اثر ملاتونین بر برخی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه لوبیا رقم صدری (*Phaseolus vulgaris* cv. Sadri) تحت تنش شوری

فاطمه عزیزی[۱]، حمزه امیری[۱*] و احمد اسماعیلی[۲]

[۱] ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[۲] ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت:۹۸/۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۳

چکیده

به تازگی نقش ملاتونین (N–استیل–۵–متوکسی تریپتامین) به عنوان یک فیتوهورمون در افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش-های محیطی مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر تیمار ملاتونین در تحمل گیاه لوبیا رقم صدری به شوری، در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. در این پژوهش تنش شوری در سه سطح ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl به صورت افزوده شده به محلول غذایی نیم‌هوگلند بر روی گیاهان لوبیا تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار ملاتونین اعمال شد. تنش شوری سبب کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه، کاهش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، افزایش میزان پرولین، قندهای محلول، مالون‌دی‌آلدهید و H_2O_2 و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شد. با استعمال ملاتونین رشد گیاه بهبود یافت. غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافت و از غلظت H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدهید کاسته شد. نتایج نشان داد که ملاتونین در افزایش مقاومت گیاه لوبیا به شوری اثر معنی‌داری داشته است و غلظت‌های پایین‌تر ملاتونین، مؤثرتر عمل کرده‌اند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، شوری، کاتالاز، لوبیا، ملاتونین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۶-۳۳۳۱۲۰۱۰ ، پست الکترونیکی: amiri_h_lu@yahoo.com

مقدمه

ملاتونین (N–استیل–۵–متوکسی تریپتامین) هورمونی از تیپ ایندول‌آمین و مشتق از تریپتوفان است که در مهره-داران نقش‌های فیزیولوژیک متعددی چون تنظیم ریتم‌های سیرکادین، نوردورگی و اثر بر خواب، تولیدمثل، سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی را برعهده دارد. در گیاهان عالی ملاتونین از نظر مسیر بیوسنتز و اعمال فیزیولوژیک دارای اشتراکاتی با هورمون شناخته شده IAA است (۲۰). در گیاهان محل بیوسنتز ملاتونین کلروپلاست‌ها هستند و مقدار ملاتونین سلول‌های گیاهی در مقایسه با سلول‌های جانوری بسیار بیشتر است (۳، ۵۳). آنچه مطالعه ملاتونین را در گیاهان جالب می‌سازد نقش‌های متعددی است که در رشد گیاه و دفاع در برابر عوامل محیطی ایفا می‌کند. گزارش‌هایی در زمینه نقش ملاتونین در بهبود پاسخ‌های گیاه به تنش‌هایی چون خشکی (۱۲، ۱۶، ۱۹، ۴۰، ۴۵، ۴۸)، شوری (۱۷، ۴۷، ۵۰)، سرما (۸، ۱۳، ۴۳، ۵۱)، حمله پاتوژن‌ها و محافظت در برابر علف‌کش (۲۷)، سمیت یونی (۴۲،۲۹) و تنش اکسیداتیو (۲۱) ارائه شده است. گزارشی از افزایش میزان ملاتونین داخلی در گیاه *Glycyrrhiza uralensis* تحت تیمار با پرتو UV-B نشان از نقش مؤثر آن در محافظت از آسیب اکسیداتیو ایجاد شده با UV دارد (۳). بنظر می‌رسد یکی از نقش‌های کلیدی ملاتونین در گیاهان در رابطه با فتوسنتز و محافظت نوری باشد. علاوه

بر آن که در شرایط تنشی مقدار ملاتونین گیاه افزایش می‌یابد، استفاده از ملاتونین خارجی نیز می‌تواند در ایجاد مقاومت در برابر تنش تأثیرگذار باشد زیرا گیاهان می‌توانند ملاتونین خارجی را جذب و ذخیره کنند (۴۹).

شوری یک تنش غیرزیستی است که در کل دنیا بویژه نواحی خشک و نیمه‌خشک بر تولید محصولات کشاورزی اثر نامطلوب می‌گذارد (۲۰، ۲۸، ۳۸، ۴۷). تنش شوری سبب ایجاد تنش اکسیداتیو از طریق افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌گردد. ROSها کربوهیدرات‌ها را اکسید کرده و رنگدانه‌ها را تخریب می‌کنند و به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب می‌زنند. پراکسیداسیون لیپیدها باعث بهم خوردن یکپارچگی غشا و تعادل متابولیسم می‌شود (۲۸، ۳۱، ۴۹). منبع اصلی تولید ROS در سلول‌های آسیب‌دیده از تنش شوری، اندامک‌هایی چون کلروپلاست، میتوکندری و پروکسیزوم‌ها هستند (۳۲، ۳۸). گیاهان برای اجتناب از اثرات ROSهایی چون H_2O_2 باید بتوانند بین تجزیه و تولید آنها تعادل ایجاد کنند. بهره بردن از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای خنثی کردن ROSها یکی از راهکارهایی است که گیاهان در شرایط تنشی پیش می‌گیرند (۳۱، ۳۸، ۳۹). ملاتونین به عنوان جاروب کننده عوامل اکسیداتیو و متعادل‌کننده فرآیندهایی که تعادل ردوکس سلول را تغییر می‌دهند، می‌تواند در متحمل کردن گیاهان به نمک گزینه مناسبی باشد (۳، ۴، ۲۶). برای بهبود بخشیدن تحمل گیاهان زراعی به نمک می‌توان از روش‌هایی چون مقاوم‌سازی به تنش، تنظیم شیمیایی و اصلاح نژاد استفاده کرد که در این میان تنظیم شیمیایی به دلیل چرخه زمانی کوتاه‌تر و هزینه‌های پایین‌تر و اثرات سریع‌تر بر روش‌های مهندسی ژنتیک و اصلاح نژاد مقدم است (۲۰). بدلایلی که شرح داده شد، در سال‌های اخیر استفاده از ملاتونین بعنوان یک فیتوهورمون که اثرات جالب توجهی بر روی رشد و نمو و مقاومت به تنش در گیاهان دارد، با اقبال مواجه شده است. از آن‌جایی که تاکنون هیچ گزارشی از اثر تیمار ملاتونین بر روی گیاه لوبیا در شرایط تنش شوری گزارش نشده است، در پژوهش حاضر به بررسی این مقوله پرداخته شده است.

