Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

اثر پیش تیمار ملاتونین بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های جعفری زینتی تحت تنش شوری

محبوبه زارع زینلی، فاطمه نصیبی*، خسرو منوچهری کلانتری و عفت السادات احمدی موسوی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۱/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰٤/۰۵)

چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بسیاری از گیاهان در مرحله گیاهچه به شوری حساس هستند و بنابراین رویش آنها در مناطق دارای آب شور با مشکلات زیادی همراه است. استفاده از روش‌ها و ترکیبات شیمیایی مختلفی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌تواند در کاهش اثرات مخرب شوری در گیاهان مفید باشد. این پژوهش برای بررسی اثر ملاتونین بر روی افزایش مقاومت گیاهچه‌های جعفری آفریقایی در برابر شوری انجام شد. به‌منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف شوری بر رشد اولیه گیاهچه‌های گل جعفری (*Tagetes erecta*)، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به اجرا درآمد. تیمارها شامل دو سطح ملاتونین ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار و چهار سطح مختلف محلول نمک سدیم کلرید، با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار بود. در این پژوهش به‌طور کلی اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر ویژگی‌های رشد، بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گیاهچه جعفری آفریقایی تحت تنش شوری بررسی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در برخی پارامترهای بیوشیمیایی مانند کلروفیل و پروتئین، غلظت ۰/۲۵ میکرومولار ملاتونین تحت تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار شوری مؤثر بود. پیش‌تیمار گیاهچه‌ها با ملاتونین در هر دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار در شرایط شوری مقدار مالون دآلدهیدها و سایر آلدهیدها را کاهش داد. فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش شوری در برگ‌ها افزایش یافت، در حالیکه تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز اثر معنی‌داری نداشت. پیش‌تیمار با ملاتونین در غلظت ۰/۲۵ میکرومولار منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهان تحت تنش شوری گردید. اما پیش‌تیمار با ملاتونین فقط در غلظت ۰/۲۵ میکرومولار منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز گیاهان تحت شوری گردید. به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پیش‌تیمار گیاهچه‌های جعفری آفریقایی با ملاتونین موجب افزایش مقاومت گیاهچه جعفری در برابر تنش شوری می‌شود.

واژگان کلیدی: تنش شوری، ملاتونین، جعفری آفریقایی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

مقدمه

تنش به‌عنوان هر عامل خارجی که رشد و نمو طبیعی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد مانند گرما، سرما، شوری و غیره (Parihar *et al.*, 2015). شوری یک فاکتور محیطی است که تمام مراحل رشد و نمو گیاه را از جوانه‌زنی تا تولید بیوماس، دانه و میوه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Manchanda *et al.*,

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: Nasibi2002@yahoo.com

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

2008).

مقدار کلروفیل و رنگیزه‌های فتوسنتزی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در ظرفیت فتوسنتزی گیاهان هستند چرا که به‌طور مستقیم بر سرعت و میزان فتوسنتز و تولید زیست‌توده تأثیر دارند. بیان شده که افزایش غلظت سدیم کلرید در محیط‌کشت گیاه، موجب کاهش میزان کلروفیل a و b شده و با افزایش زمان تنش، کاهش رنگیزه‌ها بیشتر می‌شود (قاسمی و کافی، ۱۳۹۰). در شرایط تنش شوری تغییر در الگوی بیان ژن و همچنین تغییرات کیفی و کمی سنتز پروتئین به وجود می‌آید، زیرا مراحل زیادی از سنتز پروتئین به تغییرات غلظت یونی حساس هستند (Ingram and Bartels, 1996). به‌طور کلی در شرایط تنش شوری، سنتز بسیاری از پروتئین‌ها کند شده و در عوض سنتز برخی پروتئین‌های حفاظتی تشدید می‌گردد (Parida and Das, 2005). کاهش آمینواسیدهای در دسترس، کاهش سنتز پروتئین و تخریب آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین از جمله مواردی هستند که سبب کاهش پروتئین‌ها در تنش شوری می‌شوند (Lakhdar, 2008). هنگامی که سلول‌ها در شرایط تنش قرار می‌گیرند تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و جاروب‌شدن آنها به‌هم می‌خورد و اغلب منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد. بسیاری از تنش‌های محیطی هم‌چون شوری، خشکی، فلزات سنگین و نور با ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو، آسیب به گیاهان را تشدید می‌کنند. کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و غشاهای سلولی جایگاه اصلی تولید ROS محسوب می‌شوند (Gill *et al.*, 2010). گونه‌های فعال اکسیژن برای سلول بسیار خطرناک بوده و موجب آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و از دست‌رفتن یکپارچگی غشاها و حتی مرگ سلول می‌گردد. این گونه‌های فعال اکسیژن شامل آنیون سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی است (Parida and Das, 2005). تنش شوری با پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تولید مالون دآلدئید توسط گونه‌های فعال اکسیژن، سبب آسیب‌دیدگی غشاها، افزایش نفوذپذیری و کاهش شاخص پایداری غشا می‌شود (Sairam and Srivastava, 2002).

