DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

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

شبنم جلیلی[۱]، علی اکبر احسانپور[۱*] و سید مرتضی جوادی راد[۲]

[۱] **ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری**

[۲] **ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی**

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

چکیده

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهمترین گیاهان علوفه ای در کشور می باشد که میزان و کیفیت تولید آن با تنش شوری محدود می گردد. ملاتونین بعنوان یک ایندول آمین در تحقیق حاضر با غلظت های ۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار بهمراه غلظت های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک بمنظور بررسی نقش ملاتونین درتحمل به شوری گیاهچه های یونجه پس از سه هفته رشد در شرایط کشت بافت استفاده شد، با افزایش غلظت شوری میزان رشد و نیز قدرت آنتی اکسیدانی و سنتز ترکیبات آنتی اکسیدان کاهش یافت. ملاتونین، سبب افزایش وزن تر، وزن خشک، طول ساقه، رنگیزه های فتوسنتزی، میزان کاروتنوئید و همچنین ترکیبات فنلی از جمله فنل کل، فلاونوئید و نیز دو آنزیم مهم با خاصیت آنتی اکسیدان در مسیر سنتز پلی فنل ها PAL و TAL گردید. بنابراین به نظر می رسد ملاتونین با کاهش عوامل سرکوبگر رشد از جمله پاکسازی ROS و در نتیجه کاهش آسیب های اکسیداتیو و نیز افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و ترکیبات دفاعی گیاه از جمله ترکیبات فنلی و از طرف دیگر افزایش ظرفیت و توان فتوسنتزی گیاه با حفظ رنگیزه های فتوسنتزی در افزایش تحمل به شوری ایفای نقش نموده است.

واژه های کلیدی: ملاتونین، تنش شوری، یونجه، کشت بافت، ترکیبات فنلی

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

مقدمه

در میان تنش های محیطی تنش شوری یکی از مخرب ترین تنش های غیر زیستی می باشد که سبب تجمع زیاد نمک در اندام های گیاه و به دنبال آن تولید انواع گونه های فعال اکسیژن، ایجاد سمیت، کاهش تقسیم سلولی، عدم تعادل یونی، کاهش جذب آب، اختلال در جذب عناصر، بسته شدن جزئی یا کلی روزنه ها و کاهش عملکرد فتوسنتز و کاهش رشد گیاه می شود (۴۴). یونجه بعنوان گیاه علوفه ای بدلیل کیفیت بالای غذایی و درصد پروتئین بالا، وجود اکوتیپ های متنوع برای مناطق مختلف و ارتقای سطح حاصلخیزی خاک با تثبیت ازت هوا از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد. وجود ژنوتیپ ها و اکوتیپ های مختلف یونجه نشان دهنده پتانسیل بسیار کارآمد برای شناسایی انواع متحمل در برابر تنش های مختلف به ویژه تنش شوری می باشد (۴). عوامل محیطی مختلف سبب افزایش در متابولیسم فنیل پروپانوئیده در گیاه می شود. ترکیبات فنلی دارای فعالیت پاکسازی رادیکال های آزاد اکسیژن، خاصیت آنتی اکسیدانی، ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها و ضد میکروبی می باشند (۳۹). فنل‌ها را می‌توان در پنج زیرگروه شامل: کومارین‌ها، لیگنین‌ها، فلاونوئیدها، فنولیک اسیدها و تانن‌ها دسته بندی نمود (۱۴). فلاونوئیدها فراوان‌ترین ترکیب از پلی‌فنل‌ها در رژیم غذایی انسان است که ساختار پایه‌ای آنها از هسته

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

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

ملاتونین یا N- استیل متوکسی تریپتامین، اولین بار در عصاره پینه آل گاو یافت شد. شناسایی ملاتونین در گیاهان عالی اولین بار بوسیله ی Van Tassel و O'Neill در سال ۱۹۹۳ صورت گرفت. محققان بیان داشتند، مسیر بیوسنتزی ملاتونین در گیاهان و جانوران مشابه و L –تریپتوفان پیش ماده سنتز آن نیز در هر دو یکسان است. مقدار ملاتونین در گیاهان بدلیل شرایط محیطی مختلف (به ویژه تحت شرایط استرس)، مراحل تکامل گیاه و یا روش های مختلف شناسایی و اندازه گیری نه فقط از یک گونه به گونه ی دیگر، بلکه در واریته های یک گونه نیز متفاوت می باشد (۶) این ترکیب در بسیاری از بافت های گیاه از جمله : ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر در غلظت های مختلف از پیکوگرم تا میکروگرم وجود دارد. بعنوان یک آنتی اکسیدان بسیار قوی در برابر انواع گونه های واکنشگر اکسیژن و نیتروژن فعالیت می کند (۲۵). Arnao و همکارانش بیان داشتند، ملاتونین می تواند سبب افزایش ۳- ۴ برابری میزان رشد در بخش هوایی و نیز ریشه گردد (۵). از طرف دیگر، در گیاهان *Helianthus* (۲۵) و *Zea mays* (۱۷) ملاتونین سبب بهبود شرایط رشد تحت تنش شوری گردید. در بذرهای گیاه *Vigna radiate* L. تیمار شده با ملاتونین، ۲۰٪ افزایش رشد طول ریشه و همچنین کمترین از هم گسیختگی ساختارهای سلولی تحت تنش سرما را نشان داد (۳۶). اثرات مشابه دیگری نیز، تحت تنش اسمزی در خیار گزارش شده است. کاربرد ملاتونین در *Mung bean* موجب افزایش تجمع ترکیبات فنلی و پرولین پس از ۲ روز تنش سرمایی گردید (۳۷). اگر چه اثر مثبت ملاتونین بر افزایش مقاومت در برابر برخی تنش‌ها پیش از این نیز گزارش شده است، اما، با توجه به اطلاعات اندک مبنی بر اثر ملاتونین بر ترکیبات فنلی و بویژه آنزیم های موثر در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها بخصوص در شرایط کنترل شده در کشت بافت تحقیقات بسیار محدود انجام گردیده است لذا هدف از پژوهش حاضر نیز مطالعه اثر این هورمون بر فاکتورهای رشد، محتوی کلروفیل و برخی از ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های TAL و PAL بعنوان مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز این ترکیبات در شرایط کشت در شیشه است. این پژوهش در شناسایی بهتر نحوه عملکرد ملاتونین در گیاه یونجه بعنوان یک گیاه مدل برای مقابله با تنش شوری از طریق تغییرات مسیر ترکیبات فنلی و نحوه اثر ملاتونین بر این ترکیبات دارای اهمیت می باشد.