مواد و روشها

تهیه و پرایم کردن بذرها و کشت هیدروپونیک: این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه لرستان انجام شد. بذرهای لوبیا رقم صدری از ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین تهیه شدند. بذرهای هم‌اندازه و سالم انتخاب شده و پس از استریل سطحی با هیپوکلریت سدیم ۷٪ به مدت ۵ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، بمدت ۱۲ ساعت در محلول‌های ملاتونین با غلظت صفر و ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار خیسانده شدند. سپس مجدداً با آب مقطر استریل شستشو داده شده، بر روی کاغذ صافی واتمن خشک شدند و برای جوانه‌زنی به پتری دیش‌های دارای آب مقطر استریل انتقال یافتند. جوانه‌زنی در شرایط تاریکی و با میانگین دمای روز و شب به ترتیب ۲۵ و ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از جوانه زدن بذرها و انتقال به گلدان‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی پرلیت، گلدان‌ها به گلخانه با دوره نوری ۱۶ ساعت و شدت نور ۱۲۰۰ لوکس و دمای متوسط شب و روز ۱۶ و ۲۵ درجه منتقل شدند. هر گلدان شامل سه گیاه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. آبیاری با محلول هوگلند نیم‌قدرت (pH =۶/۸–۷) انجام شد. گیاهان در مرحله چهار برگی با غلظت‌هایی از ملاتونین که با غلظت‌هایی که پرایم کردن بذرها انجام شده بود، یکسان بودند، سه بار و با فاصله دو روز از همدیگر، محلول‌پاشی شدند. برای محلول‌پاشی هر گیاه از ۵۰–۳۰ سی‌سی محلول ملاتونین استفاده شد تا حدی که محلول بر روی گیاه جاری شد. پس از آخرین مرحله محلول‌پاشی، برای ایجاد شرایط تنش شوری، NaCl به محلول هوگلند اضافه شد. گلدان‌ها به سه گروه تقسیم شدند و هر گروه در معرض یکی از غلظت‌

های صفر و ۱۰۰ و۲۰۰ میلی‌مولار NaCl قرار گرفتند. برداشت، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش صورت گرفت. از هر گلدان یک گیاه برای تعیین وزن تر و خشک برداشت شد و دو گیاه باقی‌مانده به منظور انجام سنجش‌های بعدی، پس از برداشت بلافاصله به نیتروژن مایع و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شدند.

وزن خشک بخش‌های هوایی و ریشه‌ها پس از ۴۸ ساعت نگهداری در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کارتنوئید از روش Arnon (۱۹۶۷) استفاده شد. ۰.۵ گرم از بافت تازه برگ گیاه با ۱ میلی‌لیتر استن ۸۰٪ ساییده شد. مخلوط به دست آمده، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm با استفاده از سانتریفیوژ مدل SIGMA 2-16KL سانتریفیوژ گردید و در نهایت عصاره استنی شفاف جدا شده و پس از ۳۰ دقیقه تاریکی، جذب آن با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Epoh، شرکت BioTek انگلستان) در طول موج‌های ۶۶۳ و۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل‌ها و طول موج ۴۷۰ نانومتر برای کارتنوئیدها سنجیده شد و از فرمول‌های مربوطه مقادیر رنگیزه‌ها محاسبه شد (۷). مقدار کلروفیل کل نمونه از مجموع کلروفیل a و کلروفیل b بدست آمد.

سنجش قندهای احیا و پرولین: محتوای قندهای احیای نمونه برگ به روش Somogyi (۱۹۵۲) استخراج و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار قندها با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز و بر اساس میلی‌گرم در گرم وزن تر ماده محاسبه شد (۳۷). برای تعیین غلظت پرولین برگ‌ها از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. برای این منظور پرولین با سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ استخراج شد و جذب آن در مجاورت نین‌هیدرین در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین نمونه محاسبه شد (۹).

سنجش پراکسید هیدروژن و بررسی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: استخراج H_2O_2 نمونه‌های برگ به‌روش Sergiev و همکاران (۱۹۹۷) با تری‌کلرواستیک اسید صورت گرفت و جذب نمونه در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. محتوای H_2O_2 با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ $\mu M^{-1}cm^{-1}$ و بر حسب میکرومول در گرم وزن تر گیاه بیان شد (۳۴). بررسی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به روش هیث و پارکر (۱۹۶۸) و با اندازه‌گیری مالون‌دی-آلدهید به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا انجام گرفت. میزان جذب مالون‌دی‌آلدهید تیوباربیتوریک اسید تولید شده و نیز جذب سایر رنگیزه‌های اختصاصی بترتیب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. میزان جذب در طول موج ۶۰۰ از مقدار جذب در طول موج ۵۳۲ nm کسر شد. سپس غلظت مالون‌دی‌آلدهید با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ و بر حسب واحد میکرومول در گرم وزن تر گیاه محاسبه شد (۱۵).

سنجش پروتئین و تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی
تهیه عصاره آنزیمی: ۰/۱ گرم از نمونه برگ در مجاورت ازت مایع ساییده شد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM (pH=۷) بهمراه EDTAی ۱ mM، گلیسرول ۶۰٪ و پلی وینیل پیرولیدون ۱٪، به صورت همگن درآمد. سپس در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای سنجش پروتئین و آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

محتوای پروتئین بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از سرم آلبومین به عنوان استاندارد تعیین شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید. پس از قرارگیری به مدت ۲۵ دقیقه در تاریکی و ۳۰ دقیقه

سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور، جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار پروتئین بر اساس میلی‌گرم در گرم وزن تر ماده گیاهی گزارش شد (۱۰).

فعالیت کاتالاز (CAT) به روش Kato و Shimizu (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. در این روش فعالیت این آنزیم بوسیله ارزیابی تجزیه H_2O_2 به صورت کاهش جذب مخلوط واکنشی شامل عصاره آنزیمی، پراکسید هیدروژن ۱۰mM و بافر فسفات ۲۵ mM، هر ۳۰ ثانیه در طول مدت یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش شد (۱۸). فعالیت پراکسیداز (POX) با استفاده از روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) در یک مخلوط واکنش شامل عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، محلول پراکسید هیدروژن ۳٪ و گایاکول خالص پس از گذشت ۲۰ ثانیه مورد سنجش قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن محلول‌های پراکسید هیدروژن و گایاکول آغاز گردید و فعالیت به وسیله افزایش جذب در ۴۳۶ نانومتر در فواصل زمانی ۳۰ ثانیه، به عنوان نتیجه‌ای از اکسیداسیون گایاکول ارزیابی شد (۲۲). فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) بر اساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) در یک مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن ۰/۲۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیم استخراج شده بر اساس ارزیابی نرخ کاهش غلظت آسکوربات با اندازه‌گیری جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۳). فعالیت هر سه آنزیم بر اساس واحد آنزیم در میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر گیاه گزارش شد.

