

اثر ملاتونین بر شاخص‌های رشد و ترکیبات فنلی تحت تنش شوری کشت در شیشه در گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

شبنم جلیلی^۱، علی اکبر احسانپور^{۱*} و سید مرتضی جوادی راد^۲

^۱ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری

^۲ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴

چکیده

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای در کشور می‌باشد که میزان و کیفیت تولید آن با تنش شوری محدود می‌گردد. ملاتونین بعنوان یک ایندول آمین در تحقیق حاضر با غلظت‌های ۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار به‌مراه غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک بمنظور بررسی نقش ملاتونین در تحمل به شوری گیاهچه‌های یونجه پس از سه هفته رشد در شرایط کشت بافت استفاده شد، با افزایش غلظت شوری میزان رشد و نیز قدرت آنتی‌اکسیدانی و سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدان کاهش یافت. ملاتونین، سبب افزایش وزن تر، وزن خشک، طول ساقه، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان کاروتنوئید و همچنین ترکیبات فنلی از جمله فنل کل، فلاونوئید و نیز دو آنزیم مهم با خاصیت آنتی‌اکسیدان در مسیر سنتز پلی‌فنل‌ها PAL و TAL گردید. بنابراین به نظر می‌رسد ملاتونین با کاهش عوامل سرکوبگر رشد از جمله پاکسازی ROS و در نتیجه کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات دفاعی گیاه از جمله ترکیبات فنلی و از طرف دیگر افزایش ظرفیت و توان فتوسنتزی گیاه با حفظ رنگیزه‌های فتوسنتزی در افزایش تحمل به شوری ایفای نقش نموده است.

واژه‌های کلیدی: ملاتونین، تنش شوری، یونجه، کشت بافت، ترکیبات فنلی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰، پست الکترونیکی: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

مقدمه

و اکوتیپ‌های مختلف یونجه نشان‌دهنده پتانسیل بسیار کارآمد برای شناسایی انواع متحمل در برابر تنش‌های مختلف به ویژه تنش شوری می‌باشد (۴). عوامل محیطی مختلف سبب افزایش در متابولیسم فنیل پروپانوئید در گیاه می‌شود. ترکیبات فنلی دارای فعالیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها و ضد میکروبی می‌باشند (۳۹). فنل‌ها را می‌توان در پنج زیرگروه شامل: کومارین‌ها، لیگنین‌ها، فلاونوئیدها، فنولیک اسیدها و تانن‌ها دسته‌بندی نمود (۱۴). فلاونوئیدها فراوان‌ترین ترکیب از پلی‌فنل‌ها در رژیم غذایی انسان است که ساختار پایه‌ای آنها از هسته

در میان تنش‌های محیطی تنش شوری یکی از مخرب‌ترین تنش‌های غیر زیستی می‌باشد که سبب تجمع زیاد نمک در اندام‌های گیاه و به دنبال آن تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن، ایجاد سمیت، کاهش تقسیم سلولی، عدم تعادل یونی، کاهش جذب آب، اختلال در جذب عناصر، بسته شدن جزئی یا کلی روزنه‌ها و کاهش عملکرد فتوسنتز و کاهش رشد گیاه می‌شود (۴۴). یونجه بعنوان گیاه علوفه‌ای بدلیل کیفیت بالای غذایی و درصد پروتئین بالا، وجود اکوتیپ‌های متنوع برای مناطق مختلف و ارتقای سطح حاصلخیزی خاک با تثبیت ازت هوا از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. وجود ژنوتیپ‌ها

از پیکوگرم تا میکروگرم وجود دارد. بعنوان یک آنتی اکسیدان بسیار قوی در برابر انواع گونه‌های واکنشگر اکسیژن و نیتروژن فعالیت می‌کند (۲۵). Arnao و همکارانش بیان داشتند، ملاتونین می‌تواند سبب افزایش ۳-۴ برابری میزان رشد در بخش هوایی و نیز ریشه گردد (۵). از طرف دیگر، در گیاهان *Helianthus* (۲۵) و *Zea mays* (۱۷) ملاتونین سبب بهبود شرایط رشد تحت تنش شوری گردید. در بذرهاى گیاه *Vigna radiate* L. تیمار شده با ملاتونین، ۲۰٪ افزایش رشد طول ریشه و همچنین کمترین از هم گسیختگی ساختارهای سلولی تحت تنش سرما را نشان داد (۳۶). اثرات مشابه دیگری نیز، تحت تنش اسمزی در خیار گزارش شده است. کاربرد ملاتونین در *Mung bean* موجب افزایش تجمع ترکیبات فنلی و پرولین پس از ۲ روز تنش سرمایی گردید (۳۷). اگر چه اثر مثبت ملاتونین بر افزایش مقاومت در برابر برخی تنش‌ها پیش از این نیز گزارش شده است، اما، با توجه به اطلاعات اندک مبنی بر اثر ملاتونین بر ترکیبات فنلی و بویژه آنزیم‌های موثر در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها بخصوص در شرایط کنترل شده در کشت بافت تحقیقات بسیار محدود انجام گردیده است لذا هدف از پژوهش حاضر نیز مطالعه اثر این هورمون بر فاکتورهای رشد، محتوی کلروفیل و برخی از ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های TAL و PAL بعنوان مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز این ترکیبات در شرایط کشت در شیشه است. این پژوهش در شناسایی بهتر نحوه عملکرد ملاتونین در گیاه یونجه بعنوان یک گیاه مدل برای مقابله با تنش شوری از طریق تغییرات مسیر ترکیبات فنلی و نحوه اثر ملاتونین بر این ترکیبات دارای اهمیت می‌باشد.

مواد و روشها

کشت بذر و تیمار گیاهچه یونجه با ملاتونین و شوری:
بذر گونه زراعی یونجه (*Medicago sativa*) رقم اصفهانی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. ابتدا بذرها به مدت

فلاون با ۱۵ اتم کربن که در سه حلقه نظم یافته، تشکیل شده است (۱۵). گیاهان حاوی ترکیبات فلاونوئیدی، فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهند که عمدتاً مربوط به توانایی این ترکیبات به انتقال الکترون یا اتم‌های هیدروژن بوده و به همین دلیل از نظر دارویی حائز اهمیت می‌باشند. آنتوسیانین‌ها در فعالیت آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها شرکت می‌کنند و به گستردگی در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند (۲۴). در شرایط استرس، متابولیسم ثانویه گیاه دچار تغییر شده و بمنظور مقابله با تنش و ایجاد تعادل فیزیکی در گیاه مکانیسم دفاعی گیاه فعال می‌گردد و فعالیت برخی آنزیمها که به آنها آنزیم‌های دفاعی نیز گفته می‌شود دچار تغییر می‌گردد. آنزیم PAL (Phenyl alanine ammonio lyase) و TAL (Tyrosine ammonio lyase) آنزیم‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانویدها هستند. آنزیم PAL اولین آنزیم مسیر فنیل پروپانویدها که واکنش حذف غیر اکسیداتیو گروه آمین از ال- فنیل آلانین را به ترانس سینامیک اسید کاتالیز می‌کند این واکنش منجر به تولید محدوده وسیعی از فنیل پروپانویدهای مشتق شده از محصولات ثانویه در گیاهان می‌گردد. آنزیم TAL کاتالیز کننده تیروزین به P-کوماریک اسید می‌باشد (۳۳).