مواد و روشها

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

۳ دقیقه با محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد حجمی قرار گرفت و در پایان، با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شد. در مرحله بعد، بمنظور جوانه زنی، بذور در محیط آب بهمراه آگار قرار گرفت و پس از جوانه زنی (بعد از ۲ روز) به محیط کشت MS (۳۰) که حاوی غلظت های ۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین(Solarbio Life Sciences، پکن، چین) و همچنین غلظت های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک انتقال داده شد. تیمار بدون نمک و ملاتونین بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد (لازم به ذکر است که از میان آزمایش ها اولیه از بین دامنه صفر تا ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین بهترین غلظت ها انتخاب گردید). کلیه کشت‌ها در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، فتوپریود نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور حدود ۴۵ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه رشد داده شد. پس از ۳ هفته پارامترهای رشد، میزان کلروفیل و کارتنوئید، فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL اندازه‌گیری شد. کلیه آزمایشات با حداقل ۳ تکرار انجام شد و آنالیز واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و مقایسه میانگین داده ها بر اساس آزمون دانکن و در سطح۰/۰۵ ≥P محاسبه شد.

اندازه گیری شاخص های رشد: پس از کشت گیاهان در تیمارهای مختلف، نمونه برداری جهت اندازه گیری شاخص هایی مانند وزن تر، وزن خشک، طول اندام هوایی و تعداد برگ در هر تکرار صورت گرفت. وزن تر هر یک از نمونه ها پس از برداشت سریعا با استفاده از ترازو وزن گردید و سپس بمنظور تعیین وزن خشک، هر نمونه به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گفت.

اندازه گیری رنگیزه های فتوسنتزی: مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه ی گیاه با استفاده از استون ۸۰ درصد در تاریکی بر روی یخ سائیده شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ g سانتریفیوژگردید. جذب محلول به دست آمده با دستگاه Multi-mode reader در سه طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر بترتیب برای کلروفیل a ، b و کاروتوئید اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول های زیر محاسبه گردید (۲۳)

$$Chla = (12.25\ A663.2) - (2.79\ A646.8)$$
$$Chlb = (21.21\ A646.8) - (5.1\ A663.2)$$
$$Chla+b = chla + chlb$$
$$Car = (1000A470 - 1.8\ chla - 85.02\ chlb) / 198$$

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

میزان فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی با استفاده از کلرید آلومینیوم صورت گرفت. بدین منظور ۰/۱ میلی لیتر عصاره متانولی، ۰/۲ میلی لیتر آلمینیوم کلراید۱۰٪، ۰/۲ میلی لیتر پتاسیم استات ۱ مولار با یکدیگر ترکیب و به مدت ۳۰دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از آن، جذب در ۴۱۵ نانومتر قرائت شد (۱۱).

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

فرمول ۱: $A = \varepsilon bc$

A= میزان جذب خوانده شده

ε= ضریب خاموشی

b= عرض کوئت (۱ سانتی متر)

c= غلظت بر حسب میلی مول

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAL: مقدار ۰/۳ گرم بافت برگ یونجه را با ۴ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار(pH:8/5) که محتوی ۲-مرکاپتواتانول (۱۴/۴ میلی مولار) و pvp ۵٪ بود هموژن گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دورg ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. عصاره حاصل جهت سنجش فعالیت آنزیم های PAL و TAL با استفاده از Multi-mode reader استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل: ۵/۵ میکرومولار L-تیروزین، ۵۰۰ میکرو مولار بافر تریس با اسیدیته برابر۸ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی برگ در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر بود. پس از ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد واکنش تبدیل تیروزین به کوماریک اسید با اضافه نمودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۵ نرمال متوقف شد و در طول موج ۳۳۳ نانومتر فعالیت آنزیم TAL اندازه گیری شد (۹).

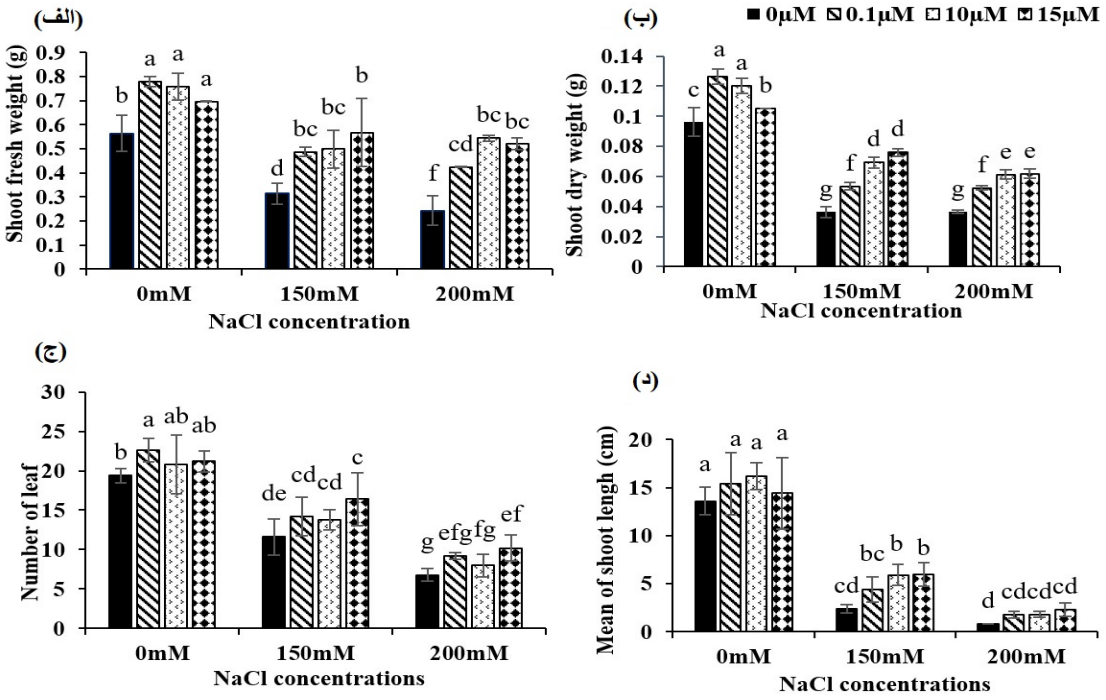
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL از عصاره آنزیمی توضیح داده شده در بالا، استفاده گردید. برای تخمین فعالیت آنزیم، ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل بافر واکنش (۵۰۰ میکرومولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸) که حاوی ۶ میکرومول فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی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