آنالیزهای آماری: برای داده‌ها تجزیه واریانس صورت گرفت و مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری با استفاده از روش دانکن به وسیله نرم افزار SPSS 20 انجام شد.

نتایج

رشد گیاه: نتایج تجزیه واریانس صفات وزن خشک اندام هوایی (SDW) و ریشه‌های (RDW) گیاه لوبیا در جدول۱ آمده است. شوری سبب کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه شد.

در بالاترین سطح شوری استفاده شده کمترین SDW مشاهده شد. اثر مثبت ملاتونین بر روی رشد ریشه بیشتر از اندام هوایی بود. مقایسه میانگین‌ها در برهم‌کنش ملاتونین و شوری نشان داد در سطوح شوری استعمال ملاتونین در همه غلظت‌ها اثرات کاهشی نمک را بهبود بخشید و بیشترین مقدار SDW با ۲۵٪ افزایش نسبت به شاهد در نمک صفر و ملاتونین ۱۰۰ µM بود.

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس اثر ملاتونین بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رشد گیاه لوبیا تحت تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	وزن بخش هوایی	وزن ریشه
			میانگین مربعات				
شوری	۲	۸/۷۶۱**	۱/۲۲۹**	۱۶/۵۱۴**	۷/۴۲۵**	۰/۱۶۵*	۰/۰۰۹**
ملاتونین	۳	۰/۴۹۹**	۰/۲۶۲**	۱/۴۱۱**	۶/۱۰۷**	۰/۰۹۳*	۰/۰۱۲**
شوری×ملاتونین	۶	۰/۳۱۸**	۰/۰۴۴**	۰/۴۴۵**	۱/۰۳۵**	۰/۰۱۱^{ns}	۰/۰۰۲*
خطا	۲۴	۰/۰۷۱	۰/۰۰۳	۰/۰۷۶	۰/۱۹۰	۰/۰۳۰	۰/۰۰۱

ns و * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱

ادامه جدول۱

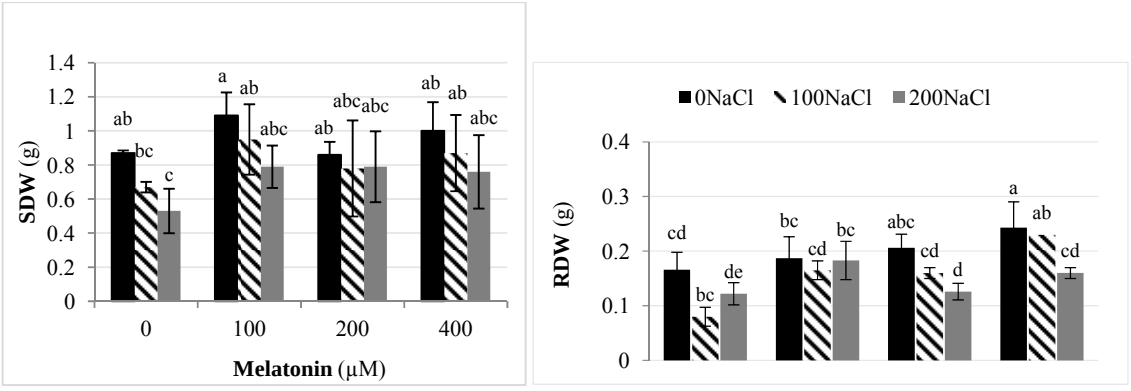
منابع تغییرات	درجه آزادی	قند احیا	پرولین	MDA	H_2O_2	POX	CAT	APX
				میانگین مربعات				
شوری	۲	۳/۷۰۷**	۰/۸۱۴**	۰/۰۶۲**	۲۳۹۱/۴۵۰**	۳۴/۴۱۲**	۲۲۷/۳۸۸**	۱۱۳/۴۸۳*
ملاتونین	۳	۱/۰۲۸*	۱/۰۴۹**	۰/۰۲۹**	۵۳۳/۲۳۴**	۱۹/۳۰۸**	۱۲۶۵/۱۷۵**	۱۸۳۵۴/۷۷۷**
شوری×ملاتونین	۶	۰/۱۰۲^{ns}	۰/۰۷۵**	۰/۰۱۰**	۶۹/۰۶۰**	۷/۵۵۶*	۳۳۹/۰۱۵**	۷۳۰/۱۹۵**
خطا	۲۴	۰/۲۲۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۴/۳۴۶	۲/۰۰	۷/۳۵۲	۳۰/۷۰۸

ns و * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱

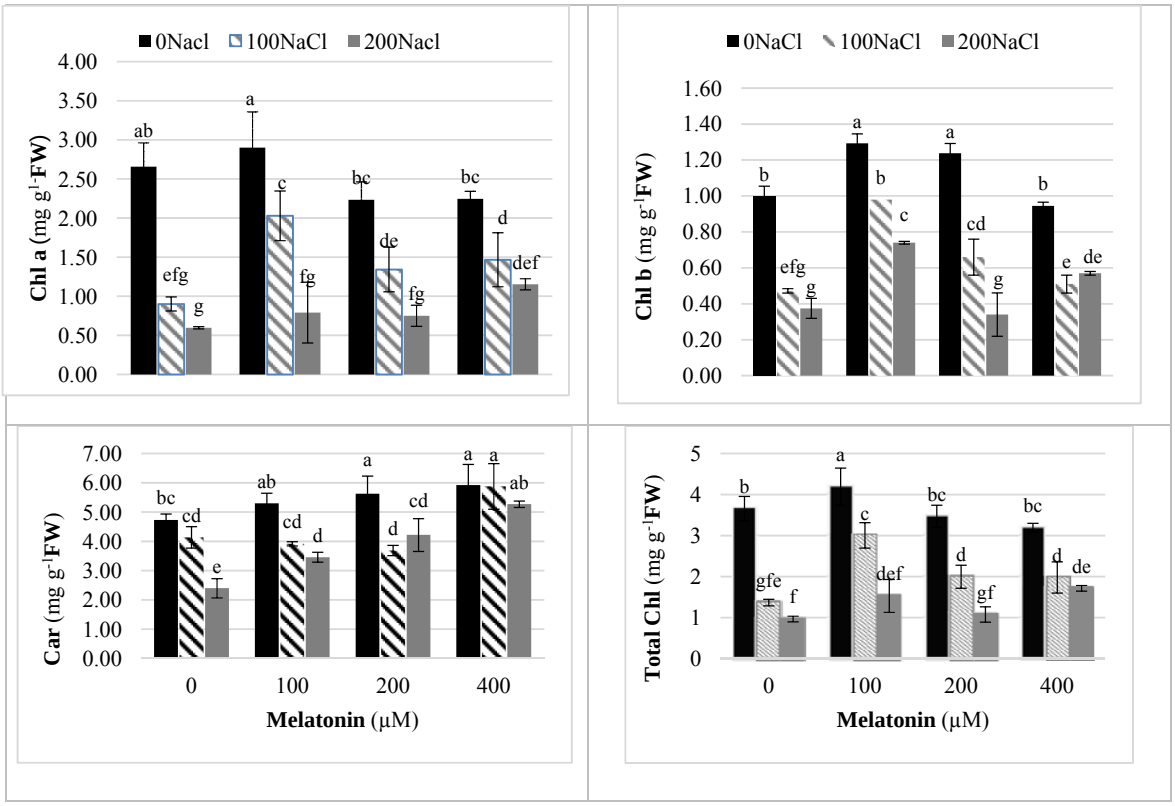
بیشترین مقدار RDW با ۴۶٪ افزایش نسبت به شاهد به سطح نمک صفر و ملاتونین ۴۰۰ µM تعلق داشت (شکل۱). **رنگیزه‌های فتوسنتزی:** شوری و ملاتونین بر روی محتوای کلروفیل a و کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدهای برگ‌های لوبیا اثر معنی‌داری داشتند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های این صفات نشان داد که برهم‌کنش شوری و ملاتونین نیز بر محتوای رنگیزه‌ها اثر معنی‌داری گذاشت (جدول۱). افزایش نمک سبب کاهش رنگیزه‌ها شد. استفاده از ملاتونین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها را در مقایسه با شاهد به ترتیب ۹٪، ۳۰٪، ۱۵٪ و ۲۵٪ افزایش داد. در مورد کلروفیل‌ها بیشترین تأثیر مربوط به غلظتµM ۱۰۰ ملاتونین و در مورد کارتنوئیدها مربوط به غلظت µM ۴۰۰ ملاتونین بود.

