مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

بررسی امکان مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی در رقم پیاز قرمز آذرشهر با کاربرد ملاتونین

بیتا خوانساری‌نژاد[۱]، فرشاد دشتی[۱*]، دوستمراد ظفری[۲] و اصغر میرزایی اصل[۳]

[۱] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

[۲] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

[۳] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۶

چکیده

به منظور بررسی اثر ملاتونین بر القاء مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ایجاد شده با قارچ *Fusarium oxyspurum* f.sp. *cepae* در گیاه پیاز رقم قرمزآذرشهر آزمایشی با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار ملاتونین صورت گرفت. در این پژوهش تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی بعد از تیمار غلظت‌های مختلف ملاتونین و بیماری پوسیدگی فوزاریومی در طی زمان‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور خصوصیاتی مانند فنل کل، پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز) و آنزیم‌های وابسته به بیماری (کیتیناز، فنیل آلانین آمونیالیاز و بتا ۱- ۴ گلوکوناز) بررسی شدند. نتایج نشان داد کاربرد ملاتونین خارجی در گیاهان تحت تیمار فوزاریوم با افزایش میزان فنل کل ، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین آنزیم‌های وابسته بیماری همراه بود که در نتیجه آن، میزان میزان مالون‌دی‌آلدئید کاهش یافت و پراکسید هیدروژن در گیاهان تحت تیمار فوزاریوم تعدیل شد. اگرچه تمام غلظت‌های مورد استفاده ملاتونین باعث تغییر برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاهان پیاز تحت تنش بیماری پوسیدگی فوزاریومی شدند، اما در مجموع بهترین نتیجه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین برای القاء مقاومت به گیاهان پیاز تحت تنش بیماری پوسیدگی فوزاریومی در روزهای دوازدهم و شانزدهم دیده شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های وابسته به بیماری، پراکسید هیدروژن، گایاکول پراکسیداز، مالون دی آلدئید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۹۱۸۳۱۳۳۵۴۱ ، پست الکترونیکی: dashti1350@yahoo.com، fdashti@basu.ac.ir

مقدمه

پیاز یک محصول مهم باغبانی از خانواده *Amaryllidaceae* است که در عرض‌های جغرافیایی مختلف رشد می‌کند و دومین میزان تولید را در بین سبزی‌ها دارا می‌باشد (۳۷). پیاز به‌وسیله پاتوژن‌هایی مانند قارچ، باکتری، نماتد و ویروس‌ها موردحمله قرار می‌گیرد (۲۷). یکی از بیماری-های مهم قارچی که پیاز را مورد حمله قرار می‌دهد، پوسیدگی‌فوزاریومی است که توسط قارچ *Fusarium oxyspurum* f.sp. *cepae* (FOC) ایجاد می‌شود. این قارچ خاکزی هرساله خسارت اقتصادی زیادی را به تولیدکنندگان پیاز وارد می‌کند (۳۲). بیماری پوسیدگی فوزاریومی می‌تواند برگ‌ها، ریشه‌ها، صفحه پایگاهی و فلس‌های پیاز را در مراحل مختلف رشد موردحمله قرار دهد (۱۲). علائم این بیماری در مراحل مختلف رشد متفاوت است، به‌طوری‌که در مرحله دانهالی باعث کم شدن رشد دانهال و مرگ گیاهچه می‌شود. در گیاهان بالغ علائم آلودگی به این بیماری شامل نکروزه شدن بافت‌ها و صفحه

DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

پایگاهی، از بین رفتن و مرگ ریشه‌ها و یا در برخی از گیاهان منجر به کلروز تمام برگ‌ها شده و بعد از آن نکروزه شدن از نوک برگ‌ها شروع و سپس تمام برگ را در بر می گیرد (۱۲).

گیاهان از یک سیستم دفاعی پیچیده و پویا مانند موانع فیزیکی و شیمیایی مختلف برای مقابله با پاتوژن‌ها استفاده می‌کنند (۳۰). این مکانیسم‌های دفاعی از چند وجه صورت می‌گیرد که شامل از بین بردن رادیکال‌های آزاد، بیان ژن‌های دفاعی گیاه و تولید ترکیبات ضدمیکروبی است (۷). علاوه بر این موانع، گیاهان دارای سیستم دفاعی به نام سیستم ایمنی ذاتی (Innate Immunity) هستند، به‌طوری‌که سلول‌ها، حمله پاتوژن را احساس کرده و به‌سرعت از خود واکنش نشان می‌دهند. یکی از این پاسخ‌ها، القاء تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogen-related proteins; PR-Proteins) است (۸). در میان این پروتئین‌ها، خانواده PR-3 نقش مهمی را در مقاومت گیاهان به بیماری‌های قارچی بازی می‌کنند. آنزیم کیتیناز از این دسته از پروتئین‌ها است که همراه با بتا ۱و ۴ گلوکوناز و پراکسیدازها نقش دفاعی را در گیاهان هنگام تنش زیستی دارند (۴۱). برخی از محققین معتقد هستند که ترکیبات فنلی نیز به‌طور مستقیم در پاسخ گیاهان به پاتوژن اثر دارند (۵۳). علاوه بر مقاومت ذاتی گیاهان، راه‌های مختلفی برای مقابله با بیماری پوسیدگی‌فوزاریومی گزارش‌شده‌است که از جمله می‌توان به تولید گیاهان میزبان مقاوم، تناوب‌کشت با گیاهانی غیرحساس به این بیماری مانند کشت گندم بهاره و یا ذرت به مدت چهار سال در زمین زراعی، کنترل بیولوژیک و استفاده از موادشیمیایی اشاره کرد (۱۲).

در طی سال‌های اخیر استفاده از عوامل غیرزنده برای القاء مقاومت به تنش‌های زیستی موردتوجه قرارگرفته‌است. یکی از این عوامل غیرزنده، تنظیم کننده رشدگیاهی جدیدی به نام ملاتونین است (۳۶). ملاتونین یک ترکیب ایندولی از پیش ماده تریپتوفان است و در سال ۱۹۹۵ در گیاهان شناسایی‌شده است (۵۴). این ماده مولکولی چندکاره و مؤثر در فعالیت‌های فیزیولوژیکی متعدد مانند رشد و نمو، ریشه زایی، جوانه‌زنی بذر، فتوسنتز و حفاظت علیه تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (۲۸). ملاتونین قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارد به‌طوری‌که توان آنتی‌اکسیدانی آن چهار برابر گلوتاتیون و دو برابر ویتامین E برآورد شده است (۴۲). در تحقیقات انجام‌شده روی آرابیدوپسیس و تنباکو مشخص شد ملاتونین با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تجمع سلولز و گالاکتوز در دیواره سلولی، افزایش بیان ژن‌های دفاعی مرتبط با بیماری، افزایش نیتریک اکسید و تاثیر بر مسیرهای سیگنالی تولید سالسیلیک اسید و جاسمونیک اسید باعث افزایش مقاومت گیاه به پاتوژن‌ها از طریق کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شوند (۵). مطالعاتی با کاربرد ملاتونین خارجی برای القاء مقاومت به پاتوژن‌های گیاهی در سیب (۵۳) ،خیار (۴۲) وگوجه‌فرنگی (۲۵) انجام‌شده است.