ملاتونین با نام شیمیایی N- استیل ۵- متوکسی تریپتامین است که در غده پینه‌آل گاو کشف شد. ملاتونین در تمامی پستانداران، پرندگان، دوزیستان، خزندگان و گیاهان یافت می‌شود (Hardeland, 2012). ملاتونین دارای خواص فیزیولوژیکی متعددی در جانوران و انسان است که از جمله آن می‌توان به تنظیم چرخه خواب و بیداری، خلق و خوی، درجه حرارت بدن، رفتار جنسی، تولید مثل فصلی، سیستم ایمنی بدن و غیره اشاره کرد (Carrillo, 2013). ملاتونین در یک طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی از جمله غلات، حبوبات، سبزیجات و غیره کشف شده است. در واقع به‌نظر می‌رسد که بافت‌های گیاهی حاوی سطحی از ملاتونین هستند (Marino and Hernandez, 2013). محل دقیق بیوسنتز ملاتونین و مکانیسم اثر بخشی آن هنوز مشخص نیست. اما احتمال می‌دهند که کلروپلاست محل اولیه بیوسنتز ملاتونین باشد (Tan, 2013). آثار متعددی از نقش حفاظتی ملاتونین در گیاهان وجود دارد. در گیاهان، ملاتونین در قسمت‌های مختلفی از جمله ریشه، هیپوکوتیل، برگ، ساقه، گل، میوه و بذر وجود دارد و بیشترین میزان ملاتونین در بذر مشاهده شده است (Aranao and Hernandez, 2007)، بنابراین حضور ملاتونین در بذر جهت حفاظت از جنین و بافت‌های تولید مثلی در برابر تنش اکسیداتیو ضروری است (Zhang, 2015). ملاتونین خط مقدم برای مقابله با تنش اکسیداتیو معرفی شده است و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به‌صورت پشتیبان بعد از ملاتونین وارد عمل می‌شوند. ملاتونین به‌دلیل طبیعت دوگانه (خاصیت آبدوستی و چربی دوستی)، به‌راحتی از عرض غشا عبور کرده و وارد سلول می‌شود. به‌همین دلیل در بین تمامی تنظیم‌کننده‌های رشد، ملاتونین دارای بیشترین توانایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوده و به‌عنوان قوی‌ترین مولکول که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد شناخته شده است (Tan, 2007). گزارش شده ملاتونین در گیاهان به‌عنوان یک محرک زیستی بوده و موجب افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و بهبود رشد و توسعه گیاه می‌گردد. همچنین مشاهده شده که در تنش‌های محیطی مقدار ملاتونین درونی گیاه افزایش

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

می‌یابد (Tan, 2007). بیان شده که با کاربرد خارجی ملاتونین در گیاهان تحت تنش شوری، اثرات مضر تنش تخفیف می‌یابد. برای مثال پیش‌تیمار بذر خیار با ملاتونین، صدمات اکسیداتیو ناشی از تنش شوری را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به میزان ۳/۱ تا ۵ برابر کاهش داد، همچنین ملاتونین از بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز ABA جلوگیری کرده و موجب کاهش ABA در طول جوانه‌زنی بذر خیار گشته و با القای بیوسنتز جیبرلین سرعت جوانه‌زنی بذر تحت تنش شوری را افزایش داد (Zhang, 2014). در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شده که کاربرد خارجی ملاتونین در گیاه ذرت تحت تنش شوری، موجب افزایش نرخ خالص فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش نشت یونی غشا می‌شود (Chaoqiang, 2016) همچنین گزارش شده پیش‌تیمار بذر خیار با ملاتونین، موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی، بهبود استقرار گیاهچه، تحریک ریشه‌زایی، جلوگیری از تجزیه کلروفیل و درنتیجه افزایش کارایی فتوسنتز تحت تنش خشکی می‌گردد (Zhang, 2015).

گل جعفری با نام علمی *Tagetes erecta*، از خانواده میناسانان است. خاستگاه آن آمریکا، خصوصاً مکزیک است. گیاهی یک‌ساله و دارای برگ‌های مرکب بوده که گل‌های آن به رنگ زرد لیمویی، زرد متمایل به کرم، طلایی و نارنجی دیده می‌شود. ارقام مختلف این گیاه از سه گونه *T. erecta*، *T. tenuifolia* و *T. patula* مشتق شده است. این گیاه بیشتر به‌عنوان گیاه بسترساز و همچنین به‌عنوان گل بریدنی و گلدانی استفاده می‌شود. دوره گلدهی آن در سرتاسر تابستان بوده و تا پاییز ادامه می‌یابد (Priyanka, 2013). گیاه جعفری علاوه بر اینکه به‌عنوان یک گیاه زینتی شناخته می‌شود دارای خواص دارویی بوده و حاوی ترکیبات خاص دارویی نیز است. از جمله ترکیبات بیوشیمیایی گیاه جعفری می‌توان، کاروتنوئیدها، لوتئین، کورستاگتین، فنول‌ها، سیرینجیک اسید و کوئیتین را نام برد. گیاه جعفری آفریقایی دارای یک منبع اصلی از کاروتنوئیدها و لوتئین بوده که امروزه این گیاه به‌صورت تجاری برای استخراج رنگیزه‌های کاروتن به‌ویژه گزانتوفیل پرورش داده می‌شود، همچنین از لوتئین موجود در آن به‌عنوان یک ماده رنگی پرمصرف در صنایع نساجی و محصولات غذایی استفاده می‌شود (Karwani and Sisodia, 2015). گیاه جعفری آفریقایی به‌طور وسیع در فضای سبز به‌عنوان بستر استفاده می‌شود، با توجه به اینکه این گیاه در فصل تابستان کشت می‌شود بنابراین مقاومت آن در برابر شرایط محیطی نامناسب مانند شوری و خشکی خاک اهمیت ویژه‌ای دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر محلول‌پاشی نشاهای گل جعفری زینتی با ملاتونین در کاهش صدمات ناشی از تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش گل جعفری آفریقایی بوده که متعلق به خانواده *Asteraceae* است. بذرهای این گیاه از شرکت نوین سبز پرور شهر ری خریداری شد. بذرهای خریداری‌شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب قرار داده شد، سپس در سینی‌های کشت نشا برای انجام فرایند جوانه‌زنی، در محیط گلخانه قرار گرفت. برای پرکردن سینی‌های کشت نشا از خاک برگ استفاده شد. بعد از گذشت چهار روز فرایند جوانه‌زنی صورت گرفت. بعد از رشد نشاها تا مرحله دو تا سه برگی، تیمار ملاتونین با غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار اعمال گردید. اعمال تیمار ملاتونین به‌صورت دو روز در میان و در سه مرحله انجام گرفت. پس از گذشت مدت زمان معلوم (تقریباً سه روز بعد از آخرین محلول‌پاشی) نشاها به گلدان‌های پرشده با ماسه بادی انتقال گشته و پس از استقرار در گلدان و گذشت سه روز، تیمار شوری با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک اعمال گردید. تیمار شوری سه مرتبه به‌صورت یک روز در میان انجام شد. با گذشت یک روز از اعمال آخرین تیمار شوری برگ‌های (ردیف سوم برگ، بعد از برگ لپه‌ای) گیاهان جعفری که ٤٤ روزه بودند جمع‌آوری شدند.