نتایج

تاثیر تیمار ملاتونین و شوری بر پارامترهای رشد: همان گونه که در شکل ۱ مشخص است، وزن تر و خشک ساقه در اثر افزایش غلظت شوری کاهش یافت. به گونه ای که وزن تر در نمونه شاهد از ۰/۵۶ گرم به ۰/۳۱ و ۰/۲۴ گرم بترتیب در گیاهچه های رشد یافته تحت شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک کاهش یافت(شکل۱- الف). همچنین وزن خشک قسمت هوایی اندازه گیری شده در نمونه شاهد از ۰/۰۹۶ گرم به ۰/۰۳۶ گرم در شوری ۲۰۰ میلی مولار نمک کاهش یافت. نتایج نشان داد که تیمار غلظت های متفاوت ملاتونین سبب افزایش معنی دار و چشمگیر وزن تر و وزن خشک در نمونه بدون نمک گردید. ملاتونین در گیاهچه های تحت تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار NaCl سبب افزایش معنی دار وزن تر و خشک شد که همین امر سبب بهبود رشد و نمو یونجه تحت تنش شوری گردید. تنش شوری سبب کاهش تعداد برگ در نمونه شاهد از ۱۹ عدد به ۶ عدد برگ در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک شد. غلظت ۱۵ میکرومولار ملاتونین، سبب افزایش معنی دار تعداد برگ در گیاهچه های تحت تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک نسبت به شوری ۱۵۰و ۲۰۰ میلی مولار نمک بدون ملاتونین گردید (شکل ۱- ج). با توجه به شکل ۱- د، در میانگین طول ساقه، بین غلظت های متفاوت ملاتونین و نمونه شاهد تفاوتی مشاهده نشد اما در شوری ۱۵۰ میلی مولار نمک، غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی داری را با ۱۵۰ میلی مولار نمک (بدون ملاتونین) نشان داد، اما در شوری ۲۰۰ میلی مولار نمک، ملاتونین اثر معنی داری بر میانگین طول ساقه ی یونجه نشان نداد.

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

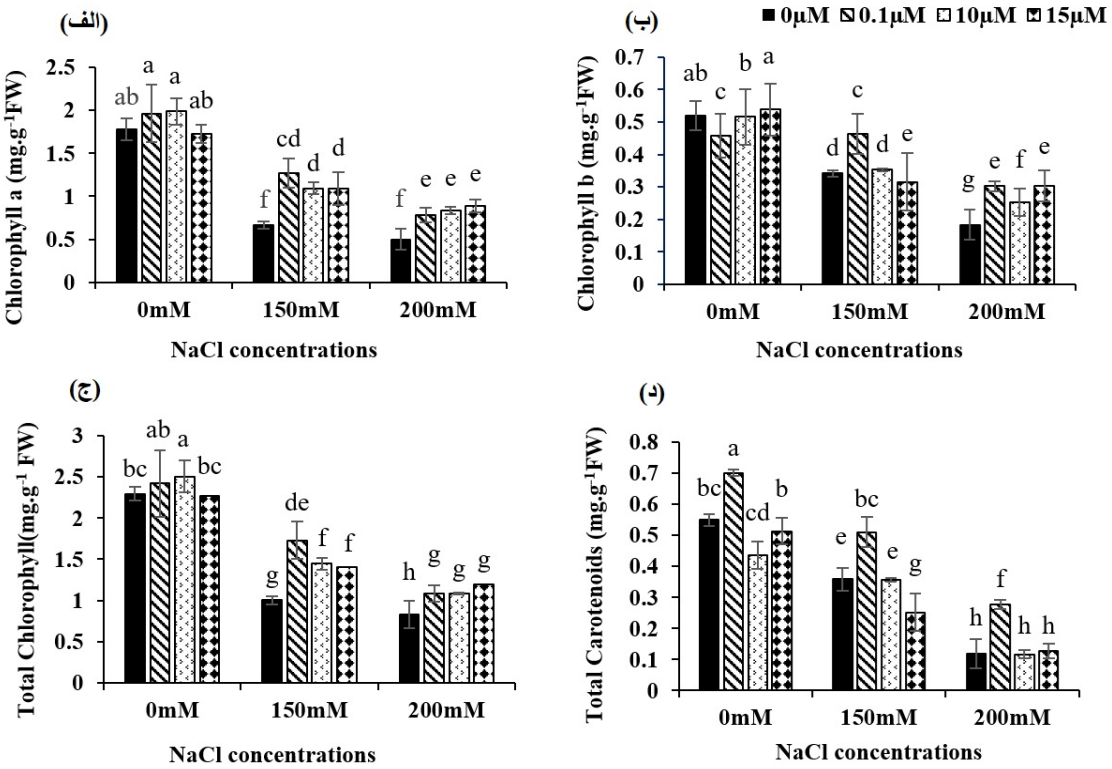


شکل ۱- وزن تر (الف)، وزن خشک (ب)، تعداد برگ (ج)، میانگین طول ساقه (د) در گیاهچه های یونجه تحت تیمار ملاتونین و نمک. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است.($p<0.05$)