ملاتونین یا N-استیل متوکسی تریپتامین، اولین بار در عصاره پنبه آل گاو یافت شد. شناسایی ملاتونین در گیاهان عالی اولین بار بوسیله ی Van Tassel و O'Neill در سال ۱۹۹۳ صورت گرفت. محققان بیان داشتند، مسیر بیوسنتزی ملاتونین در گیاهان و جانوران مشابه و L-تریپتوفان پیش ماده سنتز آن نیز در هر دو یکسان است. مقدار ملاتونین در گیاهان بدلیل شرایط محیطی مختلف (به ویژه تحت شرایط استرس)، مراحل تکامل گیاه و یا روش‌های مختلف شناسایی و اندازه‌گیری نه فقط از یک گونه به گونه دیگر، بلکه در وارته‌های یک گونه نیز متفاوت می‌باشد (۶) این ترکیب در بسیاری از بافت‌های گیاه از جمله: ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر در غلظت‌های مختلف

بر روی یخ سائیده شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در g ۵۰۰۰ سانتریفیوژگردید. جذب محلول به دست آمده با دستگاه Multi-mode reader در سه طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر بترتیب برای کلروفیل a ، b و کاروتنوئید اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (۲۳)

$$Chla = (12.25 A663.2) - (2.79 A646.8)$$

$$Chlb = (21.21 A646.8) - (5.1 A663.2)$$

$$Chla+b = chla + chlb$$

$$Car = (1000A470 - 1.8 chla - 85.02 chlb) / 198$$

اندازه‌گیری فنل کل و فلاونوئید: بمنظور استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، ۱۰۰ میلی گرم بافت تازه برگ با ۵ میلی لیتر متانول ۸۰٪ هموزن گردید. میزان فنل کل عصاره با استفاده از فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۱/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتیو ۱۰٪، ۱ میلی لیتر سدیم کربنات ۷/۵٪ و سپس ۰/۵ میلی لیتر از عصاره گیاهی به آن افزوده شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری، سپس جذب عصاره در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فنل کل به وسیله ی گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۳۵).

میزان فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی با استفاده از کلرید آلومینیوم صورت گرفت. بدین منظور ۰/۱ میلی لیتر عصاره متانولی، ۰/۲ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۰/۲ میلی لیتر پتاسیم استات ۱ مولار با یکدیگر ترکیب و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از آن، جذب در ۴۱۵ نانومتر قرائت شد (۱۱).

اندازه‌گیری آنتوسیانین: ابتدا از برگ‌های یونجه عصاره متانولی تهیه شد (نسبت ۹۹ به ۱ متانول و کلریدریک اسید در ۴ درجه سانتیگراد). سپس، جذب نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر خوانده و میزان آنتوسیانین‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد (۴۰).

۳ دقیقه با محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد حجمی قرار گرفت و در پایان، با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شد. در مرحله بعد، بمنظور جوانه زنی، بذور در محیط آب به همراه آگار قرار گرفت و پس از جوانه زنی (بعد از ۲ روز) به محیط کشت MS (۳۰) که حاوی غلظت های ۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین (Solarbio Life Sciences، پکن، چین) و همچنین غلظت های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک انتقال داده شد. تیمار بدون نمک و ملاتونین بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد (لازم به ذکر است که از میان آزمایش‌ها اولیه از بین دامنه صفر تا ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بهترین غلظت‌ها انتخاب گردید). کلیه کشت‌ها در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، فتوپریود نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور حدود ۴۵ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه رشد داده شد. پس از ۳ هفته پارامترهای رشد، میزان کلروفیل و کارتنوئید، فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL اندازه‌گیری شد. کلیه آزمایشات با حداقل ۳ تکرار انجام شد و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن و در سطح $P \leq 0.05$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: پس از کشت گیاهان در تیمارهای مختلف، نمونه برداری جهت اندازه‌گیری شاخص‌هایی مانند وزن تر، وزن خشک، طول اندام هوایی و تعداد برگ در هر تکرار صورت گرفت. وزن تر هر یک از نمونه‌ها پس از برداشت سریعاً با استفاده از ترازو وزن گردید و سپس بمنظور تعیین وزن خشک، هر نمونه به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه ی گیاه با استفاده از استون ۸۰ درصد در تاریکی

فرمول ۱:

$$A = \epsilon bc$$

A = میزان جذب خوانده شده

ε = ضریب خاموشی

b = عرض کوئت (۱ سانتی متر)