وزن خشک اندام هوایی و ریشه: برای اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها، نمونه‌های گیاهی در فویل آلومینیومی پیچیده

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

و به‌مدت ۲٤ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس وزن خشک نمونه‌ها با ترازوی مذکور بر حسب گرم گیاه اندازه‌گیری و ثبت شد.

سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها: برای سنجش میزان کلروفیل برگ از روش Lichtenhtaler (۱۹۸۷) استفاده شد. کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای گیاه جعفری به‌وسیله استون ۸۰ درصد استخراج و با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شدند. غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکرو گرم بر گرم وزن تر با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه گردید.

$$\text{Chl a } (\mu g/ml) = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$$
$$\text{Chl b } (\mu g/ml) = 21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$$
$$\text{Chl t (Chl a + Chl b)} = 7.15\ A_{663.2} + 18.71\ A_{646.8}$$
$$\text{Car } (\mu g/ml) = (1000A_{470} - 1.8 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b})/198$$

سنجش مقدار پروتئین کل به روش برادفورد: برای سنجش مقدار پروتئین، ابتدا پروتئین‌ها از اندام هوایی گیاه در دمای ٤-۰ درجه سانتی‌گراد استخراج شدند. به این منظور یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۲ که شامل اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در ٤۰۰۰×g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای مطالعه آنزیم‌ها و نیز سنجش پروتئین استفاده گردید. برای سنجش غلظت پروتئین، به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده شد و سریعاً ورتکس گردید. پس از پنج دقیقه جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6): سنجش فعالیت کاتالاز براساس کاهش شدت جذب آب اکسیژنه در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر صورت گرفت. غلظت آب اکسیژنه مصرف‌شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل ٤۰ $mM^{-1}cm^{-1}$ و رابطه A=εbc محاسبه گردید. فعالیت آنزیم به‌صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (حاصل از روش Bradford (۱۹۷٦))، در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که یک میکرومول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (CEC1.11.1.11): فعالیت این آنزیم براساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. در این روش مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آسکوربات براساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش در جذب، در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت دو دقیقه اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت آسکوربات اکسیدشده از ضریب خاموشی آسکوربات ۲/۸ $mM^{-1}cm^{-1}$ و فرمول A=εbc، استفاده شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز، مقدار آنزیمی است که یک میکرومول آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۵۰ میکرولیتر عصاره (حاصل از سنجش پروتئین کل) گزارش شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) (EC 1.11.1.7): فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از پیش‌ماده گایاکول اندازه‌گیری شد. افزایش جذب به‌دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول‌موج ٤۷۰ نانومتر به‌مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد. با استفاده از ضریب خاموشی تتراگایاکل معادل ۲۵/۵ $mM^{-1}cm^{-1}$ و فرمول A=εbc، مقدار تتراگایاکل تشکیل‌شده محاسبه شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۳۰ میکرولیتر عصاره (حاصل از سنجش پروتئین کل)، گزارش گردید.

سنجش غلظت مالون دآلدهید: اندازه‌گیری غلظت مالون دآلدهید (MDA) به روش Heath و Packer (۱۹٦۸) انجام شد. برای محاسبه غلظت MDA ازضریب خاموشی معادل ۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ ارائه گردید.