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

تاثیر تیمار ملاتونین و شوری بر فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین: تنش شوری سبب کاهش معنی دار ترکیبات فنلی از جمله محتوی آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید گردید. تیمار ملاتونین تاثیر قابل توجهی بر میزان آنتوسیانین نداشت و اختلاف معنی داری را با نمونه شاهد و تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک بدون ملاتونین و حتی ما بین غلظت های دیگر ملاتونین نشان نداد (شکل۳- الف).

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6



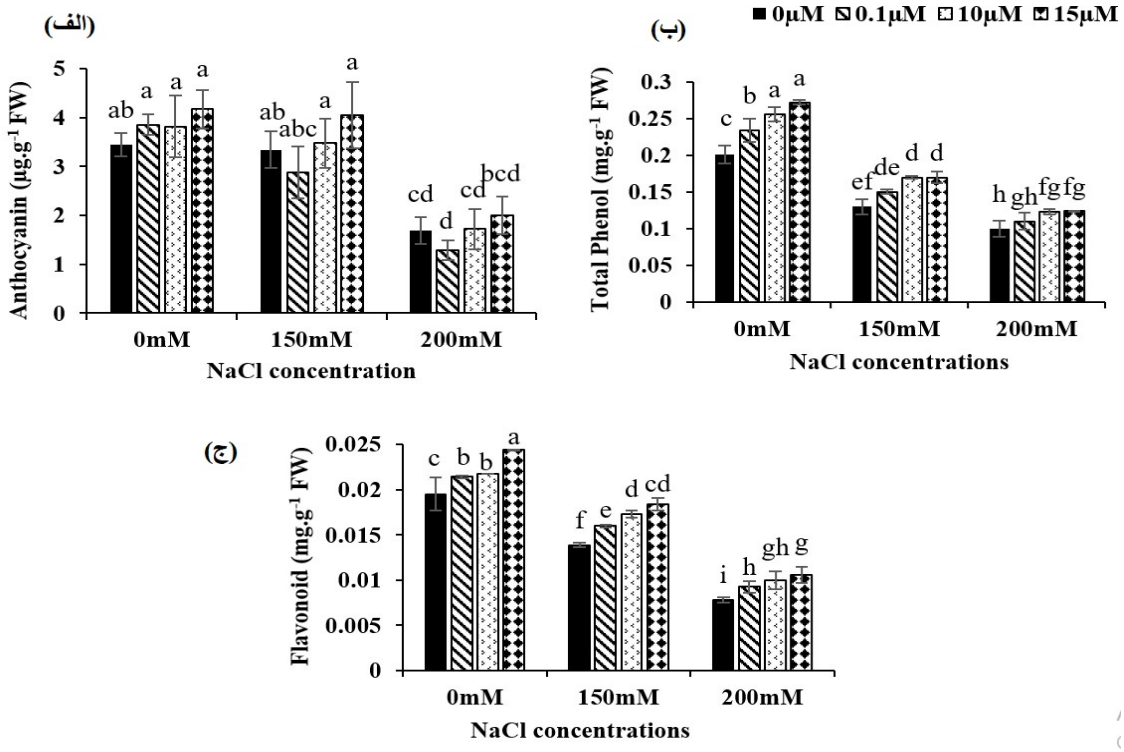
شکل ۲- میزان کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب)، کلروفیل کل (ج) و کاروتنوئید (د) در گیاهچه های یونجه تحت تیمار ملاتونین و شوری. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است($p<0.05$).

بر طبق نتایج بدست آمده در شکل۳- ب، غلظت های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین بیشترین میزان فنل را در شرایط بدون شوری نسبت به نمونه شاهد و همچنین در ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک نشان داد. تیمار ملاتونین بدون شوری سبب افزایش معنی دار محتوی فلاونوئید گردید، به گونه ای که غلظت ۱۵ میکرومولار ملاتونین بیشترین میزان فلاونوئید را نسبت به نمونه شاهد و همچنین تیمار ۱۰ و ۰/۱ میکرومولار ملاتونین نشان داد. علاوه بر آن، همانند فنل کل، هر دو غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین تحت تنش شوری، موجب افزایش مقدار فلاونوئید نسبت به دیگر تیمارها گردید (شکل ۳- ج).