در طی سال‌های اخیر استفاده از سموم برای کنترل آفات و بیماری‌ها به طور چشمگیری افزایش یافته است و تجمع این مواد در محصولات زراعی و باغی، سلامت انسان و محیط‌زیست را به مخاطره انداخته است، از طرف دیگر مقاوم شدن عوامل بیماری زا نسبت به سموم موجود، کنترل بیماری را با مشکل مواجه کرده است. درنتیجه یافتن روش‌های امن و غیرمضر برای مقابله با بیماری‌های گیاهی ضرورت پیدا می‌کند. هدف از این تحقیق بررسی اثر هورمون ملاتونین بر کاهش شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی و مکانیزم احتمالی القای مقاومت در پیاز است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: از پیاز رقم قرمز آذرشهر که در تحقیقات گذشته به‌عنوان رقم حساس (دادهای منتشرنشده) به قارچ FOC شناسایی‌شده بود، به‌عنوان ماده گیاهی برای این آزمایش استفاده شد. بذرهای پیاز رقم قرمز آذرشهر ابتدا

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

توسط هیپوکلرید سدیم ۵ ٪ ضدعفونی و سه بار با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو داده شدند و سپس در سینی نشاء کاشته شدند. پس از ۴۵ روز، نشاءهای چهار برگی به گلدان‌های سه لیتری پرشده با خاک شنی لومی اتوکلاو شده، منتقل شدند، گیاهان به مدت پنج روز در محیط گلخانه برای سازگار شدن با محیط در گلخانه نگهداری شدند و سپس تیمار گیاهان انجام شد و در نهایت گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۱۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

آماده کردن سوسپانسیون اسپوری: در مطالعات مقدماتی شناسایی قارچ FOC با استفاده از آزمایش‌های مولکولی و آزمون دامنه میزبانی در گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام شد و در کلکسیون موسسه گیاه پزشکی کشور ثبت گردید (۱). برای انجام این تحقیق ابتدا تکثیر جدایه HR1 (IRAN 3741C) قارچ FOC در محیط کشت PDA صورت گرفت. سپس پتری دیش‌ها در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. تهیه سوسپانسیون اسپوری برای تلقیح به خاک گیاهان با غلظت 10^6 اسپور/میلی لیتر انجام شد (۴۵).

تیمار گیاهان: این پژوهش در گلخانه گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان، در چهار سطح ملاتونین با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار و دو سطح فوزاریوم (بدون فوزاریوم/ فوزاریوم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار که هر تکرار حاوی ۱۰ گیاه بود صورت گرفت. برای انجام این آزمایش ابتدا نیمی از گیاهان با غلظت‌های مختلف ملاتونین و بقیه گیاهان با آب مقطر اتوکلاو شده محلول-پاشی برگی شدند. سه روز بعد از محلول‌پاشی برگی با ملاتونین، گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف ملاتونین و گیاهان بدون تیمار ملاتونین به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول که شامل گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف ملاتونین بود با سوسپانسیون اسپوری قارچ فوزاریوم با غلظت 10^6 اسپور/میلی لیتر به میزان ۴۰ میلی لیتر(فوزاریوم همراه با ملاتونین و یا فوزاریوم و بدون ملاتونین) تقسیم شدند و گروه دوم با آب مقطر اتوکلاو شده و بدون تیمار فوزاریوم (بدون ملاتونین و بدون فوزاریوم، ملاتونین و بدون فوزاریوم) تقسیم شدند. پس از تلقیح گیاهان در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در روزهای صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ پس از تلقیح، نمونه‌برداری از برگ‌های هر تیمار انجام شد و نمونه‌ها سریعاً در نیتروژن مایع فریز شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر ۸۰- برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند (۳۱، ۱۷). سنجش شدت بیماری (Severity Index)، برای هر گروه ۳۵ روز بعد از تیماردهی با فوزاریوم انجام شد. ارزیابی شدت بیماری با استفاده از این فرمول = (رتبه دهی گیاهان آلوده به بیماری پوسیدگی فوزاریومی× تعداد گیاهان قرار گرفته در این رتبه دهی)/ تعداد کل گیاهان) انجام شد و رتبه دهی بین ۳-۰ صورت گرفت، به‌طوری‌که ۴ عدد تعریف شد: ۰= گیاهان بدون علائم یا کمتر از ۱۰ ٪ آلودگی در ریشه و صفحه پایگاهی، ۱= آلودگی ملایم که بین ۱۰ -۲۰ ٪ صفحه پایگاهی و ریشه‌ها آلوده‌شده باشند، ۲= آلودگی متوسط که بین ۲۰-۵۰٪ علائم بیماری در ریشه و یا صفحه پایگاهی مشاهده شد، ۳= آلودگی زیاد که بیشتر از ۵۰ ٪ بود و علائم در ریشه‌ها، صفحه پایگاهی به عبارتی دیگر آلودگی کل گیاه پیاز را در برگرفته باشد (۳۱، ۱۷).

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی: غلظت پراکسیدهیدروژن براساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید انجام شد و نمونه‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شدندو میزان H_2O_2 برحسب نانو مول بر گرم وزن‌تر انجام شد (۴). برای اندازه‌گیری غلظت فنل کل از معرف فولین-سیکالتو استفاده شد و نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر، قرائت شدند (۱۵).

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

برای اندازه‌گیری محتوای مالون دی آلدئید (MDA) از روش استوارت و بیولی استفاده شد (۴۰). از یک عصاره‌ی آنزیمی مشابه برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) از برگ‌های پیاز استفاده شد، به طوریکه تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز از روش چنس و مهلی با کمی تغییر انجام شد و اثر فعالیت آنزیم GPX با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۲ دقیقه (هر ۵ ثانیه یک‌بار قرائت) اندازه‌گیری شد (۲۶). فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش کلیبورون مورد ارزیابی قرار گرفت و ثبت تغییرات جذب نور نمونه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه (هر ۵ ثانیه یک‌بار قرائت) با دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد (۱۱).

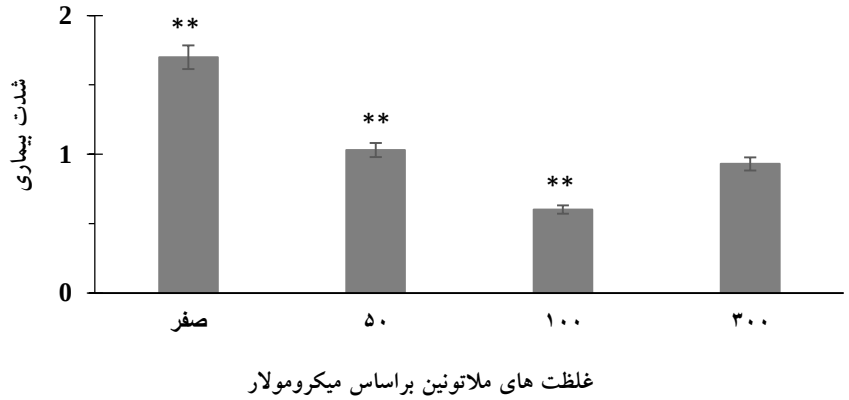
اندازه‌گیری آنزیم‌های مرتبط با مقاومت به بیماری شامل ارزیابی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL) بر اساس واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید در نمونه های مورد آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند و تغییرات جذب نور محلول با تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر برای برنامه کنیتیک ثبت گردید (۱۰). بررسی فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکوناز به روش یدیدیا صورت گرفت (۵۲) و فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از روش بنسود و باجکال انجام شد (۶).

آنالیز آماری

آزمون نرمال سازی داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنف انجام شد و پس از اطمینان از نرمال بودن داده ها تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS (۹/۴) استفاده شده برای تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS (۹/۴) استفاده شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ ٪ انجام گرفت.

نتایج

شدت بیماری: بر اساس نتایج مربوط به‌شدت بیماری، تیمار غلظت‌های مختلف ملاتونین مقاومت گیاه را نسبت به قارچ FOC افزایش داد. آنالیز داده‌های مربوط به شدت بیماری حاکی از تأثیر غلظت ۱۰۰ میکرومولار مولاتونین در کاهش شدت بیماری به میزان ۶۴ درصد بود و پس‌ازآن غلظت ۳۰۰ میکرومولار با کاهش ۴۵ درصدی بیشترین تأثیر را داشت (شکل ۱). علاوه براین، حجم ریشه گیاهان تیمار شده با ملاتونین افزایش‌یافته بود و گیاهان تیمار شده با ملاتونین نیز دارای ریشه‌های سالمی در مقایسه با گیاهان شاهد بودند (شکل۲).



