مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

بررسی تأثیر ملاتونین بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه توت‌فرنگی (*Fragaria×ananassa*) رقم پاروس تحت تنش یخ‌زدگی

ساناز یوسفی، منصور غلامی* و حسن ساری‌خانی

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی‌سینا، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۰

چکیده

تنش سرما یکی از تنش‌های غیرزیستی بسیار مهم در کاهش عملکرد بسیاری از گیاهان است. دراین رابطه اخیراً یک هورمون گیاهی به نام ملاتونین در زمینه کاهش آسیب‌های ناشی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف توجه پژوهش‌گران را به خود جلب کرده است. در پژوهش حاضر بمنظور بررسی و ارزیابی تأثیر ملاتونین بر برخی صفات فیزیولوژیکی توت‌فرنگی رقم پاروس تحت تنش سرما، آزمایشی گلدانی با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا در آمد. ابتدا گیاهان توت‌فرنگی با غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میکرومولار هورمون ملاتونین از طریق محلول‌پاشی تیمار شدند و دو هفته پس از محلول‌پاشی، گیاهان به مدت ۳ ساعت تحت تنش یخ‌زدگی در دمای ۹- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نتایج نشان داد تأثیر تیمار ملاتونین بر تغییر ویژگی‌های فیزیولوژیکی شامل پرولین، کربوهیدرات محلول، فلاونوئید کل، نشت یونی، میزان شاخص کلروفیل و پراکسید هیدروژن در شرایط تنش یخ‌زدگی معنی‌دار بود. تیمار ملاتونین باعث افزایش معنی‌دار در میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، فلاونوئید کل و میزان شاخص کلروفیل و همچنین کاهش معنی‌دار در میزان نشت یونی و پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت تنش یخ‌زدگی شد. در این آزمایش تیمار ملاتونین تأثیر معنی‌داری بر میزان محتوای نسبی آب، مالون‌دی‌آلدئید و فنل کل نداشت. باتوجه به نتایج این پژوهش، احتمالاً تیمار ملاتونین می‌تواند به عنوان راهکاری اثرگذار جهت افزایش تحمل گیاهان در مقابله با تنش سرما و کاهش آسیب‌های ناشی از آن مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اسمولیت‌ها، تنش سرما، نشت یونی، ملاتونین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۲۷۳۹۵۲ ، پست الکترونیکی: mgholami@basu.ac.ir

مقدمه

تنش‌های زیستی و غیرزیستی باعث تأخیر در رشد، کاهش عملکرد، پیری و حتی مرگ گیاه می‌شوند. در مناطق معتدله، دمای پایین یکی از اصلی‌ترین تنش‌های محیطی است که بسیاری از گیاهان در طول چرخه زندگی خود با آن روبه‌رو می‌شوند و بر رشد و نمو، عملکرد، کیفیت محصول، عمر پس از برداشت محصول و توزیع جغرافیایی گیاهان تأثیر زیادی دارد. تنش سرما را می‌توان به تنش‌های سرمازدگی (۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد) (Chilling) و یخ‌زدگی (Freezing)(کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد) تقسیم‌بندی کرد (۵۳). تنش سرما یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که بسیاری از گیاهان در طول حیات خود با آن مواجه می‌شوند، به‌ویژه گیاهان کشت شده در ارتفاعات بالاتر و این می‌تواند موجب آسیب‌های جدی اقتصادی در محصولات شود (۴۴). پیامد اولیه تنش در دمای پایین تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)مانند پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) رادیکال‌های آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) می‌باشد که به دلیل وقوع اختلال در زنجیره انتقال الکترون در

DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

کلروپلاست‌ها تشکیل می‌شوند (۱۹). کلروپلاست‌ها محل اصلی تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان هستند (۷). تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن برای اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب‌زا است و در نهایت باعث اختلال در عملکرد سلولی می‌شود (۱۹). تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن باعث غیرفعال شدن آنزیم‌های چرخه کلوین، سرکوب تثبیت کربن و نهایتاً کاهش فتوسنتز می‌شود (۷۴). در واکنش به افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن، گیاهان یک شبکه سم‌زدایی کارآمد را ایجاد می‌کنند که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی معروف عبارتند از سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، در حالی که آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل گلوتاتیون، اسیدآسکوربیک، پرولین و غیره هستند. علاوه بر این، تعداد زیادی متابولیت، از جمله کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه، برای محافظت از گیاهان در برابر آسیب‌های ناشی از سرما در سطح سلولی تولید می‌شوند (۳۸). علاوه بر به‌نژادی، روش‌های مختلفی برای افزایش مقاومت به دمای پایین در گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. در این بین کاربرد بیرونی هورمون‌های گیاهی مانند جاسمونیک‌اسید (۴۹) و ملاتونین (۱۷و ۶۳) به عنوان ترکیب‌های طبیعی و سالم مود توجه پژوهش‌گران قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین اثرات ملاتونین که مورد مطالعه قرارگرفته است، نقش آن به عنوان محرک زیستی در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (۵۱و ۵۲). ملاتونین با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و چندین گونه نیتروژن فعال (RNS)، مقدار بیش از حد این مواد خطرناک را تنظیم کرده و تعادل اکسیداسیون-احیاء را تضمین می‌کند (۶). ملاتونین همچنین بیان چندین آنزیم مسئول سم‌زدایی H_2O_2 اضافی، مانند کاتالازها، پراکسیدازها، گلوتاتیون/آسکوربات ردوکتازها و پراکسی‌ردوکسین‌ها را القاء می‌کند، بنابراین می‌تواند سطوح گونه‌های فعال اکسیژن را کنترل کند و مقدار اضافی آن‌ها را کاهش دهد (۵۷). همچنین عناصر چرخه AsA-GSH توسط ملاتونین تنظیم می‌شوند (۵۹). آسکوربات (AsA) و گلوتاتیون (GSH) دو آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی آب‌دوست هستند که در چرخه مهم آسکوربات-گلوتاتیون (AsA-GSH) شرکت می‌کنند، که نقش مهمی در از بین بردن H_2O_2 و بازیافت اشکال کاهش یافته آسکوربات و گلوتاتیون ایفا می‌کند (۲۵). براساس نتایج پژوهش‌های مختلف ثابت شده است که ملاتونین می‌تواند یک هورمون کاندید جهت افزایش تحمل تنش سرما و گرما در گیاهان باشد. در این راستا، علاوه بر افزایش طبیعی ملاتونین در مواجهه با تنش سرما، تیمار بیرونی ملاتونین نیز سبب افزایش مقاومت در برابر تنش سرما شده است (۶۴، ۶۵ و ۷۶). تورک و همکاران (۶۴) با کاربرد ملاتونین روی دانهال‌های گندم مشاهده کردند که ملاتونین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطوح محافظ‌های اسمزی بالاتری شده و با مهار گونه‌های فعال اکسیژن و تنظیم تعادل اکسایش-کاهش، سبب افزایش مقاومت به سرما شد. اوچندو و همکاران (۶۵) با تیمار ملاتونین در گیاه نارون آمریکایی در شرایط فروانجماد، بازیابی کامل رشد را در نوک شاخه‌ها و جوانه‌های خفته گزارش کردند. در گیاه برموداگراس، تیمار ملاتونین بیرونی سبب تغییر در غلظت متابولیت‌های مختلف و بهبود فعالیت فتوسیستم ۲ شد و بنابراین، تحمل به سرمای گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت (۱۶، ۲۶و ۵۸). برای حفظ ژرم‌پلاسم در معرض خطر انقراض با استفاده از روش فروانجماد، میزان بقای کالوس گیاه *Rhodiola crenulata* در فرآیند یخزدگی، با تیمار ملاتونین به طور معنی‌داری افزایش یافت (۷۶). توت‌فرنگی تجاری (*Fragaria* × *ananassa* Duch) به دلیل مزیت‌های نسبی فراوان، از مهم‌ترین میوه‌های دانه ریز در جهان به شمار می‌رود. در ایران مجموع سطح زیر کشت گیاه توت‌فرنگی در سال ۱۳۹۸، ۶۰۵۱ هکتار با عملکرد ۵۹۹۳ کیلوگرم در هکتار بوده است که بخش عمده تولید این محصول در مناطق

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

معتدله کشور و به صورت مزرعه‌ای می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۸). آسیب یخزدگی در زمستان و سرمازدگی بهاره در گیاه توت‌فرنگی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش‌دهنده میزان محصول و کیفیت در مناطق معتدله است و بقای توت‌فرنگی را به شدت محدود می‌کند (۳۲و ۵۶). در پژوهش حاضر تلاش شده است که تاثیر هورمون ملاتونین بر مقاومت به تنش یخزدگی و کاهش اثرات زیان‌بار این تنش در گیاه توت‌فرنگی رقم پاروس به عنوان رقمی روزکوتاه، غالباً مرزعه‌ای با ویژگی نیمه‌حساس به دمای پایین مورد بررسی قرارگیرد.

