌تیمار با ملاتونین باعث افزایش وزن تر و خشک بخش هوایی، کلروفیل  $a$  و  $b$ ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها،  $F_v/F_m$ ، هدایت روزنه‌ای و محتوای نسبی آب (RWC) در برگ‌های تحت تنش شوری شد. تأثیر مثبت ملاتونین بر صفات فتوسنتزی بسیار با نقش آن در افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید و بهبود هموستازی  $K^+$ ،  $Na^+$  و  $Ca^{2+}$  در برگ‌ها مرتبط بود و این اثرات با کاربرد پارا-کلروفنیل آلانین (p-CPA) به‌عنوان بازدارنده سنتز ملاتونین، تضعیف شد. براساس این نتایج، کاربرد ملاتونین خارجی، احتمالاً با تأثیر بر سنتز ملاتونین درون‌زا گیاه، قادر است که تنش اسمزی، سمیت یونی و تنش اکسیداتیو ناشی از شوری را در زرین گیاه تعدیل کند و ممکن است بتوان از تیمار با ملاتونین برای بهبود فتوسنتز و ارتقای سطح تحمل گیاه به شوری استفاده کرد.

کلمات کلیدی: زرین گیاه، شوری، ملاتونین، فتوسنتز، کلروفیل، هموستازی یونی

### مقدمه

جهان قرار دارد که با محدودیت آب بدون شوری برای آبیاری مواجه است و استفاده از آب شور در کشاورزی امری اجتناب ناپذیر است. در نتیجه، بسیاری از اراضی کشاورزی به دلیل استفاده بیش از حد از کودها و مدیریت نامناسب آبیاری با شوری ثانویه خاک مواجه شده‌اند (Fathi and Rezaei, 2013).

شوری یکی از شایع‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که تقریباً ۲۰٪ از اراضی کشاورزی در سراسر جهان و تقریباً ۵۰٪ از کل مناطق آبیاری را در جهان تحت تأثیر قرار داده است (Gengmao et al., 2015). ایران در منطقه خشک و نیمه‌خشک

گسترده‌ای در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده است (Debnath *et al.*, 2019). ملاتونین یک مولکول ایندول‌آمین با وزن مولکولی کم است که در گیاهان مشابه حیوانات، از تریپتوفان سنتز می‌شود. این پیش‌ماده طی چندین فرایند بیوشیمیایی به سروتونین و در نهایت به ملاتونین تبدیل می‌شود. مرحله تبدیل سروتونین به ملاتونین یک مرحله کلیدی در سنتز ملاتونین در گیاهان به شمار می‌رود، بطوری‌که استفاده از بازدارنده p-CPA که آنزیم این مرحله را مهار می‌کند موجب کاهش میزان ملاتونین در گیاهان می‌شود (Zheng *et al.*, 2017).

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که ملاتونین نه تنها می‌تواند به عنوان یک تحریک‌کننده رشد در شرایط بدون تنش به رشد ریشه، مورفولوژی برگ، حفظ کلروفیل، تنظیم گلدی، ریتم شبانه‌روزی، فتوسنتز، پیری و رشد میوه کمک کند بلکه در فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاهان در برابر بسیاری از تنش‌ها مانند فلزات سنگین (Nabaei and Amooaghaie, 2019a,b)، شوری (Li *et al.*, 2017) و تنش خشکی (Kabiri *et al.*, 2018) نیز نقش دارد. ملاتونین به عنوان یک پاکروبی‌کننده قوی گونه‌های فعال اکسیژن مانند اکسیژن یگانه ( $O_2^{\cdot}$ )، رادیکال آنیون سوپراکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، رادیکال هیدروکسیل ( $\cdot OH$ ) و رادیکال لیپید پراکسید ( $LOO^{\cdot}$ ) عمل می‌کند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن حتی بیش از گلوکاتیون و ویتامین E گزارش شده است (Toma's-Zapico *et al.*, 2005). علاوه بر نقش مستقیم ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، ملاتونین همچنین به طور غیرمستقیم از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز به پاکروبی ROS کمک می‌کند (Arnao and Hernandez-Ruiz, 2019). چندین گزارش نشان داده است که کاربرد ملاتونین خارجی تحمل به شوری را در آراییدوپسیس، حبوبات، گوجه‌فرنگی، برنج، خیار و ذرت از طریق بالا بردن سنتز پرولین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بهبود هموستازی  $Na^+$ ،  $K^+$  و  $Ca^{2+}$  افزایش می‌دهد (Dawood and El-Awadi, 2015; Jiang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2019; Zhan *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018).

بنابراین، ضروری است که مطالعات بیشتری در مورد پاسخ‌های ناشی از تنش شوری بر گیاهان به ویژه گیاهان دارویی و معطر ایران انجام شود.

شوری باعث کاهش پتانسیل اسمزی خاک‌ها می‌شود و از این رو جذب و انتقال آب و مواد مغذی به گیاهان کاهش می‌یابد و منجر به تنش اسمزی، کاهش تورگر سلولی و در نتیجه افت رشد و کاهش سرعت توسعه سطح برگ گیاه می‌شود. شوری همچنین به دلیل تجمع  $Na^+$  و  $Cl^-$  و کاهش جذب عناصر اساسی مانند  $K^+$  و  $Ca^{2+}$  باعث عدم تعادل یونی در گیاهان می‌شود (Isayenkov and Maathuis, 2019). کمبود آب القاء شده توسط شوری باعث بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه، کاهش جذب  $CO_2$  می‌شود. تجمع  $Na^+$  در کلروپلاست همچنین باعث اختلال در فتوسنتسم‌های I و II، پروتئین‌های ناقل الکترون و کمپلکس‌های پروتئین-رنگدانه، کاهش سنتز رنگدانه و افزایش تخریب کلروفیل می‌شود. بنابراین، محدودیت‌های روزنه‌ای و غیرروزنه‌ای کارایی فتوسنتز را تحت تنش شوری کاهش می‌دهند (Negrao *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2020). علاوه بر این، شوری موجب انحراف الکترون‌ها از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، به سمت اکسیژن مولکولی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تحریک تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود که موجب کاهش ظرفیت فتوسنتزی و رشد گیاهان می‌شود (Yang and Guo, 2018). برای کاهش تنش اسمزی، سمیت یونی و تنش اکسیداتیو ناشی از شوری، گیاهان یک سری واکنش‌های دفاعی شامل ممانعت از تجمع بیش از اندازه  $Na^+$  در سیتوپلاسم سلول‌ها به وسیله فعال‌سازی آنتی‌پورترهای  $Na^+/H^+$  مستقر در غشاء پلاسمایی (SOS1) و تونوپلاست (NHX)، تنظیم اسمزی از طریق سنتز پرولین و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در خودشان تکامل داده‌اند (Amooaghaie and Tabatabaie, 2017; Amooaghaie and Ghorbannejade 2017; Yang and Guo, 2018; Khodabakhsh *et al.*, 2014).

در سال‌های اخیر نقش ملاتونین در تحمل به تنش‌ها در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است. ملاتونین (N - استیل - ۵ - متوکسی تریپتامین) یک ترکیب شبه اکسین است که به طور

با ۶ - ۸ برگ به گلدان‌های کوچک حاوی کوکوپیت و پرلیت (در نسبت ۱:۱) منتقل شدند و با محلول غذایی یک دوم جانسون (pH = ۶) سه مرتبه در هفته به مدت ۲۰ روز آبیاری شدند. گیاهان در گلخانه (تحت درجه حرارت روز / شب ۲۸°C / ۲۰ با رطوبت نسبی ۵۰٪، سیکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با حداکثر تراکم شارش فوتون فتوستتزی (PPFD) ۵۷۰ - ۷۶۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) رشد کردند و گیاهچه‌های ۶۰ روزه برای انجام هر دو آزمایش استفاده شدند.

در آزمایش اول، گیاهچه‌های ۶۰ روزه رشدیافته در کوکوپیت و پرلیت با استفاده از غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) در محلول غذایی به مدت سه هفته آبیاری شدند. برای اطمینان از جلوگیری از انباشت نمک و شوری اضافی، هدایت الکتریکی (EC) محلول غذایی خارج‌شده از گلدان‌ها با یک EC متر قابل حمل هر هفته بررسی شد و در موارد لزوم از آب آبیاری غیرشور برای اطمینان از حفظ EC بستر کشت استفاده شد. سه هفته پس از اعمال تنش شوری، پارامترهای فتوستتزی اندازه‌گیری شدند و نمونه‌های برگ‌گی جمع‌آوری و غلظت مالون دی‌آلدئید و فعالیت کاتالاز در آن‌ها اندازه‌گیری شد. چون شاخص مقاومت به شوری تحت شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، تقریباً به میزان ۵۰٪ کاهش یافت. بنابراین، این غلظت شوری برای آزمایش دوم انتخاب شد.