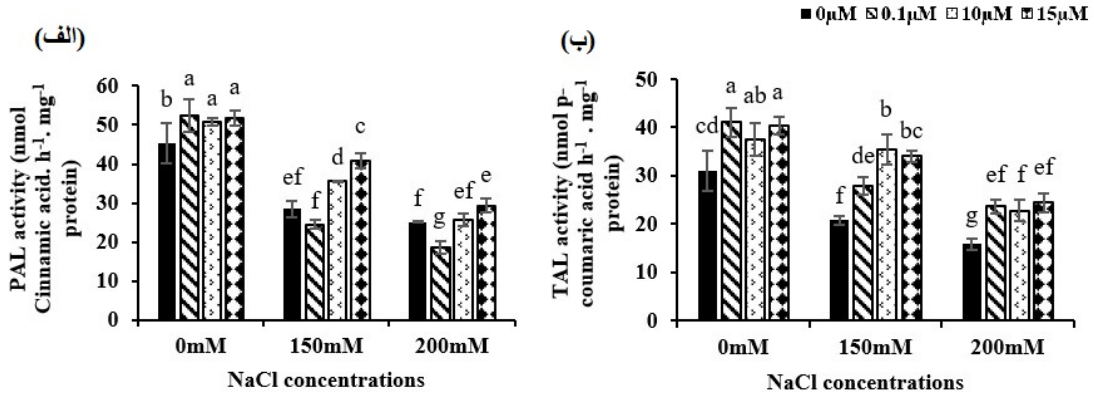
تاثیر تیمار ملاتونین و شوری بر فعالیت آنزیم PAL و TAL : بر طبق نتایج بدست آمده در شکل ۵ (الف و ب)، با افزایش غلظت شوری میزان فعالیت هر دو آنزیم کاهش یافت. فعالیت آنزیم PAL در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک ۴۴٪ نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. افزایش فعالیت چشمگیر آنزیم PAL در گیاهچه های تیمار شده با ملاتونین در محیط بدون شوری کاملا مشخص است. همچنین گیاهچه های تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین همراه با ۱۵۰ میلی مولار نمک بترتیب ۳۴٪ و ۳۹٪ نسبت به گیاهچه های تیمار شده فقط با شوری ۱۵۰ میلی مولار نمک افزایش فعالیت آنزیم را نشان داد و از طرف دیگر ۱۵ میکرومولار ملاتونین همراه با غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک با افزایش ۲۸ درصدی فعالیت آنزیم PAL نسبت به گیاهچه های تیمار شده فقط با شوری ۲۰۰ میلی مولار نیز تفاوت معنی داری را نشان داد. فعالیت آنزیم TAL مطابق شکل ۵- ب، دقیقا رفتاری مشابه فعالیت آنزیم PAL در گیاهچه های تحت تیمار ملاتونین و شوری نشان داد. فعالیت آنزیم TAL در ۱۵۰ میلی مولار نمک بهمراه غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

۳۴٪ افزایش و در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک، تیمار ملاتونین نیز موجب افزایش فعالیت آنزیم TAL گردید، اما در میان غلظت های مختلف ملاتونین تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



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



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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

بحث

گیاهان می توانند ملاتونین خارجی را از محیط جذب کرده و درون بافت های خود ذخیره کنند. طبق نتایج بدست آمده عملکرد ملاتونین در تنظیم رشد و نمو گیاهان، حتی در گونه های گیاهی مشابه وابسته به غلظت می باشد (۴۱). در تحقیق حاضر تنش شوری بطور چشمگیری سبب کاهش فاکتورهای رشدی از جمله وزن تر و خشک، طول ساقه و تعداد برگ گیاهچه یونجه گردید. مشابه نتایج بدست آمده نیز اشرفی و همکاران در گیاه یونجه تحت تنش شوری بیان داشتند (۸)،کاهش طول ساقه با افزایش میزان غلظت نمک همراه است که میزان عملکرد اندام های هوایی کاهش یافت که احتمالا بدلیل کاهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز در واحد سطح و مواد فتوسنتزی باشد. عملکرد محافظتی و بهبود عملکرد فتوسنتز و افزایش رشد توسط ملاتونین نیز در گیاهان *Malus domestica, Cucumis sativus L* گزارش شده است، بویژه افزایش کارکرد فتوسیستم دو در گیاهان تیمار شده با ملاتونین و در نتیجه افزایش رشد و نمو گیاه در شرایط تنش می شود. کاربرد ملاتونین سبب بهبود نرخ جوانه زنی، رشد و تولیدات گیاهی می شود(۵). کاهش ارتفاع گیاه و وزن خشک بدلیل رشد و نمو کندتر گیاه، ناشی از تنش اسمزی ایجاد شده توسط شوری است و یا ممکن است بدلیل بازدارندگی فتوسنتز از طریق اثرات مستقیم تنش شوری بر روی سیستم فتوسنتزی گیاه یونجه باشد. غالبا در تنش شوری انتقالات یونی تعادل اسمزی را بر هم زده و در نتیجه رشد را محدود می کند (۲۹) در خانواده گرامینه با افزایش تنش شوری غلظت یون های سدیم و کلر در ساقه زیاد و غلظت یون پتاسیم کاهش یافت در نتیجه رشد نسبی ساقه کاهش می یابد. پیامد شوری برای گیاهان عموما کاهش رشد می باشد که بدلیل کاهش محتوی آب و فتوسنتز است چرا که با افزایش شوری پتانسیل آب موجود در محیط ریشه کاهش یافت و واکنش سریع و اولیه گیاه نسبت به تنش شوری نیز بستن روزنه ها می باشد (۲۷) غلظت ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین بطور موثری سبب کاهش اثرات منفی شوری بر رشد گیاهچه یونجه شد. مطالعات متعددی در گیاهان *Glycyrrhiza uralensis, Lupinus albus L, Arabidopsis thaliana* (۳، ۷ و ۴۶) ملاتونین را بعنوان یک تنظیم کننده رشد نیز نشان داد. ملاتونین دارای ساختار ایندولی همانند IAA و نیز کارکردی مشابه اکسین در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد (۶). در تحقیق پیش رو تیمار ملاتونین احتمالا بدلیل کاهش اثرات منفی ناشی از تنش شوری همانند بهبود فرایند فتوسنتز، بهبود روابط آبی، کاهش مقاومت روزنه ای، جذب یون ها و افزایش آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی و نیز فعالیت آنزیم های انتی اکسیدان سبب بهبود رشد و افزایش وزن تر و خشک بعنوان دو عامل تعیین کننده در مقاومت به شوری گیاه گردید. مطابق با نتایج بدست آمده نیز در گیاهان *lupin* (۷) و *Brassica juncea* (۱۰) ملاتونین به صورت وابسته به غلظت سبب افزایش رشد و نمو گردید. همچنین Wei (۲۰۱۵) گزارش کرد که ملاتونین می تواند موجب افزایش بیان ژن های مربوط به تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش رشد و یا باعث فعالیت مجدد ژن های سرکوب شده توسط تنش شوری گردد (۴۱). از طرف دیگر احتمالا ملاتونین به واسطه اینتراکشن های هورمونی با دیگر تنظیم کنندگان گیاهی از جمله اکسین، جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید می تواند باعث افزایش شاخص های رشدی، افزایش فتوسنتز و افزایش بیوماس تحت تنش شوری شود.