c = غلظت بر حسب میلی مول

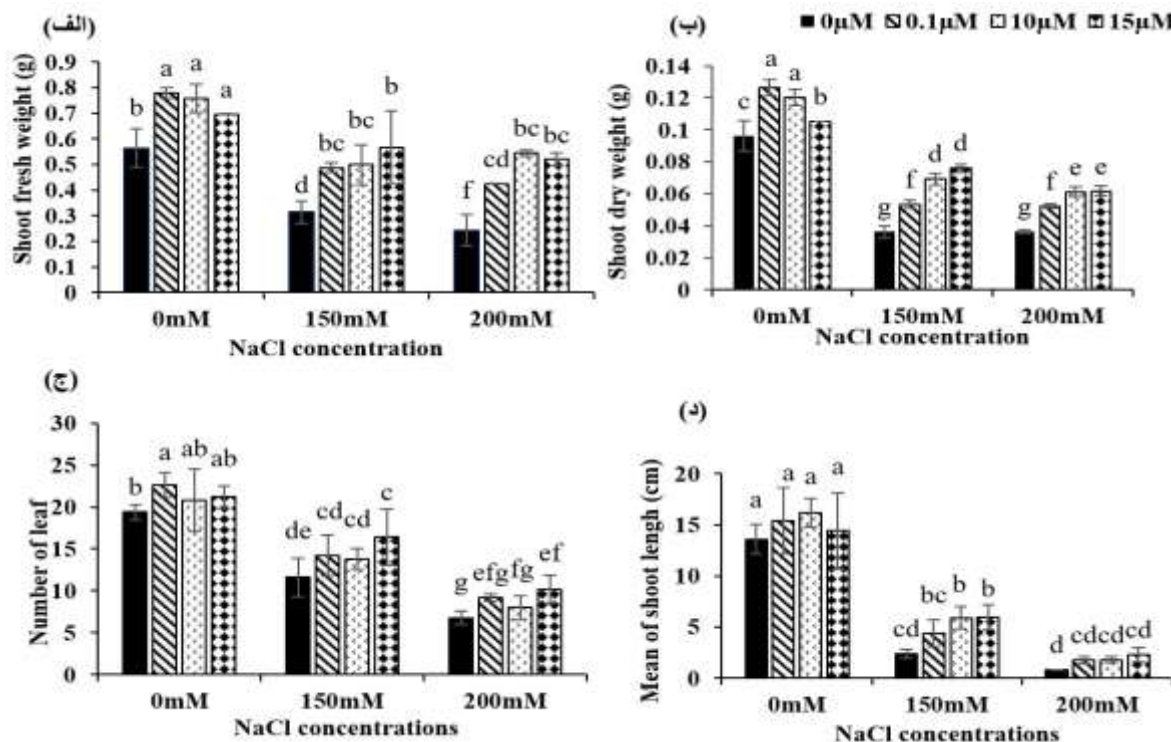
نتایج

تأثیر تیمار ملاتونین و شوری بر پارامترهای رشد: همان گونه که در شکل ۱ مشخص است، وزن تر و خشک ساقه در اثر افزایش غلظت شوری کاهش یافت. به گونه ای که وزن تر در نمونه شاهد از ۰/۵۶ گرم به ۰/۳۱ و ۰/۲۴ گرم بترتیب در گیاهچه های رشد یافته تحت شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک کاهش یافت (شکل ۱- الف). همچنین وزن خشک قسمت هوایی اندازه گیری شده در نمونه شاهد از ۰/۰۹۶ گرم به ۰/۰۳۶ گرم در شوری ۲۰۰ میلی مولار نمک کاهش یافت. نتایج نشان داد که تیمار غلظت های متفاوت ملاتونین سبب افزایش معنی دار و چشمگیر وزن تر و وزن خشک در نمونه بدون نمک گردید. ملاتونین در گیاهچه های تحت تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl سبب افزایش معنی دار وزن تر و خشک شد که همین امر سبب بهبود رشد و نمو یونجه تحت تنش شوری گردید. تنش شوری سبب کاهش تعداد برگ در نمونه شاهد از ۱۹ عدد به ۶ عدد برگ در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک شد. غلظت ۱۵ میکرومولار ملاتونین، سبب افزایش معنی دار تعداد برگ در گیاهچه های تحت تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک نسبت به شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک بدون ملاتونین گردید (شکل ۱- ج). با توجه به شکل ۱- د، در میانگین طول ساقه، بین غلظت های متفاوت ملاتونین و نمونه شاهد تفاوتی مشاهده نشد اما در شوری ۱۵۰ میلی مولار نمک، غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی داری را با ۱۵۰ میلی مولار نمک (بدون ملاتونین) نشان داد، اما در شوری ۲۰۰ میلی مولار نمک، ملاتونین اثر معنی داری بر میانگین طول ساقه ی یونجه نشان نداد.

تأثیر تیمار ملاتونین و شوری بر رنگیزه های فتوسنتزی: بمنظور بررسی اثر ملاتونین در کاهش آسیب های رشدی تنش شوری، میزان کلروفیل a, b، کلروفیل کل و کاروتنوئید اندازه گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAL: مقدار ۰/۳ گرم بافت برگ یونجه را با ۴ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار (pH:8/5) که محتوی ۲-مرکاپتواتانول (۱۴/۴ میلی مولار) و ۵٪ pvp بود هموزن گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتیفریوژ شد. عصاره حاصل جهت سنجش فعالیت آنزیم های PAL و TAL با استفاده از Multi-mode reader استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل: ۵/۵ میکرومولار L-تیروزین، ۵۰۰ میکرو مولار بافر تریس با اسیدیته برابر ۸ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی برگ در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر بود. پس از ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد واکنش تبدیل تیروزین به کوماریک اسید با اضافه نمودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد و در طول موج ۳۳۳ نانومتر فعالیت آنزیم TAL اندازه گیری شد (۹).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL از عصاره آنزیمی توضیح داده شده در بالا، استفاده گردید. برای تخمین فعالیت آنزیم، ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل بافر واکنش (۵۰۰ میکرومولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸) که حاوی ۶ میکرومول فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در نهایت، به این محلول مقدار ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید با غلظت ۵ نرمال اضافه شد تا واکنش تولید سینامیک اسید از فنیل آلانین متوقف شود. در پایان، فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس میزان تولید سینامیک اسید بر حسب نانومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (۹).

