



Investigating The Antioxidant Role of Melatonin on Alfalfa Roots (*Medicago sativa* L.) Under Salt Stress in Tissue Culture Conditions


Jalili S^a, Ehsanpour AA^{a*}

^aDepartment of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran. **Original Article**

Use your device to scan and read the article online



Citation: Jalili S, Ehsanpour AA. Investigating The Antioxidant Role of Melatonin on Alfalfa Roots (*Medicago sativa* L.) Under Salt Stress in Tissue Culture Conditions. *Journal of Cell and Tissue*. 2023;14(1): 17.

 <https://10.52547/JCT/14.1.17>

KEYWORDS

Melatonin, Salt Stress
Antioxidant, Tissue
culture, *Medicago sativa*

ABSTRACT

Aim: Salinity stress is one of the most important environmental stress in the world and one of the important factors in reducing growth in many plants, especially in arid regions of the world. Salinity stress and increased sodium ion lead to the induction of oxidative stress and consequent cell death. Melatonin is a multiple function molecule spread in different plant and triggers several physiologic responses to different environmental stress. Exogenous application of melatonin to several plants can improve crop growth and development in response to many abiotic and biotic stresses with adjusting the antioxidant system of plants. Current studies reported that, the exogenous melatonin can increase plants' stress resistance by regulating both the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense process. In this study, the effect of melatonin on alfalfa roots under tissue culture condition was investigated. The aim of the present study was to investigate how melatonin regulated the antioxidant system and non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione and ascorbate under salt stress

Materials and methods: In this study, alfalfa seeds (*Medicago sativa*) of the Isfahani variety were used and we studied the effect of melatonin and salinity stress on the alfalfa root. In order to sterilize the seeds, they were placed in a 70% ethanol solution for one minute and then in a 20% sodium hypochlorite solution for 20 minutes. After disinfecting the seeds, seeds were placed in each culture dish containing MS (Murashige and Skoog) culture medium. After germination, alfalfa seeds were transferred to MS culture medium containing concentrations of 0, 0.1, 10, and 15 micromolar melatonin and concentrations of 0, 150 and 200 mM salt. After 10 days of growth, total antioxidant capacity, the activity level of catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, and glutathione reductase, ascorbate and glutathione levels in alfalfa roots were measured.

* Corresponding author. Tel. Fax:

E-mail address: aliakbarehsanpour2@gmail.com

DOI: <https://10.52547/JCT/14.1.17>

Received 19 Nov. 2022; Received in revised form: 15 Jan. 2023; Accepted: 29 Jan. 2023

2022 Published by Arak University Press. All rights reserved.

Original Article

© Author



Results: Also, in the salinity stress, melatonin treatment significantly increased the total antioxidant power, while no significant difference was observed between different concentrations of melatonin, 0.1 μ M melatonin 82 درصد and 62 درصد raised antioxidant activity under 150 and 200 mM NaCl, so melatonin can reduce the levels of reactive oxygen species by scavenging of them through antioxidant enzyme or non- antioxidant system. Based on the results Melatonin treatment caused a significant increase in antioxidant power, the activity of CAT, APX, POD, SOD, GR enzymes, and antioxidant compounds in the glutathione-ascorbate cycle including DHA, ASC/DHA, GSH, and GSH/GSSG. along with increasing salinity concentration. On the other hand, salt stress increased oxidized compounds including DHA and GSSG in alfalfa roots. The data were carried out by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by *Duncan's* multiple range tests.

Conclusion: In addition to its direct role in clearing free radicals, melatonin activates the antioxidant defense system of the root, i.e. both antioxidant enzymes and antioxidant compounds in the ascorbate-glutathione cycle, which increases the resistance to damage oxidative effects caused by salinity stress in alfalfa root. These findings proposed that exogenous melatonin utilization dramatically activated ROS scavenging systems including enzymatic and non-enzymatic antioxidants to keep a relatively low amount of ROS and increased the tolerance of alfalfa root against salinity stress.



بررسی نقش آنتی اکسیدانتهی ملاتونین بر ریشه ی گیاه یونجه (*Medicago sativa*) (L. تحت تنش شوری در شرایط کشت بافت)

شبنم جلیلی^۱، علی اکبر احسانپور^{۲*}

۱- گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: از آن جهت که تنش شوری سبب تجمع گونه های فعال اکسیژن که منجر به تنش اکسیداتیو و مانع رشد و عملکرد گیاه می شود در این مطالعه به بررسی عملکرد ملاتونین به عنوان یک مولکول آنتی اکسیدانت بسیار قوی در پاکسازی انواع گونه های فعال اکسیژن و در نتیجه فعال شدن سیستم دفاعی گیاه در برابر تنش شوری پرداختیم.</p> <p>مواد و روش ها: در این مطالعه پس از جوانه زنی بذرهای یونجه به محیط کشت MS که حاوی غلظت های ۰، ۱/۱۰، ۱۵ و میکرومولار ملاتونین و غلظت های ۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک منتقل شد. پس از ۱۰ روز رشد ظرفیت آنتی اکسیدانتهی کل، میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز، میزان آسکوربات و گلووتاتیون در ریشه یونجه اندازه گیری شد.</p> <p>نتایج: تیمار ملاتونین سبب افزایش معنی دار و چشم گیر در میزان قدرت آنتی اکسیدانتهی کل، میزان فعالیت آنزیم های APX, CAT, SOD, POD, GR و ترکیبات آنتی اکسیدانت در چرخه گلووتاتیون-آسکوربات شامل DHA, ASC/DHA, GSH و همراه با افزایش غلظت شوری شد. از طرف دیگر تنش شوری موجب افزایش ترکیبات اکسید شده شامل DHA و GSSG در ریشه یونجه شد.</p> <p>نتیجه گیری: ملاتونین علاوه بر نقش مستقیم در پاکسازی رادیکال های آزاد موجب فعال سازی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتهی ریشه یعنی آنزیم های آنتی اکسیدانت و نیز ترکیبات آنتی اکسیدانت در چرخه آسکوربات-گلووتاتیون گردید، که این امر سبب افزایش مقاومت در برابر آسیب های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری در ریشه یونجه شد.</p>	<p>ملاتونین، تنش شوری آنتی اکسیدانتهی اکسیدانتهی، کشت بافت، یونجه</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۲۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۹</p>