در آزمایش دوم، اثر پیش‌تیمار ریشه ملاتونین و پارا-کلرو فیل‌آلانین (P-CPA)، به عنوان مهارکننده بیوستتز ملاتونین، روی رشد و فتوستتز گیاهچه‌های ۶۰ روزه تحت تنش شوری ارزیابی شد. ریشه گیاهچه‌های ۶۰ روزه با محلول ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین، به مدت ۲۴ ساعت، پیش‌تیمار شدند. لازم به یادآوری است که در مطالعه قبلی ما اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین برای پیش‌تیمار گیاه مورد بررسی قرار گرفت و غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بهترین اثر را بر رشد گیاه داشت (Vafadar et al., 2020) و به همین دلیل در پژوهش حاضر نیز از این غلظت استفاده شد. مطابق طرح آماری در

با توجه به مضرات شوری خاک برای گیاهان، وسعت خاک‌های شور به خصوص در مناطق خشک مرکزی کشور و کمبود منابع آبی، یافتن راهکارهایی برای کاهش عوارض شوری خاک در گیاهان و به طور ویژه در گیاهان دارویی ضروری است. یکی از گیاهان دارویی بومی ایران گیاه *Dracocephalum kotschy* Boiss. است که در فارسی به نام‌های زرین‌گیاه یا بادرنجبویه دنیایی مشهور است و از بخش‌های هوایی زرین‌گیاه به عنوان افزودنی برای بهبود طعم، عطر و بوی چای و ماست استفاده می‌شود. از نظر طب سنتی زرین‌گیاه دارای خواص دارویی و بیولوژیکی جالب توجه است و دارای اثرات ضدچربی بالا، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و ضد درد است (Fattahi et al., 2013). اطلاعات درباره تحمل این گیاه دارویی به شوری و شیوه‌های غلبه بر آن محدود است. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر سطوح مختلف شوری بر فتوستتز زرین گیاه و بررسی اثرات پایه و فیزیولوژیک ملاتونین بر فتوستتز و پاسخ‌های دفاعی این گیاه است. بدیهی است این مطالعات بنیادی می‌تواند اطلاعات پایه برای مهندسی ژن‌های مربوط به سنتز ملاتونین در گیاه فراهم آورد که ممکن است در برنامه‌های اصلاح‌نژاد گیاه و تولید گیاهان مقاوم به شوری در آینده مفید باشد. لذا در پژوهش حاضر اثر پیش‌تیمار ملاتونین در کنار اثر بازدارنده سنتز ملاتونین یعنی p-CPA بر فتوستتز و و پاسخ‌های مرتبط با تحمل به شوری زرین گیاه بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

**شرایط رشد گیاه و اعمال تیمارها:** بذرها از روستای سرداب بالا در نزدیکی شهرستان فریدونشهر (شاهان کوه، ارتفاعات ۲۹۵۰ - ۳۲۰۰ متر از سطح دریا) واقع در غرب استان اصفهان جمع‌آوری شدند. بذرها ضدعفونی شده در سینی‌های نشاء حاوی کوکوپیت اتوکلاو شده و پرلیت (در نسبت ۱:۱) کاشته شده و پس از جوانه‌زنی و رشد اولیه، با محلول غذایی یک چهارم جانسون (pH = ۶) سه مرتبه در هفته به مدت ۴۰ روز آبیاری شدند و سپس سه گیاهچه یکسان

برگ SC-1 (Decagon devices, Inc) و پارامترهای فلورسانس کلروفیل بر روی همان برگ‌های مورد استفاده برای هدایت روزنه‌ای، توسط فلوریمتر قابل حمل (OS-30p, U.S.A) پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن در معرض تاریکی، اندازه‌گیری شدند. حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) مطابق با روش Pfundel (۲۰۰۸) ارزیابی شد. نمونه‌های برگ خشک در کوره در دمای ۵۶۰ درجه خاکستر شد و پس از مراحل هضم با اسید کلریدریک ۲ نرمال، محتوای  $\text{Na}^+$  و  $\text{K}^+$  برگ با استفاده از دستگاه فلیم‌فوتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت  $\text{Ca}^{2+}$  با استفاده از دستگاه جذب اتمی (PerkinElmer 3030, USA) براساس روش Pratt و Chapman (۱۹۶۱) اندازه‌گیری شد.

عصاره برگ‌ها طی مراحل با استفاده از بافر استخراج تهیه و پس از سانتریفوژ، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به روش توصیف‌شده به وسیله Tabatabaei و Ehsanzadeh (۲۰۱۶) در محلول رویی آن سنجش شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، ۵۰ میکرولیتر محلول رویی به ۲۹۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH = ۷/۵ و ۵۰ میلی‌مولار) حاوی ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن اضافه شد و در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه روند کاهشی جذب قرائت شد. فعالیت آنزیم CAT با استفاده از ضریب خاموشی،  $\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  محاسبه شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، ۵۰ میکرولیتر عصاره رویی به ۲۹۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH = ۷/۵ و ۵۰ میلی‌مولار) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و EDTA اضافه شد و در طول موج ۲۹۰ نانومتر جذب قرائت شد. فعالیت آنزیم APX با استفاده از ضریب خاموشی،  $\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  محاسبه شد.

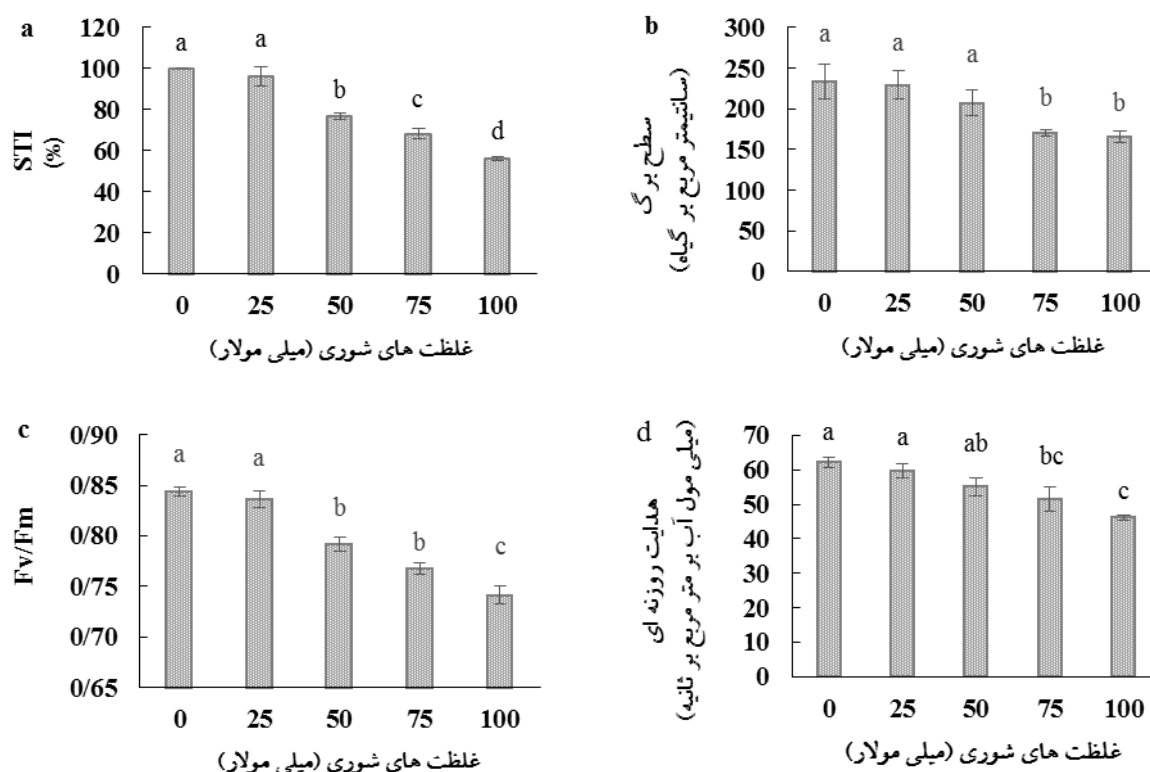
آزمایش اول با طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی و آزمایش دوم به صورت فاکتوریل با طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی انجام شد. در هر دو آزمایش، سه تکرار و هر گلدان به عنوان یک واحد آزمایش در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار تجزیه و تحلیل آماری نسخه ۹ (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) مورد تجزیه و تحلیل واریانس