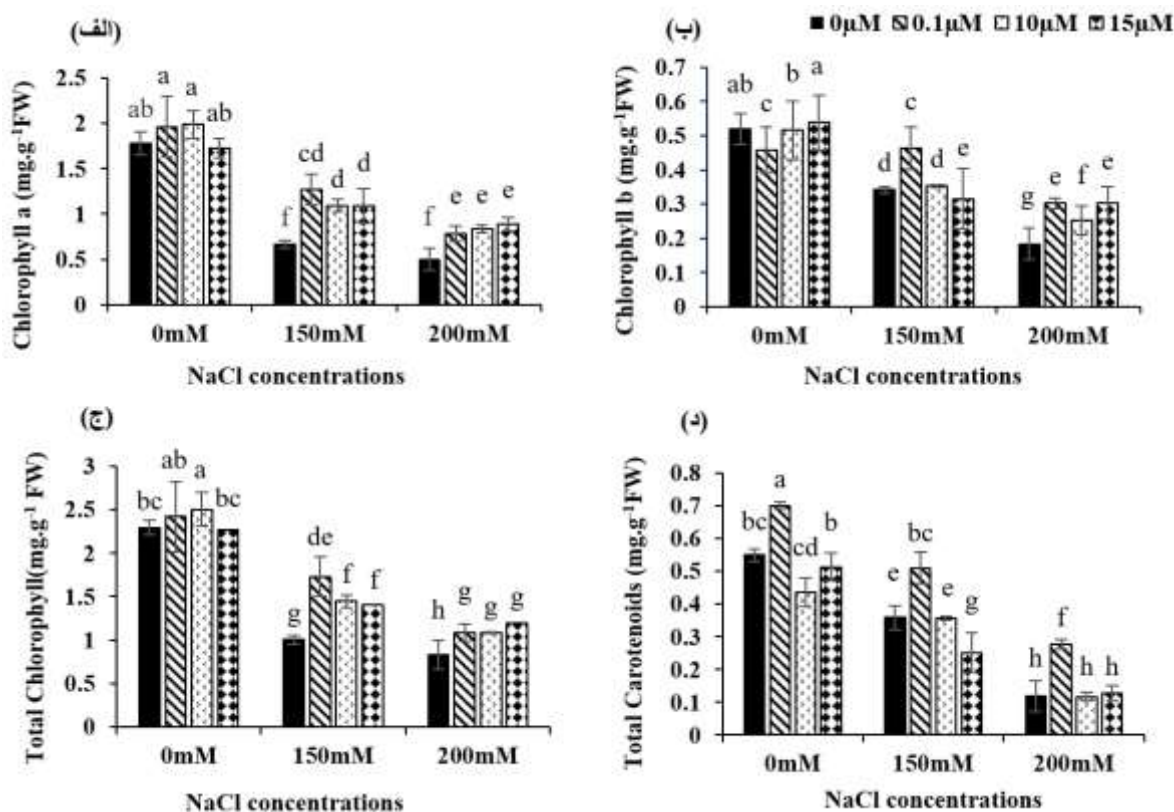


شکل ۱- وزن تر (الف)، وزن خشک (ب)، تعداد برگ (ج)، میانگین طول ساقه (د) در گیاهچه های یونجه تحت تیمار ملاتونین و نمک. داده‌ها میانگین چهار تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است. ($p < 0.05$)

شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک کاهش یافت. کاربرد ملاتونین بعنوان یک تنظیم کننده مثبت رشد و یک آنتی اکسیدان سبب افزایش مقدار این رنگیزه تحت تنش شوری شد و غلظت ۰/۱ میکرومولار ملاتونین بهترین و موثرترین غلظت در افزایش این رنگیزه آنتی اکسیدان در شرایط بدون شوری و حتی در غلظت های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک می باشد.

تأثیر تیمار ملاتونین و شوری بر فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین: تنش شوری سبب کاهش معنی دار ترکیبات فنلی از جمله محتوی آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید گردید. تیمار ملاتونین تأثیر قابل توجهی بر میزان آنتوسیانین نداشت و اختلاف معنی داری را با نمونه شاهد و تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک بدون ملاتونین و حتی ما بین غلظت های دیگر ملاتونین نشان نداد (شکل ۳- الف).

بر طبق نتایج بدست آمده در شکل ۳، با افزایش غلظت شوری میزان رنگیزه های فتوسنتزی در برگ گیاهچه یونجه بطور معنی داری کاهش یافت. غلظت های ۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین سبب افزایش قابل توجهی در میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل در گیاهچه های تحت شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک نسبت به گیاهچه هایی که فقط تحت تنش شوری بدون ملاتونین گردید. به نظر می رسد که تیمار ۰/۱ میکرومولار ملاتونین موثرترین غلظت در کاهش اثرات شوری و افزایش رنگیزه های فتوسنتزی بخصوص تحت غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک می باشد. طبق نتایج در شکل ۳- ج، این غلظت ملاتونین سبب افزایش ۷۲٪ محتوی کلروفیل کل در غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک گردید. کاروتنوئید بعنوان یک رنگیزه آنتی اکسیدان در گیاهچه یونجه با افزایش غلظت شوری کاهش معنی داری را نشان داد بطوری که در نمونه شاهد از ۵/۸ میلیگرم بر گرم به ۳/۵ و ۱/۱ میلیگرم بر گرم برترتیب در



شکل ۲- میزان کلروفیل *a* (الف)، کلروفیل *b* (ب)، کلروفیل کل (ج) و کاروتنوئید (د) در گیاهچه های یونجه تحت تیمار ملاتونین و شوری. داده‌ها میانگین چهار تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($p < 0.05$).

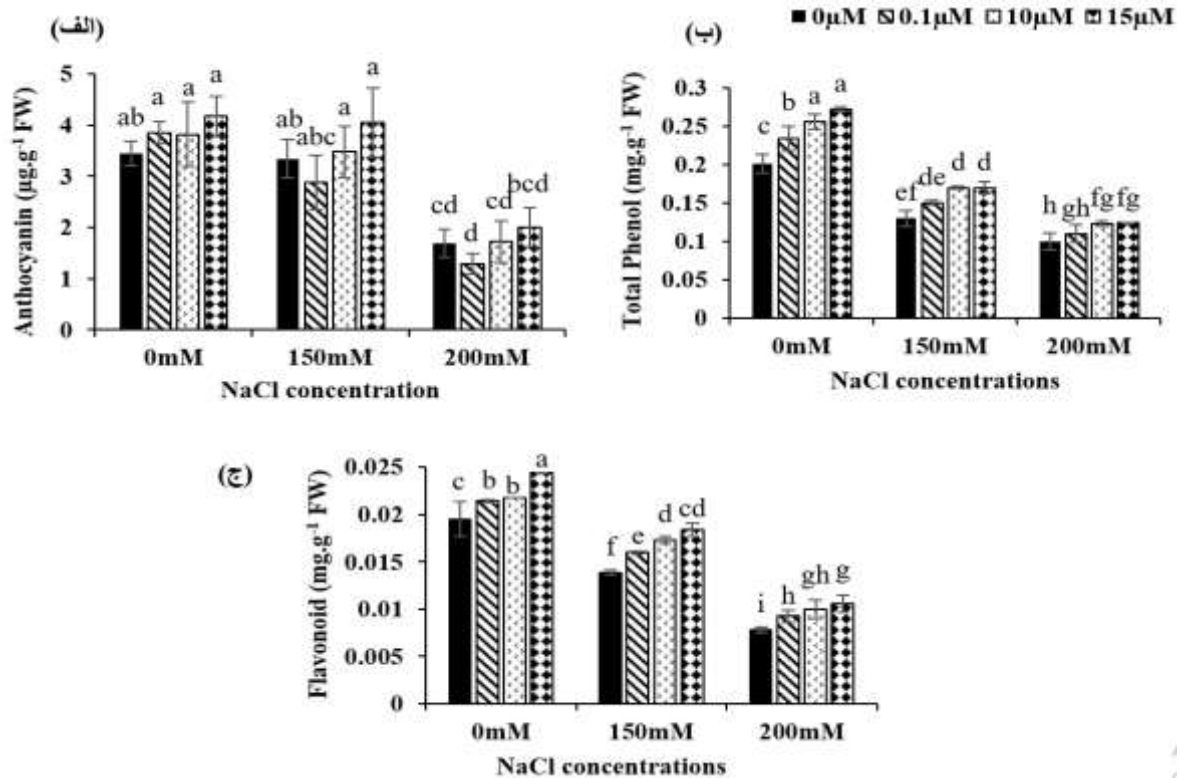
مولار نمک ۰.۴۴٪ نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. افزایش فعالیت چشمگیر آنزیم PAL در گیاهچه های تیمار شده با ملاتونین در محیط بدون شوری کاملاً مشخص است. همچنین گیاهچه های تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین همراه با ۱۵۰ میلی مولار نمک برترتیب ۰.۳۴٪ و ۰.۳۹٪ نسبت به گیاهچه های تیمار شده فقط با شوری ۱۵۰ میلی مولار نمک افزایش فعالیت آنزیم را نشان داد و از طرف دیگر ۱۵ میکرومولار ملاتونین همراه با غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک با افزایش ۲۸ درصدی فعالیت آنزیم PAL نسبت به گیاهچه های تیمار شده فقط با شوری ۲۰۰ میلی مولار نیز تفاوت معنی داری را نشان داد. فعالیت آنزیم TAL مطابق شکل ۵- ب، دقیقاً رفتاری مشابه فعالیت آنزیم PAL در گیاهچه های تحت تیمار ملاتونین و شوری نشان داد. فعالیت آنزیم TAL در ۱۵۰ میلی مولار نمک به‌مراه غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین

بر طبق نتایج بدست آمده در شکل ۳- ب، غلظت های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین بیشترین میزان فنل را در شرایط بدون شوری نسبت به نمونه شاهد و همچنین در ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک نشان داد. تیمار ملاتونین بدون شوری سبب افزایش معنی دار محتوی فلاونوئید گردید، به گونه ای که غلظت ۱۵ میکرومولار ملاتونین بیشترین میزان فلاونوئید را نسبت به نمونه شاهد و همچنین تیمار ۱۰ و ۰/۱ میکرومولار ملاتونین نشان داد. علاوه بر آن، همانند فنل کل، هر دو غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین تحت تنش شوری، موجب افزایش مقدار فلاونوئید نسبت به دیگر تیمارها گردید (شکل ۳- ج).

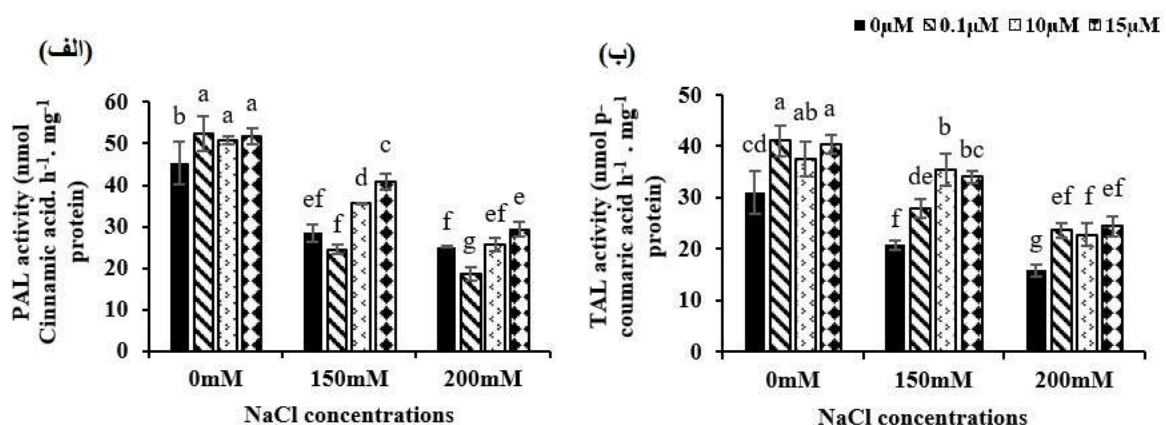
تاثیر تیمار ملاتونین و شوری بر فعالیت آنزیم PAL و TAL: بر طبق نتایج بدست آمده در شکل ۵ (الف و ب)، با افزایش غلظت شوری میزان فعالیت هر دو آنزیم کاهش یافت. فعالیت آنزیم PAL در غلظت ۲۰۰ میلی

در میان غلظت‌های مختلف ملاتونین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

۳۴٪ افزایش و در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، تیمار ملاتونین نیز موجب افزایش فعالیت آنزیم TAL گردید، اما



شکل ۳- میزان آنتوسیانین (الف)، فنل کل (ب) و فلاونوئید (ج) در گیاهچه‌های یونجه تحت تیمار ملاتونین و شوری. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($p < 0.05$)



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم PAL (الف) و میزان فعالیت آنزیم TAL (ب) در گیاهچه‌های یونجه تحت تیمار ملاتونین و شوری. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($p < 0.05$)

بحث

گیاهان می‌توانند ملاتونین خارجی را از محیط جذب کرده و درون بافت‌های خود ذخیره کنند. طبق نتایج بدست آمده عملکرد ملاتونین در تنظیم رشد و نمو گیاهان، حتی در گونه‌های گیاهی مشابه وابسته به غلظت می‌باشد (۴۱). در تحقیق حاضر تنش شوری بطور چشمگیری سبب کاهش فاکتورهای رشدی از جمله وزن تر و خشک، طول ساقه و تعداد برگ گیاهچه یونجه گردید. مشابه نتایج بدست آمده نیز اشرفی و همکاران در گیاه یونجه تحت تنش شوری بیان داشتند (۸)، کاهش طول ساقه با افزایش میزان غلظت نمک همراه است که میزان عملکرد اندام‌های هوایی کاهش یافت که احتمالاً بدلیل کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز در واحد سطح و مواد فتوسنتزی باشد. عملکرد محافظتی و بهبود عملکرد فتوسنتز و افزایش رشد توسط ملاتونین نیز در گیاهان *Malus domestica*، *Cucumis sativus L* گزارش شده است، بویژه افزایش کارکرد فتوسیستم دو در گیاهان تیمار شده با ملاتونین و در نتیجه افزایش رشد و نمو گیاه در شرایط تنش می‌شود. کاربرد ملاتونین سبب بهبود نرخ جوانه زنی، رشد و تولیدات گیاهی می‌شود (۵). کاهش ارتفاع گیاه و وزن خشک بدلیل رشد و نمو کندتر گیاه، ناشی از تنش اسمزی ایجاد شده توسط شوری است و یا ممکن است بدلیل بازدارندگی فتوسنتز از طریق اثرات مستقیم تنش شوری بر روی سیستم فتوسنتزی گیاه یونجه باشد. غالباً در تنش شوری انتقالات یونی تعادل اسمزی را بر هم زده و در نتیجه رشد را محدود می‌کند (۲۹) در خانواده گرامینه با افزایش تنش شوری غلظت یون‌های سدیم و کلر در ساقه زیاد و غلظت یون پتاسیم کاهش یافت در نتیجه رشد نسبی ساقه کاهش می‌یابد. پیامد شوری برای گیاهان عموماً کاهش رشد می‌باشد که بدلیل کاهش محتوی آب و فتوسنتز است چرا که با افزایش شوری پتانسیل آب موجود در محیط ریشه کاهش یافت و واکنش سریع و اولیه گیاه نسبت به تنش شوری نیز بستن