۱ - مقدمه

تنش شوری پس از خشکی یکی از مهم‌ترین و متداول‌ترین تنش‌های محیطی در جهان و یکی از عوامل مهم کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان می‌باشد. شوری تقریباً بر تمامی مراحل نمو و تکامل گیاهان از جمله جوانه زدن، رشد جوانه، رشد رویشی، گل‌دهی و میوه‌دهی تاثیرگذار می‌باشد. تنش شوری باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) در سلول و سبب آسیب‌های شدید اکسیداتیو می‌شود. تعادل بین تولید همزمان و پاکسازی ROS معمولاً به‌عنوان همئوستازی ردوکس شناخته می‌شود (۱). گیاهان دارای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانتی ویژه‌ای برای مهار ROS هستند که به‌دنبال آن از آسیب به سلول جلوگیری می‌کند. برای جلوگیری از آسیب احتمالی ROS به اجزای سلولی و همچنین برای حفظ رشد، توسعه، متابولیسم و بهره‌وری کلی، تعادل بین تولید و پاک‌سازی ROS در سطح داخل سلولی باید تنظیم شود و یا به‌طور کارآمدی متابولیزه شود. افزایش ROS سبب آسیب به غشای سلول، پروتئین‌ها، DNA و نهایتاً منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲). یون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن متداول‌ترین ROS ها در گیاهان می‌باشند. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو و یکی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مهم در بافت‌های گیاهی می‌باشد که دیسموتاسیون O_2^- و تولید H_2O_2 را سبب می‌شود و همچنین دارای نقشی مهم در تعیین غلظت H_2O_2 و O_2^- می‌باشد. کاتالاز (CAT) یک آنزیم هموپروتئین تترامریک دارای هم می‌باشد که در حذف و پاکسازی سلول از H_2O_2 در پراکسی‌زوم نقش بسزایی دارد. پراکسیدازهای (POD) گیاهی هموپروتئین‌هایی می‌باشند که اکسیداسیون H_2O_2 را با استفاده از طیف وسیعی از پیش ماده‌ها انجام می‌دهند (۳). آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) از آسکوربات به‌عنوان احیا کننده برای پاکسازی H_2O_2 استفاده می‌کند. چرخه آسکوربات-گلوتاتیون یک مکانیسم آنتی‌اکسیدانتی عمده در سیتوزول است که سبب پاک‌سازی H_2O_2 در حضور NAD(P)H می‌شود. در این مسیر چهار آنزیم با یکدیگر همکاری می‌کنند. گلوتاتیون اکسید تشکیل شده در این چرخه توسط گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و NADPH به گلوتاتیون تبدیل می‌شود. گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز دو آنزیم مهم در این چرخه می‌باشند (۴). آسکوربات به‌عنوان یک آنتی اکسیدانت، گیاه را در مقابل صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کند. GSH یا گلوتاتیون احیا شده سبب تنظیم وضعیت ردوکس سلولی شده و همچنین به‌عنوان یک عامل آنتی اکسیدانتی بسیار مهم برای حذف ROSها عمل می‌کند. افزایش میزان نسبت آسکوربات و گلوتاتیون احیا شده به فرم اکسید شده این ترکیبات برای حذف ROS در گیاهان ضروری می‌باشد (۵). ملاتونین یا N-استیل متوکسی تریپتامین، در میان بسیاری از کارکردهایی که ملاتونین در گیاهان انجام می‌دهد، بیشتر به‌عنوان یک مولکول آنتی اکسیدانت و تنظیم کننده رشد مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است. به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در برابر انواع گونه‌های اکسیژن و نیتروژن فعالیت می‌کند. ملاتونین به‌صورت آنزیمی و یا غیر آنزیمی در اثر اینترکشن با ROS می‌تواند متابولیت‌های زیستی دیگری را تولید کند که هر یک از آنها قدرت آنتی اکسیدانتی داشته و به این گونه، آبشاری از ترکیبات آنتی اکسیدانت را در سلول تولید که عملکرد آنتی اکسیدانت ملاتونین را حتی در غلظت‌های کم افزایش می‌دهد. ملاتونین از چند طریق سبب کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود: پاک‌سازی مستقیم رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، محافظت از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو، افزایش کارکرد زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری، کاهش تولید رادیکال‌های آزاد (۶). گیاه یونجه *Medicago sativa* از تیره لگوم‌ها یا Fabaceae بوده. یونجه به‌عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای شناخته شده است و در بین محققان و کشاورزان از اهمیت بالایی برخوردار است و به‌عنوان یک گیاه مدل، دو لپه ای در شرایط کشت بافت مطرح می‌باشد. با توجه به اطلاعات اندک مبنی بر اثر آنتی‌اکسیدانتی ملاتونین بر افزایش مقاومت در برابر تنش شوری و تنش اکسیداتیو ناشی از شوری به‌خصوص در شرایط کنترل شده در کشت بافت تحقیقات بسیار محدود انجام شده است لذا هدف از پژوهش حاضر نیز مطالعه اثر آنتی اکسیدانتی ملاتونین بر سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی در ریشه گیاه یونجه تحت تنش شوری می‌باشد.

۲- مواد و روش ها:

کشت بذر و ریشه: بذر گونه زراعی یونجه (*Medicago sativa*) رقم اصفهانی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. به منظور استریل کردن بذر، ابتدا در اتانل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس در محلول ۲۰ درصد حجمی هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت بعد از آن ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. پس از ضدعفونی کردن بذر، ۱۰ عدد بذر در هر ظرف کشت که حاوی محیط کشت MS (Murashige and Skoog) بود، قرار داده شد (۷) و به اتاق کشت با دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و نور در حدود $50 \mu\text{M} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ نگه‌داری شدند. بذر در اتاق کشت پس از ۴۸ ساعت جوانه زده و سپس به محیط کشت حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین (Solarbio Life Sciences، پکن، چین) و غلظت‌های ۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک منتقل گردید. پس از ۱۰ روز رشد ریشه ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز، میزان متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانت مانند آسکوربات و گلوکاتایون در ریشه یونجه اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد و آنالیز واریانس داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن و معنی‌داری تیمارها در سطح ($p < 0.05$) محاسبه شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در ریشه: قدرت آنتی‌اکسیدانتی ریشه‌ها توسط 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۵ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH افزوده شد. سپس به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. احیای DPPH در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل (SYNERGY /HTX -multi -mode reader) اندازه‌گیری شد (۸). میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی توسط فرمول زیر محاسبه شد:

درصد بازدارندگی = جذب نمونه تیمار - جذب نمونه کنترل / ۱۰۰ * جذب نمونه کنترل

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ریشه

استخراج عصاره آنزیمی: به منظور استخراج عصاره آنزیمی، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت ریشه به همراه یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7.8$ حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، ۴ میلی‌مولار DTT و ۲ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از محلول رو شناور جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) ریشه: فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش Aebi (۹) در یک میلی‌لیتر از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7$ ، ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به دلیل تجزیه H_2O_2 با فاصله زمانی ۱۰ ثانیه با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه شد و بر اساس میزان تجزیه H_2O_2 در هر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.1) ریشه: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم به غلظت ۵۰ میلی‌مولار، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۲ میلی‌مولار، H_2O_2 ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی سنجش شد. کاهش جذب ناشی از اکسیداسیون آسکوربیک اسید در ۲۹۰ نانومتر در بازه‌ی زمانی ۱۲۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. یک واحد از فعالیت آنزیم APX بر اساس سرعت اکسیداسیون آسکوربیک اسید و با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه شد (۱۰).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) ریشه: سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس روش Beauchamp و همکاران (۱۱) با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیموم (NBT) انجام گرفت. ۱/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7/8$ ، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیموم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی در حالی که میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با کنترل سنجدیده می‌شود، در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.7) ریشه: به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، ۱۰ میلی‌مولار گایاکول به‌همراه ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد و افزایش جذب ناشی از تشکیل ماده رنگی تترآگایاکول در اثر فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره آنزیمی در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۱۲۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه شد (۱۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR, EC 1.6.4.2) ریشه: فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در طول موج ۴۱۲ نانومتر بر اساس احیای DTNB (5,5'-d Dithio bis(2- nitrobenzoic acid)) به 5-thio(2-nitrobenzoic acid) TNB در حضور گلوتاتین احیا اندازه‌گیری شد. به این منظور بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/8$ ، گلوتاتیون ۱ میلی‌مولار (GSSG)، NADPH ۰/۱ میلی‌مولار، DTNB ۰/۷۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۵ میلی‌مولار تهیه گردید. میزان فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ($\epsilon = 14.15 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$) محاسبه شد. یک واحد از فعالیت آنزیم GR بر اساس سرعت تشکیل 1 nM min^{-1} ماده TNB در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (۱۳).

اندازه‌گیری متابولیت‌های چرخه آسکوربات- گلوتاتیون ریشه

اندازه‌گیری آسکوربات و دهیدروآسکوربات ریشه: میزان آسکوربات و دهیدروآسکوربات بر اساس روش Law (۱۴) بر اساس احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} در یک محیط اسیدی توسط آسکوربیک اسید انجام می‌گیرد. سپس Fe^{2+} با بی پیریدیل تشکیل یک کمپلکس صورتی رنگ می‌دهد که جذب آن در طول موج ۵۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل SYNERGY (HTX -multi -mode reader) قرائت شد.

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء و گلوتاتیون اکسید در ریشه: به‌منظور اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء (GSH)، گلوتاتیون اکسید (GSSG) از روش Anderson (۱۵) استفاده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل SYNERGY /HTX -multi -mode reader) قرائت شد.

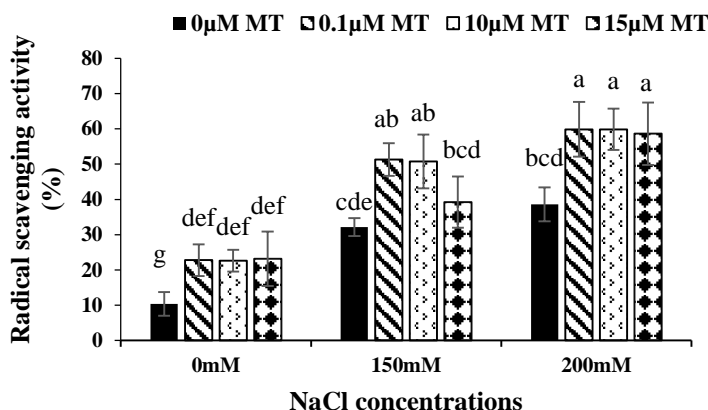
۳- آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد و آنالیز واریانس داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن و معنی‌داری تیمارها در سطح ($p < 0.05$) محاسبه شد.

۴- نتایج

تاثیر تیمار ملاتونین و شوری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانته ریشه

میزان قدرت آنتی اکسیدانته از ۱۰/۳۴ در نمونه شاهد به ۳۲/۱۳ در ریشه‌های رشد یافته در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ۳۸/۶۰ در ریشه‌های رشد یافته در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. طبق نتایج در شکل ۱، در تیمار بدون شوری، ملاتونین سبب افزایش معنی‌دار در ظرفیت آنتی اکسیدانته نسبت به نمونه شاهد گردید. همچنین در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک، تیمار ملاتونین به‌طور معنی‌دار و چشم‌گیری سبب افزایش قدرت آنتی اکسیدانته گردید در حالی که آ مابین غلظت‌های مختلف ملاتونین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۱: اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل توسط DPPH در ریشه یونجه تحت تیمارهای متفاوت ملاتونین در سطوح مختلف شوری. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بر اساس آزمون Duncan است.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار شوری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در ریشه گیاه یونجه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تنش شوری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ریشه یونجه

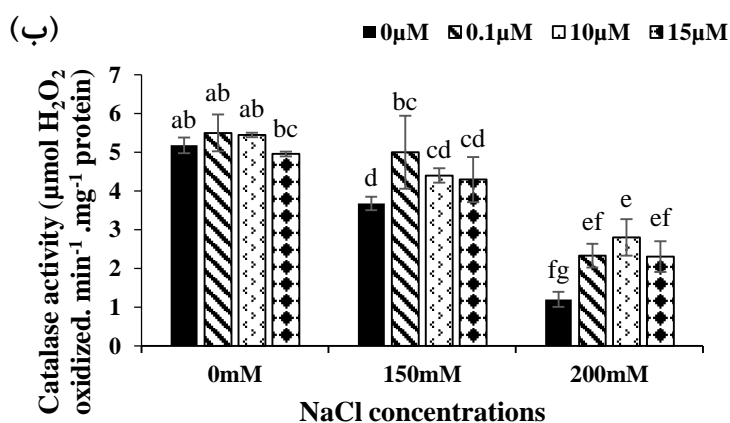
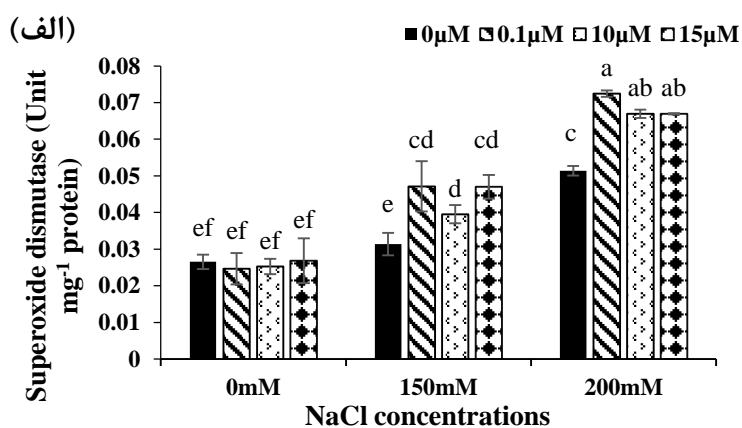
منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	گایاکول پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز
ملاتونین	۳	۴۲۵/۷*	۵۰/۳*	۰/۰۰۲*	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۰۲*
شوری	۲	۸۴۳/۵*	۸/۸*	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۴*	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۰۳*
ملاتونین × شوری	۶	۷۳۰/۸*	۲/۲*	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۵*	۰/۰۰۴*	۰/۰۰۰۴*
خطا	۲۴	۸۰	۰/۱۷۳	۰/۰۰۷	۱/۱	۰/۰۱۱	۰/۰۰۲