برخی موارد بعد از پیش‌ تیمار ریشه با ملاتونین، تیمار ریشه با p-CPA به مدت کوتاه مطابق با روش بکار رفته توسط Liu و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد و سپس گیاهان در معرض شوری قرار گرفتند. برای تیمار شوری، گیاهچه‌های پیش‌ تیمار شده در بستر کوکوپیت و پرلیت در معرض محلول غذایی یک دوم جانسون حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم قرار گرفتند و تحت همان شرایط فوق‌الذکر در گلخانه پرورش داده شدند. پس از سه هفته قرار گرفتن در معرض تنش شوری، محتوای نسبی آب برگ (RWC)، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm)، هدایت روزنه‌ای، وزن تر و خشک بخش هوایی تعیین شد. علاوه بر این، نمونه‌های برگ تازه در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد که برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، غلظت پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید، کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها مورد استفاده قرار گرفتند.

**اندازه‌گیری صفات:** شاخص تحمل شوری از نسبت وزن خشک هر تیمار به وزن خشک گیاه شاهد و ضرب آن در ۱۰۰ محاسبه گردید (Vafadar et al., 2020). سطح برگ با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح (OSK 9875 Green leaf area Meter, Japan) برای ارزیابی وزن خشک، بخش هوایی گیاهان در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. محتوای نسبی آب برگ (RWC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (عموآقایی و همکاران، ۱۴۰۱).

$$\text{RWC (\%)} = \frac{[\text{FW} - \text{DW}]/\text{TW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \times 100$$

که در آن FW = وزن برگ تازه، DW = وزن برگ خشک شده در آون در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و TW = وزن تورگر برگ بعد از غوطه‌ور شدن در آب مقطر به مدت چهار ساعت است. برای اندازه‌گیری کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئید و کلروفیل کل، پس از ساییدن برگ‌ها در استون، جذب نوری آن‌ها در طول موج‌های ۶۴۶، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر، خوانده شد و با استفاده از فرمول‌های پیشنهادی Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) مقادیر رنگیزه‌ها تعیین شد. هدایت روزنه‌ای برگ‌ها با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج روزنه‌ای



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر شاخص تحمل بخش هوایی (a)، سطح برگ (b)،  $F_v/F_m$  (c)، و هدایت روزنه‌ای (d) در زین گیاه. حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.

هواپی، سطح برگ،  $F_v/F_m$  و هدایت روزنه‌ای به ترتیب ۴۳/۵۸٪، ۲۸/۹۱٪، ۱۱/۹۱٪ و ۲۶٪ کاهش یافت (شکل ۱).

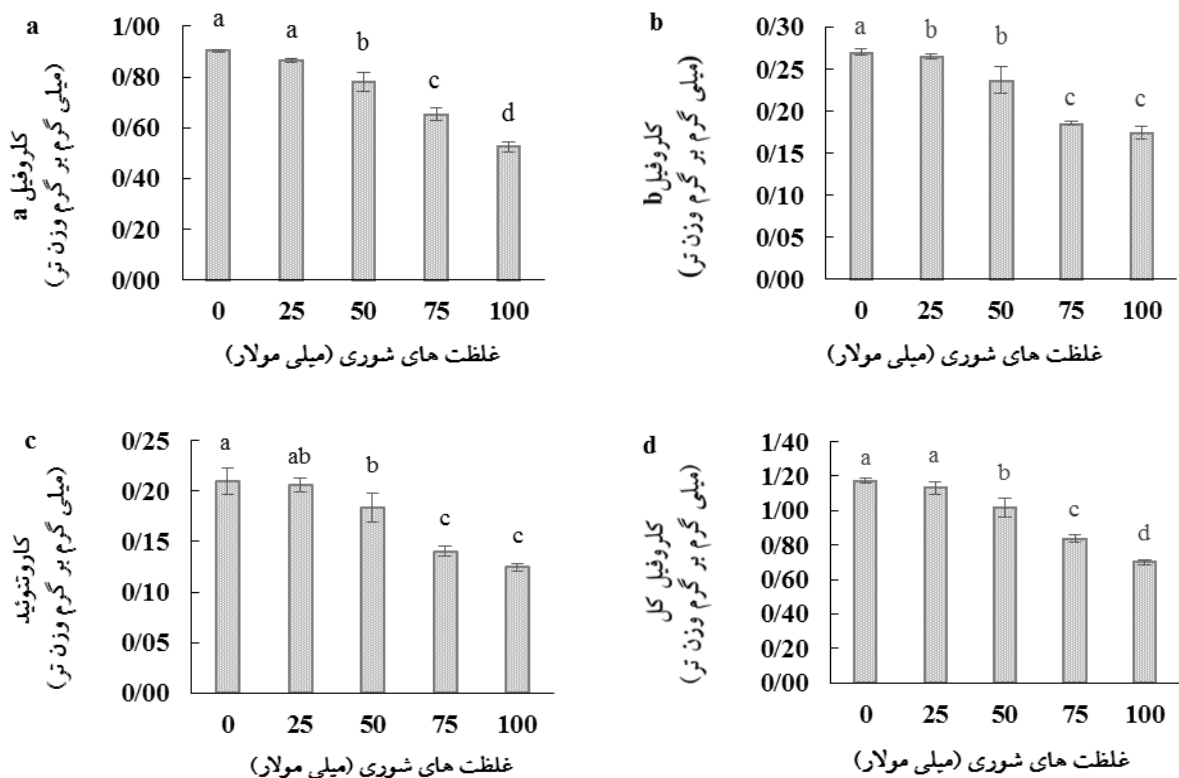
همچنین بر طبق نتایج آزمایش اول، میزان کلروفیل *a* کاروتنوئیدها و کلروفیل کل به میزان قابل‌توجهی تحت تأثیر شوری ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم تغییر نکردند. اما با افزایش غلظت‌های نمک، میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئیدها و کلروفیل کل در حد معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲). بنابر این کاهش بیوماس و در نتیجه افت شاخص تحمل زین گیاه می‌تواند به دلیل کاهش سطح برگ، افت کارایی فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای (شکل ۱) و رنگدانه‌های فتوسنتزی (شکل ۲) تحت تنش شوری باشد که منجر به کاهش دسترسی به فرآورده‌های فتوسنتزی برای رشد شد. نتایج مشابهی قبلاً در گونه‌های آویشن (Bistgani et al., 2019) و *Mangifera indica* L. (Mahouachi, 2018) گزارش شده است.

قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها از حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر (LSD) در  $P \leq 0.05$  استفاده شد.

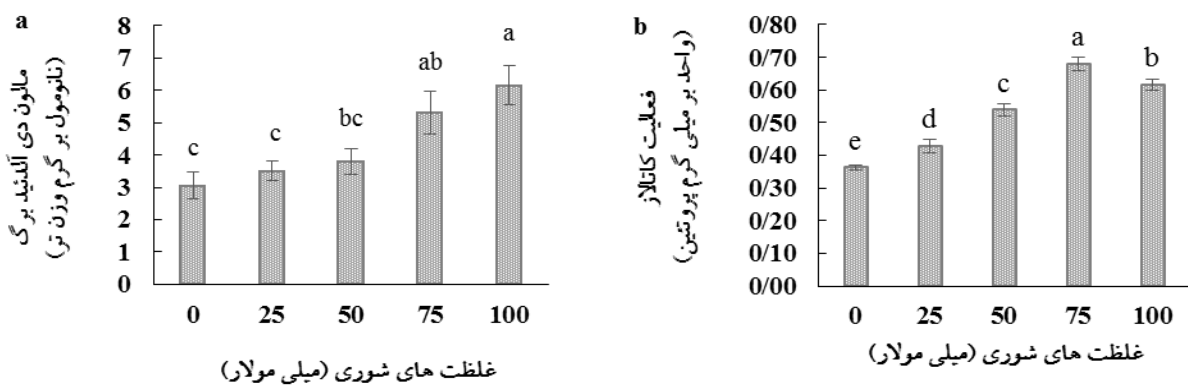
## نتایج و بحث

اثر سطوح شوری بر صفات فتوسنتزی و تنش اکسیداتیو در زین گیاه: نتایج آزمایش اول نشان داد که با افزایش غلظت نمک، شاخص تحمل بخش هوایی (STI) (a)، سطح برگ (b)،  $F_v/F_m$  (c) و هدایت روزنه‌ای (d) به طور معنی‌داری در برگ‌های زین گیاه کاهش یافت (شکل ۱).