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف ملاتونین (صفر، ۵۰، ۱۰۰، و ۳۰۰ میکرومولار) ۳۵ روز بعد از تلقیح بر شدت بیماری نسبت به شاهد. ** تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون LSD انجام شد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف ملاتونین ۳۵ روز بعد از تیمار با فوزاریوم.

A: بدون ملاتونین و بدون فوزاریوم، B: بدون ملاتونین همراه با فوزاریوم ، C: ملاتونین ۵۰ میکرومولار به همراه فوزاریوم D: ملاتونین ۵۰ میکرومولار بدون فوزاریوم E: ملاتونین ۱۰۰ میکرومولاربه همراه فوزاریوم ، F: ملاتونین ۱۰۰ میکرو مولار بدون فوزاریوم، G: ملاتونین ۳۰۰ میکرومولار به همراه فوزاریوم، H: ملاتونین ۳۰۰ میکرومولار بدون فوزاریوم

پراکسیدهیدروژن: نتایج مربوط به میزان H_2O_2 نشان دادند که این صفت به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر فوزاریوم، غلظت‌های مختلف ملاتونین، زمان نمونه‌برداری و اثرات متقابل بین آن‌ها است (جدول ۱). غلظت ۵۰ میکرومولار ملاتونین در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم در روز چهارم باعث کاهش H_2O_2 به میزان ۱۴۶/۲۹ درصد نسبت به گیاهان شاهد در همان روز شد. علاوه بر این، در روز دوازدهم غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم و بدون تیمار با فوزاریوم، میزان H_2O_2 به ترتیب ۴۲/۸۵ درصد و ۷۱/۷۸ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش پیدا کرد (شکل ۳-الف). نتایج حاصل داده‌ها نشان داد که ملاتونین تاثیر مثبتی بر کاهش میزان H_2O_2 چه در گیاهان تحت تنش فوزاریوم و بدون فوزاریوم داشته است و بهترین نتیجه در غلظت ۵۰ میکرومولار ملاتونین بدست آمد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل همبستگی داده‌ها مشخص کرد که میزان H_2O_2 با میزان فنل کل و با برخی از آنزیم‌ها از جمله کیتیناز و بتا ۱ و ۴ گلوکوناز دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۲).

فنل کل و مالون دی آلدئید: تحت تنش بیماری پوسیدگی فوزاریومی میزان فنل‌کل برگ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر فوزاریوم، غلظت‌های ملاتونین، زمان و اثرات متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ۱). کاربرد ملاتونین باعث افزایش معنی‌دار فنل‌کل برگ نسبت به گیاهان شاهد شد و بیشترین محتوای فنل‌کل مربوط به گیاهان تیمار شده با فواریوم با غلظت ۵۰ میکرومولار ملاتونین در روز شانزدهم بود که ۱۲/۰۶درصد فنل کل بیشتری نسبت به تیمار شاهد در همان روز داشت و تیمارهای فوزاریوم به همراه غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روزشانزدهم و بیستم به ترتیب ۶/۲۵ درصد و ۶/۹۰ درصد فنل کل بیشتری را نسبت گیاهان شاهد دارا بودند (شکل ۳-ب). براساس نتایج بدست آمده از همبستگی صفات، فنل کل با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های وابسته به بیماری دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح یک درصد بود.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمار ملاتونین بر فعالیت فنل کل، مالون در آلدئید، پراکسید هیدروژن ، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های وابسته به بیماری تحت تنش فوزاریوم در گیاه پیاز

صفات	درجه آزادی	فنل کل	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	پراکسیداز	کاتالاز	فنیل آلانین آمونیالیاز	کیتیناز	بتا ۱و۴ گلوکوناز
فوزاریوم	۱	۱/۴۷**	۰/۰۱۰۸**	۱۸۰۹۲۱/۱۲**	۳۵۷/۹۴**	۲۳۹۲۱/۶۲**	۰/۰۰۳۱**	۰/۱۲۸**	۷/۲۹**
ملاتونین	۳	۱/۰۹**	۰/۰۰۲۸**	۲۲۱۷۸۰/۸۰**	۲۳۴/۵۳**	۲۰۰۹۷/۳۴**	۰/۰۰۱۹**	۰/۸۷**	۹/۶۷**
زمان	۵	۲/۷۷**	۰/۰۰۷۸**	۶۰۲۸۹۰۶/۰۳**	۲۳۰/۲۵**	۳۷۰۴۹/۸۵**	۰/۰۰۱۵۹**	۰/۸۱۴**	۸/۱۰**
فوزاریوم* ملاتونین	۳	۰/۸۲**	۰/۰۰۴۰**	۲۴۸۷۶/۶۰**	۶۴/۱۷**	۴۱۱۶/۷۷**	۰/۰۰۱۳**	۰/۰۰۴۶^{ns}	۱/۲۶**
فوزاریوم* زمان	۵	۰/۵۳**	۰/۰۰۵۰^{ns}	۲۲۰۱۶/۲۶**	۱۳۸/۲۶**	۵۹۴۳/۷۷**	۰/۰۰۱۲**	۰/۰۱۲^{ns}	۰/۸۴**
ملاتونین* زمان	۱۵	۰/۴۸**	۰/۰۰۲۱**	۶۷۱۲۵/۲۱**	۶۷/۱۳**	۵۰۴۱/۴۶**	۰/۰۰۰۹۳**	۰/۱۲۷**	۱/۷۵**
فوزاریوم* ملاتونین* زمان	۱۵	۰/۱۹**	۰/۰۰۳۵**	۱۰۶۶۴/۶۹**	۱۸/۳۵**	۸۶۷/۳۷**	۰/۰۰۰۸۱**	۰/۰۵۰**	۱/۲۵**
خطا	۹۶	۰/۰۲	۰/۰۰۰۵	۲۳۸/۵۹	۷/۵۶	۱۷۱/۰۷	۰/۰۰۰۰۱۷۵	۰/۰۰۷۴	۰/۰۵۵
ضریب تغییرات	-	۲/۳۵	۱۵/۹۲	۲/۹۹	۲۷/۵۶	۲۲/۳۶	۴/۳۵	۱۲/۹۴	۹/۱۹

** تفاوت معنی دار در سطح یک درصد، ns غیر معنی دار

جدول۲- همبستگی صفات مربوط با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بین تیمارهای مورد آزمایش در گیاه پیاز