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

آنها می باشد (۱۷). تجزیه کلروپلاست باعث افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز، و از طرف دیگر تنش شوری منجر به تولید ROS خواهد شد که سبب غیر فعال شدن آنزیم ها، تجزیه ی پروتئین های سلولی و کلروپلاستی و در نتیجه کاهش میزان کلروفیل می شود (۱۷). در گیاهچه های *Malus hupehensis* طول گیاهچه، تعداد برگ، میزان کلروفیل و نشت یونی در نمونه های تیمار شده با ملاتونین بسیار کمتر تحت اثرات مخرب ناشی از تنش شوری قرار گرفت از طرف دیگر، میزان هیدروژن پراکسید و ROS کاهش یافت اما آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین در طی تنش شوری افزایش یافت(۲۱). بسیاری از محققان بیان داشتند که ملاتونین از کاهش رنگیزه های فتوسنتزی در شرایط تنش محیطی ممانعت می کند (۳۴ و ۴۱). Chen و همکارانش (۲۰۱۸) گزارش کردند؛ افزایش ظرفیت فتوسنتز در گیاهچه های ذرت بدلیل میزان بالای کلروفیل، مبادلات روزنه ای، غلظت بالای CO_2 درون سلولی و در نهایت محافظت از کلروفیل در برابر استرس اکسیداتیو با اثر مستقیم آنتی اکسیدانی ملاتونین مرتبط می باشد (۱۳). بنابراین کاربرد ملاتونین باعث افزایش رنگیزه های مهم فتوسنتزی، محافظت و کاهش تجزیه کلروفیل، و در نتیجه بهبود فرآیند فتوسنتز در گیاهچه های یونجه تحت تیمار شوری شود. غلظت ۰/۱ میکرومولار ملاتونین بطور معنی داری سبب افزایش میزان کاروتنوئید بعنوان رنگیره و یک آنتی اکسیدان مهم در یونجه گردید. طبق نتایج دیگر محققان، تیمار ملاتونین بر محتوی کاروتنوئید در گیاه cherry rootstock PHL-*C* هیچگونه اثری نداشت (۳۲). با استعمال ملاتونین رشد لوبیا رقم صدری بهبود یافت. غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافت (۱). نتایج نشان داد که ملاتونین در افزایش مقاومت گیاه لوبیا به شوری اثر معناداری داشته است و غلظت‌های پایین‌تر ملاتونین، مؤثرتر عمل کرده‌اند.بنابراین استفاده از غلظت بهینه ملاتونین در تنش شوری، سبب بهبود عملکرد روزنه ها همراه با بازگشایی مجدد آنها، می تواند مفید واقع گردد.

متابولیت های ثانویه نقش مهمی را بعنوان آنتی اکسیدان و آنتی رادیکال در گیاهان در برابر آسیب های ناشی از تنش اکسیداتیو ایفا می کنند. متابولیت های ثانویه مانند فنل ها، فلاونوئید و آنتوسیانین در پاسخ به تنش های محیطی از جمله تنش شوری در گیاهان سنتز می شوند. افزایش این ترکیبات در پاسخ به گونه های واکنشگر اکسیژن بسیار مهم است. قابلیت پاکسازی ROS ترکیبات فنولی در حالت مشابه حدود چهار برابر بیشتر از ویتامین E و C است. توانایی آن ها ناشی از واکنش پذیری بالا به صورت دهنده الکترون و پروتون، تثبیت و جابجایی الکترون های منفرد و نیز شلات کردن یون های فلزی قابل انتقال است (۲۶). بمنظور بررسی اثر ملاتونین بر آنزیم های آنتی اکسیدان در تنش شوری در مطالعه حاضر، آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز نیز اندازه گیری شد و تیمار ۰/۱ میکرومولار ملاتونین تاثیر قابل توجه و معنی داری در افزایش فعالیت این آنزیم ها در طی تنش شوری داشت (داده ها قابل ارائه نمی باشد). افزایش میزان فنل ها و فلاونوئیدها در گیاهان تحت تنش شوری بسیار گزارش شده است بعنوان مثال در برگ های گیاه *Cakile maritima* (۲۰) و یا گیاه *Artichoke* (۳۱) سنتز این ترکیبات همراه با تیمار شوری افزایش یافت. در گیاهچه های یونجه همراه با افزایش غلظت نمک محتوی فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین کاهش یافت همچنین احتمالا مقدار گونه های واکنشگر اکسیژن افزایش و موجب سرکوب سیستم دفاعی گیاه در برابر تنش های محیطی می شود. گیاهان راهکارهای دفاعی متعددی برای مقابله با این چنین آسیب ها از جمله: آنزیم های آنتی اکسیدان و ترکیبات آنتی اکسیدان غیر آنزیمی همچون فنل ها، آسکوربیک اسید و گلوتاتیون دارند (۱۵). مطالعات اخیر به نقش ملاتونین در

