Winter (2022) 12(40): 83-99
DOI: 10.30473/cb.2023.67180.1903
Received: 26 October 2022 Accepted: 15 March 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

The effect of melatonin levels on biochemical properties and the expression of genes related to antioxidant enzymes activity in *Triticum aestivum* L. under drought stress conditions

Marouf Khalili[1*], Mohammad Hasso Mohammad[2], Hamze Hamze[3]

[1]Associate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, P.O. Box 19395-3697 Tehran, Iran.
[2]M.Sc. Student, Department of Crop Science and Biotechnology, Payame Noor, Tehran, Iran.
[3]Agricultural and Natural Resources Research Center of Hamedan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

Correspondence
Marouf Khalili
Email: makhalily@pnu.ac.ir

How to cite
Khalili M., Hasoo Mohammad, M., Hamze, H. (2023). The effect of melatonin levels on biochemical properties and the expression of genes related to antioxidant enzymes activity in *Triticum aestivum* L. under drought stress conditions. *Crop Biotechnology, 12*(40), 83-99.

ABSTRACT
To study the effect of different levels of melatonin on the biochemical properties and the amount of expression of genes related to the activity of antioxidant enzymes in bread wheat, a split plot experiment was conducted based on a randomized complete *Triticum aestivum* block design. Irrigation levels (normal (FC = 80%)), mild stress (FC = 60%), and severe stress (FC = 40%)) were allocated to the main plots and melatonin foliar spray (zero, 50, 100, 150, and 200 µM) were assigned to subplots. The results showed that the flavonoid content and ascorbate peroxidase enzyme activity increased with the intensification of dehydration stress. The level of 100 µM melatonin had the highest flavonoid content, ascorbate peroxidase enzyme activity. The mean comparison interaction treatments showed that the highest content of proline, phenol, superoxide dismutase and catalase was assigned to the 100 µM melatonin foliar spray under conditions of extreme stress of dehydration. Also, the lowest amount of malondialdehyde was observed for the 50 µM melatonin foliar treatment under normal irrigation conditions. The highest content of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoid and grain yield were recorded in the treatment of foliar spray of 100 µM melatonin and normal irrigation conditions. In this investigation, the maximum expression of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase and catalase genes were determined in the foliar spray of 100 and 150 µM melatonin levels under conditions of extreme stress. . The foliar spray of melatonin, especially at the level of 100 µM, could moderate the effect dehydration stress on grain yield by improving biochemical and antioxidant properties.

KEYWORDS
antioxidant, gene expression, melatonin, dehydration stress , wheat

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال دوازدهم، شماره دوم، پیاپی چهلم، اسفند ۱۴۰۱ (۹۹-۸۳)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴

DOI: 10.30473/cb.2023.67180.1903

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

اثر ملاتونین بر خصوصیات بیوشیمایی و مقدار بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش کم‌آبی

معروف خلیلی[1*]، محمد حسو محمد[2]، حمزه حمزه[3]

[1]دانشیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران.

[2]دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

[3]استادیار بخش تحقیقات چغندرقند، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی همدان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران.