بر طبق نتایج، تیمار ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم بر شاخص تحمل زین گیاه تأثیر معنی‌داری نداشت، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر کلرید سدیم (۵۰، ۷۵ و به طور گسترده‌تر ۱۰۰ میلی‌مولار) این شاخص را در زین گیاه کاهش داد. نتایج نشان داد که در ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، شاخص تحمل بخش



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر میزان کلروفیل *a* (a)، کلروفیل *b* (b)، کاروتنوئید (c)، کلروفیل کل (d) در برگ زیرین گیاه. حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر میزان مالون دی‌آلدئید (a) و فعالیت آنزیم کاتالاز (b) در برگ زیرین گیاه. حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.

لیپیدها و در نتیجه، افزایش سطح مالون دی‌آلدئید می‌شود. به طور مشابهی، پژوهش‌های دیگری هم نشان داد که با افزایش شوری، میزان تمامیت و پایداری غشا و میزان کلروفیل و رشد گیاهچه‌های یونجه (عموآقایی و نیک

شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در زیرین گیاه شد که با افزایش سطح مالون دی‌آلدئید نمایان گردید (شکل ۳a). احتمالاً برهم ریختگی فرآیندهای فتوسنتزی تحت تنش شوری، باعث برانگیختن تولید ROS می‌شود که منجر به پراکسیداسیون

خشک بخش هوایی، سطح برگ و RWC را به ترتیب، ۲۸/۸۴٪، ۴۵/۹۵٪، ۵۲/۵۹٪ و ۳۹/۵۱٪ افزایش داد (جدول ۱). همان‌طور که در گیاه زنیان قبلاً گزارش شده است (عموآقایی و همکاران، ۱۴۰۱)، کاهش رشد گیاه تحت تنش شوری می‌تواند به دلیل کاهش جذب آب باشد که باعث کاهش تورگر سلولی در بافت‌های گیاهی می‌شود و یا ممکن است به دلیل کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی و در نتیجه کاهش دسترسی به فرآورده‌های فتوسنتزی برای رشد باشد. بهبود رشد (وزن تر و خشک) و به ویژه سطح برگ توسط پیش‌تیمار با ملاتونین با تأثیر ملاتونین در حفظ محتوای نسبی آب برگ در زرین‌گیاه ارتباط نزدیک داشت (جدول ۱). به نظر می‌رسد که ملاتونین جذب آب یا ظرفیت نگهداری آب را افزایش می‌دهد، که به نوبه خود منجر به حفظ حالت تورگر در سلول‌ها می‌شود که برای رشد سلول‌ها و توسعه سطح برگ ضروری است. Kabiri و همکاران (۲۰۱۸) هم گزارش کردند که محلول‌پاشی با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به میزان قابل توجهی سطح برگ و همچنین محتوای نسبی آب برگ را در گیاه بادرشبو تحت تنش خشکی افزایش داد.

کاربرد برون‌زای ملاتونین باعث افزایش محتوای کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئید و کلروفیل کل تحت تنش شوری در برگ‌های زرین‌گیاه (شکل ۴) شد. مطالعات دیگری هم نشان داد که تیمار ملاتونین می‌تواند محتوای کلروفیل را در خیار (Wang *et al.*, 2016) و ذرت (Jiang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018) تحت تنش شوری و در بادرشبو (Kabiri *et al.*, 2018) تحت تنش خشکی حفظ کند. ثابت شده است که تأثیر ملاتونین در حفظ محتوای کلروفیل ممکن است به دلیل نقش تنظیمی ملاتونین بر فعالیت ۵-آمینولولینات سنتاز و بیوستز سوکسینیل کوآ، گلوسین، و پورفیرین‌ها به عنوان پیش‌سازهای کلروفیل باشد (Szafranska *et al.*, 2017) یا ممکن است مربوط به کاهش تخریب اکسیداتیو کلروفیل (Siddiqui *et al.*, 2019) تحت تنش شوری باشد. غلظت‌های بالاتر کاروتنوئید القاء شده توسط ملاتونین (شکل ۴c) ممکن است، تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط انرژی اضافی در

اندیش، ۱۳۹۴) و زنیان (عموآقایی و همکاران، ۱۴۰۱) کاهش یافت.

برای مقابله با تنش اکسیداتیو (شکل ۳a)، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز، در گیاهچه‌های زرین‌گیاه تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش یافت. یافته‌های مشابه در کلزا و یونجه تحت تنش شوری گزارش شده است (Amooaghaie and Tabatabaie, 2017; Amooaghaie and Ghorbannejade, 2017). به هر حال فعالیت آنزیم کاتالاز زرین‌گیاه در شوری ۱۰۰ نسبت به شوری ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم (شکل ۳b) کاهش یافت که مبین آن است که این غلظت فراتر از حد تحمل زرین‌گیاه است، بنابر این، آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز تا حدی آسیب دید و گیاهان قادر به کنترل تنش اکسیداتیو نبودند، در نتیجه، بالاترین سطح پراکسیداسیون لیپیدی در این غلظت شوری رخ داد (شکل ۳a) و همین امر منجر به کاهش شدید شاخص تحمل به شوری و صفات فتوسنتزی گیاه در این غلظت شد (شکل ۱). در مجموع نتایج آزمایش اول، نشان داد که زرین‌گیاه یک گیاه دارویی قادر به تحمل سطوح متوسط شوری است که با یافته‌های پژوهش قبلی ما روی این گیاه مطابقت دارد (Vafadar *et al.*, 2020). با توجه به اینکه شاخص تحمل زرین‌گیاه در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم تقریباً ۵۰ درصد کاهش یافت و اثرات شوری بر سایر صفات مانند سطح برگ، Fv/Fm، هدایت روزنه‌ای، رنگدانه‌های فتوسنتزی و تنش اکسیداتیو کاملاً محرز بود، لذا این غلظت برای آزمایش بعدی انتخاب شد.

#### تأثیر تیمار ملاتونین و p-CPA بر تحمل شوری در زرین

گیاه: نتایج آزمایش دوم هم نشان داد که شوری در حد معنی‌داری، باعث کاهش وزن تر و خشک بخش هوایی، سطح برگ و محتوای نسبی آب برگ (RWC) در زرین‌گیاه شد. تحت شرایط بدون تنش، ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین وزن تر و خشک بخش هوایی و سطح برگ را به طور معنی‌داری افزایش داد. اما اثر معنی‌داری بر روی RWC نداشت (جدول ۱). علاوه بر این، کاربرد ملاتونین اثرات منفی شوری روی این صفات را بهبود داد. تحت تنش شوری، پیش‌تیمار با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین نسبت به گیاهان در معرض شوری تنها، وزن تر و

جدول ۱- اثرات تیمار ریشه با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به تنهایی و یا تیمار متوالی ملاتونین و ۱۰۰ میکرومولار p-CPA بر وزن تر و خشک بخش هوایی، سطح برگ و محتوای نسبی آب برگ (RWC) در برگ‌های زرین‌گیاه تحت شرایط بدون تنش و شوری (۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم).