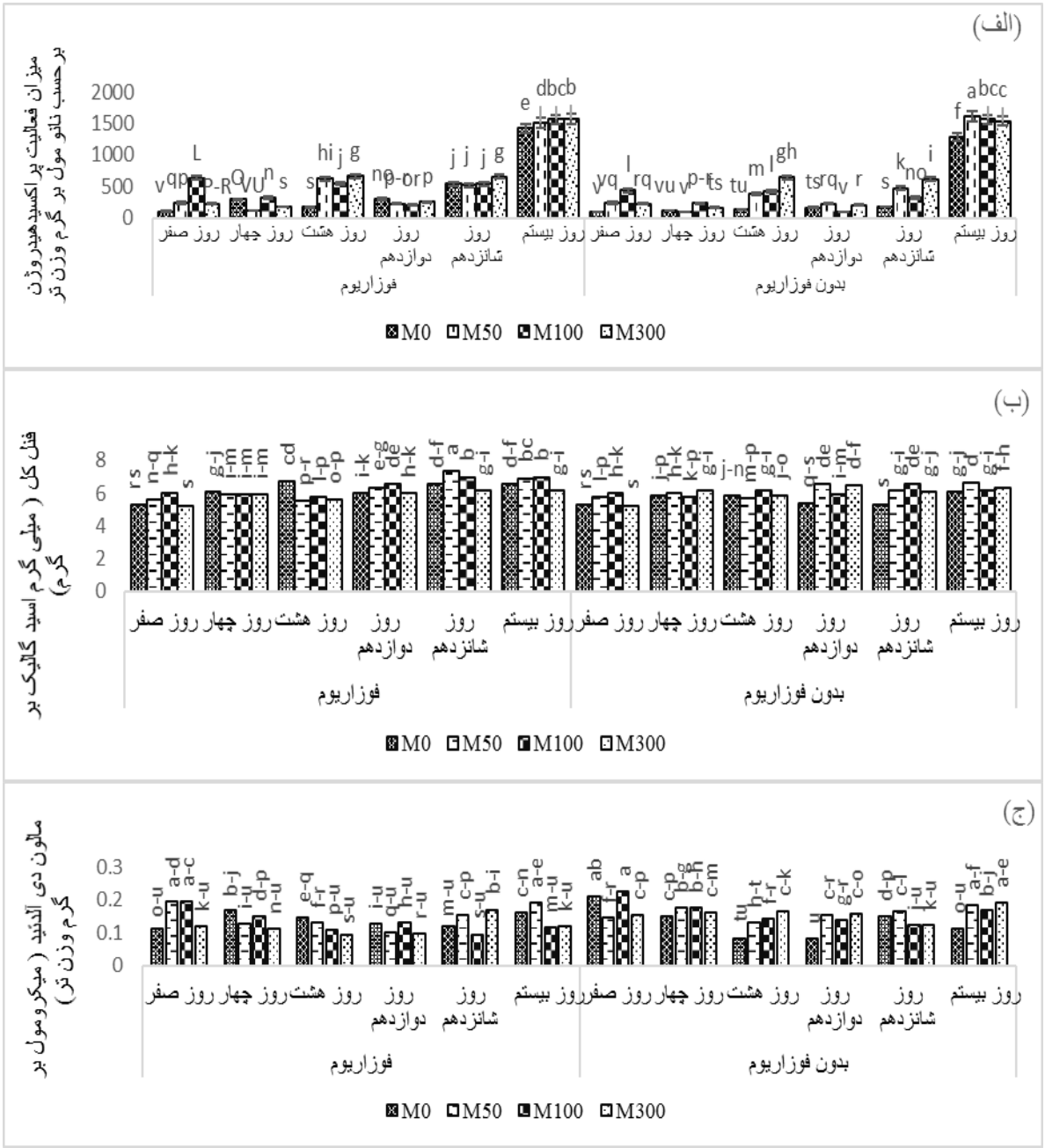
	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	فنل کل	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	کیتیناز	بتا ۱ و ۴ گلوکوناز	فنیل آلانین آمونیالیاز
مالون دی آلدئید	۱							
پراکسید هیدروژن	-۰/۰۷^{ns}	۱						
فنل کل	-۰/۴۳**	۰/۳۸**	۱					
کاتالاز	-۰/۷۳**	۰/۰۶^{ns}	۰/۷۶**	۱				
گایاکول پراکسیداز	-۰/۵۸**	۰/۰۴^{ns}	۰/۶۴**	۰/۶۷**	۱			
کیتیناز	-۰/۵۶**	۰/۴۸*	۰/۴۳**	۰/۴۹**	۰/۴۷**	۱		
بتا ۱ و ۴ گلوکوناز	-۰/۶۳**	۰/۵۰**	۰/۳۷*	۰/۵۲**	۰/۳۲^{ns}	۰/۶۱**	۱	
فنیل آلانین آمونیالیاز	-۰/۲۹^{ns}	-۰/۱۱^{ns}	۰/۱۷^{ns}	۰/۲۴^{ns}	۰/۱۸^{ns}	-۰/۲۶^{ns}	۰/۲۸^{ns}	۱

** معنی داری در سطح یک درصد، * معنی داری در سطح پنج درصد، ns عدم معنی داری

نتایج مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری در میزان MDA در سطح یک درصد وجود داشت (جدول۱). نتایج مربوط به مقایسه میانگین داده‌ها نشان‌داد کمترین میزان MDA مربوط به تیمارهای بدون فوزاریوم و بدون ملاتونین(تیمارهای شاهد) در روزهای هشتم و دوازدهم بود. در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم، غلظت ۳۰۰

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

میکرومولار ملاتونین در روزهای چهارم و هشتم، ۴۷/۷۸ درصد و ۵۵/۳۱ درصد MDA کمتری از تیمارهای شاهد در همان روز داشتند (شکل ۳-ج). میزان MDA بالاتری برای گیاهان تیمار شده با ملاتونین و بدون فوزاریوم نسبت به گیاهان تیمار شده با ملاتونین به همراه فوزاریوم مشاهده شد که ممکن است وجود قارچ FOC اثر ملاتونین را افزایش داده باشد. براساس نتایج مربوط به همبستگی صفات MDA با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های وابسته به بیماری (کیتیناز و بتا ۱ و ۴ گلوکوناز) همبستگی منفی و معنی‌داری را در سطح یک درصد دارا بود.



شکل ۳- مقایسه میانگین‌ها آزمون دانکن در سطح یک درصد برای تیمار غلظت های مختلف ملاتونین (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) (ملاتونین: M) در زمان های مختلف برای صفات پراکسید هیدروژن (الف)، فنل کل (ب) و مالون دی آلدئید (ج) اندازه گیری شده در گیاه پیاز تحت تنش بیماری پوسیدگی فوزاریومی

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: نتایج آنزیم CAT و GPX تحت تنش فوزاریوم و کاربرد ملاتونین نشان‌داد که اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف فوزاریوم، ملاتونین ، زمان و اثرات متقابل آنها در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۱). در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم به‌صورت چشمگیری از روز چهارم تا بیستم میزان فعالیت آنزیم CAT در غلظت ۱۰۰ میکرومولار افزایش پیداکرد (شکل ۴-د). بیشترین میزان فعالیت آنزیم در روز شانزدهم با میزان ۴۸۶/۳۴ درصد افزایش نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد. در گیاهان بدون تیمار فوزاریوم نیز بیشترین میزان آنزیم CAT در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در روز شانزدهم بود. تحت تنش بیماری پوسیدگی‌فوزاریومی در گیاهان پیاز رقم قرمزآذرشهر، فعالیت آنزیم GPX از روزهای هشتم تا شانزدهم در کاربرد غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به صورت چشمگیری افزایش یافته بود و همانند آنزیم CAT در روز ۱۶ ام فعالیت بیشتری (۲۵۲/۲۰ درصد) نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۴-ه).