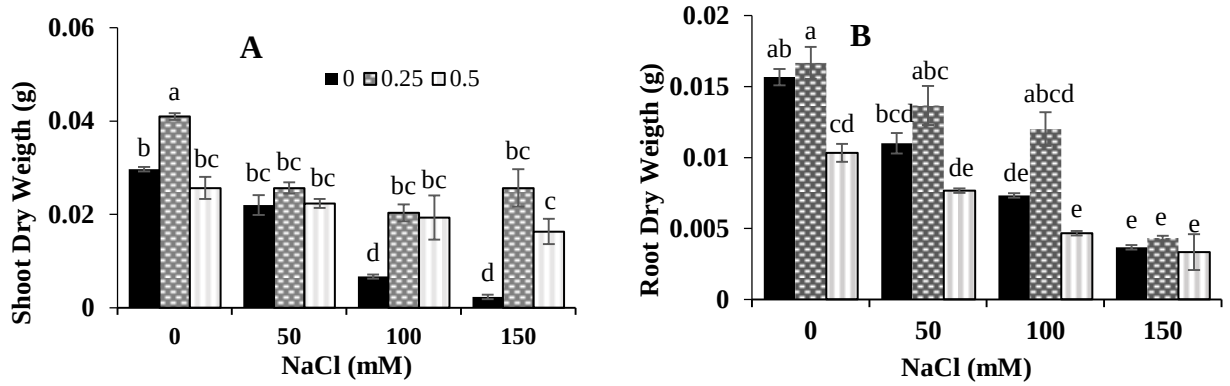
نتایج و بحث

در این پژوهش شوری در هر سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl موجب کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه گردید. همچنین نتایج حاصل از پیش‌تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار موجب افزایش وزن خشک گیاه جعفری در برابر تنش شوری شد (شکل ۱). شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد و تولید بیوماس را محدود می‌کند. البته میزان کاهش بستگی به شدت و مدت تنش، نوع گیاه و مرحله زندگی گیاه دارد (Gomez-Pando, 2010). کمبود آب ناشی از تنش‌های محیطی، موجب کاهش فشار تورگر گردیده و این پدیده تغییراتی در وضعیت آب گیاه ایجاد می‌کند که سبب کاهش رشد، ماده خشک و محصول قابل برداشت گیاه می‌شود (Arbona, 2013). تأثیر ملاتونین در دفاع آنتی‌اکسیدانی، افزایش مقاومت در برابر تنش‌ها، کاهش نشت الکترولیت‌ها، حفاظت از رنگیزه‌ها و افزایش فتوسنتز، که در مطالعات پیشین بیان شده است (Chaoqiang, 2016)، می‌تواند از دلایل بهبود رشد گیاه جعفری مطالعه‌شده در پژوهش حاضر باشد.

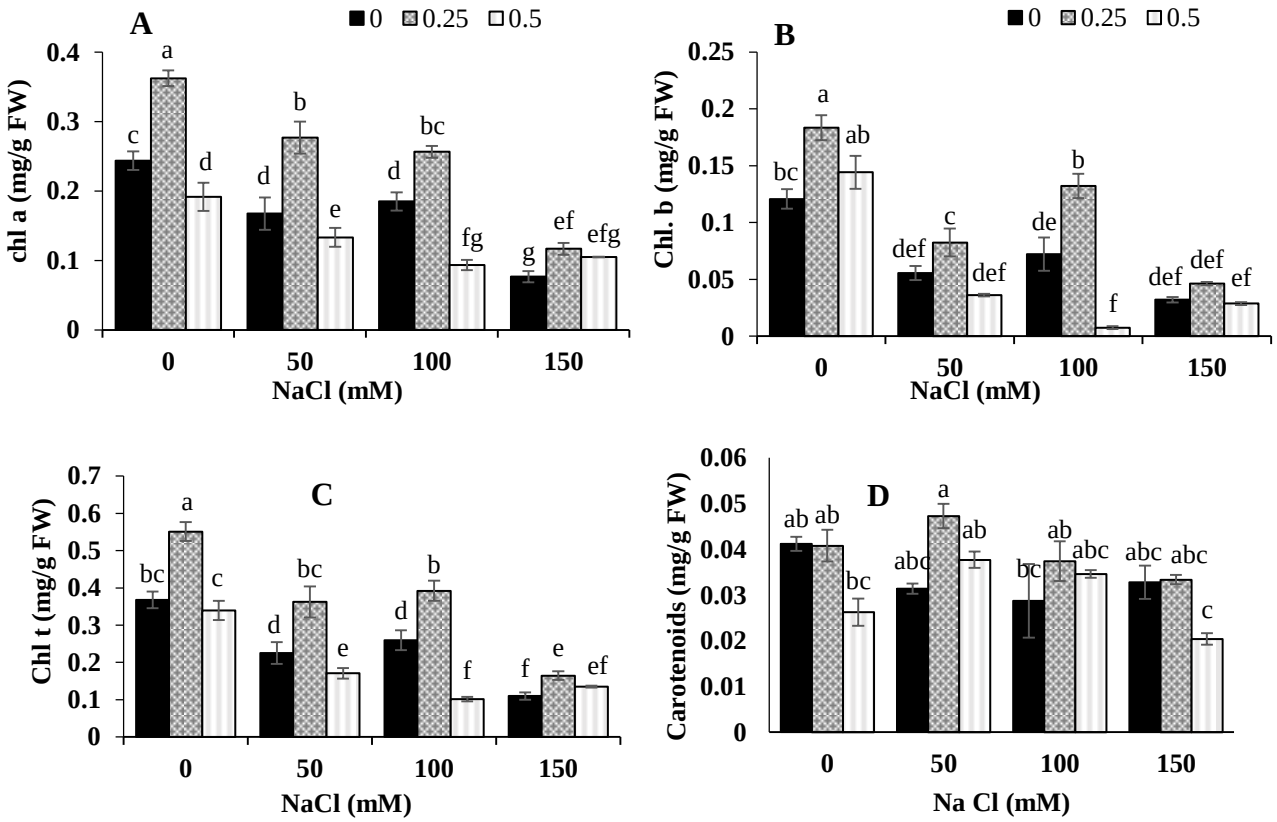
در پژوهش حاضر شوری بر مقدار کاروتنوئیدهای گیاهچه‌های جعفری گل درشت، تأثیر معنی‌داری نداشت، ولی منجر به کاهش مقدار کلروفیل گردید و پیش‌تیمار توسط ملاتونین ۰/۲۵ میکرومولار منجر به افزایش معنی‌دار کلروفیل در گیاهچه‌های تحت تنش شوری شد (شکل ۲). گزارش شده یکی از اثرات قابل توجه تنش شوری، تغییر بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی است. کاهش محتوی کلروفیل تحت تنش شوری یک پدیده‌ای است که عموماً گزارش شده است (Hasanuzzaman, 2013). اثر کاهشی محتوی کلروفیل تحت تنش شوری ممکن است به‌دلیل شکل‌گیری آنزیم‌های پروتئولیتیکی مانند کلروفیلاز باشد که مسئول تخریب کلروفیل و یا صدمه‌زدن به دستگاه فتوسنتزی باشد (Radi, 2013). همچنین کاهش مقدار کلروفیل تحت تنش شوری عمدتاً به‌دلیل کاهش آمینولوولنیک اسید سنتتاز است (Santos, 2004). کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تنش شوری از نشانه‌های تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری در نظر گرفته شده است که ممکن است علت آن تخریب ساختار کلروپلاست، دستگاه فتوسنتزی و فوتواکسیداسیون رنگیزه‌ها باشد (Dong, 2014). به علاوه تنش شوری فعالیت آنزیم روبیسکو را کاهش داده و باعث تخریب پروتئین‌های غشایی در دستگاه فتوسنتزی و نیز ناپایداری کمپلکس رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود (Jaleel, 2007). نقش ملاتونین در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در ذرت (Chaoqiang, 2016) و باقلا (Dawood, 2014) تحت تنش شوری گزارش شده است. گزارش شده است که تیمار ملاتونین نقش مهمی در حفاظت از کلروفیل و افزایش فتوسنتز به‌دلیل بالابردن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و درنتیجه مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند (Xd, 2010). بنابراین شاید یکی از دلایل افزایش محتوی کلروفیل پس از کاربرد ملاتونین در شرایط تنش به‌دلیل نقش مؤثر ملاتونین در حفاظت از دستگاه فتوسنتزی و ساختار کلروپلاست با از بین‌بردن گونه های فعال اکسیژن است.