نویسنده مسئول:
معروف خلیلی
رایانامه: makhalily@yahoo.com

چکیده

با هدف اثر سطوح مختلف ملاتونین بر خصوصیات بیوشیمیایی و مقدار بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گندم نان، آزمایشی به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. سطوح آبیاری نرمال (FC= ۸۰ درصد)، تنش ملایم (FC= ۶۰ درصد) و تنش شدید (FC= ۴۰ درصد) به کرت‌های اصلی و محلول‌پاشی ملاتونین (صفر ، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ µM) به کرت‌های فرعی اختصاص یافتند. نتایج نشان داد با تشدید تنش کم‌آبی بر محتوی فلانوئید و مقدار فعالیت آنزیم آسکروبات پراکسیداز افزوده شد و سطح ۱۰۰µM ملاتونین بالاترین محتوی فلانوئید، مقدار فعالیت آنزیم آسکروبات پراکسیداز را به خود اختصاص داد. مقایسه میانگین تیمارهای برهمکنش نشان داد بالاترین محتوی پرولین، فنل، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز به تیمار محلول‌پاشی µM ۱۰۰ ملاتونین تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی اختصاص یافت. همچنین کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدهید برای تیمار محلول‌پاشی ۵۰µM ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال مشاهده شد. بالاترین محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید و عملکرد دانه در تیمار محلول‌پاشی ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و شرایط آبیاری نرمال ثبت شد. در این بررسی حداکثر بیان ژن‌های سوپر اکسید دیسموتاز، آسکروبات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز در تیمار محلول‌پاشی سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ µM ملاتونین تحت شرایط تنش شدید اختصاص یافت. محلول‌پاشی ملاتونین به خصوص سطح µM ۱۰۰ توانست با بهبود خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی اثر تنش کم‌آبی را بر عملکرد دانه تعدیل نماید.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان، بیان ژن، کم‌آبی، گندم، ملاتونین.

استناد به این مقاله:

خلیلی، معروف، حسو محمد، محمد و حمزه، حمزه (۱۴۰۱). اثر ملاتونین بر خصوصیات بیوشیمیایی و مقدار بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گندم نان (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش کم‌آبی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی, ۱۲(۴۰), ۸۳-۹۹.

مقدمه

اغلب گیاهان در معرض تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند و کمبود آب یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده در محدود ساختن و تولید محصول در سرتاسر جهان به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (فائو، ۲۰۲۲). ملاتونین از موادی است که کاربرد خارجی آن برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی و افزایش کمیت و کیفیت عملکرد محصول مورد توجه قرار گرفته است، اثرات سودمند این ماده بر سلامتی انسان به اثبات رسیده است. این ماده به‌صورت غیرمستقیم در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی در داخل گیاهان به‌صورت مستقیم نقش دارد (لیو، وانگ و سان، ۲۰۱۵). ملاتونین به‌عنوان یک ترکیب طبیعی ایندول آمین از تریپتوفان (اناستیل ۵ متوکسی تریپتامین) مشتق شده است، که قبلاً تصور بر این بود که این ماده تنها مختص جانوران است (ماریا و پوسمیک، ۲۰۱۳). اعمال فیزیولوژیکی مختلفی را به ملاتونین نسبت داده‌اند، به غیر از نقش پیام‌رسانی تاریکی و تحریک و سنتز تنظیم‌کننده‌های رشد، این ماده می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانتی مؤثری در ارتباط با فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه و محافظت گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو داخلی و محیطی داشته باشد (ریتر و همکاران، ۲۰۱۵؛ ژانگ و همکاران ۲۰۱۵ و تان و همکاران، ۲۰۱۵). گزارش شده است ملاتونین خط مقدم دفاع و حسگر داخلی در برابر تنش اکسیداتیو در گیاهان است (تان و همکاران، ۲۰۱۱).