نتایج حاکی از آن است که اثر بهبوددهنده ملاتونین در شرایط بدون نمک بر روی میزان این رنگیزه‌ها بیشتر بوده است (شکل۲). در مورد کارتنوئیدها، بیشترین مقدار کارتنوئید در شرایط نمک صفر و سطح ملاتونین µM ۴۰۰ مشاهده شد. ممکن است افزایش میزان کارتنوئید در این غلظت از ملاتونین نسبت به سایر غلظت‌های ملاتونین به نقش آنتی‌اکسیدانی این رنگیزه و تنش‌زا بودن غلظت‌های بالای ملاتونین مربوط باشد.

محتوای قند و پرولین: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که شوری به طور معنی‌داری سبب افزایش میزان قند و پرولین شد. با افزایش غلظت NaCl مقدار آنها نیز افزایش یافت (جدول۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین صفات وزن خشک اندام هوایی (SDW) و وزن خشک ریشه (RDW) در غلظت‌های مختلف NaCl و تیمار با غلظت‌های مختلف ملاتونین. هر ستون معرف میانگین ± انحراف معیار ۳ تکرار است. حروف مشترک عدم اختلاف معنی‌دار از لحاظ آزمون دانکن را نشان می-دهد.



شکل۲- مقایسه میانگین محتوای رنگیزه‌های گیاه لوبیا در غلظت‌های مختلف NaCl و تیمار با غلظت‌های مختلف ملاتونین. هر ستون معرف میانگین ± انحراف معیار ۳ تکرار است. حروف مشترک عدم اختلاف معنی‌دار از لحاظ آزمون دانکن را نشان می‌دهد.

ملاتونین به طور معنی‌داری اثر افزایشی نمک را در مورد محتوای پرولین تشدید کرد. در بین اثرات متقابل شوری و ملاتونین با مقایسه میانگین‌ها بیشترین میزان محتوای قند و پرولین در سطح ۱۰۰ µM ملاتونین و شرایط ۲۰۰ mM NaCl مشاهده شد که به ترتیب نسبت به شاهد بدون ملاتونین در این سطح شوری ۶۱٪ و ۲۸۰٪ افزایش میانگین نشان دادند.

مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون غشاها: نتایج واریانس داده‌های مربوط به مقادیر H_2O_2 و MDA برگ در جدول۱ آمده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افزایش سطح نمک به طور معنی‌داری سبب افزایش H_2O_2 و MDA شد. استفاده از ملاتونین سبب کاهش این دو فاکتور در شاهد و سایر سطوح نمک شد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین مؤثرتر عمل کردند. مقایسه میانگین‌ها در اثر متقابل شوری و ملاتونین نشان داد که کمترین مقدار H_2O_2 و MDA مربوط به غلظت صفر میلی مولار NaCl و ۱۰۰ µM ملاتونین است که در مورد H_2O_2، ۹٪ و در مورد MDA، ۲۶٪ کاهش نسبت به شاهد نشان داد. بیشترین مقدار H_2O_2 در شرایط ۲۰۰ mM NaCl و ۴۰۰ µM ملاتونین مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (جدول۲) و بیشترین مقدار MDA مربوط به شرایط شوری ۲۰۰ mM NaCl و صفر میکرومولار ملاتونین بود که معنی‌داری اختلاف میانگین‌ها در جدول۲ آمده است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در جدول۱ آمده است. بجز در مورد CAT، افزایش سطح شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم شد.

جدول۲- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه لوبیا تحت تأثیر سطوح مختلف شوری و ملاتونین. هر عدد معرف میانگین ۳ تکرار است. حروف مشترک عدم اختلاف معنی‌دار از لحاظ آزمون دانکن را نشان می‌دهد.