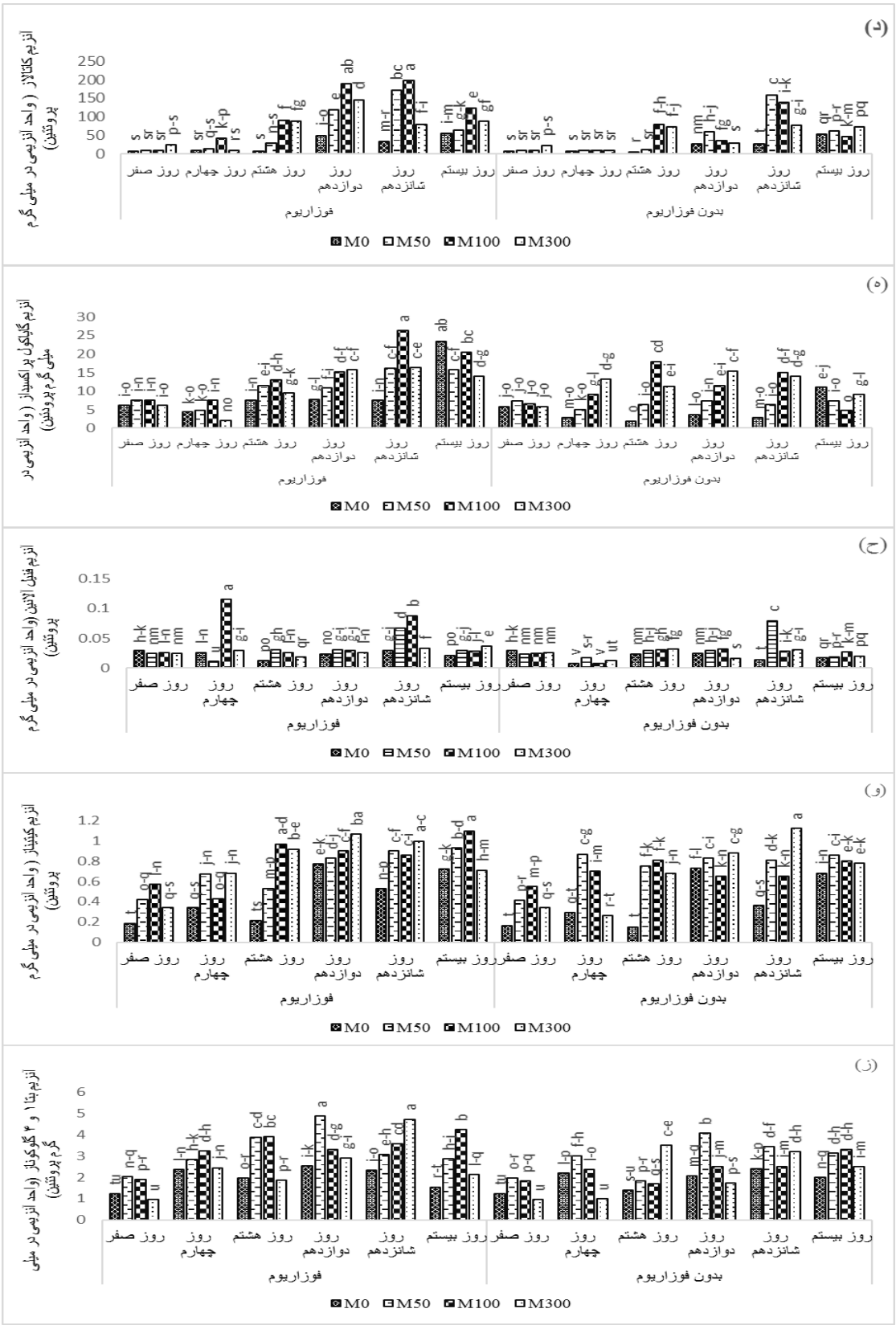
آنزیم‌های مرتبط به بیماری: نتایج بدست آمده از فعالیت آنزیم‌های PAL و بتا ۱ و ۴ گلوکوناز اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها و اثرات متقابل آنها را در سطح یک درصد نشان دادند (جدول ۱) اما در مورد فعالیت آنزیم کیتیناز اختلاف معنی‌داری برای تیمارهای ملاتونین، فوزاریوم، زمان و اثرات متقابل فوزاریوم×ملاتونین× زمان در سطح یک درصد وجودداشت.

نتایج سنجش فعالیت آنزیم PAL نشان‌داد ملاتونین تاثیر مثبت روی فعالیت آنزیم PAL چه در گیاهان تحت تنش FOC و بدون تیمار FOC داشته است. در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم بهترین تیمار ملاتونین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار در روزهای مختلف بود که افزایش فعالیت آنزیم را نسبت به گیاهان شاهد داشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL در گیاهان تحت تنش فوزاریوم در روز چهارم و شانزدهم به ترتیب با افزایش ۳۴۲/۳۰ درصد و ۱۹۳/۳۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۴-ح). در گیاهان بدون فوزاریوم به همراه ملاتونین نیز میزان فعالیت آنزیم PAL افزایش یافت اما میزان فعالیت آنزیم PAL نسبت به گیاهان تحت تنش فوزاریوم کمتر بود (شکل ۴-ح).

میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در همه تیمارها، از روزهای چهارم تا بیستم در غلظت‌های مختلف ملاتونین روند افزایشی داشتند. که تاثیر مثبت تیمار ملاتونین را برای فعالیت آنزیم کیتیناز نشان می‌دهد. لازم به ذکر است بیشترین تاثیر برای فعالیت آنزیم کیتیناز مربوط به گیاهان تیمار شده با فوزاریوم به همراه غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در روز ۲۰ ام بود که۵۲/۷۷ درصد فعالیت آنزیم نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته‌بود. در بین گیاهان بدون فوزاریوم به همراه ملاتونین در روز هشتم و شانزدهم به ترتیب ۸۱/۴۸ درصد و ۶۷/۹۷ درصد افزایش چشمگیری در فعالیت آنزیم کیتیناز نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۴-و).

نتایج بدست آمده از فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکوناز در پیازهای تیمار شده با فوزاریوم و بدون فوزاریوم نشان دهنده تاثیر غلظت‌های مختلف ملاتونین برای فعالیت این آنزیم بود (شکل ۴-ز). نتایج حاکی از بیشترین تاثیر ملاتونین در میزان فعالیت آنزیم برای تیمارهای فوزاریوم به همراه غلظت‌های ۵۰ میکرومولار (۹۲/۸۴ درصد) و ۳۰۰ میکرومولار (۱۰۰/۸۵ درصد) ملاتونین در روزهای دوازدهم و شانزدهم بودند. در گیاهان بدون فوزاریوم، غلظت ۵۰ میکرومولار ملاتونین در روز دوازدهم ۹۵/۶۷ درصد فعالیت آنزیم بتا ۱و ۴ گلوکوناز بیشتری را نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۲-ز).

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276



شکل ۴- مقایسه میانگین‌ها آزمون دانکن در سطح یک درصد برای تیمار غلظت های مختلف ملاتونین (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) (ملاتونین: M) در زمان های مختلف برای صفات کاتالاز(د)، گایاکول پراکسیداز (ه)، فنیل آلانین آمونیالیاز(ح)، کیتیناز(و) و بتا ۱و۴ گلوکونواز(ز) اندازه گیری شده در گیاه پیاز تحت تنش بیماری پوسیدگی فوزاریومی

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

بحث

با توجه به نقش چندگانه ملاتونین، مطالعات اخیر نشان می‌دهد، تیمار گیاهان با ملاتونین باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی و درنتیجه، کاهش علائم بیماری در سیستم‌های بیماری‌زا مختلف شده است. گزارش‌هایی از موفقیت کنترل بیماری یا کاهش علائم آن به‌وسیله تیمار گیاهان با کاربرد ملاتونین خارجی ارائه شده‌است (۴۲، ۵۲). علاوه براین، نقش ملاتونین در تحریک رشد ریشه‌های اصلی و جانبی از طریق تاثیر بر ژن‌های حامل اکسین در گونه‌های گیاهی مختلف تایید شده است (۵). در تحقیق حاضر گیاهان تیمار شده با ملاتونین از ریشه‌های سالم‌تری نسبت به نمونه‌های شاهد برخوردار بودند که می‌تواند به دلیل نقش ملاتونین در رشد ریشه باشد که همانند هورمون اکسین عمل کرده و رشد ریشه را در گیاهان پیاز افزایش داده‌است. در مطالعه ون و همکاران (۴۹) نیز ملاتونین باعث افزایش رشد ریشه‌های جانبی در گیاهان گوجه‌فرنگی شده‌بود.

در بین تیمارهای مورد آزمایش، غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بهترین نتیجه را برای کاهش شدت‌بیماری در بین گیاهان تیمار شده با فوزاریوم دارا بود که نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش با نتایج گزارش‌شده برای کاربرد غلظت‌های مختلف ملاتونین برای کاهش شدت‌بیماری با قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان سیب (۵۲)، خیار (۴۲) مطابقت داشت.