پیشینهٔ پژوهش

با پیشرفت تکنولوژی در ابزارهای مولکولی و ژنتیکی تغییر گسترده‌ای در استفاده از روش‌های مولکولی و بهره‌مندی از روش‌های نوین ایجاد شده است. در این زمینه، یکی از مهم‌ترین ابزارهای مولکولی مورد استفاده در غربالگری منابع ژرم‌پلاسمی و شناسایی بهترین افراد جهت به‌کارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، مانند انتخاب بهترین فرد به‌منظور استفاده در برنامه‌های تلاقی، استفاده از الگوی بیان ژن است. به‌عنوان نمونه در گذشته شناسایی افراد تنها با استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان‌پذیر بود ولی با استفاده از تکنیک بیان ژن نه‌تنها این شناسایی صورت می‌گیرد بلکه میزان بیان ژن(های) دخیل در تحمل و مقاومت به تنش‌ها نیز سنجیده می‌شود و اطلاعات مفید دیگری در رابطه با سازوکارهای ژن‌های مورد هدف برای پژوهشگران فراهم می‌شود. تغییرات اقلیمی به‌واسطه بروز تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، گرما و شوری بر تولید محصولات کشاورزی تأثیر چشمگیری دارند. بنابراین تمرکز بر به‌کارگیری راهبردهای جدید برای مواجهه با شرایط نامطلوب ایجادشده به‌واسطه تغییرات اقلیمی و ایجاد واریته‌های مقاوم جهت کشت در چنین شرایطی یکی از ملزومات اساسی در برنامه‌های اصلاحی آینده به‌شمار می‌آید (فلیتا-سوریانو و همکاران، ۲۰۱۷). بیشتر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه شناسایی و تعیین توالی شده‌اند (پورابوقداره و همکاران، ۲۰۲۲). ملاتونین یک ترکیب ایندولی است که به‌صورت طبیعی در گیاهان سنتز می‌شود و در تنظیم رشد ریشه، شاخه، جوانه‌زنی بذر و تأخیر در پیری برگ نقش دارد (آرناو و هرناندز- روز، ۲۰۱۴). تنش خشکی مشابه سایر تنش‌ها منجر به القای تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند رادیکال‌های سوپراکسید (O_{-2}) هیدروکسیل (OH) پرهیدروکسی (H_2O_2)، الکوزی (RO) و دیگر عوامل غیررادیکالی مانند پراکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی می‌شوند (سینگ-جیل و توتیجا، ۲۰۱۰). تولید ROS رابطه خطی با شدت تنش آبی دارد که باعث پراکسیداسیون غشاها، اندامک‌ها و فعال‌شدن آنزیم یا غیرفعال شدن و تجزیه اسیدهای نوکلئیک می‌شود (اوتوکارت و همکاران، ۲۰۱۹). افزایش محتوای مالون دی آلدئید (MDA) به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای تخریب غشا درنظر گرفته شده است. در پژوهشی گزارش نمودند که کاهش پایداری غشاء نشان‌دهندهٔ میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ROS است (شارما، سارین و ساینی، ۲۰۱۷). سطوح پایین MDA با تحمل به تنش خشکی در گندم مرتبط بود (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۱). زمانی که گیاهان در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند، ازنظر فیزیولوژیکی تغییر می‌کنند تا این تنش را تحمل نماید (سلام و همکاران، ۲۰۱۹).

در سال‌های اخیر استفاده از ملاتونین (N-acetyl-5-methoxytrypatamine) در جهت بهبود مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی مورد توجه قرار گرفته شده است. باجوا و همکاران (2014) در مطالعه اثر ملاتونین بر روی گیاه آرابید و پس بیان نمودند که ملاتونین باعث تنظیم و بیان ژن‌های مقاومت به سرما می‌شود. گزارش شده است که کاربرد ملاتونین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در خربزه شده