APX U mg^{-}) (^{1}Protein	CAT U mg^{-}) (^{1}Protein	POX U mg^{-}) (^{1}Protein	H_2O_2 µg g^{-1}) (FW	MDA µmol g^{-}) (^{1}FW	پرولین (µg g^{-1}FW)	قند احیا (mg g^{-1}FW)	ملاتونین (µM)	NaCl (mM)
۱۲۵/۱۸۳e	۳۲/۶۱d	۴/۸۲d	۳۶/۲۳۱fg	۰/۱۹۵cd	۰/۱۵۷۷g	۱/۴۱۰e	۰	
۱۴۵/۶۸۰bc	۵۸/۹۱a	۵/۷۷d	۳۲/۶۷۲g	۰/۱۴۴d	۰/۴۵۴۰e	۱/۹۲۶e	۱۰۰	۰
۱۰۶/۲۴۳f	۲۵/۴۰fg	۵/۴۸d	۳۸/۱۲۵f	۰/۲۶۸bc	۰/۵۴۳۰e	۱/۲۷۰e	۲۰۰	
۶۱/۹۸۰h	۲۶/۷۲ef	۶/۷۲cd	۳۹/۲۲۶f	۰/۳۳۴b	۰/۱۵۴۷g	۱/۳۲۰e	۴۰۰	
۱۳۵/۲۷۷d	۳۱/۰۴de	۶/۴۸cd	۵۳/۲۶۸d	۰/۲۱۳cd	۰/۲۰۵۷g	۲/۱۶۰cd	۰	
۱۵۱/۷۳۷b	۳۳/۹۸cd	۱۱/۰۴a	۳۷/۵۷۲f	۰/۱۷۴d	۰/۹۷۳۷bc	۲/۵۷۶b	۱۰۰	۱۰۰
۹۲/۵۴۷g	۲۰/۷۹gh	۷/۲۵cd	۴۶/۹۳۳e	۰/۳۱۱b	۰/۹۳۱۳c	۲/۳۲۰bc	۲۰۰	
۶۴/۴۲۰h	۲۳/۴۶fg	۵/۳۰d	۶۳/۴۳۶c	۰/۳۵۰ab	۰/۲۵۹۰fg	۱/۸۰۶d	۴۰۰	
۱۴۰/۰۱cd	۵۳/۶۹b	۸/۴۵bc	۶۸/۳۷۳b	۰/۴۳۸a	۰/۳۴۶۰f	۱/۸۸۶d	۰	
۱۸۸/۱۷۰a	۳۷/۸۷c	۱۱/۵۳a	۵۱/۰۳۰d	۰/۳۲۵b	۱/۳۲۶۳a	۳/۰۴۳a	۱۰۰	۲۰۰
۸۵/۴۱۶g	۱۸/۲۶h	۹/۹۱ab	۶۵/۵۴۱bc	۰/۳۶۱ab	۱/۰۵۵۰b	۲/۵۴۳b	۲۰۰	
۴۸/۸۲۰i	۱۱/۷۷i	۶/۴۳cd	۷۴/۲۳۱a	۰/۳۵۸ab	۰/۶۶۵۰d	۱/۹۴۶d	۴۰۰	

استفاده از ملاتونین سبب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به شاهد بدون ملاتونین شد. غلظت مؤثر ملاتونین غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود. در اثر متقابل شوری و ملاتونین بیشترین فعالیت POX و APX در غلظت mM NaCl ۲۰۰ و µM ۱۰۰ ملاتونین دیده شد. در مورد کاتالاز، حداکثر فعالیت در سطح نمک صفر و ملاتونین µM ۱۰۰، با ۸۰٪ افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. POX و APX در بیشترین مقدار خود بترتیب نسبت به شاهد ۱۳۰٪ و ۵۰٪ افزایش فعالیت نشان دادند (جدول۲).

بحث و نتیجه‌گیری

تنش شوری با ایجاد محدودیت در جذب آب و نیز سمیت یونی بر وضعیت آب بافتی گیاه، فرآیندهای متابولیکی و رشد گیاه تأثیر می‌گذارد، کاهش مقدار کلروفیل و نرخ فتوسنتز سبب کاهش قابل توجهی در رشد می‌شود (۳۱، ۵۰) و متابولیسم کربوهیدرات و اسمولیت‌هایی چون اسیدهای آمینه (بیشتر از همه پرولین) تغییر می‌کند (۳۰، ۳۶) سیستم‌های غشایی و آنزیمی با بالا رفتن سطح ROS و بهم خوردن هومئوستازی ROS آسیب می‌بینند. تلاش-های گیاه برای مقابله با آسیب‌های ناشی از تنش با به‌کار گرفتن یک سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی پروتئینی و غیرپروتئینی، معمولا در ساعات اولیه رویایی با تنش آغاز می‌شود. تولید ROSها بعنوان پیامبرهای ثانویه (۵۰)، مسیرهای علامت‌رسانی را روشن می‌کند و در نهایت سیستم آنتی‌اکسیدانی با کاهش ROS آسیب‌های ناشی از تنش را آرام می‌کند. در پژوهشی در مورد گیاه لوبیا که در معرض شوری ۱۲۰mM قرار داشت، مقدار پروتئین کاهش زیادی پیدا کرد در حالی که محتوای نسبی رنگیزه‌های فتوسنتزی افزایش یافت. فتوسنتز کاهش یافت، رشد دانه-رست‌ها و وزن خشک آنها با افزایش غلظت نمک در محیط، کاهش یافت (۴۶). در پژوهشی دیگر تنش شوری (۱۰۰ mM NaCl) در دو رقم لوبیای حساس و غیرحساس به شوری، سبب افزایش فعالیت APX و CAT شد که در رقم متحمل به نمک افزایش فعالیت بیشتر بود. میزان MDA نیز تحت تنش نمک افزایش یافت. مقدار کلروفیل

در رقم حساس کاهش یافت و در رقم متحمل تغییری نداشت (۴۴). تنش خشکی سبب تغییر کارکرد فتوسیستم II (کاهش Fv/Fm و Fv و افزایش میزان فلورسانس حداقل)، کاهش محتوای کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها در دو رقم لوبیا شد (۱).