در این بررسی شوری منجر به افزایش مالون دآلدهید و سایر آلدهیدها گردید و تیمار ملاتونین در گیاهان تحت تنش شوری منجر به کاهش مقدار مالون دآلدهید شد (شکل ۳). غشا پلاسمایی، اولین جایی است که با تنش شوری مواجه می‌شود، شوری باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید و تخریب تمامیت غشا می‌شود، این پدیده به‌دلیل تولید مقادیر زیاد گونه‌های فعال اکسیژن است (Kaya, 2009). اسیدهای چرب غیراشباع از ترکیبات اصلی لیپیدی غشا هستند که به پراکسیداسیون حاصل از رادیکال‌های آزاد حساس هستند (Elkahoui, 2005). اندازه‌گیری سطح مالون دآلدهید تولیدشده در پراکسیداسیون لیپیدها، شاخص خوبی برای اندازه‌گیری میزان آسیب اکسیداتیو وارد شده به غشا است (Zhang, 2014). افزایش در مقدار مالون دآلدهید تحت تنش شوری به‌علت افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها است، بنابراین تنش شوری احتمالاً موجب اختلال در فرایند انتقال الکترون

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021



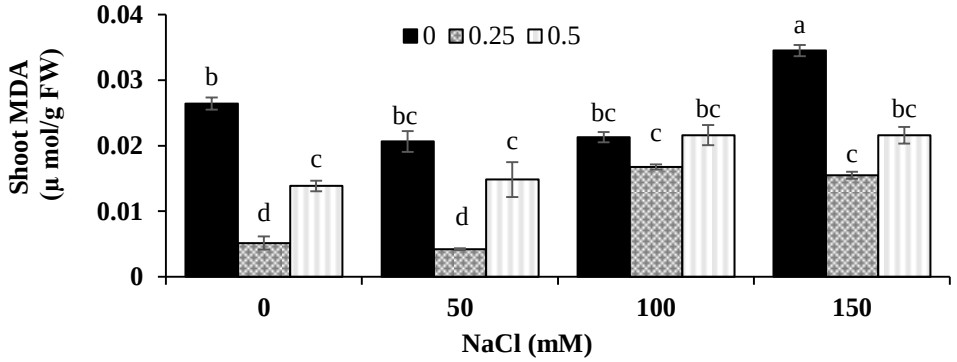
شکل ۱- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر وزن خشک اندام هوایی (A) و ریشه (B) تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌هابا آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. $P < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.