تیمارها	وزن تر بخش هوایی (گرم)	وزن خشک بخش هوایی (گرم)	سطح برگ (سانتی‌متر مربع بر گیاه)	RWC (%)
کنترل	۱۰/۳۷ ± ۰/۴۱ <sup>b</sup>	۱/۸۲ ± ۰/۱۲ <sup>b</sup>	۲۳۵/۲۵ ± ۱۹/۰۰ <sup>b</sup>	۸۱/۹۴ ± ۲/۳۵ <sup>ab</sup>
ملاتونین	۱۲/۲۱ ± ۰/۵۵ <sup>a</sup>	۲/۳۱ ± ۰/۱۱ <sup>a</sup>	۲۹۸/۴۲ ± ۱۰/۱۵ <sup>a</sup>	۸۵/۳۸ ± ۱/۶۸ <sup>a</sup>
ملاتونین + p-CPA	۹/۸۰ ± ۰/۶۸ <sup>b</sup>	۱/۷۹ ± ۰/۳۱ <sup>b</sup>	۲۳۵/۲۲ ± ۱۷/۹۲ <sup>b</sup>	۷۸/۵۲ ± ۵/۵۴ <sup>ab</sup>
شوری	۷/۴۹ ± ۰/۱۲ <sup>c</sup>	۱/۱۱ ± ۰/۰۳ <sup>c</sup>	۱۵۴/۱۲ ± ۱۴/۳۵ <sup>c</sup>	۵۱/۹۹ ± ۳/۶۳ <sup>c</sup>
شوری + ملاتونین	۹/۶۵ ± ۰/۰۷ <sup>b</sup>	۱/۶۲ ± ۰/۱۲ <sup>b</sup>	۲۳۵/۱۷ ± ۱۷/۹۶ <sup>b</sup>	۷۲/۵۳ ± ۳/۲۱ <sup>b</sup>
شوری + ملاتونین + p-CPA	۸/۳۲ ± ۰/۱۵ <sup>c</sup>	۱/۰۶ ± ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۱۱۳/۱۷ ± ۸/۷۲ <sup>c</sup>	۵۲/۴۲ ± ۳/۸۳ <sup>c</sup>

حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.

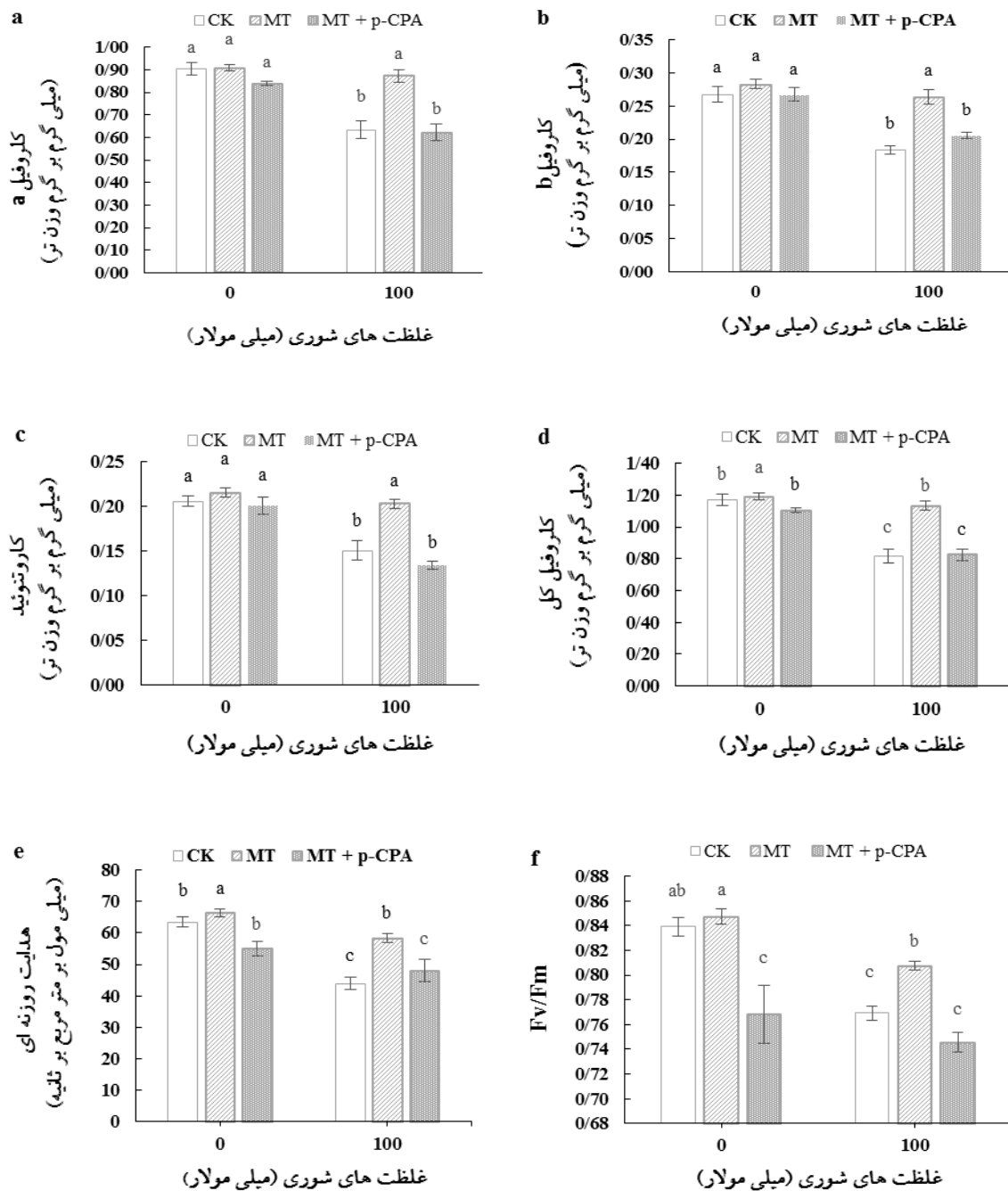
نهایت حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) را تحت تنش شوری (شکل ۴f) افزایش داد. به همین ترتیب، مطالعات قبلی نشان دادند که استفاده از ملاتونین، میزان کلروفیل، غلظت CO<sub>2</sub> بین سلولی، هدایت روزنه‌ای و کارایی فتوسیستم II را بهبود می‌بخشد و افت فتوستنز را در گیاهچه‌های کیوی تحت تنش خشکی (Liang *et al.*, 2019)، گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما (Yang and Guo, 2018) و گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری (Liu *et al.*, 2015) کاهش می‌دهد.

در مجموع به نظر می‌رسد که افزایش وزن خشک بخش هوایی و سطح برگ گیاهان زرین‌گیاه تیمار شده با ملاتونین تحت تنش شوری (جدول ۱) با تأثیر ملاتونین بر بهبود شاخص‌های فتوستنزی و حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (شکل ۴f)، که در دسترس بودن مواد فتوستنزی برای رشد را افزایش می‌دهد، مرتبط باشد.

اثرات تحریک‌کننده ملاتونین بر حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II و حفظ کلروفیل را می‌توان به اثرات ملاتونین بر پاکروبی ROS در کلروپلاست نسبت داد (Zheng *et al.*, 2017). ملاتونین یک آنتی‌اکسیدان فوق‌العاده است که نه فقط ممکن است مستقیماً با ROS برهمکنش داشته باشد، بلکه قادر است پاکروبی ROS را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های

برگ‌های زرین‌گیاه تحت شرایط تنش را تقلیل دهد و در نتیجه تجزیه کلروفیل توسط تنش اکسیداتیو در برگ‌های زرین‌گیاه را کاهش یابد.