گیاهان در مواجه با تنش‌های زیستی دچار تغییرات بیوشیمیایی می‌شوند که یکی از این تغییرات بیوشیمیایی تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند O_2^- و H_2O_2 می باشد که به‌سرعت به انواع بیومولکول‌ها آسیب می‌زنند (۴۵). H_2O_2 در گیاهان دارای نقش‌های متنوعی است و در مقایسه با رادیکال‌های اکسیژن از ثبات بیشتری برخوردار است (۳۸). مولکول H_2O_2 به‌طور بالقوه با مولکول‌های حاوی آهن و بقیه فلزات مانند منیزیم واکنش بیشتری نشان می‌دهند بنابراین کلروفیل، میتوکندری و زنجیره انتقال الکترون منابع خوبی برای تولید ROS می‌باشند (۹). گیاهان برای حفاظت از خود دارای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و غیرآنتی‌اکسیدانی هستند که توازنی بین رادیکال‌های آزاد ایجاد کنند. این آنزیم‌ها نقش مهمی را در زمینه نرمال بودن متابولیسم گیاه و افزایش مقاومت به تنش‌ها بازی می‌کنند (۱۹). از این‌رو کاربرد خارجی ملاتونین به‌طور مستقیم با فعال کردن آنزیم‌های اکسیدانی و غیر اکسیدانی سبب کاهش سطح ROS ها در گیاهان می‌شوند (۱۹). در مطالعه حاضر، کاربرد خارجی ملاتونین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار باعث کاهش سطح H_2O_2 شد. نتایج بدست آمده از این تحقیق با کاربرد ملاتونین با غلظت۵۰ میکرو مولار باعث کاهش تجمع H_2O_2 در گوجه‌فرنگی‌های انباری تحت تنش بیماری با *Botrytis cinerea* مشابهت داشت (۲۴). در تنش‌های غیر زیستی مانند تنش سرما، خشکی و UV کاربرد ملاتونین خارجی باعث کاهش میزان H_2O_2 شده است (۱۴) که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هم‌راستا بود. لازم به ذکر است که H_2O_2 می‌تواند دارای نقش دوگانه باشد به‌طوریکه از یک سو باعث تخریب سلول شود و از سوی دیگر در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک مولکول سیگنالی عمل کرده و باعث فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی در سلول‌های گیاهی شود (۳۸). نتایج بدست آمده از همبستگی صفات در این پژوهش نیز تاکیدی بر نقش سیگنالی H_2O_2 در گیاهان پیاز تحت تیمار فوزاریوم و ملاتونین بود زیرا همبستگی مثبت و معنی‌داری بین H_2O_2 و آنزیم‌های CAT، GPX، کیتیناز، بتا ۱ و ۴ گلوکوناز و فنل‌کل وجود داشت که با نتایج بدست آمده از مطالعه تانگ و همکاران مشابهت داشت (۴۴).

MDA یک محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدهاست و معمولا به‌عنوان نماد یکپارچگی غشاءسلولی در گیاهان نظر گرفته می‌شود. در گونه‌های گیاهی تحت شرایط تنش زیستی، اکسیداسیون خودکار لیپیدها ناشی از تولید ROS هاست که منجر به کاهش سیالیت غشا سلول و آزاد شدن لیپیدها می‌شود

DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

(۲۴). در تحقیق حاضر محلول‌پاشی برگی ملاتونین، باعث کاهش میزان MDA از طریق جمع کردن میزان رادیکال-های آزاد شد که با نتایج بدست آمده از کاربرد ملاونین خارجی برای کاهش MDA برای تنش‌های غیرزیستی مطابقت داشت (۴۳). تاکنون مطالعه‌ای در مورد کاربرد ملاتونین برای کنترل این صفت برای تنش‌های زیستی گزارش نشده‌است اما نتایج بدست آمده از این تحقیق با برخی مطالعات انجام شده در تنش‌های غیر زیستی مانند تنش سرما مطابقت داشت (۱۶). طبق تحقیقات صورت گرفته از MDA به عنوان یک نشانگر برای آسیب به غشاء تحت شرایط تنش شناخته می‌شود که وجود آنزیم های آنتی‌اکسیدانی توانمند باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (۱۳). نتایج حاصل از همبستگی صفات نشان داد که MDA دارای همبستگی منفی با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های وابسته دفاعی در گیاهان می‌باشدکه تاکیدی بر مطلب فوق است و با نتایج بدست آمده از (۴۸) و (۳۲) مطابقت داشت.

در گیاهان ترکیبات فنلی به دلیل اثرات فیزیولوژیکی که برای گیاهان دارند موردتوجه قرارگرفته‌اند. فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند که از مسیر شیکمیک‌اسید و فنیل پروپانوئید مشتق می‌شوندکه نقش مهمی در حفاظت گیاهان علیه تنش‌های زیستی و غیر زیستی بازی می‌کنند (۲۳، ۲۹). طبق گزارش محققان، کاربرد ملاتونین با افزایش ترکیبات فنلی در گیاهان همراه بوده‌است که در نتیجه آن به محافظت گیاهان در برابر اثرات مخرب ROS کمک می‌کند (۲۰). نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق بامطالعه لیو و همکاران (۲۴) مطابقت داشت به‌طوری‌که کاربرد ملاتونین باعث افزایش مقدار فنل‌کل در میوه‌های گوجه‌فرنگی‌های تیمار شده با کپک خاکستری شده بود.

رادیکال‌های آزاد تولید شده در زمان تنش ها به‌دلیل واکنش‌پذیری بسیار بالا با اکثر مولکول‌های زیستی به گیاهان خسارت وارد می‌کنند و درنتیجه باعث مرگ سلول می‌شوند (۴۶،۳۵). گیاهان برای حفاظت سلول‌ها از خسارت‌های اکسیداتیو فعالیت آنزیم‌های غیر آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و اکسیدانی مانند CAT و GPX را به‌صورت چشمگیری افزایش می‌دهند (۳، ۲۲).

آنزیم GPX دارای ایزومرهای مختلفی است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژی درگیاهان نقش دارند. در زمان حمله پاتوژن به گیاهان، این آنزیم با ساخت لیگنین و پیوندهای دیستروسین (Dityrosine Bonds) در دیواره سلولی افزایش می‌دهد و با استفاده از آنزیم اسید فرولیک و ترکیبات فنلی باعث اکسیداسیون H_2O_2 می‌شوند که نقش مهمی را در مقاومت گیاه به پاتوژن بازی می‌کند (۲۹). همانند پراکسیداز، آنزیم CAT نیز به وسیله تخریب H_2O_2 به آب و اکسیژن راندمان بالایی در جلوگیری از خسارات اکسیداتیو دارد (۳۴). مطالعات زیادی در مورد خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین وجود دارد که با تغییر در فعالیت آنزیم‌هایی مانند CAT و GPX باعث کاهش استرس‌های اکسیداتیو و تعدیل ROS ها در گیاهان می-شوند و از اینرو مقاومت گیاهان به تنش زیستی را افزایش می‌دهد (۱۸). در این پژوهش کاربرد ملاتونین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT و GPX در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم به‌همراه ملاتونین شده بود، که تاثیر این ماده را برای کنترل گسترش قارچ فوزاریوم به گیاه پیاز نشان می‌دهد که با نتایج بدست آمده از افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه سیب تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ملاتونین تحت تنش *Diplocarpon mali* ، گیاهان خیار تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت تنش بیماری سفیدک داخلی و گوجه فرنگی تیمار شده با قارچ *Botritis cinere* همراستا بود.