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6

افزایش بیوسنتز متابولیت های ثانویه تحت تنش های محیطی پرداخته است، برای مثال Wei (۲۰۱۹) بیان داشت کاربرد ملاتونین باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئید در سیب، تحت تنش شوری گردید (۴۲) و یا در گیاه *Thymus daenensis L.* اسپری ملاتونین بر روی برگ های آن سبب افزایش ترکیبات فنلی در طی تنش شوری شد (۱۰). شدت یافتن تنش اکسیداتیو سبب کاهش فعالیت آنزیم های مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی از جمله PAL و TAL می گردد و یا با کاهش اسید آمینه فنیل آلانین بعنوان پیش ماده سنتز این ترکیبات موجب کاهش سنتز آنها در گیاهچه یونجه گردد اما تیمار ملاتونین بعنوان یک آنتی اکسیدان موثر و از طرف دیگر با ایجاد یک آبشار آنتی اکسیدان، از متابولیت های حاصل از واکنش های ملاتونین در برابر انواع ROS سبب افزایش میزان هر سه این ترکیبات و فعالیت آنزیم های درگیر در مسیر سنتز آنها گردید. بر طبق نتایج دیگر محققان تیمار ملاتونین سبب افزایش میزان فنل در گیاهان *Vigna radiata* (۳۸) و *Vicia faba* L. (۱۶) شد، همچنین پیش تیمار برگ های کیوی با ملاتونین سبب افزایش میزان فلاونوئید و بویژه هشت ژن مربوط به سنتز آن از جمله PAL و چالکون سنتاز گردید و در واقع ملاتونین با اثر بر میزان فلاونوئید توانست پیری برگ ها را به تاخیر بیاندازد (۲۵) همچنین تیمار ملاتونین سبب افزایش آنزیم *PAL* و نیز میزان تجمع فنل، آنتوسیانین و آسکوربیک اسید بهمراه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در توت فرنگی افزایش یافت (۲). آنزیم های PAL و TAL دو آنزیم اصلی مسیر سنتز فنیل پروپانوئیدها می باشند. در تحقیق حاضر فعالیت این دو آنزیم دفاعی گیاه با افزایش غلظت شوری، انواع رادیکال های آزاد و آسیب های ناشی از تنش اکسیداتیو کاهش یافت، همانگونه که سبب کاهش سنتز فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین گردید. از طرف دیگر، تیمار ملاتونین بهمراه شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم ها شد. Xu (۲۰۱۷) بیان داشت؛ ملاتونین سبب افزایش بیان ژن های مسیر بیوسنتز فنل ها از جمله PAL و Cinnamate (C$_4$H 4-Hydroxylase) در کلم سفید و قرمز گردید. همچنین ملاتونین از طریق اینتراکشن با دیگر هورمون ها از جمله اتیلن و افزایش میزان ACC بر سنتز پلی فنول ها موثر است، چرا که تیمار ACC سبب افزایش بیان ژن PAL و STS (Stilbene Synthase) و در نتیجه افزایش ذخیره ی پلی فنول ها می شود (۴۳). بنابراین ملاتونین بطور غیر مستقیم با تاثیر بر ترکیبات و آنزیم های آنتی اکسیدان سبب پاکسازی گونه های واکنشگر اکسیژن و بهبود رشد و محتوی رنگیزه های فتوسنتزی و نهایتا فتوسنتز در گیاهچه های یونجه تحت تیمار شوری گشت. مکانیسم مقاومت به شوری در گیاهان در شرایط گوناگون، متفاوت می باشد، چرا که فرآیندهای مهم فیزیولوژیکی گیاهی به شوری حساس است. شناسایی مکانیزم های افزایش مقاومت در برابر تنش شوری همانند استفاده از ملاتونین بعنوان یک تنظیم کننده رشد با غلظت معین و مناسب، و نیز کاربرد تکنیک های موثر همچون کشت بافت، با هدف اصلاح و بهبود عملکرد گیاه در اراضی شور، از اهمیت بسزایی برخوردار است.

نتیجه گیری

ملاتونین بعنوان یک ترکیب جدید شناخته شده بعنوان یک تنظیم کننده رشد و آنتی اکسیدان، سبب افزایش مقاومت گیاهچه یونجه در برابر تنش شوری و آسیب های ناشی از آن و در نتیجه افزایش وزن تر و خشک، فاکتورهای رشد و رنگیزه های فتوسنتزی که در نهایت منجر به بهبود رشد و تکامل گیاه گردید. از طرف دیگر با ظرفیت آنتی اکسیدانی خود، سب افزایش ترکیبات فنلی و آنزیم های آنتی اکسیدان PAL و TAL و در نتیجه افزایش قدرت پاکسازی ROS و تنظیم عملکرد گیاه و افزایش مقاومت در برابر آسیب های ایجاد شده تحت تنش شوری گردید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6
مقاله پژوهشی

مسئولین گروه علوم گیاهی دانشگاه اصفهان و همچنین قطب آنتی اکسیدان های گیاهی به جهت فراهم نمودن شرایط و حمایت های مالی به جهت انجام این پژوهش ابراز می نمایند.

منابع

۱- *عزیزی ف.*، امیری ح. و اسماعیلی ا.، ۱۳۹۸، اثر ملاتونین بر برخی ویژگی‌های مورفولوفیزیولوژیکی گیاه لوبیا رقم صدری *(Phaseolus vulgaris cv. Sadri)*تحت تنش شوری. مجله پژوهش های گیاهی، جلد ۳۲، شماره ۳. ۶۹۸-۷۱۱.

۲- منصوری س.، ساری خانی ح.، سیاری م. و سلیمانی اقدم م.، ۱۴۰۰، اثر محلول‌پاشی قبل از برداشت ملاتونین بر رسیدن و ویژگی‌های کیفی پس از برداشت میوه توت‌فرنگی *(Fragaria × anannasa cv. Queen Elisa)*. مجله پژوهش های گیاهی، جلد ۳۴، شماره ۳. ۶۴۳-۶۵۷.

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

4- Anower, M.R., Mott, I.W., Peel, M.D., Wu, Y., 2013. Characterization of physiological responses of two alfalfa half-sib families with improved salt tolerance. Plant Physiol Biochem, 71: 103-111.

5- Arnao, M.B., 2014. Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants. Advances in Botany, doi:10.1155/2014/815769

6- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2018. Melatonin and its relationship to plant hormones. Annals of Botany, 121: 195-207.

7- Arnao, M.B., Hernández- Ruiz, J., 2007. Melatonin promotes adventitious□and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. Journal of pineal research, 42: 147-152.