مواد و روشها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۹ در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی‌سینا، به صورت گلدانی اجرا شد. برای انجام پژوهش، بوته‌های توت‌فرنگی رقم پاروس (Paros) از ساقه‌های رونده سال جاری تهیه و در گلدان‌های پلاستیکی یک کیلویی حاوی مخلوط خاک باغچه و ماسه به نسبت ۱:۱ کشت و بوته‌ها در شرایط یکسان در گلخانه تا زمان محلول‌پاشی (چهار تا شش برگی) نگهداری شدند. ملاتونین به غلظت ۱۰۰ میکرومولار جهت محلول‌پاشی روی برگ‌ها تهیه شد. ابتدا ملاتونین در اتانول حل و سپس با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانده شد. برای جلوگیری از تجزیه نوری ملاتونین، محلول‌پاشی پس از غروب آفتاب انجام شد. محلول‌پاشی بترتیبی صورت گرفت که هر دو طرف برگ‌ها کاملاً به محلول آغشته شود. این پژوهش در ۳ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. دو هفته پس از انجام محلول‌پاشی، گیاهان تیمار شده با ملاتونین ۱۰۰ و صفر میکرومولار (شاهد)، به اتاقک سرماساز جهت اعمال تیمار دمایی منتقل شدند. دما در اتاقک سرماساز به میزان ۲ درجه سانتی‌گراد در هر ساعت کاهش یافت و پس از رسیدن به دمای ۹- درجه سانتی‌گراد، گیاهان به مدت ۳ ساعت در این دما نگهداری شدند و سپس دما مجدداً با میزان افزایش ۲ درجه سانتی‌گراد در هر ساعت، افزایش یافت. پس از اعمال تیمار دمایی گیاهان از اتاقک سرماساز خارج شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت ویژگی‌های مورد نظر در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه بین گیاهان تیمار شده با ملاتونین و شاهد تحت تنش سرما صورت گرفت.

نشت یونی: بررسی درصد نشت یونی با روش لوتوس و همکاران (۴۵) صورت گرفت. پس از اعمال تیمارهای دمایی، ۵ عدد دیسک به قطر نیم سانتی‌متر از برگ‌ها جدا شده و در ظرف‌هایی شبیه به قوطی فیلم، حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. سپس هدایت الکتریکی اولیه محلول‌ها (EC1) با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج (مدل CC-501 WTW، آلمان) قرائت شد. پس از آن ظرف‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از خارج کردن لوله‌ها از اتوکلاو و هم‌دما شدن با محیط، هدایت الکتریکی محلول‌ها (EC2) مجدداً قرائت شد و در نهایت درصد نشت یونی برگ‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد نشت یونی = (EC1/EC2) × 100

محتوای نسبی آب: سنجش محتوای نسبی آب برگ‌ها با استفاده از روش بار و واترلی (۸)، صورت گرفت. برای هر نمونه ۵ عدد دیسک نیم سانتی‌متری از برگ‌ها با ترازو (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شده و وزن تر (FW) بدست آمد. سپس نمونه‌های برگ در قوطی فیلم‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. سپس مجدداً توزین شدند و وزن اشباع (TW) بدست آمد. پس از اندازه‌گیری وزن اشباع، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در آون جهت اندازه‌گیری وزن خشک نگهداری و سپس مجدداً توزین و وزن خشک

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

(DW) بدست آمد. در نهایت محتوای نسبی آب برگ‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

محتوای نسبی آب = (FW-DW) / (TW-DW) × 100

محتوای مالوندی‌آلدئید: جهت سنجش محتوای مالوندی‌آلدئید (Malondialdehayde) (MDA) از روش استوارت و بیولی (۶۱)، استفاده شد. در این روش ۰/۲ گرم نمونه برگ گیاهی با استفاده از تری‌کلرواستیک ۰/۱ با نیتروژن مایع در هاون کوبیده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ یک میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد و به آن یک میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد اسیدتیوباربیتوریک (Thiobarbituric acid) حاوی اسید تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بمنظور توقف واکنش بلافاصله پس از خارج نمودن از بن‌ماری، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب یخ قرارگرفتند. سپس میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (یووی- ۱۲۸۰، شیمادزو، ژاپن) در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر از جذب در طول موج نخست کسر گردید. محاسبه غلظت مالوندی‌آلدئید براساس رابطه زیر و با در نظر گرفتن فاکتور رقت، قطر کووت و ضریب خاموشی انجام شد.

$$MDA = \frac{A532-A600}{Quvete\ diameter \times 155} \times Dilution\ factor$$

دراین فرمول مقدار مالوندی‌آلدئید برحسب نانومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه می‌شود. قطر کووت معمولاً یک سانتی‌متر و ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مول بر سانتی‌متر می‌باشد. مقدار محاسبه شده نهایی باتوجه به وزن و حجم عصاره استفاده شده تبدیل به میکرومول بر گرم می‌گردد.

پراکسیدهیدروژن: غلظت پراکسیدهیدروژن براساس واکنش با یدیدپتاسیم و با استفاده از روش آلکسیوا و همکاران (۴)، اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۱ گرم بافت تازه گیاه در تری‌کلرواستیک‌اسید ۰/۱ درصد کوبیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف شده، ۵۰۰ میکرولیتر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی و دمای اتاق نگهداری و پس از آن جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پراکسیدهیدروژن بر اساس نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

شاخص کلروفیل برگ: میزان کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD-502, Minolta, Japan) اندازه‌گیری شد.

کربوهیدرات کل: اندازه‌گیری کربوهیدرات کل بر اساس روش پاکوین و لچاستر (۵۴)، انجام شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی کوبیده شد. سپس قسمت بالایی محلول جدا و ۵ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد به رسوبات به جا مانده از مرحله قبل افزوده شد. این عمل دو بار تکرار شد و عصاره استخراج شده با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از قسمت رویی عصاره برداشته شد و ۳ میلی‌لیتر آنترون (۳۰۰ میلی‌گرم آنترون + ۱۵۰ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید ۷۲ درصد) به آن اضافه شد. نمونه‌ها پس از گذاشتن در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و تشکیل ماده رنگی، بلافاصله به داخل یخ منتقل شدند. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر، میزان جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و با مقایسه با منحنی جذب استاندارد گلوکز، غلظت کربوهیدرت‌های محلول کل نمونه‌ها برحسب میلی‌گرم بر گرم بیان گردید.

پرولین: جهت اندازه‌گیری پرولین از روش بیتس و همکاران (۹) استفاده شد. در این روش، ۰/۵ گرم از نمونه

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

برگ در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیک‌اسید ۳ درصد کوبیده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره بالایی جدا و به داخل لوله آزمایش منتقل و سپس ۲ میلی‌لیتر گلایسیال‌استیک‌اسید و ۲ میلی‌لیتر نین‌هیدرین تازه (۲/۵ گرم نین‌هیدرین + ۶۰ میلی‌لیتر گلایسیال‌استیک‌اسید + ۴۰ میلی‌لیتر فسفریک‌اسید ۶ مولار) به آن افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شدند تا واکنش خاتمه یابد. به هر یک از نمونه‌ها ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شدند تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. محلول صورتی رنگ قسمت بالایی برای قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت و با مقایسه جذب نمونه‌ها با منحنی جذب استاندارد پرولین، غلظت پرولین نمونه‌ها بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

عصاره‌گیری برای اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید کل: جهت سنجش میزان فنل و فلاونوئید کل، ۰/۳ گرم از بافت برگ پس از توزین در ۳ میلی‌لیتر حلال (۳۵ میلی‌لیتر استون خالص، ۳۵ میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر اسیدفرمیک یا استیک‌اسید) کوبیده شد و سپس ۳۰ دقیقه بر روی شیکر ۱۱۰ دور در دقیقه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفت و در انتها عصاره به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

فنل کل: اندازه‌گیری غلظت فنل کل با استفاده از روش فولین‌سیکالتو انجام شد (۶۰). مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد به ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره برگ اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷ درصد نیز به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه روی شیکر با ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفتند و در انتها ۶ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک، فنل کل به صورت میلی‌گرم اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم وزن تازه بدست آمد.

فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری غلظت فلاونوئید کل از روش لی و همکاران (۴۲)، استفاده شد. بدین‌ترتیب که جهت اندازه‌گیری فلاونوئید کل، ۰/۲۷۵ میلی‌لیتر از عصاره برگ با ۸۲۵ میکرولیتر آب مقطر به حجم ۱/۱ میلی‌لیتر رسانده شد سپس ۰/۳ میلی‌لیتر نیتریت‌سدیم ۵ درصد به محلول اضافه گردید. پس از سپری شدن مدت زمان ۵ دقیقه، ۰/۶ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم (سود) ۱ مولار بهمراه یک میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردید و شدت جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک آب مقطر قرائت شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید کل، میزان جذب نمونه‌ها با منحنی جذب استاندارد روتین (کوئرستین ۳-روتینوزید) مقایسه شد و غلظت فلاونوئید کل در برگ بر حسب میکروگرم روتین در ۱۰۰ گرم وزن تر بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹,۱ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ صورت پذیرفت.

نتایج

نشت یونی: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار ملاتونین تاثیر معنی‌داری در سطح ۱ درصد بر کاهش نشت یونی در گیاهان توت‌فرنگی تحت تنش یخزدگی نسبت به گیاهان شاهد داشت (جدول ۱). تنش سرما به طور کلی باعث افزایش نشت یونی در گیاه می‌گردد و تیمار ملاتونین

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

در آزمایش حاضر این نشت را به میزان قابل‌توجهی کاهش داد. به طوری‌که میانگین آن از ۳۶/۵۲ درصد در گیاهان شاهد به ۲۲/۵۲ درصد در گیاهان تیمار شده با ملاتونین تحت تنش یخ‌زدگی کاهش یافت (جدول ۲).

محتوای نسبی آب: در پژوهش حاضر با وجود اینکه محتوای نسبی آب در گیاهان تیمار شده با ملاتونین ۶/۷۵ درصد نسبت به گیاهان تیمار نشده تحت تنش یخ‌زدگی بیشتر بود، اما این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول‌های ۱ و ۲).

مالون‌دی‌آلدئید: در پژوهش حاضر بین گیاهان تیمار شده با ملاتونین و گیاهان شاهد تحت تنش یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری به لحاظ آماری در میزان مالون‌دی‌آلدئید مشاهده نشد، هرچند میانگین مقدار آن در گیاهان تیمار شده، کاهشی در حدود ۶ درصد نشان داد (جدول‌های ۱ و ۲).

پراکسیدهیدروژن: در پژوهش حاضر تاثیر ملاتونین بر میزان پراکسیدهیدروژن در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد در شرایط تنش سرما در سطح ۵ درصد معنی‌دار و موجب کاهش میانگین آن در گیاهان تیمار شده با ملاتونین شد (جدول ۱). میانگین این مقدار در گیاهان تیمار شده با ملاتونین برابر با ۶۲/۲۶ و در گیاهان شاهد برابر با۱۲۱/۱۵ میلی‌گرم بر گرم بود (جدول ۲).

پرولین: غلظت پرولین آزاد در دماهای پایین افزایش می‌یابد و می‌تواند به عنوان شاخص تنش در گیاهانی که در معرض تنش قرار گرفته‌اند، مورد استفاده قرار گیرد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ملاتونین موجب افزایش میزان پرولین در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد، تحت تنش یخ‌زدگی شد و این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). میانگین مقدار پرولین از ۱۲/۰۲ میکرومول بر گرم در گیاهان شاهد به ۲۳/۶ میکرومول بر گرم در گیاهان تیمار شده با ملاتونین تحت تنش یخ‌زدگی افزایش یافت (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر ملاتونین بر میزان نشت یونی، محتوای نسبی آب، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسیدهیدروژن و پرولین در شرایط تنش یخ‌زدگی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		نشت یونی	محتوای نسبی آب	مالون‌دی‌آلدئید	پراکسیدهیدروژن	پرولین
ملاتونین	۱	۲۹۳/۸۶**	۴۶/۱۴۸ns	۰/۰۱۳ns	۵۲۰۱/۴۶*	۲۰۰/۷۹۷**
خطای آزمایشی	۴	۱/۸۳	۱۹۸/۲۷	۰/۰۱۴۷	۶۴۷/۳۹	۷/۹۷
ضریب تغییر (درصد)		۴/۵۸	۱۶/۵۶	۸/۷۴	۲۷/۷۴	۱۵/۸۵

ns، *، و ** بترتیب بی‌معنی و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر ملاتونین بر میزان نشت یونی، محتوای نسبی آب، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسیدهیدروژن و پرولین در شرایط تنش یخ‌زدگی

تیمار	نشت یونی (%)	محتوای نسبی آب (%)	مالون‌دی‌آلدئید (µmol/g)	پراکسیدهیدروژن (nmol/g)	پرولین (µmol/g)
شاهد	۳۶/۵۲± ۱/۵۵a	۸۲/۲۲± ۱۶/۷۸a	۱/۴۳± ۰/۱۵a	۱۲۱/۱۵± ۱۵/۶۵a	۱۲/۰۲۶± ۰/۷ b
ملاتونین	۲۲/۵۲± ۱/۱۱b	۸۷/۷۷± ۱۰/۷۲a	۱/۳۴± ۰/۰۸a	۶۲/۲۶b± ۳۲/۴b	۲۳/۶± ۳/۹۳ a

حروف همسان در هر ستون نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

شاخص کلروفیل: در پژوهش حاضر تحت تأثیر تنش یخزدگی تفاوت معنی‌داری در میزان شاخص کلروفیل بین گیاهان تیمار شده با ملاتونین و گیاهان شاهد مشاهده شد و این تفاوت در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). در گیاهان شاهد، تحت تنش یخزدگی شاخص کلروفیل میانگین ۴۶/۶۷ و در گیاهان تیمار شده با ملاتونین میانگین ۵۹/۰۳ را نشان داد (جدول ۴).

کربوهیدرات محلول: در پژوهش حاضر تاثیر ملاتونین بر میزان کربوهیدرات محلول در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد در شرایط تنش یخزدگی، در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). تحت تنش سرما مقدار کربوهیدرات محلول در گیاهان تیمار شده با ملاتونین نسبت به گیاهان شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. میانگین این مقدار در گیاهان شاهد برابر با ۵۸/۰۶ و در گیاهان تیمار شده با ملاتونین برابر با ۸۴/۷۷ میلی‌گرم بر گرم بود (جدول ۴).

فنل کل: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ملاتونین تأثیر معنی‌داری به لحاظ آماری بر میزان فنل کل موجود در گیاهان تحت تنش یخزدگی نداشت هرچند میزان میانگین فنل کل در گیاهان تیمار شده با ملاتونین، ۲۵/۸ درصد بیشتر از گیاهان تیمار نشده بود (جدول‌های ۳ و ۴).

فلاونوئید کل: در پژوهش حاضر استفاده از تیمار ملاتونین تأثیری معنی‌داری بر میزان فلاونوئید کل در برگ‌های گیاهان در سطح ۱ درصد داشت (جدول ۳). تحت تأثیر ملاتونین میانگین میزان فلاونوئید کل از ۰/۲۹ میلی‌گرم در گرم در گیاهان شاهد به ۰/۵۴ میلی‌گرم در گرم در گیاهان تیمار شده با ملاتونین افزایش یافت (جدول ۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر ملاتونین بر میزان شاخص کلروفیل، کربوهیدرات محلول، فنل کل، فلاونوئید کل در شرایط تنش یخزدگی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		شاخص کلروفیل	کربوهیدرات محلول	فنل کل	فلاونوئید کل
ملاتونین	۱	۲۲۹/۴**	۱۰۷۰/۱۳۶**	۰/۷۸۴ns	۰/۰۸۹۷**
خطای آزمایشی	۴	۸/۷۵	۱۹/۷۵	۰/۳	۰/۰۰۱۴
ضریب تغییر(درصد)		۵/۵۹	۶/۲۲	۱۷/۲۸	۹/۱

ns، * و ** بترتیب بی‌معنی و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر ملاتونین بر میزان شاخص کلروفیل، کربوهیدرات محلول، فنل کل، فلاونوئید کل در شرایط تنش یخزدگی

تیمار	شاخص کلروفیل	کربوهیدرات محلول (mg/g)	فنل کل (mg/g)	فلاونوئید کل (mg/g)
شاهد	۴۶/۶۷± ۳/۲b	۵۸/۰۶± ۱/۰۲b	۲/۸۳± ۰/۳۸a	۰/۲۹± ۰/۰۴b
ملاتونین	۵۹/۰۳± ۲/۶۸a	۸۴/۷۷± ۶/۲a	۳/۵۶± ۰/۶۸a	۰/۵۴± ۰/۰۳a