طبق برخی از مطالعات صورت گرفته در طی سال‌های اخیر، ملاتونین به‌عنوان یک مولکول تحریک کننده

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

سیگنالی در مقاومت به پاتوژن شناسایی شده است که بیان و فعالیت پروتیئن‌های وابسته به بیماری مانند کیتیناز، PAL و گلوکونازها را افزایش می‌دهد و با همکاری هورمون‌های داخلی و آنزیمهای اکسیداتیو باعث القاء مقاومت به تنش های زیستی می‌شود (۳۴). آنزیم PAL واکنش تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک را کاتالیز می‌کند که مرحله مهمی در مسیر و میزان تولید فنیل پروپانوئید است که به‌عنوان یک نشانگر در گیاهان برای ایجاد مقاومت در نظر گرفته می‌شود (۲، ۵۳). آنزیم PAL در فعالیت‌های متابولیکی بسیاری از گیاهان عالی دیده می‌شود. در پاسخ به تنش‌های زیستی به گیاهان، آنزیم PAL به‌عنوان آنزیم اصلی سنتز کننده ترکیبات فنلی القاء می‌شود که چندین ترکیب ثانویه دفاعی مانند لیگین‌ها و فنل‌ها را تولید می‌کنند که به‌عنوان آنتی اکسیدان عمل کرده و رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازند (۴۹). در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم PAL به‌میزان چشمگری در گیاهان تیمار شده با فوزاریوم به‌همراه ملاتونین افزایش یافت که با نتایج بدست‌آمده از تیمار ملاتونین در گیاهان سیب تحت تنش با قارچ *Diplocarpon mali* (۵۲) و گیاهان خیار تحت تنش بیماری سفیدک داخلی (۴۲) مطابقت داشت.

کیتین و گلوکان از اجزای تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بسیاری از پاتوژن‌های قارچی هستند. در بسیاری از گیاهان در پاسخ به آلودگی فعالیت این دو آنزیم القاء شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شوند. کیتینازها دارای فعالیت ضدقارچی بالقوه متعلق به خانواده گلیکوزیل هیدرولاز ها هستند (۳۹). گیاهان در پاسخ به حمله پاتوژن پروتئین‌های کیتیناز را تولید می‌کنندکه پلی‌ساکاریدهای ساختاری دیواره سلولی پاتوژن قارچی مانند پیوندهای بتا ۱ و ۴ بین N-acetylglucosamine را تجزیه می‌کنند (۲۰). در مطالعات انجام شده توسط (۴۲، ۵۳، ۲۴) کاربرد ملاتونین خارجی باعث افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز شده بود که با تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در فرایند آلوده سازی پاتوژن، تراوش سلولاز به وسیله عامل بیماری زا عامل اصلی تعیین‌کننده بیماری است که نقش مهمی در نرم شدن دیواره سلولی گیاه دارد. آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکوناز، پلی ساکاریدهای مهم در دیواره سلولی قارچ‌ها را که حاوی زنجیره‌های بلند بتا ۱و۴ وصل شده به گلوگز هستند را تجزیه می‌کند (۵۱). اطلاعات اندکی درباره نقش آنزیم بتا ۱و۴ گلوکوناز در واکنش مرتبط با مقاومت به بیماری در برابر عوامل بیماری‌زا و ملاتونین وجود دارد. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد ملاتونین باعث افزایش فعالیت آنزیم بتا ۱و۴ گلوکوناز می‌شود. در مطالعات مربوط به مقاومت به پاتوژن به‌صورت محدود از آنزیم بتا ۱و۴ گلوکوناز استفاده شده است (۴۷).

نتیجه‌گیری کلی

کاربرد ملاتونین توانست اثرات مخرب فوزاریوم را به میزان قابل توجهی کنترل کند. به طوریکه شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین به میزان ۶۴ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت. کاربرد ملاتونین در گیاهان تحت تنش با افزایش فنل‌کل، فعالیت آنزیم‌های CAT، GPX و آنزیم‌های وابسته دفاعی و کاهش MDA همراه بود، که این امر موجب کاهش خسارت‌های اکسیداتیو در اثر تنش بیماری پوسیدگی-فوزاریومی می‌شود. علاوه براین، همبستگی منفی و معنی‌داری بین MDA که به عنوان یک معرف برای بررسی میزان صدمات غشاء در شرایط تنش شناخته می‌شود و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های وابسته دفاعی وجود داشت. در پایان لازم به ذکر است هدف نهایی از پژوهش برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی، کاهش خسارت‌های اقتصادی گیاهان با حداقل رساندن خسارت به محیط زیست است. از این رو، استفاده از ملاتونین به‌عنوان یک ترکیب موثر به‌منظور القاء مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی در گیاه پیاز پیشنهاد می‌گردد.

DOI: 10.22034/JPR.2024.2276 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی همکاران و مسئولین گروه باغبانی و گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا به جهت فراهم نمودن شرایط و امکانات انجام این پژوهش ما را یاری نمودند، ابراز مینمایند.

منابع

۱. خوانساری نژاد، ب.، دشتی، ف.، ظفری، د. و میرزایی-اصل، ا. ۱۴۰۰. غربالگری برخی از رقمهای پیاز خوراکی در برابر بیماری پوسیدگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*) و بررسی بیان رونوشت ژنهای COI1 و ERF1 در رقمهای حساس و متحمل. علوم باغبانی ایران. ۵۲ (۱): ۱۸۳-۱۹۴.

۲. منصوری، س.، ساری خانی، ح.، سیاری، م.، سلیمانی اقدم، م. و عسگری سرچشمه، م. ع. ۱۴۰۰. اثر محلولپاشی قبل از برداشت ملاتونین بر رسیدن و ویژگیهای کیفی پس از برداشت توت فرنگی (Fragaria × anannasa cv. Queen Elisa) میوه. مجله پژوهشهای گیاهی. ۳۴(۳):۶۴۳-۶۵۷.

۳. عباسی، ن.، میرزائی اصل، ا. و خدائی، ل. ۱۴۰۱. اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان و میزان آرتمیزینین گیاه درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*). مجله پژوهش های گیاهی. ۳۵(۲): ۳۸۹-۴۰۲.

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): 1337-1344.
5. Arnao, M. B., and Hernández-Ruiz, J. 2018. Melatonin and its relationship to plant hormones. Annals of botany. 121: 195-207.
6. Bansode, V. B., and Bajekal, S. S. 2006. Characterization of chitinases from microorganisms isolated from Lonar Lake.
7. Bari, R. and Jones, J. D. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant molecular biology. 69(4): 473-488.
8. Boccardo, N. A., Segretin, M. E., Hernandez, I., Mirkin, F. G., Chacón, O., Lopez, Y., Borrás-Hidalgo, O., and Bravo-Almonacid, F. F. 2019. Expression of pathogenesis-related proteins in transplastomic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials. Scientific reports. 9(1): 1-13.
9. Cheeseman, J. M. 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. Plant stress. 1(1): 4-15.
10. Chen Y. H., Du G. H., and Zhang J. T. 2000. Salvianolic acid B protects brain against injuries caused by ischemia-reperfusion in rats Acta pharmacologica sinica. 21: 463-466.
11. Claiborne, A. 1985. Catalase activity; in the CRC handbook of methods for oxygen radical research. Greenwald, R. A. (ed.), pp. 283−284, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
12. Cramer, C. S. 2000. Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion. Euphytica. 115(3): 159-166.
13. Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., and Lowe, K. C. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. Biotechnology advances. 23(2): 131-171.
14. Debnath, B., Islam, W., Li, M., Sun, Y., Lu, X., Mitra, S., Hussain, M., Liu, S., and Qiu, D. 2019. Melatonin mediates enhancement of stress tolerance in plants. International journal of molecular sciences. 20(5): 1040.
15. Dewanto, V., Wu, X., and Liu, R. H. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. Journal of agricultural and food chemistry. 50(17): 4959-4964.
16. Erdal, S. 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. Plant physiology and biochemistry. 57: 1-7.
17. Galván, G. A., Koning-Boucoiran, C. F., Koopman, W. J., Burger-Meijer, K., González, P. H., Waalwijk, C., Kik, C., and Scholten, O. E. 2008. Genetic variation among Fusarium isolates from onion, and resistance to fusarium basal rot in related Allium species. European journal of plant pathology. 121(4): 499-512.
18. Gulcin, I., Buyukokuroglu, M. E., Oktay, M., Kufrevioglu, O. I. 2002. On the in vitro antioxidative properties of melatonin Journal of pineal research. 33: 167-171.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

19. Han, Q. H., Huang, B., Ding, C. B., Zhang, Z. W., Chen, Y. E., Hu, C., Zhou, L. J., Huang, Y., Liao, J. Q., Yuan, S., and Yuan, M. 2017. Effects of melatonin on anti-oxidative systems and photosystem II in cold-stressed rice seedlings. Frontiers in plant science. 8: 785.