8- Ashrafi, E., Razmjoo, J., Zahedi, M., Pessarakli, M., 2014. Selecting alfalfa cultivars for salt tolerance based on some physiochemical traits. Agronomy Journal, 106: 1758-1764.

9- Beaudoin-Eagan, L.D., Thorpe, T.A., 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiology, 78: 438-441.

10- Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., Morshedloo, M.R., 2019. Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. Industrial Crops and Products 135: 311-320.

11- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis, 10: 3.

12- Chen, Q., Qi, W.-b., Reiter, R.J., Wei, W., Wang, B.m., 2009. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. Journal of plant physiology, 166: 324-328.

13- Chen, Y.E., Mao, J.J., Sun, L.Q., Huang, B., Ding, C.B., Gu, Y., Liao, J.Q., Hu, C., Zhang, Z.W., Yuan, S., 2018. Exogenous melatonin enhances salt stress tolerance in maize seedlings by improving antioxidant and photosynthetic capacity. Physiologia plantarum, 164: 349-363.

14- Cosme, P., Rodríguez, A.B., Espino, J., Garrido, M., 2020. Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. Antioxidants, 9: 1263.

15- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15: 7313-7352.

16- Dawood, M.G., El-Awadi, M.E., 2015. Alleviation of salinity stress on *Vicia faba* L. plants via seed priming with melatonin. Acta Biológica Colombiana, 20: 223-235.

17- Fang, Z., Bouwkamp, J.C., Solomos, T., 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. Journal of Experimental Botany, 49: 503-510.

18- Hernandez-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M.B., 2004. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. Planta, 220: 140-144.

19- Kim, M., Seo, H., Park, C., Park, W.J., 2016. Examination of the auxin hypothesis of phytomelatonin action in classical auxin assay systems in maize. Journal of plant physiology, 190: 67-71.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6

20- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 244-249.

21- Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., Jia, D., Fu, M., Ma, F., 2012. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity□induced stress in *Malus hupehensis*. Journal of pineal research, 53: 298-306.

22- Liang, D., Shen, Y., Ni, Z., Wang, Q., Lei, Z., Xu, N., Deng, Q., Lin, L., Wang, J., Lv, X., 2018. Exogenous melatonin application delays senescence of kiwifruit leaves by regulating the antioxidant capacity and biosynthesis of flavonoids. Frontiers in plant science, 9: 426.

23- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Portland Press Ltd, 591- 592.

24- Martín, J., Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M., Asuero, A.G., 2017. Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction. Phenolic compounds–Natural sources, importance and applications. InTech, 117-152.

25- Michard, E., Simon, A.A., 2020. Melatonin's antioxidant properties protect plants under salt stress. Plant, Cell and Environment.

26- Minatel, I.O., Borges, C.V., Ferreira, M.I., Gomez, H.A.G., Chen, C.-Y.O., Lima, G.P.P., 2017. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. Phenolic Compd. Biol Act, 8: 1-24.

27- Moradi, F., Ismail, A.M., 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. Annals of botany, 99: 1161-1173.

28- Mukherjee, S., David, A., Yadav, S., Baluška, F., Bhatla, S.C., 2014. Salt stress□induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. Physiologia plantarum, 152: 714-728.

29- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance, Annual reviews Plant Biology, 59: 651-681.

30- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.

31- Rezazadeh, A., Ghasemnezhad, A., Barani, M., Telmadarrehei, T., 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. Res J Med Plant. 6: 245-252.

32- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., Koukourikou-Petridou, M., 2012. Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium*× *Prunus cerasus*). Plant Physiology and Biochemistry, 61: 162-168.

33- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. Molecules, 24: 2452.

34- Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D.-X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z., 2015. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. Journal of experimental botany, 66: 681-694.

35- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology, 299: 152-178.

36- Szafrańska, K., Glińska, S., Janas, K., 2013. Ameliorative effect of melatonin on meristematic cells of chilled and re-warmed *Vigna radiata* roots. Biologia plantarum, 57: 91-96.

37- Szafrańska, K., Glińska, S., Janas, K.M., 2012. Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of *Vigna radiata* seeds. Journal of plant physiology, 169: 34-40.

38- Szafrańska, K., Szewczyk, R., Janas, K., 2014. Involvement of melatonin applied to *Vigna radiata* L. seeds in plant response to chilling stress. Open Life Sciences, 9: 1117-1126.

39- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular plant, 3: 2-20.

40- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant physiology, 64: 88-93.

41- Wei, W., Li, Q.T., Chu, Y.N., Reiter, R.J., Yu, X.M., Zhu, D.H., Zhang, W.K., Ma, B., Lin, Q., Zhang, J.S., 2015. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.5.6

plants. Journal Experimental Botany, 66: 695-707.

42- Wei, Z., Li, C., Gao, T., Zhang, Z., Liang, B., Lv, Z., Zou, Y., Ma, F., 2019. Melatonin increases the performance of *Malus hupehensis* after UV-B exposure. Plant Physiology and Biochemistry, 139: 630-641.

43- Xu, L., Yue, Q., Bian, F.e., Sun, H., Zhai, H., Yao, Y., 2017. Melatonin enhances phenolics accumulation partially via ethylene signaling and resulted in high antioxidant capacity in grape berries. Frontiers in plant science, 8: 1426.

44- Yildiz, M., Poyraz, İ., Çavdar, A., Özgen, Y., Beyaz, R., 2020. Plant Responses to Salt Stress. Plant Breeding-Current and Future Views.

45- Zhu, J.K., 2007. Plant salt stress. eLS.

46- Zuo, B., Zheng, X., He, P., Wang, L., Lei, Q., Feng, C., Zhou, J., Li, Q., Han, Z., Kong, J., 2014. Overexpression of MzASMT improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. Journal of Pineal Research, 57: 408-417.

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

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

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

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

Abstract

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

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