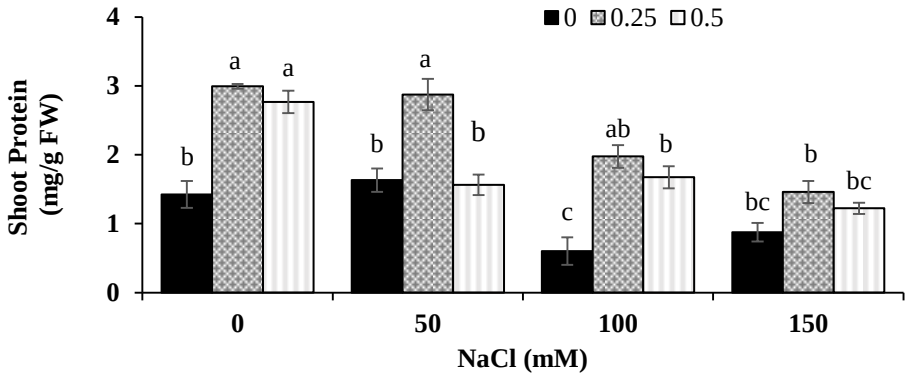
شکل ۲- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئیدها (D) تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. $P < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.

میتوکندری و کلروپلاست شده و با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، موجب آسیب اکسیداتیو غشا و درنتیجه افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون دآلدهید در گیاهان می‌گردد (Demiral and Turkan, 2005). اثر ملاتونین بر

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021



شکل ۳- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر مقدار مالون دی‌آلدهید اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌هابا آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. P<0.05 به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.

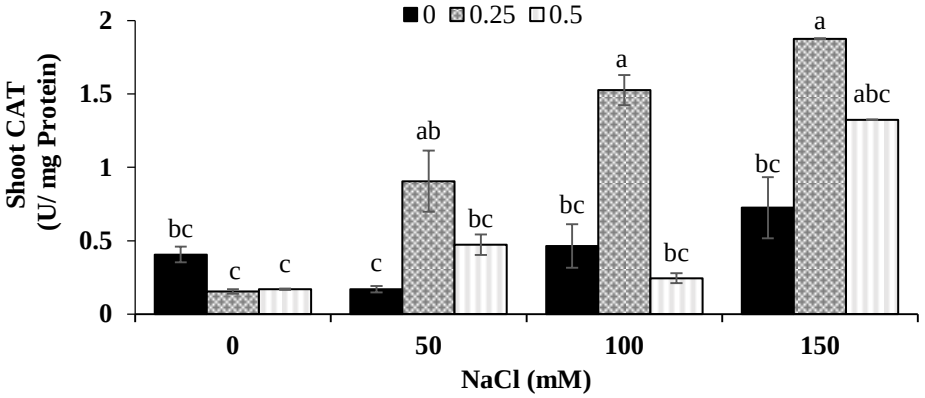


شکل ٤- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر مقدار پروتئین اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. P<0.05 به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.

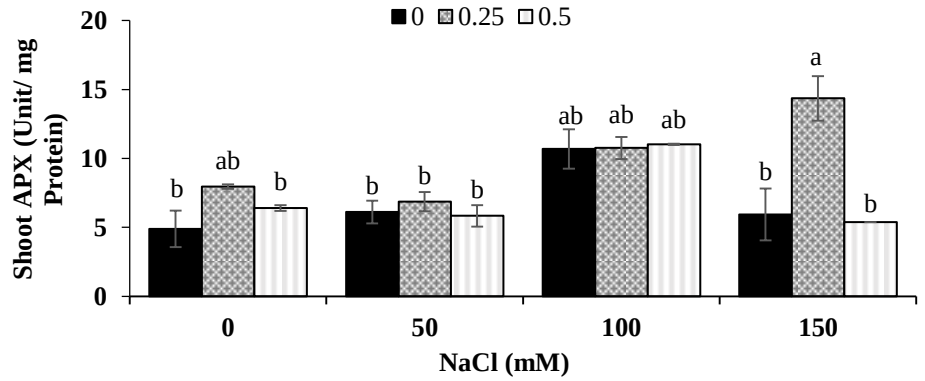
کاهش مقدار مالون دآلدهید، تأکید بر نقش محافظتی آن از غشا در برابر آسیب‌های ناشی از تنش شوری دارد. بنابراین ملاتونین موجب کاهش نفوذپذیری غشا و پراکسیداسیون لیپیدها و حفظ یکپارچگی و عملکرد غشا در برابر تنش شوری می‌شود (Zhang, 2014). بنابراین به‌نظر می‌رسد که ملاتونین روند تشکیل مالون دآلدهید را در شرایط تنش تحت کنترل خود در می‌آورده و سطح آن را کاهش می‌دهد که این احتمالاً به‌علت اثر ملاتونین بر آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز و گایاکول پراکسیداز سیستم آنتی‌اکسیدانی است.

با توجه به شکل ٤ تنش شوری منجر به کاهش مقدار پروتئین برگ نسبت به گیاهچه‌های شاهد شده است. کاربرد خارجی ملاتونین در غلظت ۰/۲۵ میکرومولار در گیاهان تحت تنش شوری در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار منجر به افزایش مقدار پروتئین گردید. کاهش مقدار پروتئین یک پدیده متداول در تنش‌هایی نظیر شوری و خشکی است که تنش شوری موجب سرکوب سنتز برخی پروتئین‌ها و القای سنتز پروتئین‌های جدید می‌گردد (Xd, 2010). کاهش پروتئین در غلظت‌های بالای سدیم کلرید ممکن است به‌دلیل هیدرولیز یا کاهش سنتز پروتئین‌ها باشد (Cherian and Reddy, 2003). شوری تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال را القا می‌کند که می‌تواند منجر به آسیب‌های اکسیداتیو به ترکیبات مختلف نظیر لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شود (Hawrylak, 2009). از آن جایی که ملاتونین مقاومت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان در معرض تنش‌های مختلف را