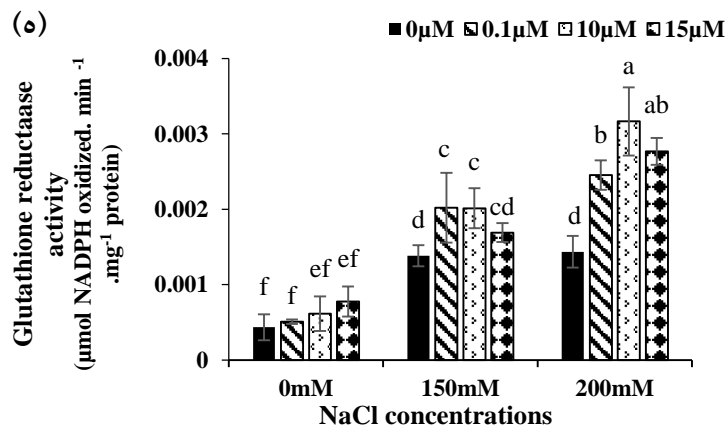
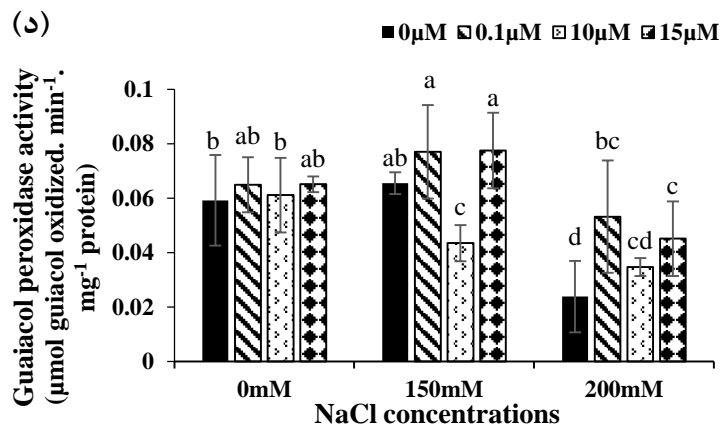
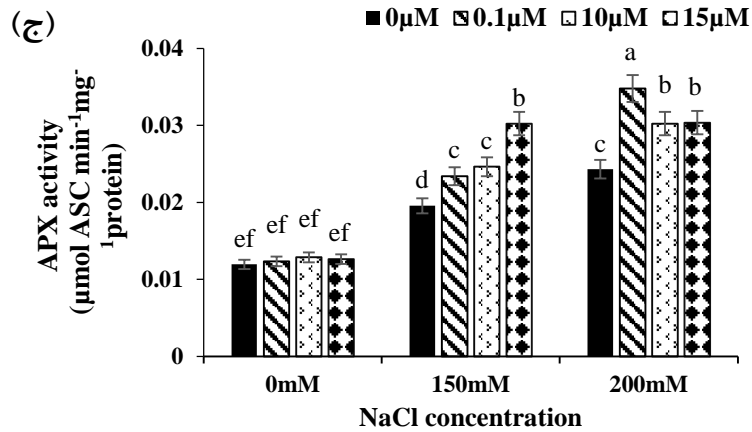
* = معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ریشه

یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های دفاعی ریشه یونجه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز می‌باشد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک ۱۸ درصد و ۹۵ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت و غلظت‌های ۰/۱ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و همچنین غلظت ۰/۱ میکرومولار ملاتونین در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار با افزایش ۳۹ درصد نسبت به نمونه کنترل، بیشترین فعالیت آنزیم SOD را نشان دادند (شکل ۲ الف). نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) نشان داد که تنش شوری در سطح معنی‌داری سبب کاهش فعالیت این آنزیم شد به طوری که ۲۶ درصد و ۷۶ درصد به ترتیب در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک کاهش یافت. در حالی که تیمار ملاتونین در هر سه غلظت و هر دو تیمار شوری سبب افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم گردید (شکل ۲ ب).

بررسی داده‌ها مشخص کرد که تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) شد که تیمار شوری ۲۰۰ میلی‌مولار حدود ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین فعالیت این آنزیم در ریشه‌های تیمار شده با ملاتونین افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل نشان داد. طبق نتایج در شکل ۲ ج تیمار ۱۵ میکرومولار ملاتونین به همراه شوری ۱۵۰ میلی‌مولار ۵۴ درصد و غلظت ۰/۱ میکرومولار ملاتونین بعلاوه شوری ۲۰۰ میلی‌مولار ۴۳ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش داشت آنالیز داده‌ها مشخص کرد که فعالیت آنزیم گاباکول پراکسیداز (POD) (با افزایش شوری، کاهش می‌یابد. فعالیت این آنزیم در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار ۵۹ درصد نسبت به نمونه شاهد (بدون نمک) کاهش یافت و در شرایط بدون شوری تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. تیمار ۰/۱ و ۱۵ میکرومولار ملاتونین در ۱۵۰ میلی‌مولار نمک، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم و همچنین در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار به همراه غلظت ۰/۱ میکرومولار ملاتونین، افزایش ۲/۲ برابری نسبت به نمونه کنترل را در افزایش فعالیت آنزیم POD نشان داد (شکل ۲ د). بررسی فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز (GR) مشخص کرد که فعالیت آنزیم با افزایش غلظت شوری افزایش معنی‌داری را نشان داد اما بین تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. این درحالی است که تیمار ملاتونین در غلظت‌های مختلف نمک سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم GR شد و بیشترین فعالیت در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بعلاوه‌ی غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد (شکل ۲ ه).





شکل ۲: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (الف)، کاتالاز (ب)، آسکوربات پراکسیداز (ج)، گایاکول پراکسیداز (د) و گلوکاتاتیون ردوکتاز (ه) در ریشه یونجه تحت تیمارهای متفاوت ملاتونین در سطوح مختلف شوری. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار $\pm SD$ و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) بر اساس آزمون Duncan است.