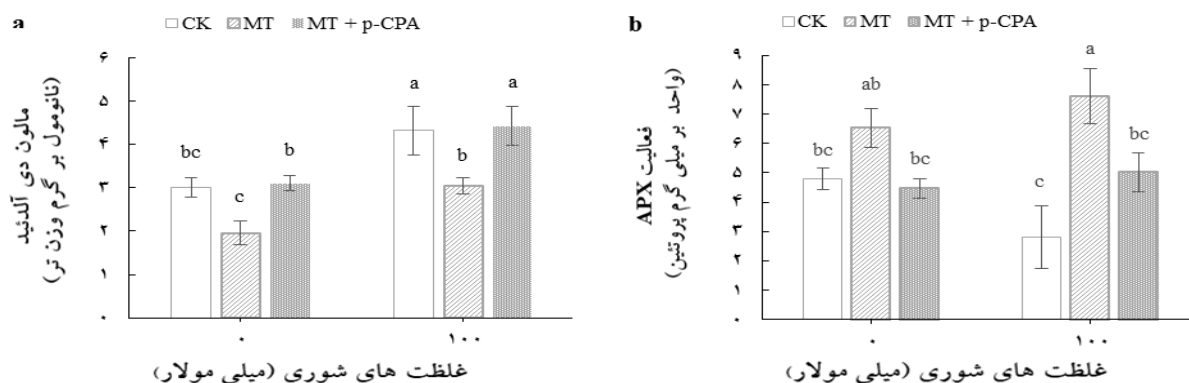
پس از قرار گرفتن در معرض تنش شوری، سطح برگ (جدول ۱) و هدایت روزنه‌ای (شکل ۴) در گیاهان زرین‌گیاه برای جلوگیری از هدر رفت آب کاهش یافت، که احتمالاً منجر به کاهش تبادلات گازی فتوستنز و محدودیت روزنه‌ای فتوستنز می‌شوند. استفاده از ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین هدایت روزنه‌ای را تحت تنش شوری افزایش داد (شکل ۴e)، که نشان می‌دهد تیمار ملاتونین گیاهان را قادر می‌سازد تا روزنه‌های خود را تحت تنش شوری مجدداً باز کنند. به طور مشابهی، مستند شده است که دوز مطلوب ملاتونین به طور قابل‌توجهی باعث افزایش هدایت روزنه‌ای در گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری شده است (Yin *et al.*, 2019). جالب اینجاست که پیش‌تیمار با ملاتونین منجر به افزایش همزمان محتوای نسبی آب برگ (جدول ۱) و هدایت روزنه‌ای (شکل ۴e) تحت تنش شوری در برگ‌های زرین‌گیاه شد. این نتیجه نشان می‌دهد که ملاتونین باعث ایجاد مکانیسم‌هایی برای افزایش جذب آب و هدایت هیدرولتیکی در ریشه‌ها می‌شود که امکان باز شدن روزنه‌ها برای تبادلات گازی فتوستنز را فراهم می‌آورد. افزایش هدایت روزنه‌ای و محتوای رنگیزه‌های فتوستنزی توسط ملاتونین در



شکل ۴- اثرات تیمار ریشه با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به تنهایی (MT) و یا تیمار متوالی ملاتونین و ۱۰۰ میکرومولار p-CPA (MT+ p-) در مقایسه با شاهد (CK) بر غلظت کلروفیل *a* (a)، کلروفیل *b* (b)، کاروتنوئیدها (c) و کلروفیل کل (d)، هدایت روزنه ای (e) و حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (f) در برگ زین گیاه تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری (۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم). حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.

آنتی‌اکسیدان تقویت کند، که به نوبه خود منجر به محافظت از رنگدانه‌ها و اجزای ساختاری کلروپلاست‌ها در برابر آسیب‌های حاصل از ROS می‌شود (Farouk and Al-Amri, 2019; Nabaei and Amooaghaie, 2019). داده‌های پژوهش حاضر هم تأیید کردند که اثرات ملاتونین در بهبود پارامترهای فتوسنتزی (شکل ۴) به میزان زیادی با تأثیر آن بر کاهش مالون

آنتی‌اکسیدان تقویت کند، که به نوبه خود منجر به محافظت از رنگدانه‌ها و اجزای ساختاری کلروپلاست‌ها در برابر آسیب‌های حاصل از ROS می‌شود (Farouk and Al-Amri, 2019; Nabaei and Amooaghaie, 2019). داده‌های پژوهش حاضر هم تأیید کردند که اثرات ملاتونین در بهبود پارامترهای فتوسنتزی (شکل ۴) به میزان زیادی با تأثیر آن بر کاهش مالون



شکل ۵- اثرات تیمار ریشه با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به تنهایی (MT) و یا تیمار متوالی ملاتونین و ۱۰۰ میکرومولار p-CPA (MT+ p-) در مقایسه با شاهد (CK) بر غلظت مالون دی آلدئید (a) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (b) در برگ زیرین گیاه تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری (۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم). حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.

جدول ۳- اثرات تیمار ریشه با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به تنهایی و یا تیمار متوالی ملاتونین و ۱۰۰ میکرومولار p-CPA بر میزان  $Na^+$ ،  $K^+$  و  $Ca^{2+}$  و نسبت‌های  $Na^+/K^+$  و  $Na^+/Ca^{2+}$  در برگ‌های زیرین گیاه تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری (۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم).

$Na^+/Ca^{2+}$	$Na^+/K^+$	$Ca^{2+}$ ، $K^+$ ، $Na^+$			تیمارها
		(میلی گرم بر گرم وزن خشک)			
$0.60 \pm 0.02^c$	$0.12 \pm 0.01^d$	$11.58 \pm 0.33^{bc}$	$57.02 \pm 5.41^{ab}$	$6.93 \pm 0.12^c$	کنترل
$0.58 \pm 0.03^c$	$0.11 \pm 0.004^d$	$12.04 \pm 0.40^{ab}$	$65.28 \pm 3.10^a$	$6.92 \pm 0.15^c$	ملاتونین
$0.59 \pm 0.05^c$	$0.14 \pm 0.01^{cd}$	$11.75 \pm 0.78^{abc}$	$52.03 \pm 1.62^b$	$6.88 \pm 0.22^c$	ملاتونین + p-CPA
$1.25 \pm 0.05^a$	$0.31 \pm 0.01^b$	$10.38 \pm 0.19^d$	$41.63 \pm 2.27^c$	$12.95 \pm 0.46^a$	شوری
$0.75 \pm 0.05^b$	$0.16 \pm 0.01^c$	$12.71 \pm 0.44^a$	$58.99 \pm 2.14^{ab}$	$9.48 \pm 0.37^b$	شوری + ملاتونین
$1.33 \pm 0.07^a$	$0.34 \pm 0.01^a$	$10.79 \pm 0.42^{dc}$	$41.97 \pm 2.52^c$	$14.42 \pm 1.26^a$	شوری + ملاتونین + p-CPA

حروف یکسان در هر ستون نشانگر عدم تفاوت معنی دار میانگین‌ها در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD است.

محافظت می‌کند (جدول ۳).

تنش شوری غلظت  $Na^+$  بخش هوایی را ۸۶/۸۷٪ افزایش داد، اما غلظت  $K^+$  را ۲۶/۹۹٪ و غلظت  $Ca^{2+}$  را ۱۰/۳۶٪ کاهش داد. در نتیجه، شوری نسبت  $Na^+/K^+$  و  $Na^+/Ca^{2+}$  را به ترتیب در برگ‌های گیاهچه زیرین گیاه نسبت به گیاهان کنترل به ترتیب ۲/۵۸ برابر و ۲/۰۸ برابر افزایش داد. تحت تنش شوری، پیش‌تیمار با ملاتونین غلظت  $Na^+$  را ۲۶/۸۰٪ کاهش داد اما غلظت  $K^+$  و  $Ca^{2+}$  را به ترتیب، ۴۱/۷۰٪ و ۲۲/۴۵٪ افزایش داد. در نتیجه نسبت  $Na^+/K^+$  و  $Na^+/Ca^{2+}$  نسبت به گیاهان در

دی آلدئید و افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (شکل ۵) در برگ‌های زیرین گیاه تحت تنش شوری مرتبط است. بهبود همزمان فتوسنتز و سیستم آنتی‌اکسیدانی با تیمار ملاتونین در هندوانه (Li et al., 2017)، خیار (Zhang et al., 2020) و گوجه‌فرنگی (Yin et al., 2019) تحت تنش شوری نیز گزارش شده است.