حروف همسان در هر ستون نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

تنش‌های غیرزیستی به میزان قابل‌توجهی از طریق مکانیسم‌های مختلف مهار رشد، سبب کاهش عملکرد محصولات می‌شوند. تنش سرما یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که منجر به کاهش رشد گیاهان و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌گردد (۴۴). توت‌فرنگی تجاری

DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

(*Fragaria* × *ananassa* Duch) یکی از مهم‌ترین میوه‌های دانه‌ریز در جهان می‌باشد که در مناطق معتدله در معرض آسیب یخ‌زدگی در زمستان و سرمازدگی در بهار بوده و این تنش‌ها از عوامل محدوده‌کننده میزان محصول آن به شمار می‌روند (۳۲و ۵۶). بنابراین جستجوی روشی موثر برای کاهش خسارت تنش سرما در این گیاه دارای اهمیت می‌باشد. اخیراً ثابت شده است که ملاتونین می‌تواند در محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی نقش داشته باشد (۶۴، ۶۵ و ۷۶). کاربرد این هورمون در توت‌فرنگی رقم پاروس تحت تنش سرما و بررسی برخی صفات مرتبط با تنش سرما در برگ‌های گیاه، نشان داد که کاربرد این هورمون می‌تواند راهکاری موثر در جهت کاهش آسیب‌های ناشی از این تنش و افزایش تحمل سرما در گیاه باشد. این تیمار سبب بهبود صفات مختلفی در گیاه از جمله کاهش میزان نشت یونی شد. محل اولیه آسیب تنش سرما، غشاء سلولی می‌باشد. میزان آسیب به غشاء را می‌توان با اندازه‌گیری میزان نشت یونی سنجید. به طور کلی تنش سرما باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و سپس منجر به نشت یونی به خارج سلول می‌گردد (۲۸). نفوذپذیری غشاء اغلب به عنوان یک شاخص فیزیولوژیکی مهم برای مقاومت گیاهان به تنش سرما مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان نشت یونی با تحمل به تنش گیاهان رابطه معکوس دارد (۲۱). در پژوهش حاضر تأثیر تیمار ملاتونین بر نشت یونی به لحاظ آماری در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده (جدول ۱) و سبب کاهش نشت یونی در گیاهانی که تحت تنش یخ‌زدگی قرار گرفته بودند به میزان ۳۸/۳۳ درصد شد (جدول ۲). نتایج پژوهش حاضر با اثر مشاهده شده ملاتونین بر کاهش نشت یونی پس از تنش سرما در دانهال‌های خیار (۷۵)، هندوانه (۳۹) و گوجه‌فرنگی (۱۳) مطابقت دارد. به نظر می‌رسد ملاتونین از طریق کاهش تنش اکسیداتیو سبب حفظ یکپارچگی غشاء شده و سبب پایداری آن پس از تنش یخ‌زدگی می‌گردد (۱۳). از دیگر اثرات تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش سرما در گیاهان کم آبی سلول‌ها و دهیدراته شدن سلول‌ها می‌باشد که در نتیجه تشکیل یخ در فضای آپوپلاستی سلول‌ها و متعاقباً انتقال آب داخل سلول‌ها به فضای آپوپلاستی ایجاد می‌شود (۵۰). تجمع ترکیب‌های فعال اسمزی در سلول‌ها، راه اصلی مقاومت در برابر از دست دادن آب و دهیدراته شدن سلول‌ها است. در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری در محتوای نسبی آب بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با ملاتونین تحت تنش یخ‌زدگی مشاهده نشد، گرچه افزایشی ۶/۷۵ درصدی در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (جدول‌های ۱ و ۲). احتمالاً در تنشی دیگر مانند تنش خشکی این نتیجه متفاوت می‌بود، همان‌طور که در برخی تحقیقات تاثیر مثبت ملاتونین بر افزایش محتوای نسبی آب در تنش خشکی اثبات شده است (۳ و ۲۷). فاکتور دیگری که معمولاً سنجش آن در بررسی میزان آسیب‌های ناشی از تنش در گیاهان مد نظر قرار می‌گیرد میزان مالوندی‌آلدئید می‌باشد که محتوای آن در بافت‌های گیاهی تحت تأثیر تنش می‌گیرد. مالوندی‌آلدئید در اثر پراکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع ایجاد می‌گردد. پراکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع که در اثر تنش‌های مختلف در گیاهان رخ می‌دهد مالوندی‌آلدئید را هنگام تجزیه ایجاد می‌کند و در بسیاری از موارد مالوندی‌آلدئید فراوان‌ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدئید است (۱۴). اسیدهای چرب غیراشباع که اجزاء اصلی غشاءهای زیستی هستند، در پاسخ به تنش اکسیداتیو به راحتی پراکسید می‌شوند. تعیین مقدار این هیدروپراکسیدهای چربی اولیه به دلیل بی‌ثباتی و واکنش‌پذیری آن‌ها مشکل است. بنابراین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی معمولاً با اندازه‌گیری غلظت محصولات ثانویه تجزیه حاصل از این هیدروپراکسیدهای اولیه برآورد می‌شود. مالوندی‌آلدئید یکی از رایج‌ترین آلدئیدها می‌باشد که از تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع با بیش از ۲ پیوند دوگانه متیلن منقطع، ایجاد می‌شود (۱۵). اسیدهای چرب غیراشباع سه‌گانه، موجب

DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

سیالیت بالای غشاها شده اما به دلیل حساسیت زیاد به اکسیداسیون به راحتی پراکسید می‌شوند (۴۷). به طورکلی اعتقاد براین است که محصول اصلی پراکسیداسیون یعنی مالون‌دی‌آلدئید، منجر به عوارض جانبی در گیاهان می‌شود، بنابراین مالون‌دی‌آلدئید آزاد به عنوان نشانگری برای تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تنش تعیین شده است (۷۳). در مطالعاتی نشان داده شد که تحت تنش‌های خشکی، شوری و سرما، پیش‌تیمار ملاتونین تأثیر معنی‌داری بر میزان مالون‌دی‌آلدئید در گیاهان برمودگراس (۵۸) و چای (۴۰) داشته و میزان آن در گیاهان تیمار شده با ملاتونین نسبت به گیاهان شاهد کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داده است. گرچه در پژوهش حاضر نیز مقدار مالون‌دی‌آلدئید در گیاهان تیمار شده با ملاتونین در تنش یخ‌زدگی، کاهشی ۶/۳ درصدی نسبت به گیاهانی که تیمار ملاتونین را دریافت نکرده بودند نشان داد اما این کاهش و اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول‌های ۱و ۲). پراکسیدهیدروژن شاخصی مهم دیگری در بررسی تنش‌های غیرزیستی است (۴۰). پراکسیدهیدروژن محصول کاهش دو الکترون از O_2 است و به طور بالقوه اکسیژن فعال است که می‌تواند نقش دوگانه مفید و مضر را در گیاهان داشته باشد (۲۳). در مقایسه با سوپراکسیداز ($O_2^{\bullet-}$) و مطمئناً در مقایسه با رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$)، H_2O_2 نسبتاً بی‌ضرر است زیرا در غیاب فلزات واسطه، پراکسیدهیدروژن ثابت و غیرفعال است، حتی در غلظت‌های خیلی بیشتر از آنچه یک سیستم بیولوژیکی همیشه تولید می‌کند. از نظر عملکردی، این مسئله به آن تحرک بیشتری در بین بافت‌ها می‌بخشد و به طور بالقوه نه تنها به عنوان یک سوبسترا در انواع واکنش‌ها بلکه به عنوان یک مولکول برای سیگنالینگ مربوط به گونه‌های فعال اکسیژن هم سودمند است. با این‌حال پراکسیدهیدروژن به طور بالقوه کاملاً با مولکول‌های حاوی Fe^{2+} یا فلزات واسطه از طریق واکنش فنتون واکنش‌پذیر است (۱۰). نتیجه این واکنش همولیز H_2O_2 به ۲، $OH^{\bullet}$ بوده و سمیت پراکسیدهیدروژن اغلب با این عمل آن همراه است (۲۹). برخی مطالعات اثبات کرده‌اند که ملاتونین می‌تواند تأثیر مثبتی بر کاهش میزان پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش داشته باشد. بررسی مقدار پراکسیدهیدروژن در پژوهش حاضر نشان داد که ملاتونین تأثیری معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر مقدار پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت تنش یخ‌زدگی داشته است. تیمار ملاتونین سبب کاهش ۴۸/۶ درصدی مقدار پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت تنش یخ‌زدگی شد (جدول‌های ۱ و ۲). نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهش‌گران از جمله لی و همکاران که نشان دادند در گیاه چای ملاتونین بیرونی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و بنابراین مقدار پراکسیدهیدروژن را در طول تنش سرما در گیاه در سطح پایینی نگه می‌دارد (۴۰)، همچنین دینگ و همکاران که نشان دادند پس از تنش سرما گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با ملاتونین سطح بسیار پایین‌تری از پراکسیدهیدروژن و آنیون سوپراکسید را در مقایسه با گیاهان بدون تیمار ملاتونین را داشتند (۱۳) مطابقت دارد. همچنین در پژوهشی دیگر نشان داده شد که استفاده از ملاتونین خارجی قبل از تنش سرما، به طور قابل‌توجهی از افزایش محتوای پراکسیدهیدروژن در گیاه چای در تنش سرما جلوگیری می‌کند (۴۱). گیاهان با تجمع پرولین که منجر به تنظیم اسمزی بهتر در سلول ها می شود، از بافت های خود در برابر آسیب دمای پایین محافظت می کنند (۲۸). پرولین یکی از گسترده‌ترین املاح سازگاری است که در شرایط نامساعد محیطی در گیاهان تجمع می‌یابد و نقش مهمی در مقاومت گیاهان در برابر تنش ایفا می‌کند. در بسیاری از گیاهان، پرولین آزاد در پاسخ به طیف وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی تجمع می‌یابد. پرولین علاوه بر این که به عنوان یک اسمولیت عالی عمل می‌کند، در هنگام تنش نقش‌های مهمی مانند کلات‌کننده فلز، مولکول دفاعی آنتی‌اکسیدانی و مولکول سیگنالینگ را ایفا می‌کند. پرولین با تعدیل عملکردهای میتوکندریایی موجب مقاومت

DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

به تنش می‌شود، تکثیر سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بیان ژن‌های خاص را تحریک و غشاءها را تثبیت می‌کند، بنابراین از نشت یونی جلوگیری نموده و با قرار دادن غلظت گونه‌های فعال اکسیژن در محدوده طبیعی منجر به بهبود تحمل تنش می‌شود (۳۴). همچنین ظرفیت نگهداری آب سلول‌ها و پایداری بیولوژیکی ماکرومولکول‌ها با پرولین افزایش می‌یابد، بنابراین تجمع پرولین با بهبود مقاومت به سرما همبستگی دارد (۲۸). در پژوهش حاضر تیمار بوته‌های توت‌فرنگی با ملاتونین سبب افزایش معنی‌دار در سطح ۱ درصد در غلظت پرولین شد (جدول ۱). نتایج مشابهی نیز پس از تیمار ملاتونین درگوجه‌فرنگی (۱۳)، برموداگراس (۱۶) و لوبیا (۶۲) گزارش شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که بمنظور افزایش پرولین در شرایط تنش سرما، تیمار ملاتونین می‌تواند روشی موثر باشد. دراین پژوهش تیمار ملاتونین سبب افزایش ۹۶/۲۳ درصدی مقدار پرولین در گیاهان تیمار شده با ملاتونین شد (جدول ۲). کاهش فتوسنتز ناشی از دمای پایین، پاسخی کاملاً شناخته شده در گیاهان حساس به سرما می‌باشد. گزارش شده است که کلروفیل a و b در گیاهان، تحت شرایط تنش سرما کاهش می‌یابند (۷۲). به طور کلی تنش دمای پایین می‌تواند بر میزان فتوسنتز گیاه تأثیر بگذارد و باعث کاهش استفاده از نور گردد (۶۹). کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش در گیاهان به عنوان شاخص مستقیم آسیب در نظر گرفته می‌شود و برای تعیین آسیب ناشی از تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۰). کلروفیل یک مولکول زیستی بسیار مهم و حیاتی در فتوسنتز با عملکرد جذب نور و تبدیل انرژی نور است (۷۱). کلروفیل‌های a و b موجود در برگ‌های گیاهان عالی، رنگدانه‌های اصلی فتوسنتز در کلروپلاست هستند و عملکرد مهمی در جذب و بهره‌برداری از انرژی نور دارند، در نتیجه بر کارایی فتوسنتز تأثیر می‌گذارند. هر دو کلروفیل در اثر تنش اکسیداتیو که یکی از پیامدهای ناشی از تنش‌های محیطی از جمله تنش سرما است، تخریب می‌شوند (۳۳). در پژوهش‌هایی، استفاده از ملاتونین سبب حفظ کلروفیل‌های a و b و جلوگیری از کاهش کلروفیل در شرایط تنش دمای پایین در گیاهان چای (۴۰) و برنج (۳۱) شد. نتایج پژوهش حاضر نیز نتایج سایر پژوهش‌گران را تائید می‌نماید. در پژوهش حاضر تاثیر ملاتونین بر میزان شاخص کلروفیل در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده (جدول ۳) و مشاهده شد که در گیاهانی که تیمار ملاتونین دریافت کرده بودند پس از تنش یخزدگی، میانگین شاخص کلروفیل، ۲۶/۴۸ بیشتر از گیاهانی بود که این تیمار را دریافت نکرده بودند (جدول ۴). تجمع ترکیبات فعال اسمزی در سلول‌ها راه اصلی مقاومت در برابر از دست دادن آب است. تجمع اسمولیت‌ها پتانسیل اسمزی سلول را کاهش می‌دهد، که این امر موجب افزایش ظرفیت تجمع آب می‌شود و از نگهداری آب در سلول حمایت می‌کند (۷۰). کربوهیدرات‌های غیرساختاری مانند هگزوزها (گلوکز و فروکتوز)، دی‌ساکاریدها (ساکارز، ترهالوز) و الیگوساکاریدها (رافینوز، استاکیوز) از جمله مهم‌ترین اسمولیت‌های سازگار هستند (۳۷). تغییر در ترکیب و سیالیت غشاء در اثر سرما، باعث تجمع محافظ‌های اسمزی مختلف می‌شود که منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو می‌گردد (۱۱). گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که دمای پایین باعث افزایش قندهای محلول در برگ گیاهان مختلف می‌شود (۱ و ۲). حرکت آب مایع به خارج از سلول‌ها و افزایش غلظت اسمزی داخل سلول‌ها از یخزدگی داخل سلول جلوگیری می‌کند (۵). میزان جذب کربن و نسبت Fv/Fm به طور قابل‌توجهی در تنش سرما کاهش می‌یابد. با این حال نشان داده شده است که این پارامترها هر دو در گیاه گوجه‌فرنگی با استفاده از تیمار ملاتونین به میزان کمتری کاهش یافتند و در واقع تیمار ملاتونین باعث افزایش ظرفیت فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش سرما شد (۱۳). در آزمایشی بر روی گیاه برموداگراس کربوهیدرات‌هایی مانند فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز و ساکارز که از اجزای اساسی برای سازگاری