روزنه‌ها می‌باشد (۲۷) غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین بطور موثری سبب کاهش اثرات منفی شوری بر رشد گیاهچه یونجه شد. مطالعات متعددی در گیاهان *Glycyrrhiza uralensis*، *Lupinus albus L*، *Arabidopsis thaliana* (۳، ۷ و ۴۶) ملاتونین را بعنوان یک تنظیم‌کننده رشد نیز نشان داد. ملاتونین دارای ساختار ایندولی همانند IAA و نیز کارکردی مشابه اکسین در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد (۶). در تحقیق پیش رو تیمار ملاتونین احتمالاً بدلیل کاهش اثرات منفی ناشی از تنش شوری همانند بهبود فرایند فتوسنتز، بهبود روابط آبی، کاهش مقاومت روزنه‌ای، جذب یون‌ها و افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب بهبود رشد و افزایش وزن تر و خشک بعنوان دو عامل تعیین‌کننده در مقاومت به شوری گیاه گردید. مطابق با نتایج بدست آمده نیز در گیاهان *lupin* (۷) و *Brassica juncea* (۱۰) ملاتونین به صورت وابسته به غلظت سبب افزایش رشد و نمو گردید. همچنین Wei (۲۰۱۵) گزارش کرد که ملاتونین می‌تواند موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش رشد و یا باعث فعالیت مجدد ژن‌های سرکوب شده توسط تنش شوری گردد (۴۱). از طرف دیگر احتمالاً ملاتونین به واسطه اینتراکشن‌های هورمونی با دیگر تنظیم‌کنندگان گیاهی از جمله اکسین، جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید می‌تواند باعث افزایش شاخص‌های رشدی، افزایش فتوسنتز و افزایش بیوماس تحت تنش شوری شود.

در مطالعه حاضر میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمار شوری کاهش یافت اما تیمار شوری به‌مراه ملاتونین سبب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی گردید. مشابه با نتایج حاصل از این مطالعه در سایر گیاهان از جمله برنج، گندم و ذرت تنش شوری سبب کاهش میزان کلروفیل گردید (۴۴). کاهش سنتز کلروفیل احتمالاً بدلیل کاهش میزان ترکیب آمینووالریک اسید، کاهش تعداد کلروپلاست، تغییرات ساختار تیلاکوئیدها، غشا و تجزیه‌ی

مؤثرتر عمل کرده‌اند. بنابراین استفاده از غلظت بهینه ملاتونین در تنش شوری، سبب بهبود عملکرد روزنه‌ها همراه با بازگشایی مجدد آنها، می‌تواند مفید واقع گردد.

متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی را بعنوان آنتی‌اکسیدان و آنتی‌رادیکال در گیاهان در برابر آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو ایفا می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه مانند فنل‌ها، فلاونوئید و آنتوسیانین در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری در گیاهان سنتز می‌شوند. افزایش این ترکیبات در پاسخ به گونه‌های واکنشگر اکسیژن بسیار مهم است. قابلیت پاکسازی ROS ترکیبات فنولی در حالت مشابه حدود چهار برابر بیشتر از ویتامین E و C است. توانایی آن‌ها ناشی از واکنش‌پذیری بالا به صورت دهنده الکترون و پروتون، تثبیت و جابجایی الکترون‌های منفرد و نیز شلات کردن یون‌های فلزی قابل انتقال است (۲۶). بمنظور بررسی اثر ملاتونین بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تنش شوری در مطالعه حاضر، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز نیز اندازه‌گیری شد و تیمار ۰/۱ میکرومولار ملاتونین تاثیر قابل توجه و معنی‌داری در افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در طی تنش شوری داشت (داده‌ها قابل ارائه نمی‌باشد). افزایش میزان فنل‌ها و فلاونوئیدها در گیاهان تحت تنش شوری بسیار گزارش شده است بعنوان مثال در برگ‌های گیاه *Cakile maritima* (۲۰) و یا گیاه *Artichoke* (۳۱) سنتز این ترکیبات همراه با تیمار شوری افزایش یافت. در گیاهچه‌های یونجه همراه با افزایش غلظت نمک محتوی فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین کاهش یافت همچنین احتمالاً مقدار گونه‌های واکنشگر اکسیژن افزایش و موجب سرکوب سیستم دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود. گیاهان راهکارهای دفاعی متعددی برای مقابله با این چنین آسیب‌ها از جمله: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی همچون فنل‌ها، آسکوربیک اسید و گلوکاتایون دارند (۱۵). مطالعات اخیر به نقش ملاتونین در

آنها می‌باشد (۱۷). تجزیه کلروپلاست باعث افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از، و از طرف دیگر تنش شوری منجر به تولید ROS خواهد شد که سبب غیر فعال شدن آنزیم‌ها، تجزیه‌ی پروتئین‌های سلولی و کلروپلاستی و در نتیجه کاهش میزان کلروفیل می‌شود (۱۷). در گیاهچه‌های *Malus hupehensis* طول گیاهچه، تعداد برگ، میزان کلروفیل و نشت یونی در نمونه‌های تیمار شده با ملاتونین بسیار کمتر تحت اثرات مخرب ناشی از تنش شوری قرار گرفت از طرف دیگر، میزان هیدروژن پراکسید و ROS کاهش یافت اما آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز بدلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در طی تنش شوری افزایش یافت (۲۱). بسیاری از محققان بیان داشتند که ملاتونین از کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش محیطی ممانعت می‌کند (۳۴ و ۴۱). Chen و همکارانش (۲۰۱۸) گزارش کردند؛ افزایش ظرفیت فتوسنتز در گیاهچه‌های ذرت بدلیل میزان بالای کلروفیل، مبادلات روزنه‌ای، غلظت بالای CO₂ درون سلولی و در نهایت محافظت از کلروفیل در برابر استرس اکسیداتیو با اثر مستقیم آنتی‌اکسیدانی ملاتونین مرتبط می‌باشد (۱۳). بنابراین کاربرد ملاتونین باعث افزایش رنگیزه‌های مهم فتوسنتزی، محافظت و کاهش تجزیه کلروفیل، و در نتیجه بهبود فرآیند فتوسنتز در گیاهچه‌های یونجه تحت تیمار شوری شود. غلظت ۰/۱ میکرومولار ملاتونین بطور معنی‌داری سبب افزایش میزان کاروتنوئید بعنوان رنگیزه و یک آنتی‌اکسیدان مهم در یونجه گردید. طبق نتایج دیگر محققان، تیمار ملاتونین بر محتوی کاروتنوئید در گیاه *cherry* rootstock PHL-C هیچگونه اثری نداشت (۳۲). با استعمال ملاتونین رشد لوبیا رقم صدری بهبود یافت. غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافت (۱). نتایج نشان داد که ملاتونین در افزایش مقاومت گیاه لوبیا به شوری اثر معناداری داشته است و غلظت‌های پایین‌تر ملاتونین،