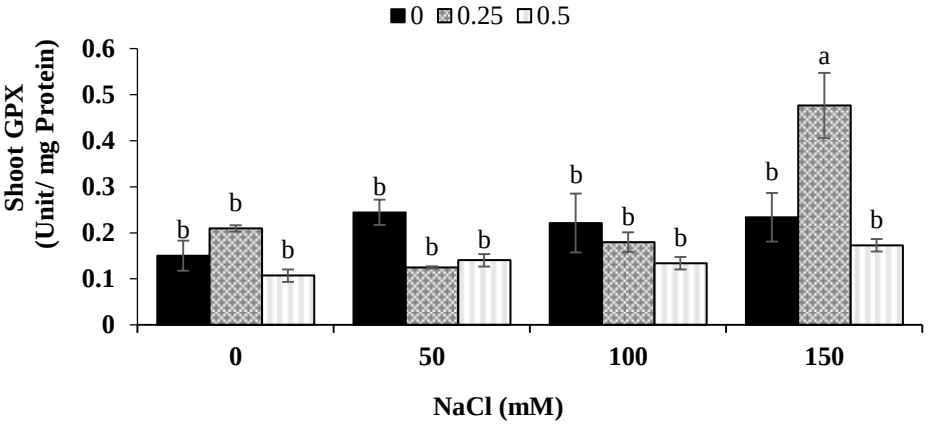
Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021



شکل ۵- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر فعالیت آنزیم کاتالاز اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. P<0.05 به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.



شکل ٦- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر فعالیت آنزیم آسکوربات پر اکسیداز اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. P<0.05 به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.



شکل ۷- اثر تیمار ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SD است. P<0.05 به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان در معرض تنش‌های مختلف را افزایش می‌دهد، می‌تواند گونه‌های فعال اکسیژن را جذب کند (Chaoqiang, 2016). بنابراین شاید یکی از دلایل افزایش محتوای پروتئین پس از کاربرد ملاتونین در شرایط تنش، به‌دلیل نقش مؤثر ملاتونین در بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از واردشدن آسیب‌های اکسیداتیو به پروتئین‌ها و تخریب آنها باشد.

در پژوهش حاضر تنش شوری منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید (شکل ۵) و پیش‌تیمار ملاتونین در غلظت ۰/۲۵ میکرومولار سبب افزایش فعالیت کاتالاز شد، اما تحت تنش شوری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٦ و ۷) و تحت شوری ۱۵۰ میلی‌مولار، کاربرد بیرونی ۰/۲۵ میکرومولار ملاتونین سبب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها گردید. در تنش شوری تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن به‌هم می‌خورد درنتیجه موجب تجمع رادیکال‌های آزاد و آسیب سلولی می‌شود (Foyer and Noctor, 2000). برای کاهش استرس اکسیداتیو، گیاهان دارای سیستم‌های دفاعی آنتی-اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای جاروب‌کردن گونه-های فعال اکسیژن هستند (Choi, 2011). استفاده از ملاتونین سبب مهار تجمع H_2O_2 می‌شود که ممکن است درنتیجه تأثیر مستقیم آن بر روی مهار گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و پراکسیداز باشد، همچنین ملاتونین به‌عنوان یک مولکول جاذب رادیکال‌های آزاد و یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی شناخته شده است (شکل ۵، ٦ و ۷) (Reiter, 2007).

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان‌دهنده توانایی ملاتونین در افزایش مقاومت گیاه جعفری گل درشت در برابر تنش شوری است. ملاتونین با فعال‌سازی آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان، حفظ رنگیزه‌های فتوسنتزی و غشا می‌تواند در کاهش اثرات مخرب ناشی از تنش شوری نقش داشته باشد.

منابع

قاسمی قهساره، م. و کافی، م. (۱۳۹۰) گلکاری علمی و عملی. جلد اول. انتشارات گلبن.

Aranao, M. and Hernandez-Ruiz, J. (2007) Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. Journal Pineal Reserch 42: 147-152.

Arbona, V. M. (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. International Journal of Molecular Sciences 14: 4885-4911.

Bradford, M. M. (1976) Arapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry 72: 248-254.

Carrillo, A. R. (2013) Melatonin: buffering the immune system. International Journal of Molecular Sciences 14: 8638-8683.

Chaoqiang, J. Q. (2016) Melatonin improves antioxidant capacity and ion homeostasis and enhances salt tolerance in maize seedlings. Acta Physiologiae Plantarum 20: 38-82.

Cherian, S. and Reddy, M. P. (2003) Evaluation of NaCl tolerance in the callus cultures of *Suaeda nudiflora* Moq. Biologia Plantarum 46: 193-198.

Choi, S. D. (2011) Melatonin protectsagainst oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membranemelatonin receptors. Journal of Pineal Research 51: 94-103.

Dong, Y. J. (2014) Effect of exogenous nitric oxide on growth of cotton seedling under NaCl stress. Journal Soil and Science Plant Nutrition 141: 1-13.

Dawood, M. and EL-Awad, M. (2014) Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L. plantsvia seed primin with melatonin. Acta Biologica Colombiana 20: 223-235.

Demiral, T. and Turkan, B. (2005) Comparativelipid peroxidation, antioxidant defense systemand proline content in root of two rice cultivarsdiffering in salt tolerance. Environmentaland Experimental Botany 53: 247-257.