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

اسمزی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی هستند با تیمار ملاتونین نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان دادند (۱۶). این نشان می‌دهد که ملاتونین ممکن است در تنظیم سنتز این متابولیت‌ها برای بهبود مقاومت به سرما نقش داشته باشد. در پژوهشی دیگر پیش‌تیمار ملاتونین باعث افزایش تجمع ساکارز در گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما شد، با این حال مقدار نشاسته را کمی کاهش داد (۱۳). نتایج پژوهشی دیگر نشان داده است که ملاتونین در شرایط تنش با افزایش فعالیت SBPase که یک آنزیم کلیدی در چرخه کالوین است به افزایش میزان کربن کمک می‌کند (۱۳). نتایج پژوهش حاضر نیز نتایج سایر پژوهش‌گران را تایید نموده و نشان می‌دهد که تیمار ملاتونین می‌تواند مقدار کربوهیدرات محلول را در گیاهان تیمار شده با ملاتونین افزایش دهد. در رابطه با تاثیر تیمار ملاتونین بر مقدار کربوهیدرات محلول، در پژوهش حاضر مشاهده شد که ملاتونین تاثیری معنی‌دار در سطح ۱ درصد بر مقدار کربوهیدرات داشته است (جدول ۳). میانگین مقدار کربوهیدرات محلول در گیاهانی که با ملاتونین تیمار شده بودند ۴۶ درصد نسبت به گیاهانی که این تیمار را دریافت نکرده بودند بیشتر بود (جدول ۴). در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش سرما، توانایی سنتز ترکیبات فنولی به گیاهان اجازه می‌دهد تا با چالش‌های محیطی که دائماً در حال تغییر هستند کنار بیایند. تنش‌های محیطی می‌توانند منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و سایر گونه‌های اکسیداتیو در گیاهان شوند. فنولیک‌های گیاهی نقشی کلیدی در ترکیبات دفاعی گیاهان دارند. مشاهده شده است که دمای پایین (اما نه یخ‌زدگی) موجب افزایش متابولیسم فنولیک‌ها در گیاهان می‌شود. تجزیه و تحلیل محتوای اسیدهای فنلی در طول تنش می‌تواند یکی از راه‌های تشخیص میزان مقاومت گیاه به یک عامل تنش‌زا باشد. بسیاری از پژوهش‌گران گزارش کرده‌اند که تنش‌های غیرزیستی باعث افزایش سنتز ترکیبات فنلی در بافت‌های گیاهی می‌شوند (۶۷). متابولیسم ترکیبات فنلی در دمای پایین بحرانی تحریک می‌شود، یعنی دمای آستانه‌ای که در آن آسیب ناشی از سرمازدگی نیز ایجاد می‌شود (۳۰). تنش سرما باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در دیواره سلولی به صورت سوبرین یا لیگنین می‌شود (۲۰). منصوری و همکاران (۴۸)، نشان دادند که پیش‌تیمار ملاتونین علاوه بر بهبود کیفیت حسی میوه توت‌فرنگی، تجمع فنل در میوه‌های تیمار شده را در مقایسه با میوه‌های شاهد افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که گندم‌هایی که تحت تیمار ملاتونین قرار گرفته‌اند قادر به حفظ محتوای ماده فنلی بیشتری در شرایط تنش سرما هستند (۶۴). فنول‌ها گروه بزرگی از ترکیبات را تشکیل می‌دهند که ممکن است به پنج زیرگروه تقسیم شوند: کومارین‌ها، لیگنین‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی و تانن‌ها (۲۲). در پژوهش حاضر ما شاهد افزایش ۲۵/۸ درصدی مقدار فنل کل در گیاهان تیمار شده با ملاتونین در برابر گیاهان شاهد، تحت تنش یخ‌زدگی بودیم، گرچه این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول‌های ۳ و ۴). در این پژوهش از بین اجراء فنل‌ها، میزان فلاونوئید کل مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شد که میزان فلاونوئید کل، افزایش قابل‌توجهی در گیاهان تیمار شده با ملاتونین نسبت به گیاهان تیمار نشده، تحت تنش یخ‌زدگی نشان داده است اما همان‌طور که ذکر شد تغییر معنی‌داری در میزان فنل کل در این آزمایش مشاهده نشد. در سنتز فنل‌ها مسیرها و اجزای بسیار متنوعی وجود دارد و این احتمال وجود دارد که علی‌رغم افزایش میزان فلاونوئید، در سایر ترکیبات فنلی کاهش رخ داده باشد و برآیند این کاهش و افزایش موجب عدم تغییر معنی‌دار در میزان فنل کل شده باشد. میانگین میزان فلاونوئید در پژوهش حاضر افزایشی ۸۶/۲ درصدی در گیاهان تیمار شده با ملاتونین نسبت به گیاهان شاهد، تحت تنش یخ‌زدگی نشان داد و این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول‌های ۳ و ۴). فلاونوئیدها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد فلاونوئیدها دارای

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹
DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

عملکرد آنتی‌اکسیدانی هستند (۲۴و ۵۵). فلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی تولید شده در گیاهان تحت تنش هستند و در جلوگیری از تولید گونه‌های فعال اکسیژن نقش داشته و باعث کاهش مقدار آن‌ها می‌شوند (۳۴). بیوسنتز فلاونوئیدهای آنتی‌اکسیدان در گونه‌های حساس به تنش بیشتر از گونه‌های مقاوم افزایش می‌یابد (۶۸). شرایط تنشی شدید ممکن است آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی را غیرفعال کند، در حالی که بیوسنتز فلاونوئیدها را به میزان بالایی تنظیم کند (۱۸). بنابراین، فعالیت فلاونوئیدها ممکن است یک سیستم آنتی‌اکسیدانی ثانویه باشد که در نتیجه کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی فعال می‌شود (۱۸). در شرایط یخ‌زدگی، مقدار زیادی آب از داخل سلول به کریستال یخ بین سلولی منتقل می‌شود، در این شرایط انتظار می‌رود که فلاونوئیدها به شدت به فاز لیپیدی غشاء سلولی اختصاص داده شده و موجب تثبیت آن‌ها شوند (۳۶). نشان داده شده است که استفاده از ملاتونین بیرونی بیوسنتز فلاونوئیدها را در گیاهان افزایش می‌دهد (۴۳). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که تحت تنش سرما گیاهان تیمار شده با ملاتونین محتوای فلاونوئید بیشتری را نسبت به گیاهان شاهد که تیماری دریافت نکرده بودند، داشتند. بنابراین احتمالاً ملاتونین نقش موثری در افزایش محتوای فلاونوئیدها دارد.

نتیجه‌گیری کلی

در چند سال گذشته پیشرفت‌های چشمگیری در رابطه با اثرات ملاتونین در گیاهان بدست آمده است. این پیشرفت‌ها، دانش وجود، متابولیسم و عملکرد ملاتونین در گیاهان را گسترش داده است. تا به امروز انبوهی از پژوهش‌ها نشان داده‌اندکه ملاتونین نقش اساسی در بهبود تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. غلظت ملاتونین درون‌زا در گیاهان تحت شرایط تنشی مختلف افزایش می‌یابد و این بدان معنی است که ملاتونین در تنظیم تحمل تنش در گونه‌های مختلف گیاهی نقش دارد. نتایج پژوهش حاضر که تاثیر کاربرد خارجی هورمون ملاتونین بر برخی صفات فیزیولوژیکی مرتبط با تنش سرما را در برگ‌های گیاه توت‌فرنگی مورد بررسی قرار داد، تایید می‌نماید که ملاتونین خارجی می‌تواند تأثیری مثبت بر برخی از این صفات در گیاه داشته باشد و احتمالاً موجب افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش سرما شود.

منابع

1. Adams, W.W., Muller, O., Cohu, C.M., and Demmig-Adams, B., 2013. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? Photosynthesis Research, 117(1–3), PP: 31–44. doi: 10.1007/S11120-013-9849-7.
2. Adams, W.W., Muller, O., Cohu, C.M., and Demmig-Adams, B., 2014. Photosystem II Efficiency and Non-Photochemical Fluorescence Quenching in the Context of Source-Sink Balance. In: Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W., Govindjee (eds) Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration (Including Bioenergy and Related Processes), vol 40, PP: 503–529. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1_23.
3. Ahmad, S., Kamran, M., Ding, R., Meng, X., Wang, H., Ahmad, I., Fahad, S., and Han, Q., 2019. Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. PeerJ, 2019(10), doi: 10.7717/PEERJ.7793/SUPP-2
4. Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., and Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell & Environment, 24(12), PP: 1337–1344. doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00778.X
5. Améglio, T., Cochard, H., and Ewers, F.W., 2001. Stem diameter variations and cold hardiness in walnut trees. Journal of Experimental Botany, 52(364), 2135–2142. doi: 10.1093/jexbot/52.364.2135
6. Arnao, M.B., and Hernández-Ruiz, J., 2019. Melatonin and reactive oxygen and nitrogen

species: a model for the plant redox network. Melatonin Research, 2(3), PP: 152–168. doi: 10.32794/11250036

7. Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology, 141(2), PP: 391–396. doi: 10.1104/PP.106.082040
8. Barrs, H., and Weatherley, P., 1962. are-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences, 15(3), 413p. doi: 10.1071/bi9620413.
9. Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39(1), PP: 205–207, doi: 10.1007/BF00018060/METRICS
10. Becana, M., Moran, J.F., and Iturbe-Ormaetxe, I., 1998. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. Plant and Soil, 201(1), PP: 137–147. doi: 10.1023/A:1004375732137.
11. Beck, E.H., Heim, R., and Hansen, J., 2004. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening, Journal of Biosciences, 29(4), PP: 449–459. doi: 10.1007/BF02712118.
12. Bhattacharya, J., GhoshDastidar, K., Chatterjee, A., Majee, M., and Majumder, A.L., 2004. Synechocystis Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 316(2), PP: 540–544. doi: 10.1016/J.BBRC.2004.02.084.
13. Ding, F., Liu, B., and Zhang, S., 2017. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. Scientia Horticulturae, 219, PP: 264–271. doi: 10.1016/j.scienta.2017.03.029.
14. Esterbauer, H., and Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology, 186(C), PP: 407–421. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-H.
15. Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology and Medicine, 11(1), PP: 81–128. doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6.
16. Fan, J., Hu, Z., Xie, Y., Chan, Z., Chen, K., Amombo, E., Chen, L., and Fu, J., 2015. Alleviation of cold damage to photosystem II and metabolisms by melatonin in Bermudagrass. Frontiers in Plant Science, 6(NOVEMBER), 925. doi: 10.3389/FPLS.2015.00925/BIBTEX.
17. Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., and Chen, L., 2018. Melatonin: A multifunctional factor in plants. International Journal of Molecular Sciences, 19(5). doi: 10.3390/ijms19051528.
18. Fini, A., Guidi, L., Ferrini, F., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Biricolti, S., Pollastri, S., Calamai, L., and Tattini, M., 2012. Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in Fraxinus ornus leaves: An excess light stress affair? Journal of Plant Physiology, 169(10), PP: 929–939. doi: 10.1016/J.JPLPH.2012.02.014.
19. Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A.R., Karpiński, S., and Mittler, R., 2016. ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. Plant Physiology, 171(3), PP: 1606–1615. doi: 10.1104/PP.16.00434.
20. Griffith, M., and Yaish, M.W.F., 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. Trends in Plant Science, 9(8), PP: 399–405. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2004.06.007.
21. Guan, C., Huang, Y.H., Cui, X., Liu, S.J., Zhou, Y.Z., and Zhang, Y.W., 2018. Overexpression of gene encoding the key enzyme involved in proline-biosynthesis (PuP5CS) to improve salt tolerance in switchgrass (*Panicum virgatum* L.), Plant Cell Reports, 37(8), PP: 1187–1199. doi: 10.1007/s00299-018-2304-7.
22. Gumul, D., Korus, J., and Achremowicz, B., 2007. The influence of extrusion on the content of polyphenols and antioxidant/antiradical activity of rye grains (*Secale cereale* L.), Acta Sci. Pol., Technol, Aliment, 6(4), PP: 103-111.
23. Halliwell, B., Clement, M.V., and Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Letters, 486(1), PP: 10–13. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02197-9.
24. Hernández, I., Chacón, O., Rodriguez, R., Portieles, R., López, Y., Pujol, M., and Borrás-Hidalgo, O., 2009. Black shank resistant tobacco by silencing of glutathione S-transferase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 387(2), PP: 300–304. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.003.
25. Hernández, J.A., Barba-Espín, G., and Diaz-Vivancos, P., 2017. Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. Glutathione in Plant

Growth, Development, and Stress Tolerance, PP: 309–329. doi: 10.1007/978-3-319-66682-2_14

26. Hu, Z., Fan, J., Xie, Y., Amombo, E., Liu, A., Gitau, M.M., Khaldun, A.B.M., Chen, L., and Fu, J., 2016. Comparative photosynthetic and metabolic analyses reveal mechanism of improved cold stress tolerance in bermudagrass by exogenous melatonin. Plant Physiology and Biochemistry, 100, PP: 94–104. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2016.01.008.

27. Huang, B., Chen, Y.E., Zhao, Y.Q., Ding, C.B., Liao, J.Q., Hu, C., Zhou, L.J., Zhang, Z.W., Yuan, S., and Yuan, M., 2019. Exogenous melatonin alleviates oxidative damages and protects photosystem ii in maize seedlings under drought stress. Frontiers in Plant Science, 10, 677. doi: 10.3389/FPLS.2019.00677/BIBTEX.

28. Huang, X., Chen, M.H., Yang, L.T., Li, Y.R., and Wu, J.M., 2015. Effects of exogenous abscisic acid on cell membrane and endogenous hormone contents in leaves of sugarcane seedlings under cold stress. Sugar Tech, 17(1), PP: 59–64. doi: 10.1007/s12355-014-0343-0.

29. Ishida, H., Makino, A., and Mae, T., 1999. Fragmentation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase by Reactive Oxygen Species Occurs near Gly-329. Journal of Biological Chemistry, 274(8), 5222–5226. doi: 10.1074/JBC.274.8.5222

30. Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., and Ovesná, J., 2010. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment? Plant Biology, 12(3), PP: 395–405. doi: 10.1111/J.1438-8677.2009.00299.X.

31. Kang, K., Lee, K., Park, S., Kim, Y.S., and Back, K., 2010. Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin N-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. Journal of Pineal Research, 49(2), PP: 176–182. doi: 10.1111/J.1600-079X.2010.00783.X

32. Karami, F., Gholami, M., Ershadi, A., Sio-Se Mardeh, A., Ph Student, F.D., and Professor, A., 2018. Evaluation of winter cold tolerance and critical temperature (LT50) estimation in 21 strawberry cultivars, Iranian Journal of Horticultural Science, 49(1), PP: 79–91. doi: 10.22059/IJHS.2017.213337.1060.

33. Kasajima, I., 2017. Difference in oxidative stress tolerance between rice cultivars estimated with chlorophyll fluorescence analysis. BMC Research Notes, 10(1), PP: 1–12. doi: 10.1186/S13104-017-2489-9/TABLES/1.

34. Kaur, G., and Asthir, B., 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. Biologia Plantarum, 59(4), PP: 609–619. doi: 10.1007/S10535-015-0549-3

35. Kingston-Smith, A.H., Harbinson, J., and Foyer, C.H., 1999. Acclimation of photosynthesis, H2O2 content and antioxidants in maize (Zea mays) grown at sub-optimal temperatures, Plant, Cell & Environment, 22(9), PP: 1071–1083. doi: 10.1046/J.1365-3040.1999.00469.X.

36. Korn, M., Peterek, S., Mock, H.P., Heyer, A.G., and Hincha, D.K., 2008. Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between Arabidopsis thaliana accessions of widely varying freezing tolerance. Plant, Cell & Environment, 31(6), PP: 813–827. doi: 10.1111/J.1365-3040.2008.01800.X

37. Krasavina, M.S., Burmistrova, N.A., and Raldugina, G.N., 2014. The role of carbohydrates in plant resistance to abiotic stresses. Emerging technologies and management of crop stress tolerance: Biological Techniques, 1, PP: 229–270. doi: 10.1016/B978-0-12-800876-8.00011-4

38. Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., and Mori, W., 2002. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes1, Journal of the American Chemical Society, 80(10), 2587 p. doi: 10.1021/JA01543A060.

39. Li, H., Dong, Y., Chang, J., He, J., Chen, H., Liu, Q., Wei, C., Ma, J., Zhang, Y., Yang, J., and Zhang, X., 2016. High-throughput MicroRNA and mRNA sequencing reveals that microRNAs may be involved in melatonin-mediated cold tolerance in *Citrullus lanatus* L. Frontiers in Plant Science, 7(AUG2016), 1231p. doi: 10.3389/FPLS.2016.01231/BIBTEX.

40. Li, J., Yang, Y., Sun, K., Chen, Y., Chen, X., and Li, X. 2019. Exogenous melatonin enhances cold, salt and drought stress tolerance by improving antioxidant defense in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Molecules, 24(9), 1826 p. doi: 10.3390/molecules24091826.

41. Li, X., Wei, J.P., Scott, E.R., Liu, J.W., Guo, S., Li, Y., Zhang, L., and Han, W.Y., 2018. Exogenous melatonin alleviates cold stress by promoting antioxidant defense and redox homeostasis in *Camellia sinensis* L. Molecules, 23(1), 165 p. doi: 10.3390/molecules23010165.

42. Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food

Chemistry, 96(2), PP: 254–260. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.033.

43. Liang, D., Shen, Y., Ni, Z., Wang, Q., Lei, Z., Xu, N., Deng, Q., Lin, L., Wang, J., Lv, X., and Xia, H., 2018. Exogenous melatonin application delays senescence of kiwifruit leaves by regulating the antioxidant capacity and biosynthesis of flavonoids. Frontiers in Plant Science, 0, 426. doi: 10.3389/FPLS.2018.00426.

44. Liu, Y., Dang, P., Liu, L., and He, C., 2019. Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports, 38(5), PP: 511–519. doi: 10.1007/S00299-019-02376-3/FIGURES/3.

45. Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J., 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. Journal of Experimental Botany, 46(12), PP: 1843–1852. doi: 10.1093/jxb/46.12.1843.

46. Manchester, L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K., and Qi, W., 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants: Possible function in germ tissue protection. Life Sciences, 67(25), PP: 3023–3029. doi: 10.1016/S0024-3205(00)00896-1.