ترکیبات شیمیایی متعدد برای بهبود مقاومت گیاهان به شرایط تنشی توسط پژوهشگران زیادی استفاده شده است. در مورد گیاه لوبیا، استعمال آسکوربیک اسید (ASA) و جیبرلین خارجی (GA3) بر روی دانه‌رست‌های لوبیای تیمار شده با ۲۰۰ mM NaCl، آسیب اکسیداتیو حاصل از شوری را کاهش داد (۳۳). خیساندن بذرهای لوبیا یا افشانه برگی آنها با SA و MLE (عصاره برگ *Moringa oleifera*) توانست فاکتورهای فیزیولوژیکی و رشدی و تعادل یونی گیاه را در برابر تنش شوری بهبود بخشد و غلظت کل قندهای محلول و پرولین آزاد را افزایش دهد (۳۱). اسپری برگی گیاه لوبیا با غلظت‌هایی از اتانول، با بهبود فاکتورهای فتوسنتزی، تحمل گیاه را به تنش خشکی افزایش داد (۵). استفاده از کمپوست و ورمی‌کمپوست در تعدیل اثرات سمی فلزات سنگینی چون کادمیوم و سرب در گیاه لوبیا رقم صدری نقش مثبتی ایفا کرد و با کاهش اثرات سمی این فلزات، اثر مثبتی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چون پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز داشت (۲). اخیراً چندین پژوهش نشان داده‌اند که ملاتونین با بهبود بخشیدن به فتوسنتز و هومئوستازی یونی، مقاومت به شوری را در هندوانه، سیب و خیار بهبود بخشیده است (۱۴). پیش‌تیمار با ملاتونین سبب افزایش ظرفیت فتوسنتزی و توسعه سیستم ریشه‌ای می‌شود. تیمارهای ملاتونین با افزایش سطح رونوشت‌برداری و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توانایی گیاه را برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری بهبود می‌بخشد. ملاتونین به طور معنی‌داری تولید H_2O_2 و رادیکال‌های هیدروکسیل را سرکوب می‌کند (۵۰). در پژوهش حاضر کاهش بیوماس ایجاد شده تحت تأثیر تنش شوری در اندام هوایی و ریشه، با تیمار ملاتونین جبران شد. همچنین ملاتونین سبب افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در شاهد و در شرایط شوری شد. نتایج مشابهی از اثر ملاتونین بر روی این فاکتورها در گیاهان دیگری گزارش شده است. از جمله استفاده از ملاتونین در گیاه جوی دوسر که در معرض تنش شوری بود سبب افزایش محتوای کلروفیل و سطح برگ شد و وزن تر و وزن خشک گیاه را افزایش داد (۱۴). همچنین در تحقیقی که Zhang و همکاران (۲۰۱۶) بر روی *Cucumis melo* L. انجام دادند، استفاده از ملاتونین خارجی با غلظت µM ۲۰۰ به صورت افشانه برگی به طور معنی‌داری از سرکوب رشد القا شده بوسیله سرما جلوگیری کرد و گیاهان تیمار شده با ملاتونین نسبت به غیر تیمار شده‌ها رشد و محتوای کلروفیل بیشتری داشتند (۵۱). Wang و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ملاتونین با تغییر بیان ژن یک پروتئین که طی دوره پیری برگ در تجزیه کلروفیل نقش دارد، از کلروفیل محافظت می‌کند. علاوه بر این تأثیر ملاتونین به عنوان جاروب کننده ROS و فعال کننده آنتی‌اکسیدان‌ها بر پایداری غشاها، سبب پایداری کلروپلاست و جلوگیری از تجزیه کلروفیل می‌شود. اثر ملاتونین بر روی فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌هایی چون روبیسکو می‌تواند بر تولید خالص اولیه تأثیر مثبت داشته باشد که در نهایت افزایش رشد گیاه را به دنبال دارد (۴۱، ۵۱). در پژوهش حاضر شوری در گیاه لوبیا مشابه با پژوهش‌های دیگر به طور معنی‌داری سبب افزایش غلظت قندهای محلول و پرولین شد (۲۵). اثر افزایشی ملاتونین به طور وابسته به غلظت بر این فاکتورها در شرایط تنش و بدون تنش مشهود بود. پرولین بر روی آنزیم‌ها و تمامیت غشای سلولی اثرات مثبتی دارد و بین میزان انباشته شدن اسمولیت پرولین و مقاومت گیاه به تنش ارتباط مثبت وجود دارد. پرولین علاوه بر نقشی که به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی دارد، در تنش شوری که با تنش اکسیداتیو دنبال می‌شود، در تنظیم پتانسیل ردوکس سلولی نیز مؤثر است و از آسیب رساندن ROSها به

غشاهای سلولی در شرایط تنش جلوگیری می‌کند (۳۲، ۲۴)، با استناد به نتایج حاضر می‌توان بر نقش مؤثر ملاتونین در مقاوم کردن گیاه به شرایط شوری، تأکید کرد. Qian و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تیمار ملاتونین در گیاه گوجه فرنگی که در معرض حمله باکتریایی قرار داده شد، سبب افزایش سطح قندهایی چون فروکتوز، گلوکز و گلیسرول شد. در میان ۱۶ اسیدآمینه‌ای که اندازه‌گیری کردند، سطح پرولین به طور معنی‌داری پس از تیمار افزایش یافت (۳۰). آسیب به غشاهای زیستی در نتیجه تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری با افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدهید همراه است که می‌تواند با افزایش میزان H_2O_2 ارتباط مستقیم داشته باشد (۲۹). در پژوهش حاضر تنش شوری در گیاه لوبیا سبب افزایش معنی‌دار غلظت H_2O_2 و MDA شد و فعالیت آنزیم‌های POX، CAT و APX را افزایش داد. استفاده از ملاتونین به طور معنی‌داری سبب کاهش H_2O_2 و MDA در شرایط تنش شد که با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همراه بود. غلظت ۱۰۰ µm ملاتونین مؤثر بود و غلظت ۴۰۰ میکرومولار آن اثرات شوری را تشدید کرد که تأیید کننده نتایج پژوهش‌های پیشین می‌باشد. در دانه‌رست‌های ذرت، استعمال ۱۰۰ µM ملاتونین خارجی سبب کاهش میزان H_2O_2 و MDA القا شده به وسیله خشکی شد (۴۵). علاوه بر این که ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در جاروب کردن مستقیم H_2O_2 تولید شده در تنش اکسیداتیو، شوری و سرما به روش وابسته به مقدار مؤثر است، با افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیم‌های SOD، POX، CAT و APX در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ایفای نقش می‌کند (۴، ۲۰، ۱۱، ۲۷، ۱۵). Li و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ملاتونین خارجی می‌تواند آسیب‌های ناشی از تنش شوری را در برنج کاهش دهد، میزان H_2O_2 را کاسته و فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را افزایش دهد (۲۰). اثرات افزایش‌دهنده ملاتونین بر روی تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهانی که تحت تنش‌های شوری (۱۹، ۳۵، ۵۰)، خشکی (۴۰، ۴۵)، اکسیداتیو (۳) و سرما (۵۱) بوده‌اند، گزارش شده است. Jiang و همکاران (۲۰۱۶) گزارشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های POX و APX با به کار بردن ملاتونین در برگ‌های ذرت تحت تنش شوری ارائه دادند (۱۷). همچنین Zhang و همکاران (۲۰۱۶) افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، POX و کاتالاز را در دانه‌رست‌های خربزه قرار گرفته تحت تنش سرما گزارش کردند (۵۱).