Elkahoui, S. H. (2005) Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. Plant Science 168: 607-613.

Foyer, C. and Noctor, G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis:regulation and signalling. Acta Biologica Colombiana 146: 359-388.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

Gill, S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stresstolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Gomez-Pando, L. R., Alvarez-Castro, R. and Eguiluz-de la Barra, A. (2010) Effect of Salt Stress on peruvian germplasm of *Chenopodium quinoa* Willd.: A Promising Crop. Journal of agronomy and crop sciences 196: 391-396

Hardeland, R. R. (2012) The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. Neurosci Biobehav Rev 17: 347-357.

Hasanuzzaman, M. N. (2013) Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigatesalt-induced damages. Springer 25-87.

Hawrylak-Nowak, B. (2009) Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. Biological Trace Element Research 132: 259-269.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and satoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Ingram, J. and Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47: 377-403.

Jaleel, C. M. (2007) NaCl as physiologycal modulator of prolin metabolism and antioxidant potential in phylanthus amarus. Comptes Rendus Biologies 330: 806-813.

Karwani, G. and Sisodia, S. (2015) Tagetes erecta plant: Review with significant pharmacological activities. World Journal of Pharmaceutical Sciences 3: 1180-1183.

Kaya, C. A. (2009) The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on key growth parameters and fruit yield of pepper plants growth at high salinity. Scientia Horticulturae 121: 1-6.

Lakhdar, A. H. (2008) Application of municipal solid waste compost reduces the negative effects of saline water in (*Hordum maritimum*). Bioresource Technology 99: 7160-7167.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Method Enzymology 148: 350-382.

Manchanda, G. and Garg, N. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Acta Physiologiae Plantarum 30: 595-618

Marino, B. and Hernandez, A. (2013) Growh condition determine different melatonin levels in lupines albus. Journal of Pineal Research 55: 149-155.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach choloroplast. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Pratap Singh, V. and Prasad, S. (2015) Effect of salinity stress on plants and its tolerance. Environmental Science and Pollution Research 22: 4056-4075.

Parida, A. and Das, A. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324

Priyanka, D. S. (2013) A brief study on marigold (tagetes species) a review. International Research Journal.

Radi, A. F. (2013) Physiological and biochemical responses of salt-tolerant and salt-sensitive wheat and bean cultivars to salinity. Journal of Biology and Earth Sciences 3: 72-88.

Reiter, R. T. (2007) Melatonin and itsmetabolites: new findings regarding their production and theirradical scavenging actions. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 54: 1-9.

Sairam, R. and Srivastava, G. (2002) Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions oftolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science 162: 897-904.

Santos, C. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis anddegradation by salt stress in sunflower leaves. Scient Horticul 103: 93-99.

Tan, D. X. (2013) Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. Journal of Pineal Research 54: 127-138.

Tan, D. X. (2007) Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. Plant Signaling and Behavior 2: 514-516.

XD, X. S. (2010) Effects of exogenousmelatonin on active oxygen metabolism of cucumberseedlings under high temperature stress.Ying Yong ShengTai Xue Bao 21: 1295-1300.

Zhang, N. S. (2015) Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. Environmental and Experimental Botany 66: 647-56.

Zhang, H. Z. (2014) Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of Pineal Research 57: 269-279.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:04 IRST on Saturday December 4th 2021

Effect of Melatonin Pretreatment on some physiological parameters and reduction of oxidative stress in *Tagetes erecta* seedlings under salt stress

Mahboobeh zare zeinali, fatemeh nasibi *, Khosro Manuchehri Kalantari and Effat Ahmadi Mousavi

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman
(Received: 31/01/2018, Accepted: 26/06/2019)

Abstract

Salinity is one of the most important environmental stresses which affects the growth of plants. Most of the plants are sensitive to salt stress at the seedling stage, thus growth in salt-water accompanies with problems. Various agronomic and physiological practices (treatments) are applied to minimize the adverse effects of salinity on plant growth, and using plant growth regulator is one of them. This study was conducted to investigate the effect of melatonin on the resistance of Tagetes erecta seedlings to salinity. In order to evaluate the effect of different levels of salinity on early growth of Tagetes erecta seedlings, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Experimental treatments consisted of two levels of 0.25 and 0.5 µM of melatonin, and four different levels of saline solution containing pure sodium chloride at concentrations of 0, 50, 100 and 150 mM. In this research, the effect of pretreatment with two concentrations of Melatonin was investigated on the growth biochemical and antioxidant parameters of Tagetes erecta under salt stress. In some measured parameters, such as chlorophyll and protein content, pretreatment with 0.25 µM Melatonin 50, 100 and 150 mM NaCl was effective. Pretreatment with melatonin at both concentrations 0.25 and 0.5 µM in seedlings which were under salinity stress, reduced MDA and other aldehydes. Salinity stress increased activity of catalase in leaves, while had no effect on the ascorbate and guaiacol peroxidaes activity. Pretreatment of seedlings with melatonin at concentrations 0.25 µM increased the catalase activity under salinity condition. However, pretreatment with melatonin only at concentrations 0.25 µM increased ascorbate and guaiacol peroxidaes activity in salinity condition. The results indicated that Tagetes erecta pretreatment by melatonin increased seedlings tolerance under salt stress.

Key Words: Salt stress, Melatonin, Tagetes erecta, Antioxidant enzymes

Corresponding author, Email: Nasibi2002@yahoo.com