47. Mano, J., Torii, Y., Hayashi, S., Takimoto, K., Matsui, K., Nakamura, K., Inzé, D., Babiychuk, E., Kushnir, S., and Asada, K., 2002. The NADPH: Quinone oxidoreductase p1-ζ-crystallin in Arabidopsis catalyzes the α, β-hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. Plant and Cell Physiology, 43(12), PP: 1445–1455. doi: 10.1093/PCP/PCF187

48. Mansouri, S., Sarikhani, H., Sayyari, M., Solimani Aghdam, M., and Askari Sarcheshmeh, M.A., 2021. Effect of preharvest treatment of melatotin on ripening and postharvest qualitative characteristics of strawberry (*Fragaria* × *anannasa* cv. Queen Elisa). Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 34(3), PP: 643–657.

49. Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G.B., Pozo, M.J., Pieterse, C.M.J., and Wees, S.C.M., Van, 2017. Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by Trichoderma protects tomato against the root knot nematode Meloidogyne incognita, New Phytologist, 213(3), PP: 1363–1377. doi: 10.1111/NPH.14251.

50. McKersie, B. D., and Bowley, S. R., 1997. Active Oxygen and Freezing Tolerance in Transgenic Plants, Plant Cold Hardiness, PP: 203–214. doi: 10.1007/978-1-4899-0277-1_18

51. Moustafa-Farag, M., Almoneafy, A., Mahmoud, A., Elkelish, A., Arnao, M.B., Li, L., and Ai, S., 2019. Melatonin and its protective role against biotic stress impacts on plants, Biomolecules, 10(1), 54, doi: 10.3390/BIOM10010054

52. Moustafa-Farag, M., Mahmoud, A., Arnao, M.B., Sheteiwy, M.S., Dafea, M., Soltan, M., Elkelish, A., Hasanuzzaman, M., and Ai, S., 2020. Melatonin-induced water stress tolerance in plants: Recent advances. Antioxidants, 9(9), PP: 1–23. doi: 10.3390/ANTIOX9090809.

53. Nakashima, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. Physiologia Plantarum, 126(1), PP: 62–71. doi: 10.1111/J.1399-3054.2005.00592.X.

54. Paquin, R., and Lechasseur, P., 1979. Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. Canadian Journal of Botany, 57(18), PP: 1851–1854. doi: 10.1139/B79-233

55. Pollastri, S., and Tattini, M., 2011. Flavonols: old compounds for old roles. Annals of Botany, 108(7), PP: 1225–1233. doi: 10.1093/AOB/MCR234.

56. Sarikhani, H., and Safariyan-Nejad, M.S., 2021. Improving of winter cold hardiness by glycine betaine in strawberry. International Journal of Horticultural Science and Technology, 8(4), PP: 401–413.

57. Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M.B., Ali, M., Ali, Q., Muhammad, I., Shalmani, A., Nawaz, M.A., Chen, P., and Li, Y., 2018. Melatonin and its effects on plant systems. Molecules, 23(9). doi: 10.3390/MOLECULES23092352.

58. Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., and 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(3), PP: 681–694. doi: 10.1093/jxb/eru373.

59. 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.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹ DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

International Journal of Molecular Sciences, 20(2). doi: 10.3390/IJMS20020353.

60. Singleton, V.L., and Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16(3), PP: 144-158.

61. Stewart, R.R.C., and Bewley, J.D., 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology, 65(2), PP: 245–248. doi: 10.1104/PP.65.2.245.

62. Szafrańska, K., Glińska, S., and 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(1), PP: 34–40. doi: 10.1016/j.jplph.2011.08.011.

63. Tassel, D.L., Van, Roberts, N., Lewy, A., and O'Neill, S.D., 2001. Melatonin in plant organs, Journal of Pineal Research, 31(1), PP: 8–15. doi: 10.1034/J.1600-079X. 2001.310102.X

64. Turk, H., Erdal, S., Genisel, M., Atici, O., Demir, Y., and Yanmis, D., 2014. The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. Plant Growth Regulation, 74(2), PP: 139–152. doi: 10.1007/S10725-014-9905-0.

65. Uchendu, E.E., Shukla, M.R., Reed, B.M., and Saxena, P.K., 2013. Melatonin enhances the recovery of cryopreserved shoot tips of American elm (*Ulmus americana* L.). Journal of Pineal Research, 55(4), PP: 435–442. doi: 10.1111/JPI.12094

66. Uemura, M., and Steponkus, P.L., 1993. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. Advances in Low Temperature Biology, 3, PP: 211–312.

67. Weidner, S., Karolak, M., Karamać, M., and Amarowicz, R., 2011. Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 78(2), PP: 97–103. doi: 10.5586/asbp.2009.013.

68. Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R., and Rensing, S.A., 2010. The molecular and physiological responses of physcomitrella patens to ultraviolet-b radiation. Plant Physiology, 153(3), PP: 1123–1134. doi: 10.1104/PP.110.154658.

69. Wu, J., Lightner, J., Warwick, N., and Browse, J., 1997. Low-temperature damage and subsequent recovery of fab1 mutant arabidopsis exposed to 2°C. Plant Physiology, 113(2), PP: 347–356. doi: 10.1104/pp.113.2.347.

70. Xin, Z., and Browse, J., 2000. Cold comfort farm: The acclimation of plants to freezing temperatures. Plant, Cell and Environment, 23(9), PP: 893–902. doi: 10.1046/J.1365-3040.2000.00611.X.

71. Xu, W., Rosenow, D.T., and Nguyen, H.T., 2000. Stay green trait in grain sorghum: Relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. Plant Breeding, 119(4), PP: 365–367. doi: 10.1046/j.1439-0523.2000.00506.X.

72. Yadegari, L.Z., Heidari, R., and Carapetian, J., 2007. The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (Glycine max) seedlings. Journal of Biological Sciences, 7(8), PP: 1436–1441. doi: 10.3923/jbs.2007.1436.1441.

73. Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K., and Sugimoto, Y., 2008. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. Plant Physiology and Biochemistry, 46(8–9), PP: 786–793. doi:10.1016/J.PLAPHY.2008.04.018.

74. Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2015. Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. Plant and Cell Physiology, 56(6), PP: 1043–1052. doi: 10.1093/PCP/PCV060.

75. Zhao, H., Zhang, K., Zhou, X., Xi, L., Wang, Y., Xu, H., Pan, T., and Zou, Z., 2017. Melatonin alleviates chilling stress in cucumber seedlings by up-regulation of CsZat12 and modulation of polyamine and abscisic acid metabolism. Scientific Reports, 7(1), PP: 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-05267-3.

76. Zhao, Y., Qi, L.W., Wang, W.M., Saxena, P.K., and Liu, C.Z., 2011. Melatonin improves the survival of cryopreserved callus of *Rhodiola crenulata*. Journal of Pineal Research, 50(1), PP: 83–88. doi: 10.1111/J.1600-079X. 2010.00817.X.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۹۵-۳۷۹ DOI: 10.22034/JPR.2023.2176

Study of the melatonin pre-treatment effect on some physiological traits of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivar 'Paros' under freezing stress

Yousefi S., Gholami M. and Sarikhani H.

Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan. I.R. of Iran

Abstract

Recently, melatonin was proved to be a candidate hormone that could increase the cold and heat stress tolerance in plants. Cold stress is important abiotic stress for plants in nature. In this study, in order to investigate the effect of exogenous application of melatonin on some physiological traits related to cold (freezing) stress on the strawberry cultivar 'Paros' a pot experiment with three replications was performed in a completely randomized design. Strawberry plants pre-treated with 100 µM melatonin were subjected to freezing stress treatment (-9°C for 3 h without cold acclimation) after two weeks some physiological traits (proline, carbohydrate, total flavonoid, chlorophyll content index, ion leakage, hydrogen peroxide, content of water, malondialdehyde, and total phenol) related to cold stress in plant leaves were measured. The results showed that melatonin treatment has a significant effect on some physiological traits (proline, carbohydrate, total flavonoid, chlorophyll content index, ion leakage, and hydrogen peroxide) in the strawberry plants under freezing stress. Proline, carbohydrate, total flavonoid, and chlorophyll content index were significantly enhanced, and a significant reduction was observed in ion leakage and hydrogen peroxide in melatonin-pre-treated plants. In this experiment, melatonin treatment had no significant effect on the relative water content, malondialdehyde, and total phenol. According to the results of our study, exogenous application of melatonin could effectively improve freezing tolerance in strawberry plants after two weeks of application.

Key words: Osmolytes, Cold stress, Ion leakage, Melatonin