(C₄H₄-Hydroxylase) در کلم سفید و قرمز گردید. همچنین ملاتونین از طریق ایتراکشن با دیگر هورمون‌ها از جمله اتیلن و افزایش میزان ACC بر سنتز پلی فنول‌ها موثر است، چرا که تیمار ACC سبب افزایش بیان ژن PAL و STS (Stilbene Synthase) و در نتیجه افزایش ذخیره‌ی پلی فنول‌ها می‌شود (۴۳). بنابراین ملاتونین بطور غیر مستقیم با تاثیر بر ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب پاکسازی گونه‌های واکنشگر اکسیژن و بهبود رشد و محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی و نهایتاً فتوسنتز در گیاهچه‌های یونجه تحت تیمار شوری گشت. مکانیسم مقاومت به شوری در گیاهان در شرایط گوناگون، متفاوت می‌باشد، چرا که فرآیندهای مهم فیزیولوژیکی گیاهی به شوری حساس است. شناسایی مکانیزم‌های افزایش مقاومت در برابر تنش شوری همانند استفاده از ملاتونین بعنوان یک تنظیم‌کننده رشد با غلظت معین و مناسب، و نیز کاربرد تکنیک‌های موثر همچون کشت بافت، با هدف اصلاح و بهبود عملکرد گیاه در اراضی شور، از اهمیت بسزایی برخوردار است.

نتیجه‌گیری

ملاتونین بعنوان یک ترکیب جدید شناخته شده بعنوان یک تنظیم‌کننده رشد و آنتی‌اکسیدان، سبب افزایش مقاومت گیاهچه یونجه در برابر تنش شوری و آسیب‌های ناشی از آن و در نتیجه افزایش وزن تر و خشک، فاکتورهای رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی که در نهایت منجر به بهبود رشد و تکامل گیاه گردید. از طرف دیگر با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خود، سبب افزایش ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان PAL و TAL و در نتیجه افزایش قدرت پاکسازی ROS و تنظیم عملکرد گیاه و افزایش مقاومت در برابر آسیب‌های ایجاد شده تحت تنش شوری گردید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از

افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تنش‌های محیطی پرداخته است، برای مثال Wei (۲۰۱۹) بیان داشت کاربرد ملاتونین باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئید در سیب، تحت تنش شوری گردید (۴۲) و یا در گیاه *Thymus daenensis L.* اسپری ملاتونین بر روی برگ‌های آن سبب افزایش ترکیبات فنلی در طی تنش شوری شد (۱۰). شدت یافتن تنش اکسیداتیو سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی از جمله PAL و TAL می‌گردد و یا با کاهش اسید آمینه فنیل آلانین بعنوان پیش‌ماده سنتز این ترکیبات موجب کاهش سنتز آنها در گیاهچه یونجه گردد اما تیمار ملاتونین بعنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر و از طرف دیگر با ایجاد یک آبشار آنتی‌اکسیدان، از متابولیت‌های حاصل از واکنش‌های ملاتونین در برابر انواع ROS سبب افزایش میزان هر سه این ترکیبات و فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز آنها گردید. بر طبق نتایج دیگر محققان تیمار ملاتونین سبب افزایش میزان فنل در گیاهان *Vigna radiata* (۳۸) و *Vicia faba L.* (۱۶) شد، همچنین پیش‌تیمار برگ‌های کیوی با ملاتونین سبب افزایش میزان فلاونوئید و بویژه هشت ژن مربوط به سنتز آن از جمله PAL و چالکون سنتاز گردید و در واقع ملاتونین با اثر بر میزان فلاونوئید توانست پیری برگ‌ها را به تاخیر بیاورد (۲۵) همچنین تیمار ملاتونین سبب افزایش آنزیم PAL و نیز میزان تجمع فنل، آنتوسیانین و آسکوربیک اسید به همراه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در توت فرنگی افزایش یافت (۲). آنزیم‌های PAL و TAL دو آنزیم اصلی مسیر سنتز فنیل پروپانویدها می‌باشند. در تحقیق حاضر فعالیت این دو آنزیم دفاعی گیاه با افزایش غلظت شوری، انواع رادیکال‌های آزاد و آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو کاهش یافت، همانگونه که سبب کاهش سنتز فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین گردید. از طرف دیگر، تیمار ملاتونین به همراه شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌ها شد. Xu (۲۰۱۷) بیان داشت؛ ملاتونین سبب افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز فنل‌ها از جمله PAL و Cinnamate

شرایط و حمایت‌های مالی به جهت انجام این پژوهش ابراز می‌نمایند.

مسئولین گروه علوم گیاهی دانشگاه اصفهان و همچنین قطب آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی به جهت فراهم نمودن

منابع

- ۱- عزیزی ف.، امیری ح. و اسماعیلی ا.، ۱۳۹۸. اثر ملاتونین بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه لوبیا رقم صدری (*Phaseolus vulgaris* cv. *Sadri*) تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۲، شماره ۳، ۶۹۸-۷۱۱.
- ۲- منصوری س.، ساری‌خانی ح.، سیاری م. و سلیمانی اقدم م.، ۱۴۰۰. اثر محلول‌پاشی قبل از برداشت ملاتونین بر رسیدن و ویژگی‌های کیفی پس از برداشت میوه توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* cv. *Queen Elisa*). مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۴، شماره ۳، ۶۴۳-۶۵۷.
- 3- Afreen, F., Zobayed, S.M., Kozai, T., 2006. Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation. *Journal of pineal research*, 41: 108-115.
- 4- Anower, M.R., Mott, I.W., Peel, M.D., Wu, Y., 2013. Characterization of physiological responses of two alfalfa half-sib families with improved salt tolerance. *Plant Physiol Biochem*, 71: 103-111.
- 5- Arnao, M.B., 2014. Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants. *Advances in Botany*, doi:10.1155/2014/815769
- 6- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2018. Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of Botany*, 121: 195-207.
- 7- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2007. Melatonin promotes adventitious-and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *Journal of pineal research*, 42: 147-152.
- 8- Ashrafi, E., Razmjoo, J., Zahedi, M., Pessarakli, M., 2014. Selecting alfalfa cultivars for salt tolerance based on some physiochemical traits. *Agronomy Journal*, 106: 1758-1764.
- 9- Beaudoin-Eagan, L.D., Thorpe, T.A., 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, 78: 438-441.
- 10- Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., 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.
- 11- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10: 3.
- 12- Chen, Q., Qi, W.-b., Reiter, R.J., Wei, W., Wang, B.m., 2009. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *Journal of plant physiology*, 166: 324-328.
- 13- Chen, Y.E., Mao, J.J., Sun, L.Q., Huang, B., Ding, C.B., Gu, Y., Liao, J.Q., Hu, C., Zhang, Z.W., Yuan, S., 2018. Exogenous melatonin enhances salt stress tolerance in maize seedlings by improving antioxidant and photosynthetic capacity. *Physiologia plantarum*, 164: 349-363.
- 14- Cosme, P., Rodríguez, A.B., Espino, J., Garrido, M., 2020. Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants*, 9: 1263.
- 15- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- 16- Dawood, M.G., El-Awadi, M.E., 2015. Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L. plants via seed priming with melatonin. *Acta Biológica Colombiana*, 20: 223-235.
- 17- Fang, Z., Bouwkamp, J.C., Solomos, T., 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 503-510.
- 18- Hernandez-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M.B., 2004. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220: 140-144.
- 19- Kim, M., Seo, H., Park, C., Park, W.J., 2016. Examination of the auxin hypothesis of phytomelatonin action in classical auxin assay systems in maize. *Journal of plant physiology*, 190: 67-71.
- 20- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects

- on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 244-249.
- 21- Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., Jia, D., Fu, M., Ma, F., 2012. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of pineal research*, 53: 298-306.
- 22- Liang, D., Shen, Y., Ni, Z., Wang, Q., Lei, Z., Xu, N., Deng, Q., Lin, L., Wang, J., Lv, X., 2018. Exogenous melatonin application delays senescence of kiwifruit leaves by regulating the antioxidant capacity and biosynthesis of flavonoids. *Frontiers in plant science*, 9: 426.
- 23- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Portland Press Ltd*, 591- 592.
- 24- Martín, J., Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M., Asuero, A.G., 2017. Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction. Phenolic compounds–Natural sources, importance and applications. *InTech*, 117-152.
- 25- Michard, E., Simon, A.A., 2020. Melatonin's antioxidant properties protect plants under salt stress. *Plant, Cell and Environment*.
- 26- Minatel, I.O., Borges, C.V., Ferreira, M.I., Gomez, H.A.G., Chen, C.-Y.O., Lima, G.P.P., 2017. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compd. Biol Act*, 8: 1-24.
- 27- Moradi, F., Ismail, A.M., 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of botany*, 99: 1161-1173.
- 28- Mukherjee, S., David, A., Yadav, S., Baluška, F., Bhatla, S.C., 2014. Salt stress-induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiologia plantarum*, 152: 714-728.
- 29- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual reviews Plant Biology*, 59: 651-681.
- 30- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- 31- Rezazadeh, A., Ghasemnezhad, A., Barani, M., Telmadarrehei, T., 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Res J Med Plant*. 6: 245-252.
- 32- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., Koukourikou-Petridou, M., 2012. Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium* × *Prunus cerasus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 61: 162-168.
- 33- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24: 2452.
- 34- Shi, H., Jiang, C., Ye, 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. *Journal of experimental botany*, 66: 681-694.
- 35- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299: 152-178.
- 36- Szafrńska, K., Glińska, S., Janas, K., 2013. Ameliorative effect of melatonin on meristematic cells of chilled and re-warmed *Vigna radiata* roots. *Biologia plantarum*, 57: 91-96.
- 37- Szafrńska, K., Glińska, S., Janas, K.M., 2012. Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of *Vigna radiata* seeds. *Journal of plant physiology*, 169: 34-40.
- 38- Szafrńska, K., Szewczyk, R., Janas, K., 2014. Involvement of melatonin applied to *Vigna radiata* L. seeds in plant response to chilling stress. *Open Life Sciences*, 9: 1117-1126.
- 39- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3: 2-20.
- 40- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*, 64: 88-93.
- 41- Wei, W., Li, Q.T., Chu, Y.N., Reiter, R.J., Yu, X.M., Zhu, D.H., Zhang, W.K., Ma, B., Lin, Q., Zhang, J.S., 2015. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean

- plants. *Journal Experimental Botany*, 66: 695-707.
- 42- Wei, Z., Li, C., Gao, T., Zhang, Z., Liang, B., Lv, Z., Zou, Y., Ma, F., 2019. Melatonin increases the performance of *Malus hupehensis* after UV-B exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139: 630-641.
- 43- Xu, L., Yue, Q., Bian, F.e., Sun, H., Zhai, H., Yao, Y., 2017. Melatonin enhances phenolics accumulation partially via ethylene signaling and resulted in high antioxidant capacity in grape berries. *Frontiers in plant science*, 8: 1426.
- 44- Yildiz, M., Poyraz, İ., Çavdar, A., Özgen, Y., Beyaz, R., 2020. Plant Responses to Salt Stress. *Plant Breeding-Current and Future Views*.
- 45- Zhu, J.K., 2007. Plant salt stress. eLS.
- 46- Zuo, B., Zheng, X., He, P., Wang, L., Lei, Q., Feng, C., Zhou, J., Li, Q., Han, Z., Kong, J., 2014. Overexpression of MzASMT improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Pineal Research*, 57: 408-417.

Effect of melatonin on growth parameters and phenolic compounds of *in vitro* salt stress of *Medicago sativa* L.

Jalili Sh.¹ and Ehsanpour A.A.¹ and Javadirad S.M.²

¹ Dept of Plant and Animal Biology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

² Dept of Cell and Molecular Biology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is the most cultivated forage legume in Iran that productivity and quality of that are limited by salt stress. Melatonin as an indole amine was used for this study, with different concentrations of melatonin (0.1, 10 and 15 μ M) under *in vitro* salt stress (150 and 200 mM NaCl) of alfalfa seedlings which by increasing salinity, growth rate as well as antioxidant power and synthesis of antioxidant compounds decreased. Growth parameters and defense system such as antioxidant enzymes were reduced in plants under salt stress. Exogenous utilization of melatonin in alfalfa significantly elevated fresh and dry weight, shoot length, photosynthetic pigments and carotenoid content. Melatonin application was augmented phenolic compounds such as total phenol, flavonoids and also antioxidant enzymes, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL). According to our findings, Melatonin could be an excellent candidate for increasing salt resistance, by antioxidant capacity, scavenging ROS, reducing oxidative damage, augmented of non-enzymatic antioxidant such as phenolic compounds and on the other hand increasing the photosynthetic capacity of the plant by preserving photosynthetic pigments in alfalfa seedlings.

Keywords: *Medicago sativa*, Melatonin, Salt stress, Tissue cultures, Phenolic compounds