تأثیر مقادیر مختلف ملاتونین در محدوده غلظت‌های بالا و پایین در گونه‌های مختلف و حتی نزدیک به هم متفاوت بوده است (۶، ۴۹، ۵۱). به عنوان مثال در *Brassica oleracea* L. غلظت ۱ و ۱۰ µM ملاتونین اثرات بازدارندگی فلز مس را کاهش داد و غلظت ۱۰۰ µM ملاتونین، این اثرات را تشدید کرد (۲۹). در حالی‌که غلظت ۲۰۰µM ملاتونین بر روی دانه‌رست‌های خیار که در معرض تنش سرمازدگی قرار داشتند، اثر بهبود دهنده داشت (۵۲). غلظت ۰/۱ µM ملاتونین در گیاه ذرت تحت تنش شوری سبب بهبود رشد، افزایش فتوسنتز خالص و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها و نیز بهبود هومئوستازی یونی شد (۱۷). در پژوهش حاضر غلظت بهینه ملاتونین که سبب بهبود مقاومت گیاه لوبیا در برابر شرایط تنش شوری شد، میزان ۱۰۰ µM بود که در تعداد محدودی از موارد با غلظت‌های بالاتر ملاتونین اختلاف معنی‌داری نداشت. گزارشات کمی از تأثیر بهبود دهنده غلظت‌های بالای ملاتونین بر روی تحمل گیاه به شرایط تنشی گزارش شده است که نتایج پژوهش ما در غلظت ۴۰۰ µM تأییدکننده اثرات بازدارنده غلظت ملاتونین می‌باشد.

در مجموع استعمال ملاتونین به طور وابسته به غلظت با افزایش پایداری رنگیزه‌ها و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی از آسیب‌های تنش شوری به غشاها کاست و با افزایش تجمع قندهای محلول و کاهش H_2O_2 سبب بهبود رشد گیاه لوبیا در شرایط تنش و شاهد شد.

منابع

۱- افشار محمدیان م.، امیدی پور م. و جمال امیدی ف.، ۲۰۱۸، اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر شاخص‌های فلورسانس کلروفیل دو رقم لوبیا. مجله پژوهشهای گیاهی، جلد ۳۱، شماره ۳. ۷۰۹-۶۹۴.

۲- امینی ف. و بلوچی ح.، تأثیر فلزات سنگین و ترکیبات مختلف بستر کاشت بر آنزیم‌های پاداکساینده و عملکرد لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris L. cv. Sadri*). مجله پژوهشهای گیاهی، ۲۰۱۷. جلد ۳۰، شماره ۳. ۵۱۱-۴۹۸.

3- Afreen F., Zobayed S. M. A. and Kozai T., 2006, Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation, Journal of pineal research; 41:108–115.

4- Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L. and Livrea M.A., 2003, The chemistry of melatonin's interaction with reactive species, Journal of pineal research; 34:1–10.

5- Armand N., Amiri H. and Ismaili A.,2016, Interaction of Methanol Spray and Water-Deficit Stress on Photosynthesis and Biochemical Characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadri, Photochemistry and Photobiology; 92:102–110.

6- Arnao M. B. and Hernandez-Ruiz J., 2009, Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves, Journal of pineal research; 46:58–63.

7- Arnon A. N., 1967, Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal; 23:112-121.

8- Bajwa V. S., Shukla M. R., Sherif S. M., Murch S. J. and Saxena P. K., 2014, Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana*, Journal of pineal research; 56(3):238-245

9- Bates L., Waldren R., Teare I., 1973. Rapid determination of free proline for water- stress studies, Plant and soil; 39:205-207.

10- Bradford M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry; 72:248-254.

11- Cao S., Shao J., Shi L., Xu L., Shen Z., Chen W. and Yang Z., 2018, Melatonin increases chilling tolerance in postharvest peach fruit by alleviating oxidative damage, Scientific Reports; 8(1):806.

12- Cui G., Zhao X., Liu S., Sun F., Zhang C., Xi Y., 2017, Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings, Plant Physiology and Biochemistry; 118:138-149.

13- Fu J., Wu Y., Miao Y., Xu Y., Zhao E., Wang J., Sun H., Liu Q., Xue Y., Xu Y. and Hu T., 2017, Improved cold tolerance in *Elymus nutans* by exogenous application of melatonin may involve ABA-dependent and ABA-independent pathways, Scientific Reports; 7:39865.

14- Gao W., Feng Z., Bai Q., He J. and Wang Y., 2019, Melatonin-Mediated Regulation of Growth and Antioxidant Capacity in Salt-Tolerant Naked Oat under Salt Stress, International journal of molecular sciences; 20(5):1176.

15- Heath R. L. and Packer L.,1968, Photoperoxidation in isolated Chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, Archives of biochemistry and Biophysics; 126:189-198.

16- Huang Y. H., Liu S. J., Yuan S., Guan C., Tian D. Y., Cui X., Zhang Y.W. and Yang F. Y., 2017, Overexpression of ovine *AANAT* and *HIOMT* genes in switchgrass leads to improved growth performance and salt-tolerance, Scientific Reports; 7(1):12212

17- Jiang X., Li H. and Song X., 2016, Seed priming with melatonin effects on seed germination and seedling growth in maize under salinity stress, Pak. J. Bot.; 48(4):1345-1352.

18- Kato, M. and Shimizu S., 1987, Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation, Can. J. Bot.; 65:729–735.

19- Li J., Zeng L., Cheng Y., Lu G., Fu G., Ma H., Liu Q., Zhang X., Zou X. and Li C., 2018, Exogenous melatonin alleviates damage from drought stress in *Brassica napus* L. (rapeseed) seedlings, Acta Physiologiae Plantarum; 40:43.

20- Li X., Yu B., Cui Y., Yin Y., 2017, Melatonin application confers enhanced salt tolerance by regulating Na^+ and Cl^- accumulation in rice, Plant Growth Regul; 83(3):441–454.

21- Li H., He J., Yang X., Li X., Luo D., Wei C., Ma J., Zhang Y., Yang J. and Zhang X., 2016, Glutathione-dependent induction of local and systemic defense against oxidative stress by exogenous melatonin in cucumber (*Cucumis sativus* L.), Journal of pineal research; 60:206–216.

22- MacAdam J. W., Nelson C.J. and Sharp R. E., 1992, Peroxidase Activity in the Leaf Elongation Zone of Tall Fescue, Plant Physiol.; 99:872-878.

23- Nakano Y. and Asada K. 1981, Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, Plant Cell Physiol.; 22:867–880.

24- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K., 1999, Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*, Federation of European Biochemical Societies; 461(3):205-10.

25- Palma F., Lluch C., Iribarne C., Garcı´a-Garrido J. M. and Tejera Garcı´a N. A., 2009, Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*, Plant Growth Regul; 58:307–316.

26- Park S. and Back K., 2012, Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination, Journal of pineal research; 53(4):385-9.

27- Park S., Lee D. E., Jang H., Byeon Y., Kim Y. S. and Back K., 2012, Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress, Journal of pineal research; 54(3):258-63.