اثر تنظیمی ملاتونین بر کاهش میزان  $Na^+$  و بالا بردن  $K^+$  و  $Ca^{2+}$  نیز ممکن است دلیل دیگری باشد که ملاتونین از دستگاه فتوسنتزی در برگ گیاهان زیرین گیاه در معرض تنش شوری

هموستازی یونی (جدول ۳) در برگ‌ها را کاهش داد و حتی وقتی بعد از پیش‌تیمار با ملاتونین استفاده شد، اثرات مثبت کاربرد ملاتونین خارجی را بر پارامترهای فوق را تا حد زیادی منتفی کرد. این نتیجه بیشتر تأیید می‌کند که این پاسخ‌ها در گیاه به وسیله ملاتونین تنظیم می‌شوند. خنثی شدن اثرات ملاتونین به وسیله p-CPA بر رشد و محتوای کلروفیل در برگ‌های گیاه پریش (Nabaei and Amooaghaie, 2019) و بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و هموستازی یونی در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش قلیایی (Liu et al., 2015) نیز قبلاً گزارش شده است. مطالعه قبلی ما نشان داد که کاربرد ملاتونین خارجی سنتز ملاتونین داخلی را فعال می‌کند (Vafadar et al., 2020). در این مطالعه ما به طور مستقیم محتوای ملاتونین درون‌زا را اندازه‌گیری نکردیم، اما از آنجا که p-CPA به عنوان مهارکننده بیوستتز ملاتونین، از تبدیل سروتونین به ملاتونین جلوگیری می‌کند (Liu et al., 2015)، داده‌های ما به طور غیرمستقیم نشان می‌دهد که ملاتونین برون‌زا به احتمال زیاد تحریک‌کننده بیوستتز ملاتونین درون‌زا بوده و ملاتونین درون‌زا در بهبود فتوستتز و القای پاسخ‌های دفاعی برای تحمل شوری مؤثر است چون p-CPA نه تنها بیوستتز ملاتونین داخلی را کاهش می‌دهد بلکه در صورتی که بعد از کاربرد ملاتونین خارجی تیمار شود اثرات مثبت ملاتونین خارجی را هم کاهش می‌دهد. به احتمال زیاد ملاتونین فتوستتز را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تنظیم هموستازی یونی تقویت می‌کند و در مجموع این اثرات، تحمل به شوری را در زرین گیاه افزایش می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

در کل یافته‌های این مطالعه نشان داد که ملاتونین افت فتوستتز ناشی از شوری را از طریق برقراری مجدد هموستازی  $\text{Na}^+$ ،  $\text{K}^+$  و  $\text{Ca}^{2+}$  و فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه تعدیل می‌کند. داده‌های ما نشان می‌دهد که ملاتونین خارجی همانند ملاتونین درون‌زا نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای فتوستتز و

معرض شوری، به ترتیب ۴۸/۳۹٪ و ۴۰٪ کاهش یافت. با این وجود، پیش‌تیمار با p-CPA همراه با ملاتونین اثرات تحریکی ملاتونین را بر روی این صفات را تحت تنش شوری کاهش داد (جدول ۳).

نگهداری هوموستازی  $\text{Na}^+$ ،  $\text{K}^+$  و  $\text{Ca}^{2+}$  یکی از ارکان اساسی تحمل به شوری در گیاهان است (Shafeiee and Ehsanzadeh, 2019; Tabatabaei and Ehsanzadeh, 2016; Yang and Guo, 2018). داده‌های ما نشان می‌دهد که تحت شرایط شوری ملاتونین احتمالاً فرآیندهای جذب و انتقال یونی را در سطح ریشه تحت تأثیر قرار داده است و در نتیجه، انباشت  $\text{Na}^+$  را کاهش و میزان  $\text{K}^+$  و  $\text{Ca}^{2+}$  را در برگ‌ها بهبود داده‌اند و منجر به کاهش قابل توجه در نسبت‌های  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  و  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  در برگ‌ها شده است (جدول ۳). بهبود هموستازی  $\text{Na}^+$ ،  $\text{K}^+$  و  $\text{Ca}^{2+}$  توسط ملاتونین قبلاً در *Vicia faba L.* (Dawood and El-Awadi, 2015) تحت تنش شوری نیز گزارش شده است. Jiang و همکاران (۲۰۱۶) اعلام کردند که ملاتونین می‌تواند بارگذاری  $\text{Na}^+$  در آوند چوبی ریشه‌ها را محدود کند و یا بازگشت  $\text{Na}^+$  از شاخه‌ها را افزایش دهد. در نتیجه، محتوای  $\text{Na}^+$  در برگ گیاهان ذرت تحت تنش شوری، کاهش می‌یابد. همچنین نشان داده شده است که ملاتونین، می‌تواند بیان ژن یا فعالیت‌های ناقلین مربوط به ورود  $\text{K}^+$  (Liu et al., 2020) و ناقلین مرتبط با خروج  $\text{Na}^+$  از سیتوپلاسم مثل SOS1 و NHX1 (Zhao et al., 2018) را فراتنظیم کند که به نوبه خود موجب تنظیم هموستازی  $\text{Na}^+$ ،  $\text{K}^+$  در سلول‌های تحت تنش شوری می‌شود. افزایش کلسیم نیز خود به افزایش تحمل شوری در گیاهان کمک می‌کند و آنتی‌پورترهای SOS1 و NHX1 با دخالت کلسیم در گیاه فعال می‌شوند. تحقیقات قبلی نقش کلسیم را در بهبود فتوستتز و در تحمل تنش شوری در فستوکا (Wang et al., 2017) و گیاهان چند ساله چاودار (Hu et al., 2016) اثبات کرده است.

در این آزمایش محدودکردن بیوستتز ملاتونین داخلی با به کار بردن بازدارنده p-CPA پارامترهای فتوستتزی (شکل ۴)، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز (شکل ۵b) و

از حوزه معاونت پژوهشی و مالی دانشگاه شهرکرد برای حمایت‌های مالی پژوهش حاضر قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از کارشناسان آزمایشگاه‌های فیزیولوژی و پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و مسئولین گلخانه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان که در اجرای موفق این پژوهش کمال همکاری و مساعدت را داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

پاسخ‌های دفاعی در ژنوتیپ زرین گیاه فریدون‌شهر اصفهان تحت تنش شوری ژنوتیپ داشت. این احتمال وجود دارد که کاربرد ملاتونین به صورت اسپری نیز بر حفظ محتوای کلروفیل و سایر شاخص‌های فتوسنتزی تأثیر بگذارد و عملکرد نهایی زرین گیاه را در خاک شور افزایش دهد. بنابر این، لازم است در تحقیقات بعدی اثرات اسپری ملاتونین بر سایر شاخص‌های فتوسنتزی در ژنوتیپ‌های دیگر زرین گیاه و در شرایط مزرعه‌ای بیشتر بررسی شود.

## تشکر و قدردانی

## منابع

عموآقایی، ر. و نیک اندیش، ف. (۱۳۹۴) اثر تلقیح ریشه دو رقم یونجه با جدایه‌هایی از گونه‌های سینوریزویوم و باسیلوس بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول در شرایط تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران سابق) ۲۸: ۱۴۰-۱۵۲.

عموآقایی، ر.، مجیدی، م. و فرهادیان، ص. (۱۴۰۱) اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر تحمل تنش شوری در گیاه زنیان *Carum copticum* L. مجله کارکرد و فرآیند گیاهی ۴۸: ۱۹-۳۳.

- Amooaghaie, R. and Ghorbannejade, H. (2017) Differential changes of proline content and activities of antioxidant enzymes results in varied salt-tolerance in canola genotypes. *Journal of Genetic Resources* 3: 36-46.
- Amooaghaie, R. and Tabatabaie, F. (2017) Osmopriming-induced salt tolerance during seed germination of alfalfa most likely mediates through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling and upregulation of heme oxygenase. *Protoplasma* 254: 1791-1803.
- Arnao, M. B. and Hernandez-Ruiz, J. (2019) Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network. *Melatonin Research* 2: 152-168.
- Bistgani, Z. E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F. and Morshedloo, M. R. (2019) Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products* 135: 311-320.
- Chapman, H. D. and Pratt, P. F. (1961) Methods of analysis for soils, plants and waters. *Soil Science* 93: 68.
- Dawood, M. G. and El-Awadi, M. E. (2015) Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L. plants via seed priming with melatonin. *Acta Biologica Colombiana* 20: 223-235.
- Debnath, B., Islam, W., Li, M., Sun, Y., Lu, X., Mitra, S., Hussain, M., Liu, S. and Qiu, D. (2019) Melatonin mediates enhancement of stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1040.
- Farouk, S. and Al-Amri, S. M. (2019) Exogenous melatonin-mediated modulation of arsenic tolerance with improved accretion of secondary metabolite production, activating antioxidant capacity and improved chloroplast ultrastructure in rosemary herb. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180: 333-347.
- Fathi, M. and Rezaei, M. (2013) Soil salinity in the central arid region of Iran: Esfahan Province. *Developments in Soil Salinity Assessment and Reclamation* 141-153.
- Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R. M., Zamani, Z. and Palazon, J. (2013) Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry* 141: 139-146.
- Gengmao, Z., Yu, H., Xing, S., Shihui, L., Quanmei, S. and Changhai, W. (2015) Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products* 64: 175-181.
- Hu, T., Chen, K., Hu, L., Amombo, E. and Fu, J. (2016) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup>-based signaling and associated ion accumulation, antioxidant systems and secondary metabolism orchestrate the response to NaCl stress in perennial ryegrass. *Scientific Reports* 6: 36396.
- Isayenkov, S. V. and Maathuis, F. J. (2019) Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-11.