میزان آسکوربات (ASC) در ریشه

طبق نتایج به دست آمده در شکل ۳ الف، میزان آسکوربات با افزایش غلظت شوری کاهش می یابد به طوری که از ۱/۰۹ در نمونه شاهد به ۰/۶۶ و ۰/۵۲ به ترتیب در ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک کاهش یافت. در شرایط بدون شوری تیمار ملاتونین سبب افزایش آسکوربات گردید و تفاوت معنی داری را با نمونه شاهد نشان داد. همچنین غلظت های مختلف ملاتونین نیز سبب افزایش میزان آسکوربات در شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک گردید. از طرف دیگر میزان دی هیدروآسکوربات با افزایش شوری افزایش معنی داری داشت، به طوری که ۴۸ درصد و ۶۴ درصد افزایش DHA به ترتیب در شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک مشاهده شد. تیمار ملاتونین بدون شوری سبب کاهش معنی دار DHA شد و ۱۵ میکرومولار آن کمترین میزان DHA را نشان داد (شکل ۳ ب). تحت غلظت های متفاوت شوری، ملاتونین سبب کاهش معنی دار DHA شد. علاوه بر آن با توجه به نتایج به دست آمده از شکل ج، تیمار ملاتونین سبب افزایش قابل توجهی در نسبت ASC/DHA در شرایط بدون نمک و یا در حضور نمک شد و مشابه با آسکوربات همراه با افزایش غلظت نمک، ASC/DHA کاهش یافت (شکل ۳ ج).

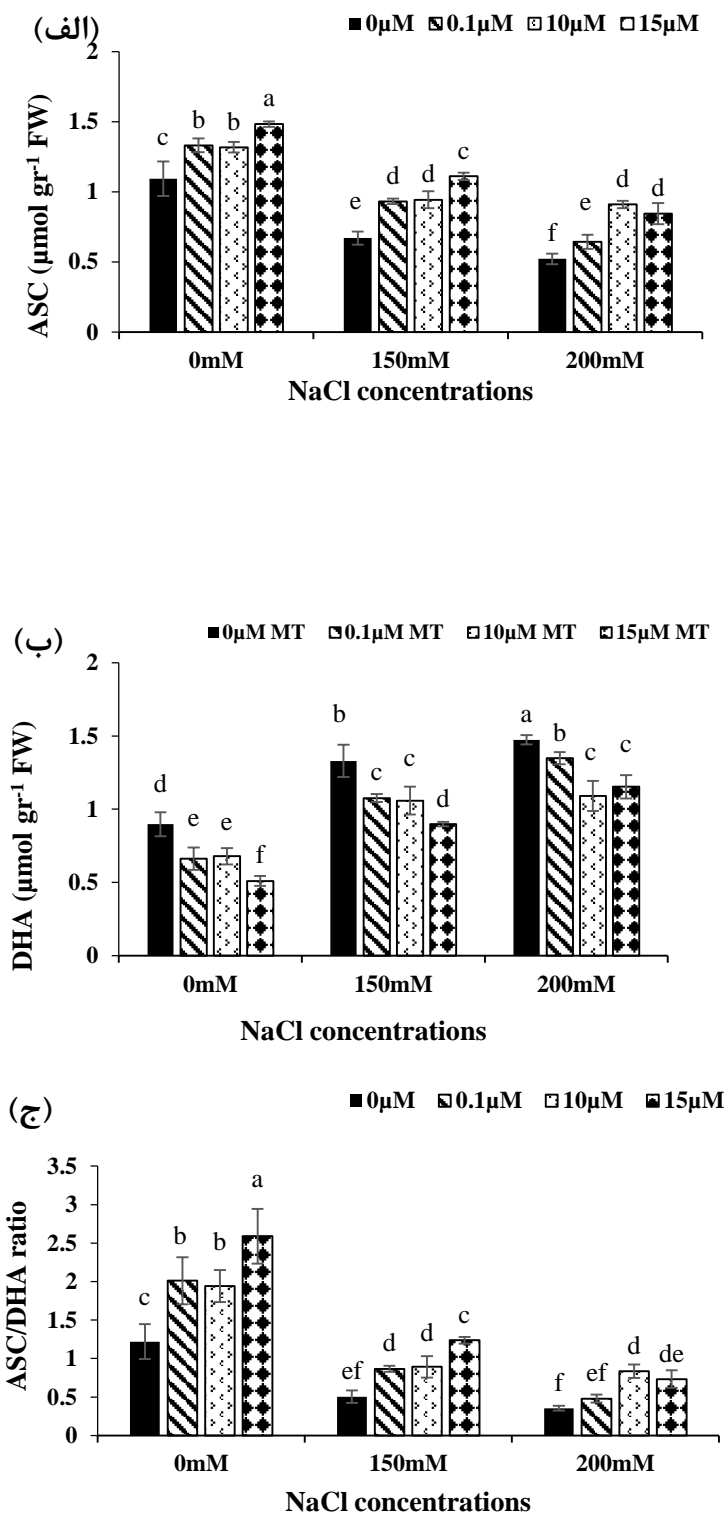
جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تنش شوری بر ترکیبات آسکوربات (ASC)، دی هیدروآسکوربات (DHA)، گلوتاتیون احیا (GSH)، گلوتاتیون اکسید (GSSG) ریشه یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	ASC	DHA	GSH	GSSG
ملاتونین	۳	۲/۰۵*	۲*	۰/۰۳*	۰/۰۰۶*
شوری	۲	۰/۷*	۰/۷۸*	۰/۰۳*	۰/۰۰۲*
ملاتونین × شوری	۶	۰/۰۸*	۰/۰۹*	۰/۰۲*	۰/۰۰۱*
خطا	۲۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵

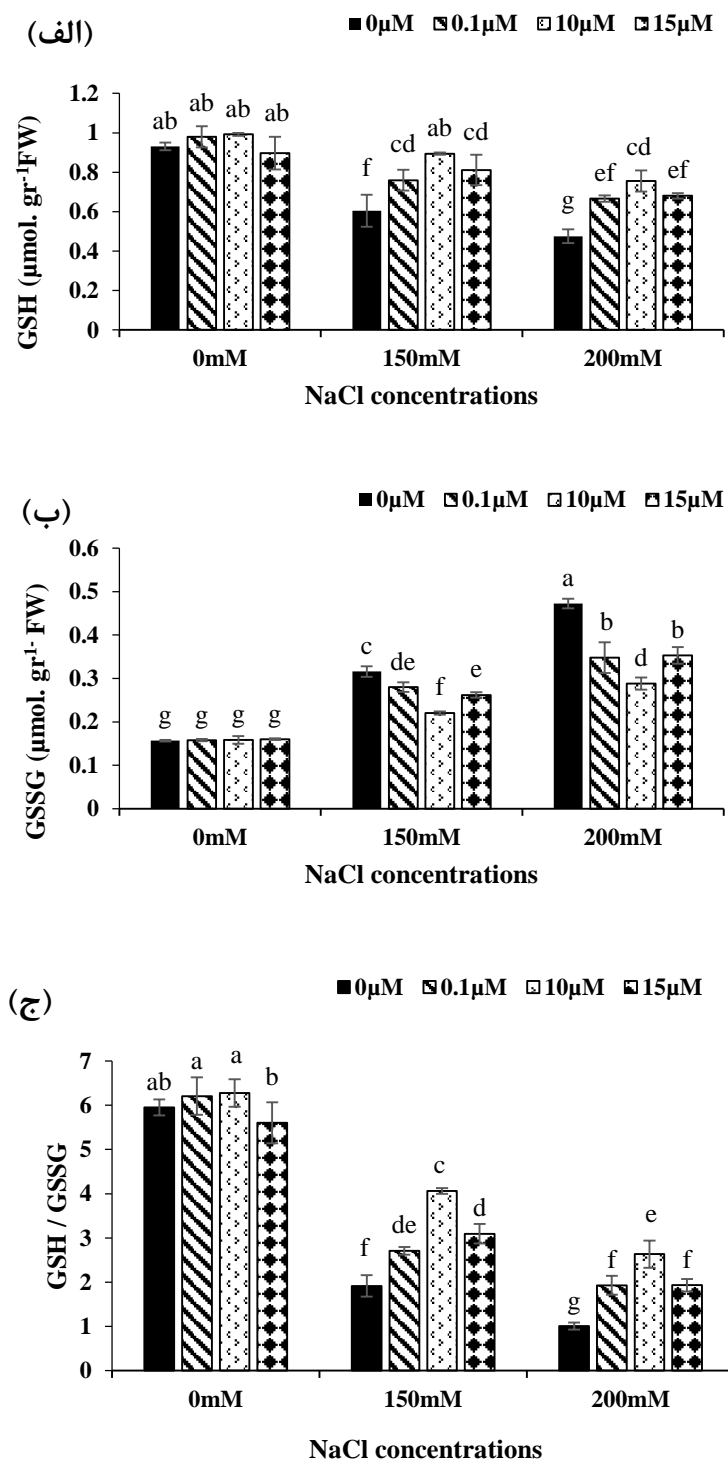
* = معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

میزان گلوتاتیون (GSH) ریشه

محتوی گلوتاتیون در ریشه با افزایش غلظت نمک به صورت معنی داری کاهش یافت و تیمار ۲۰۰ میلی مولار نمک با کاهش ۴۸ درصد نسبت به نمونه شاهد کمترین میزان گلوتاتیون را دارا می باشد. تیمار ملاتونین در عدم حضور نمک، تفاوت معنی داری با نمونه شاهد نداشت در حالی که در شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک تفاوت قابل توجهی را نشان داد و غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین تحت تنش شوری بیشترین میزان گلوتاتیون را نسبت به غلظت های دیگر نشان داد (شکل ۴ الف). طبق نتایج به دست آمده میزان گلوتاتیون اکسید با افزایش شوری افزایش یافت و غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک دارای بالاترین مقدار GSSG می باشد. تیمار غلظت های مختلف ملاتونین تحت تنش شوری سبب کاهش مقادیر GSSG گردید. غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین در شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک به ترتیب ۳۰ درصد و ۳۹ درصد کاهش GSSG را نشان داد (شکل ۴ ب). با توجه به آنالیز داده ها، نسبت GSH/GSSG همانند گلوتاتیون با افزایش غلظت شوری کاهش یافت اما تیمار ملاتونین بخصوص غلظت ۱۰ میکرومولار سبب افزایش چشم گیر این نسبت تحت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار شوری گردید (شکل ۴ ج).



شکل ۳: میزان تغییرات آسکوربات (ASC) (الف)، دی هیدروآسکوربات (DHA) (ب)، و ASC/DHA (ج) در ریشه یونجه تحت تیمارهای متفاوت ملاتونین در سطوح مختلف شوری. داده ها میانگین حداقل ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بر اساس آزمون Duncan است.



شکل ۴: میزان تغییرات GSH (الف)، GSSG (ب)، GSH/GSSG (ج) در ریشه یونجه تحت تیمارهای متفاوت ملاتونین در سطوح مختلف شوری. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بر اساس آزمون Duncan است.