28- Pasandi Pour A., Farahbakhsh H., Saffari M., 2014, Response of fenugreek to short-term salinity stress in relation to lipid peroxidation, antioxidant activity and protein content, Ethno-Pharmaceutical products; 1(1):45 -52.

29- Posmyk M. M., Kuran H., Marciniak K. and Janas K. M., 2008, Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations, Journal of pineal research; 45:24–31.

30- Qian Y., Tan D. X., Reiter R. J. and Shi H., 2015, Comparative metabolomic analysis highlights the involvement of sugars and glycerol in melatonin mediated innate immunity against bacterial pathogen in Arabidopsis, Scientific Reports; 28(5):15815.

31- Rady M. M. and Mohamed G. F., 2015, Modulation of salt stress effects on the growth, physio-chemical attributes and yields of *Phaseolus vulgaris* L. plants by the combined application of salicylic acid and *Moringa oleifera* leaf extract, Scientia Horticulturae; 193:105–113.

32- Razavizadeh R. and Ehsanpour A. A., 2009, Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants, BIOLOGICAL LETT., 46(2):63–75.

33- Saeidi-sar S., Abbaspour H., Afshari H. and Yaghoobi S. R., 2013, Effects of ascorbic acid and gibberellin A3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, Acta Physiol Plant; 35:667–677.

34- Sergiev, I., Alexieva V. and Karanov E., 1997, Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.; 51:121-124.

35- 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):681–694.

36- Siddiqui M. H., Alamri S., Al-Khaishany M. Y., Nasir Khan M., Al-Amri A., Ali 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, Int. J. Mol. Sci.; 20(2):353.

37- Somogyi M., 1952, Notes on sugar determination, J. Biol. Chem.; 195:19-23.

38- Stepien P. and Klobus G., 2005, Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress, Physiologia Plantarum; 125:31–40.

39- Sytar O., Brestic M., Zivcak M., Olsovska K., Kovar M. and Shao H., He X., 2017, Applying hyperspectral imaging to explore natural plant diversity towards improving salt stress tolerance, Science of the Total Environment; 578:90–99.

40- Wang P., Sun X., Li C., Wei Z., Liang D. and Ma F., 2013, Long-term exogenous application

of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple, Journal of pineal research; 54:292–302.

41-Wang P., Sun X., Xie Y., Li M., Chen W., Zhang S., Liang D. and Ma F., 2014, Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*, Journal of pineal research; 57:291–307

42- Yadu B., Chandrakar V., Meena R. K., Poddar A. and Keshavkant S., 2018, Spermidine and Melatonin Attenuate Fluoride Toxicity by Regulating Gene Expression of Antioxidants in *Cajanus cajan* L., Journal of Plant Growth Regulation; 37(4):1113–1126.

43- Yang X.L., Xu H., Li D., Gao X., Li T.L. and Wang R., 2018, Effect of melatonin priming on photosynthetic capacity of tomato leaves under low-temperature stress, Photosynthetica; 56(3):884–892.

44- Yasar F., Ellialtioglu S. and Yildiz K., 2008, Effect of Salt Stress on Antioxidant Defense Systems, Lipid Peroxidation, and Chlorophyll Content in Green Bean, Russian Journal of Plant Physiology; 55(6):782–786.

45- Ye J., Wang S., Deng X., Yin L., Xiong B. and Wang X., 2016, Melatonin increased maize (*Zea mays* L.) seedling drought tolerance by alleviating drought-induced photosynthetic inhibition and oxidative damage, Acta Physiol Plant; 38:48.

46- Younis M.E., Abbas M.A. and Shukry W.M., 1993, Effects of salinity on growth and metabolism of *Phaseolus vulgaris*, Biologia Plantarum; 35(3):417-424.

47- Zeng L., Cai J., Li J., Lu G., Li C., Fu G., Zhang X., Ma H., Liu Q., Zou X. and Cheng Y., 2018, Exogenous application of a low concentration of melatonin enhances salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings, Journal of Integrative Agriculture; 17(2):328–335.

48- Zhang N., Zhao B., Zhang H. J., Weeda S., Yang C., Yang Z. C., Ren S. and Guo Y. D., 2013, Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.), Journal of pineal research; 54:15–23.

49- Zhang N., Sun Q., Zhang H., Cao Y., Weeda S., Ren S. and Guo Y. D., 2014, Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants, Journal of Experimental Botany; 66(3):647-56.

50- Zhang H., Zhang N., Yang R., Wang L., Sun Q., Li D., Cao Y., Weeda S., Zhao B., Ren S. and Guo Y., 2014, Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.), Journal of pineal research; 57:269–279.

51- Zhang Y.P., Yang S. J. and Cheny Y., 2016, Effects of melatonin on photosynthetic performance and antioxidants in melon during cold and recovery, Biologia Plantarum; 61(3):571–578.

52- 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; 7:4998.

53- Zheng X., Tan D. X., Allan A. C., Zuo B., Zhao Y., Reiter R. J., Wang L., Wang Z., Guo Y., Zhou J., Shan D., Li Q., Han Z. and Kong J., 2017, Chloroplastic biosynthesis of melatonin and its involvement in protection of plants from salt stress, Scientific Reports; 1(7):41236.

Effect of Melatonin on Some Morphophysiological Characteristics of *Phaseolus vulgaris* cv. Sadri under Salinity Stress

Azizi F.[1], Amiri H.[1] and Ismaili A.[2]

[1] Dept. of Biology, Faculty of basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, I.R of Iran

[2] Dept. of Agronomy and plant breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R of Iran

Abstract

Melatonin (N-acetyle-5-methoxy tryptamine) has recently been considered as a phytohormone in raising the resistance of plants against environmental stresses. The present study aims to assess the effect of melatonin treatment on the tolerance of salt by *Phaseolus vulgaris* cv. Sadri which was conducted in completely randomized design, repeated three times. In this study, salinity stress was introduced in three levels of 0, 100 and 200 mM of NaCl to bean plants treated by melatonin with respective concentrations of 0, 100 and 200 µM. It was found that salinity stress decreased the dry weight of shoot, the root and the photosynthetic pigments while it increased proline, soluble sugars, malondialdehyde and H_2O_2 as it increased the activity of antioxidant enzymes of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase. Applying melatonin improved plant growth, the concentration of photosynthetic pigments, proline, soluble sugars and the activity of antioxidant enzymes while it reduced H_2O_2 and malondialdehyde concentration. Results showed that melatonin had a significant effect on raising the resistance of *phaseolus vulgaris* cv. Sadri against salt and that lower concentrations of melatonin worked better.

Key words: Antioxidant, Salinity, Catalase, *Phaseolus vulgaris*, Melatonin