20. Karaca, P., and Cekic, F. Ö. 2019. Exogenous melatonin-stimulated defense responses in tomato plants treated with polyethylene glycol. International journal of vegetable science. 25(6): 601-609.

21. Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., and Pareek, N. 2018. Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. Agriculture. 8(7): 88.

22. Li, J., Arkorful, E., Cheng, S., Zhou, Q., Li, H., Chen, X., Sun, K., and Li, X. 2018. Alleviation of cold damage by exogenous application of melatonin in vegetatively propagated tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Scientia horticulturae. 238: 356-362.

23. 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. 9: 426.

24. Liu, C., Chen, L., Zhao, R., Li, R., Zhang, S., Yu, W., Sheng, J., and Shen, L. 2019. Melatonin induces disease resistance to Botrytis cinerea in tomato fruit by activating jasmonic acid signaling pathway. Journal of agricultural and food chemistry. 67(22): 6116-6124.

25. Liu, Z., CAI, J. S., L. I, J. J., LU, G. Y., LI, C. S., F.U, G. P., Zhang, X. K., Liu, Q. Y., Zou, X. L., and Cheng, Y. 2018. Exogenous application of a low concentration of melatonin enhances salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. Journal of integrative agriculture. 17(2): 328-335.

26. Maehly, A., and Chance, B. 1955 Assay of catalases and peroxidases, in methods in enzymology. Methods enzymology. 2: 764–775.

27. Maude R. 1990. Leaf diseases of onions. In: H.D. Rabinowitch & J.L. Brewster (Eds), Onions and allied crops, volume II. 173–190. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

28. Nawaz, M. A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R. J., Niu, M., and Hameed, S. 2016. Melatonin: current status and future perspectives in plant science. Frontiers in plant science. 6: 1230.

29. Nowogórska, A., and Patykowski, J. 2015. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection. Acta physiologiae plantarum. 37(1): 1-10.

30. Onaga, G., and Wydra, K. 2016. Advances in plant tolerance to abiotic stresses. Plant genomics. 10: 229-272.

31. Rout, E., Tripathy, P., Nanda, S., Nayak, S., and Joshi, R. K. 2016. Evaluation of cultivated and wild Allium accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological sciences. 86(3): 643-649.

32. Rukmini, M. S., D'souza, B., and D'souza, V. 2004. Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. Indian journal of clinical biochemistry. 19(2): 114-118.

33. Sasaki, K., Nakahara, K., Tanaka, S., Shigyo, M., and Ito, S. I. 2015. Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. phytopathology. 105(4): 525-532.

34. 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): 2352.

35. Sharma, B. 2014. Oxidative stress in HIV patients receiving antiretroviral therapy. Current HIV research. 12(1): 13-21.

36. Shi, H., Chen, K., Wei, Y., and He, C. 2016. Fundamental issues of melatonin-mediated stress signaling in plants. Frontiers in plant science. 7: 1124.

37. Shigyo, M., Khar, A., and Abdelrahman, M. 2018.The allium genomes. Springer, Cham

38. Smirnoff, N., and Arnaud, D. 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants New Phytologist. 221: 1197-1214.

39. Souza, T. P., Dias, R. O., and Silva-Filho, M. C. 2017. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. Genetics and molecular biology. 40: 360-372.

40. Stewart, R. R., and Bewley, J. D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱ DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

of soybean axes. Plant physiology. 65(2): 245-248.

41. Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A., and Shetty, H. S. 2012. Pathogenesis related proteins in plant defense response. In Plant defence: biological control. 379-403.

42. Sun, Y., Liu, Z., Lan, G., Jiao, C., and Sun, Y. 2019. Effect ofexogenous melatonin on resistance of cucumber to *downy mildew*. Scientia horticulturae. 255: 231-241.

43. Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., and Reiter, R. J. 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. Journal of experimental botany. 63(2): 577-597.

44. Tang, J., Wang, S. Q., Hu, K. D., Huang, Z. Q., Li, Y. H., Han, Z., Chen, X. Y., Hu, L.Y., Yao, G. F., and Zhang, H. 2019. Antioxidative capacity is highly associated with the storage property of tuberous roots in different sweetpotato cultivars. Scientific reports. 9(1): 1-10.

45. Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D. J., Thomas, B., Pink, D. A. C., Jones, J. E., and Clarkson, J. P. 2013. Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. Plant pathology. 62(1): 103-111.

46. Thakur, M., and Sohal B. S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. ISRN Biochemistry. 1–10.

47. Urbanek, H., and Zalewska-Sobczak, J. 1986. 1.4-β-Galactanases and 1.3-β-glucanases of *Botrytis cinerea* isolate infecting apple. Biochemie und physiologie der Pflanzen. 181(5): 321-329.

48. Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., and Chen, L. 2019. Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. Agronomy. 9(10): 597.

49. Wen, D., Gong, B., Sun, S., Liu, S., Wang, X., Wei, M., and Shi, Q. 2016. Promoting roles of melatonin in adventitious root development of *Solanum lycopersicum* L. by regulating auxin and nitric oxide signaling. Frontiers in plant science. 7: 718.

50. Vanitha, S. C., Niranjana, S. R., and Umesha, S. 2009. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. Journal of phytopathology. 157(9): 552-557.

51. Xu, L., Yue, Q., Bian, F. E., Sun, H., Zhai, H., and 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.

52. Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activityduring early stages of root colonizationby the mycoparasite Trichoderma harzianum strain T-203. Plant physiology and biochemistry. 38(11): 863-873.

53. Yin, L., Wang, P., Li, M., Ke, X., Li, C., Liang, D., Wu, S., Ma, X., Li, C., Zou, Y., and Ma, F. 2013. Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to *M. arssonina* apple blotch. Journal of pineal research. 54(4): 426-434.

54. Zhang, S., Zheng, X., Reiter, R.J., Feng, S., Wang, Y., Liu, S., Jin, L., Li, Z., Datla, R., and Ren, M. 2017. Melatonin attenuates potato late blight by disrupting cell growth, stress tolerance, fungicide susceptibility and homeostasis of gene expression in Phytophthora infestans. Frontiers in plant science. 8: 1993.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۵-۱
DOI: 10.22034/JPR.2024.2276

Investigating the possibility of resistance to Fusarium Basal Rot in Azarshahr red onion cultivar using Melatonin

Khansarinejad B.[1], Dashti F.[1*], Zafari D.[2] and Mirzaie-Asl A.[3]

[1] Dept. of Horticultural science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[2] Dept. of Plant pathology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[3] Dept. of Biothecnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

An experiment was carried out using 0, 50, 100 and 300 µM melatonin in onion cultivar to investigate its effect on induction of resistance to Fusarium basal rot caused by *Fusariumoxysporum* f. sp. *cepae*. In this experiment, traits such as total phenolic content, hydrogen peroxide, malondialdehyde, antioxidant enzymes (catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) and disease-related enzymes (phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chitinase and β-1,4-glucanase) were measured. The results showed an application of exogenous melatonin caused an increase in the total phenolic content and activity of antioxidants and disease-related enzymes, resulting a decrease malondialdehyde (MDA) and in the hydrogen peroxide (H_2O_2) level in Fusarium-treated plants. Although all concentrations of melatonin altered some biochemical and physiological traits in onions under Fusarium basal rot stress, the best overall result regarding induction of resistance to *Fusariumoxysporum* f. sp. *cepae* in these plants was observed on days 12 and 16 by applying 100 µM melatonin.

Key words: Disease-related enzymes, hydrogen peroxide, guaiacol peroxidase, malondialdehyde