بحث

بر طبق نتایج به دست آمده ریشه‌های گیاه یونجه در معرض تنش شوری نسبت به گیاه شاهد ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل بیشتری از خود نشان دادند و تیمار ملاتونین در بهبود و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانتی ریشه در شرایط تنش و حتی بدون تنش اثر گذار بوده است. در گیاهان ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل توسط طیف وسیعی از مولکول‌ها از جمله پلی فنول‌ها، توکوفرول، آسکوربات و گلوتاتیون مشخص می‌شود و تطبیق الگوی تغییرات این ترکیبات آنتی اکسیدانت با تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل، نقش هر یک از آن‌ها را مشخص می‌نماید. ملاتونین با اندازه کوچکی که دارد به راحتی بین محفظه‌های سلولی حرکت می‌کند و آن‌ها را در برابر ROS اضافی محافظت نماید (۱۶). علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ملاتونین حتی در غلظت‌های پایین در محافظت از ارگانسیم‌ها در برابر استرس اکسیداتیو بسیار موثرتر عمل می‌کند (۱۷). IC50 (مقادیر نمونه مورد نیاز برای حذف ۵۰ درصد رادیکال آزاد) تیمارها نشان داد، که غلظت ۰/۱ و ۱۰ میکرومولار ملاتونین به‌طور قابل توجهی فعالیت مهاری رادیکال‌های آزاد را در ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl افزایش داد و همچنین کاهش ROS، H_2O_2 و O_2^- تایید کننده نتایج به دست آمده و مهار رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد (۱۸ و ۱۹). کاربرد ملاتونین در ریشه یونجه باعث افزایش فعالیت رادیکال‌زدایی می‌شود که احتمالاً از طریق بهبود رشد گیاه، فعال‌سازی تکثیر DNA، تقسیم سلولی و کاهش آسیب‌های غشا و محافظت از ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، DNA، لیپید و نیز از تولید بیش از حد ROS و از اثرات نامطلوب آن توسط تنش شوری جلوگیری می‌کند (۲۰). همچنین ملاتونین در واکنش با رادیکال‌های آزاد طیف وسیعی از ترکیبات آنتی اکسیدانت را تولید می‌کند که توانایی حذف بیشمار رادیکال آزاد را خواهد داشت و سبب افزایش قدرت آنتی اکسیدانتی می‌گردد. به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر عملکرد ملاتونین در فعال شدن سیستم دفاعی ریشه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت SOD، POD، CAT، GR و APX در ریشه‌های یونجه تیمار شده با ملاتونین تحت تنش شوری به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های SOD، APX، GR، CAT و POD در پاسخ به ملاتونین افزایش یافت. تیمار شوری به همراه ملاتونین و یا بدون آن باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، APX و POD شد در حالی‌که تنش شوری بدون ملاتونین باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز با افزایش غلظت شوری کاهش یافت که احتمالاً به دلیل کاهش سنتز آن‌ها یا افزایش هیدرولیز آنزیم‌ها بدلیل اثرات مخرب و اکسیداتیو ناشی از تنش شوری می‌باشد. تاثیر ملاتونین بر فعالیت CAT تحت استرس غیرزیستی نیز مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج نشان می‌دهد که ملاتونین موجب افزایش، کاهش و یا حتی بدون کوچکترین تاثیر بر فعالیت کاتالاز می‌باشد. ملاتونین خارجی فعالیت CAT را در *Zea mays L.* و *Cynodon dactylon L.* تحت تنش شوری افزایش داد (۲۱، ۲۲). Zhang و همکاران (۲۳) گزارش کردند، ۱ میکرومولار ملاتونین، به‌طور قابل توجهی در غلظت‌های بالای شوری بیان ژن CAT را در *Cucumis sativus L.* افزایش داد. نتایج مشابه بدست آمده در این مطالعه نیز در نهال خیار تحت تنش شوری مشاهده شد که فعالیت SOD، CAT، POD و APX در گیاهان پیش تیمار شده با ملاتونین به‌طور قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های شاهد بود. مطالعات متعدد بیان بیش از حد ایزوفرم‌های مختلف SOD را پس از کاربرد ملاتونین نشان داده است. Martinez و همکاران (۲۴) گزارش کردند که ملاتونین خارجی باعث افزایش فعالیت SOD در طول تنش شوری شد. بنابراین در این مطالعه، کاربرد ملاتونین باعث افزایش فعالیت SOD، کاهش محتوای آنیون سوپراکسید و افزایش تحمل گیاه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری در ریشه گیاه یونجه گردید. تفاوت بین فعالیت POD، CAT و APX را می‌توان با میل ترکیبی متفاوت نسب به H_2O_2 به‌عنوان سوبسترای برای اتصال به آنزیم‌های APX، CAT و POD توضیح داد. (۲۵). طبق نتایج حاصل شده، فعالیت APX در ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl افزایش یافت. طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق، فعالیت APX به همراه آنتی اکسیدانت‌هایی که در کارکرد این آنزیم همکاری می‌کنند یعنی آسکوربات و گلوتاتیون افزایش یافت. ملاتونین ممکن است نسبت $NADP^+/NADPH$ ، مقدار $NADP^+$ و مطمئناً نسبت GSH/GSSH را در ریشه یونجه افزایش داده باشد. احتمالاً به دلیل این‌که GR تنها در مقادیر بسار اندک و ناچیز در میتوکندری و سیتوپلاسم ریشه یونجه حضور خواهد داشت، قادر به تولید مقادیر بیشتر GSH در ۲۰۰ میلی‌مولار نمک نبوده

است. علاوه بر این، GSSG به صورت آنزیمی یا با سنتز *de novo* به GSH تبدیل می‌شود و همچنین GR سوبسترای کافی برای افزایش فعالیت خود در غلظت‌های بالای شوری در ریشه یونجه احتمالاً داشته است. مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نیز در گیاه *Malus hupehensis* تحت تنش شوری و همراه با تیمار ۰/۱ میکرومولار ملاتونین فعالیت کلیه‌ی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش چشم‌گیری را نشان داد (۲۶). با توجه به نتایج گزارش شده توسط **Cen و همکاران (۲۷)**، کاربرد ملاتونین در نهال‌های یونجه باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های POD، Cu/Zn-SOD، CAT و همچنین افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر سنتز این آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی تحت تنش شوری شد. طبق تحقیقات اخیر ملاتونین بیش‌ترین تاثیر را بر آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز داشته است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین سبب افزایش هموستازی ردوکس سلولی از طریق تحریک کل سیستم‌های آنتی اکسیدانتی و محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری در ریشه یونجه شد.

GR و APX دو آنزیم کلیدی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون هستند. گلوتاتیون اکسید توسط آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به گلوتاتیون احیا تبدیل می‌شود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تنش شوری سبب کاهش آسکوربات و گلوتاتیون احیا می‌شود که این امر سبب کاهش نسبت GSH/GSSG و ASC/DHA می‌شود. در صورتی که DHA و GSSG روند متضادی را نشان دادند. این مساله می‌تواند نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد به دلیل تنش شوری باشد. همچنین افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تنش شوری به ترکیب آسکوربات به عنوان دهنده الکترون برای تولید DHA نیاز دارد. طبق مکانیسم چرخه آسکوربات-گلوتاتیون می‌توان گفت که احتمالاً علاوه بر فعالیت APX فعالیت GR و DHAR و دیگر موارد این چرخه موثر است. توضیح این مساله که چرا علی‌رغم افزایش فعالیت APX در نتیجه تنش شوری مقدار آسکوربات کاهش یافت و DHA افزایش یافت همچنین باید گفت که آسکوربات به عنوان سوبسترای آنزیم APX توسط آنزیم دهیدروآسکوربات ردوکتاز از DHA تولید می‌شود. بنابراین تغییرات ASC و DHA تحت تنش شوری و تیمار ملاتونین احتمالاً با فعالیت آنزیم DHAR مرتبط باشد اما فعالیت APX بیشتر با تغییرات میزان H_2O_2 مرتبط می‌باشد. کاهش میزان GSH در طی تنش شوری احتمالاً نتیجه احیا DHA توسط آنزیم DHAR تحت تنش اکسیداتیو می‌باشد چرا که این واکنش مربوط به نیروی احیا کنندگی GSH می‌باشد و به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نتوانسته است این کاهش را جبران نماید. تیمار ملاتونین به عنوان یکی از قدرتمندترین و مهم‌ترین ترکیبات آنتی اکسیدانت سبب افزایش میزان آسکوربات و گلوتاتیون احیا در شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک از طرف دیگر همراه با افزایش غلظت شوری، ملاتونین سبب افزایش نسبت GSH/GSSG و ASC/DHA شد. مطابق با نتایج بدست آمده نیز در گیاه سیب، تیمار ملاتونین سبب فعال سازی آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون از جمله APX و ADMHR و همچنین آسکوربات احیا و گلوتاتیون احیا شد (۲۸). **Chen و همکارانش (۲۹)** گزارش کردند که گیاهچه ذرت تحت تنش شوری به همراه تیمار ملاتونین، مقادیر بسیار زیادی از آسکوربات و گلوتاتیون احیا را نشان داد. اگرچه میزان DHA و GSSG به مقدار کمی، کم‌تر از نمونه بدون تیمار بود. کاربرد ملاتونین در پنبه تحت تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی و محتوای مواد احیا کننده مانند ASC و GSH شد (۳۰). به همین ترتیب، لی و همکاران (۲۶)، دریافتند که پیش تیمار ملاتونین منجر به افزایش سطوح GSH و ASC می‌شود اما میزان GSSG و DHA تحت تنش شوری کاهش یافت. نسبت GSH/GSSG و ASC/DHA نیز در گیاهانی که از قبل با ملاتونین تیمار شده بودند در مقایسه با شاهد پس از تنش شوری نیز بیشتر بود (۲۶). علاوه بر این، سطوح بالاتر ASC و GSH نیز در سایر محصولات زراعی همچون گوجه و خیار به دنبال تیمار با ملاتونین تحت تنش شوری توصیف شده است (۳۱، ۳۲). در مطالعه ای دیگر غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، ترکیبات آنتی اکسیدانت غیر آنزیمی شد (۳۳). بنابراین ملاتونین با افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانت سبب پاکسازی رادیکال‌های آزاد و نیز حفظ هموستازی ردوکس تحت تنش شوری شد.