- Jiang, C., Cui, Q., Feng, K., Xu, D., Li, C. and Zheng, Q. (2016) Melatonin improves antioxidant capacity and ion homeostasis and enhances salt tolerance in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 82.
- Kabiri, R., Hatami, A., Oloumi, H., Naghizadeh, M., Nasibi, F. and Tahmasebi, Z. (2018) Foliar application of melatonin induces tolerance to drought stress in Moldavian balm plants (*Dracocephalum moldavica*) through regulating the antioxidant system. *Folia Horticulturae* 30: 155-167.
- Khodabakhsh, F., Amooaghaie, R. and Mostajeran, A. (2014) Effect of hydro and osmo-priming on membrane deterioration, proline accumulation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes in two salt stressed chickpea cultivars. *Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ)* 13: 619-626.
- Li, H., Chang, J., Chen, H., Wang, Z., Gu, X., Wei, C., Zhang, Y., Ma, J., Yang, J. and Zhang, X. (2017) Exogenous melatonin confers salt stress tolerance to watermelon by improving photosynthesis and redox homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 8: 295.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Liang, D., Ni, Z., Xia, H., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., Lin, L., Deng, Q. and Luo, X. (2019) Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae* 246: 34-43.
- Liu, N., Gong, B., Jin, Z., Wang, X., Wei, M., Yang, F., Li, Y. and Shi, Q. (2015) Sodic alkaline stress mitigation by exogenous melatonin in tomato needs nitric oxide as a downstream signal. *Journal of Plant Physiology* 186: 68-77.
- Liu, Z., Cai, J. S., Li, J. J., Lu, G. Y., Li, C. S., Fu, G. P., Zhang, X. K., Liu, Q. Y., Zou, X. 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: 328-335.
- Liu, J., Shabala, S., Zhang, J., Ma, G., Chen, D., Shabala, L., Zeng, F., Chen, Z. H., Zhou, M. and Venkataraman, G. (2020) Melatonin improves rice salinity stress tolerance by NADPH oxidase-dependent control of the plasma membrane K<sup>+</sup> transporters and K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant, Cell and Environment* 43: 2591-2605.
- Mahouachi, J. (2018) Long-term salt stress influence on vegetative growth and foliar nutrient changes in mango (*Mangifera indica* L.) seedlings. *Scientia Horticulturae* 234: 95-100.
- Nabaei, M. and Amooaghaie, R. (2019a) Interactive effect of melatonin and sodium nitroprusside on seed germination and seedling growth of *Catharanthus roseus* under cadmium stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 66: 128-139.
- Nabaei, M. and Amooaghaie, R. (2019b) Nitric oxide is involved in the regulation of melatonin-induced antioxidant responses in *Catharanthus roseus* roots under cadmium stress. *Botany* 97: 681-690.
- Negrao, S., Schmockel, S. and Tester, M. (2017) Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany* 119: 1-11.
- Pan, T., Liu, M., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Nie, C., Yu, M., Kuznetsov, V. V., Allakhverdiev, S. I. and Shabala, S. (2020) Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 1-35.
- Pfundel, E. E. (2009) Deriving room temperature excitation spectra for photosystem I and photosystem II fluorescence in intact leaves from the dependence of FV/FM on excitation wavelength. *Photosynthesis Research* 100: 163-177.
- Shafeiee, M. and Ehsanzadeh, P. (2019) Physiological and biochemical mechanisms of salinity tolerance in several fennel genotypes: Existence of clearly-expressed genotypic variations. *Industrial Crops and Products* 132: 311-318.
- Siddiqui, M. H., Alamri, S., Al-Khaishany, M. Y., Khan, M. N., Al-Amri, A., Ali, H. M., Alaraidh, I. A. and Alsahli, A. A. (2019) Exogenous melatonin counteracts NaCl-induced damage by regulating the antioxidant system, proline and carbohydrates metabolism in tomato seedlings. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 353.
- Szafrańska, K., Reiter, R. J. and Posmyk, M. M. (2017) Melatonin improves the photosynthetic apparatus in pea leaves stressed by paraquat via chlorophyll breakdown regulation and its accelerated de novo synthesis. *Frontiers in Plant Science* 8: 878.
- Tabatabaei, S. and Ehsanzadeh, P. (2016) Photosynthetic pigments, ionic and antioxidative behaviour of hulled tetraploid wheat in response to NaCl. *Photosynthetica* 54: 340-350.
- Toma's-Zapico, C. and Coto-Montes, A. (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research* 39: 99-104.
- Wang, L., Liu, J., Wang, W. and Sun, Y. (2016) Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress. *Photosynthetica* 54: 19-27.
- Wang, G., Bi, A., Amombo, E., Li, H., Zhang, L., Cheng, C., Hu, T. and Fu, J. (2017) Exogenous calcium enhances the photosystem II photochemistry response in salt stressed tall fescue. *Frontiers in Plant Science* 8: 2032.
- Vafadar, F., Amooaghaie, R., Ehsanzadeh, P., Ghanati, F. and Sajedi, R. H. (2020) Crosstalk between melatonin and Ca<sup>2+</sup>/CaM evokes systemic salt tolerance in *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of Plant Physiology* 252: 153237.
- Yang, Y. and Guo, Y. (2018) Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt stress responses. *New Phytologist* 217: 523-539.

- Yin, Z., Lu, J., Meng, S., Liu, Y., Mostafa, I., Qi, M. and Li, T. (2019) Exogenous melatonin improves salt tolerance in tomato by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate–glutathione cycle. *Journal of Plant Interactions* 14: 453-463.
- Zhan, H., Nie, X., Zhang, T., Li, S., Wang, X., Du, X., Tong, W. and Song, W. (2019) Melatonin: A small molecule but important for salt stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 709.
- 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.
- Zhao, G., Zhao, Y., Yu, X., Kiprotich, F., Han, H., Guan, R., Wang, 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: 1912.
- Zheng, X., Tan, D. X., Allan, A. C., Zuo, B., Zhao, Y., Reiter, R. J., Wang, L., Wang, Z., Guo, Y. and Zhou, J. (2017) Chloroplastic biosynthesis of melatonin and its involvement in protection of plants from salt stress. *Scientific Reports* 7: 1-12.

## The role of melatonin in improving photosynthesis and salt tolerance of *Dracocephalum kotschy* Boiss.

Farinaz Vafadar<sup>1</sup>, Rayhaneh Amooaghaie<sup>1\*</sup>, Parviz Ehsanzadeh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Plant Biology Department, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran

(Received: 31/07/2022, Accepted: 30/08/2022)

### Abstract

In this study, the effect of various levels of salinity on *Dracocephalum kotschy* Boiss. (Fereidounshahr population) and the role of melatonin in improving photosynthesis and the acquisition of salt tolerance was investigated using two independent experiments. In the first experiment, the effect of different concentrations of sodium chloride (0, 25, 50, 75 and 100 mM) on the growth and photosynthetic traits of 60-day-old plants was evaluated. The results showed that with increasing salt concentration, the tolerance index and the amount of photosynthetic pigments,  $F_v/F_m$ , as well as stomatal conductance decreased, whereas the level of lipid peroxidation and catalase activity increased in the leaves. In the second experiment, the effect of root pretreatment with 100  $\mu$ M melatonin was investigated on salt tolerance (100 mM sodium chloride) of *D. kotschy* seedlings. The results showed that pretreatment with melatonin increased fresh and dry weight of aerial part, chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll and carotenoids,  $F_v/F_m$ , stomatal conductance and relative water content in leaves under salt stress. The positive effect of melatonin on photosynthetic parameters was closely related to its role in increasing ascorbate peroxidase enzyme activity, reducing malondialdehyde content and improving  $Na^+$ ,  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the leaves, and these effects were weakened by the application of p-CPA as an inhibitor of melatonin synthesis. Based on these results, the application of external melatonin, probably by affecting the endogenous melatonin synthesis in plants, was able to moderate the osmotic stress, ionic toxicity and oxidative stress caused by salinity in *D. kotschy* plants, and it is possible that melatonin treatment can be used to improve photosynthesis and the level of plant's tolerance to salinity.

**Keywords:** *Dracocephalum kotschy*, Salinity, Melatonin, Photosynthesis, Chlorophyll

Corresponding author, Email: rayhanehamooaghaie@yahoo.com