۵- نتیجه گیری

بر طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، ملاتونین به عنوان یک مولکول آنتی اکسیدانت بسیار موثر در پاک سازی رادیکال‌های آزاد به صورت مستقیم و نیز غیر مستقیم از طریق افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل و همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز شد. از طرف دیگر میزان متابولیت‌های آنتی اکسیدانت از جمله آسکوربات و گلوکاتایون احیا با تیمار ملاتونین افزایش یافت. ملاتونین در ریشه یونجه سبب افزایش مقاومت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری از طریق پاکسازی موثر رادیکال‌های آزاد و فعال کردن سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت در غلظت‌های بالای شوری شد.

۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از مسئولین گروه علوم گیاهی دانشگاه اصفهان و همچنین قطب آنتی اکسیدانت‌های گیاهی به جهت فراهم نمودن شرایط و حمایت‌های مالی به جهت انجام این پژوهش ابراز می‌نمایند.

۷- منابع

1. Zhao S, Zhang Q, Liu M, Zhou H, Ma C, Wang P. Regulation of Plant Responses to Salt Stress. *International Journal Molecular Science*. 2021; 22(9):4609.
2. Liang W, Ma X, Wan P, Liu L. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018; 495(1):286-91.
3. Kao CH. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: reactive oxygen species scavenging-systems. *Journal Taiwan Agriculture Research*. 2017;66, 1-8.
4. Hernández JA, Barba-Espín G, Diaz-Vivancos P. Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. In *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Springer, Cham. 2017;309-329.
5. Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017;23, 249-268.
6. Murch, SJ, Lauren AE. "A systematic review of melatonin in plants: an example of evolution of literature. *Frontiers in Plant Science*. 2021; 12:1060.
7. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-97.
8. De Torre MP, Cavero RY, Calvo MI, Vizmanos JL. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants*. 2019;8(5):142.
9. Aebi, H. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*. 1984;121-126.
10. Nakano Y, Asada K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*. 1987;28(1):131-40.
11. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1971;44(1):276-87.
12. Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1991;247(1):57-64.
13. Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*. 1988;175(2):408-13.
14. Law M, Charles SA, Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochemical Journal*. 1983;210(3):899-903.
15. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*. 1985;548-55.
16. Back, K. "Melatonin metabolism, signaling and possible roles in plants." *The Plant Journal*. 2021; 105:376-391.
17. Tiwari RK, et al. Insight into melatonin-mediated response and signaling in the regulation of plant defense under biotic stress. *Plant Molecular Biology*. 2021; 1-15.

18. Jalili S, Ehsanpour AA, Javadirad SM. The role of melatonin on caspase 3-like activity and expression of the genes involved in programmed cell death (PCD) induced by in vitro salt stress in alfalfa (*Medicago sativa L.*) roots. *Botanical Studies*. 2022;63(1), 1-11.
19. Jalili S, Ehsanpour AA, Javadirad SM. "Melatonin improves salt tolerance of in vitro root culture of alfalfa (*Medicago sativa L.*)."*Biologia* (2022): 1-10.
20. Michard E, Simon AA. Melatonin's antioxidant properties protect plants under salt stress. *Plant Cell Environment*. 2020. DOI: 10.1111/pce.13911
21. Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2014;2:53.
22. Xie C, Xiong X, Huang Z, Sun L. et al. Exogenous melatonin improves lead tolerance of bermudagrass through modulation of the antioxidant defense system. *International Journal of Phytoremediation*. 2018;20(14):1408-17.
23. Zhang HJ, Zhang N, Yang RC, Wang L. et al. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA 4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus L.*). *Journal of Pineal Research*. 2014;57(3):269-79.
24. Marta B, Szafrńska K, Posmyk MM. Exogenous melatonin improves antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus L.*) germinated under chilling stress. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:575.
25. Martinez V, Nieves-Cordones M, Lopez-Delacalle M, Rodenas R. et al. Tolerance to stress combination in tomato plants: new insights in the protective role of melatonin. *Molecules*. 2018;23(3):535.
26. Hasanuzzaman M, Raihan MRH, Masud AAC, Rahman K, Nowroz F, Rahman M, Nahar K, Fujita M.. Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(17): 9326.
27. Li C, Wang P, Wei Z, Liang D. et al. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*. 2012;53(3):298-306.
28. Cen H, Wang T, Liu H, Tian D. et al. Melatonin application improves salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa L.*) by enhancing antioxidant capacity. *Plants*. 2020;9:220.
29. Duan M, Feng H-L, Wang L-Y, Li D. et al. Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato. *Journal of Plant Physiology*. 2012;169(9):867-77.
30. Jiang D, Lu B, Liu L, Duan W, Chen L, Li J, Zhang K, Sun H, Zhang Y, Dong H, Li C, Bai Z. Exogenous melatonin improves salt stress adaptation of cotton seedlings by regulating active oxygen metabolism. *PeerJ*. 2020; 8:e10486.
31. Chen YE, Mao JJ, Sun LQ, Huang B. et al. Exogenous melatonin enhances salt stress tolerance in maize seedlings by improving antioxidant and photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*. 2018;164(3):349-63.
32. Zhang T, et al. Alleviating effects of exogenous melatonin on salt stress in cucumber. *Scientia Horticulturae*. 2020; 109070.
33. ElSayed AI, Boulila M, Rafudeen MS, Mohamed AH, Sengupta S, Rady M, Omar AA. Melatonin regulatory mechanisms and phylogenetic analyses of melatonin biosynthesis related genes extracted from peanut under salinity stress. *Plants*. 2020; 9(7): 854.