است. یانگ و همکاران (یانگ و همکاران، ۲۰۱۸) گزارش کردند که کاربرد ملاتونین به‌صورت اسپری و یا همراه با آب آبیاری باعث کاهش خسارت به سیستم فتوسنتزی گوجه‌فرنگی می‌شود. در گیاه فلفل، میزان ملاتونین میوه‌های سایه‌دار کمتر از میوه‌های بدون سایه است که نشان می‌دهد تابش خورشیدی باعث افزایش سطح ملاتونین می‌شود (ریگا و همکاران، ۲۰۱۴). در تجزیه و تحلیل بیان ژن تعدیل‌شده توسط ملاتونین، مشخص شد که سطوح پایین و بالای ملاتونین اثر متفاوتی دارند. همه ژن‌های تنظیم‌شده توسط ملاتونین پایین توسط ملاتونین بالا تنظیم نمی‌شوند (ویدا و همکاران، ۲۰۱۴). گونه‌های گیاهی ازنظر حساسیت به ملاتونین متفاوت هستند. ملاتونین بر فیزیولوژی ریشه لوپین و جو تأثیر دارد. با این‌حال، ریشه‌های لوپین در مقایسه با جو نسبت به ملاتونین حساس‌تر هستند، ملاتونین بر بازسازی ریشه‌های جانبی و فرعی در هیپولپه‌های اتیول‌دار لوپین آلبوس و *B. juncea* اثر دارد (سین و همکاران، ۲۰۲۰). آن‌ها تأیید کردند که ملاتونین عملکرد اصلی خود را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان انجام می‌دهد و به‌طور مثبت تحمل به شوری در یونجه را از طریق مهار ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بهبود می‌بخشد. در گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) کاربرد برون‌زای ملاتونین نیز به‌طور قابل‌توجهی در کاهش تنش غرقابی نقش داشت (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین محققان مشاهده کردند ملاتونین تولید اتیلن را از طریق کاهش ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اتیلن و کاهش نقصان رشد ناشی از تنش، کلروز و پیری زودرس در گیاهان سرکوب می‌کند، متعاقباً، ملاتونین محتوای پلی‌آمین را با افزایش فعالیت و بیان ژن آنزیم پلی‌آمین افزایش می‌دهد، بنابراین، ملاتونین تنش غرقابی را از طریق تنظیم متقابل یا با تعدیل مستقیم مسیرهای متابولیک پلی‌آمین و اتیلن در یونجه کاهش می‌دهد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۹). احقیل و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی اثر محلول‌پاشی ملاتونین بر خصوصیات رویشی گندم تحت شرایط تنش روی نشان دادند. افزایش سطح بور (B) منجر به ایجاد آسیب اکسیداتیو از طریق افزایش محتوی مالون دی‌آلدهید، آنیون سوپراکسید و H_2O_2 و افزایش فعالیت گلیکولات اکسیداز (آنزیم تولیدکننده (H2O2) شد. با این‌حال، محلول‌پاشی ملاتونین به‌طور قابل‌توجهی غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی را با افزایش δ-ALA[1]، δ-ALAD[2] و کاهش تجزیه کلروفیل و کاهش فعالیت کلروفیلاز[3] بهبود بخشید و منجر به افزایش ویژگی‌های رشد گیاه در شرایط سمیت بور و غیرسمی شد. در تحقیقی بر روی گندم مشخص شد محلول‌پاشی ملاتونین در بهبود فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش شوری در ژنوتیپ‌های گندم مؤثر بود به‌طوری‌که استفاده از ملاتونین ۵۰۰ میکرومولار موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده و خسارات ناشی از تنش شوری بر خصوصیات رشدی گندم را بهبود بخشید (زفر و همکاران، ۲۰۱۹).

پژوهش فوق با هدف مطالعه اثر تنش کم‌آبی، محلول‌پاشی ملاتونین و اثرات متقابل بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدان و خصوصیات زراعی، آنزیمی و مورفولوژیک در گندم نان بهاره اجرا گردید.

روش‌شناسی پژوهش

این پژوهش در مزرعه و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام‌نور مهاباد به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۴۰۰ انجام شد. سه رژیم آبیاری نرمال (FC= ۸۰ درصد)، تنش ملایم (FC= ۶۰ درصد) و تنش شدید (FC= ۴۰ درصد) و محلول‌پاشی ملاتونین در پنج سطح صفر ، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ μM اجرایی گردید. رقم مورد استفاده رقم پیشتاز بود. برای تعیین سطوح مختلف آبیاری، از روابط ارائه‌شده توسط بهرا و پاندا (۲۰۰۹) استفاده شد. مقدار آب خاک با استفاده از دستگاه انعکاس‌سنجی زمانی (TDR در عمق گفته‌شده تعیین و از منحنی‌های کالیبراسیون رطوبتی خاک برای تعیین رابطه بین مقدار عددی ارائه‌شده توسط دستگاه و مقدار حجمی رطوبت خاک استفاده شد. محلول‌پاشی ملاتونین نیز با سطوح مورد نظر در دومرحله ۵۰ درصد پنجه‌دهی و ۵۰ درصد گلدهی با استفاده از سم‌پاش دستی در زمان غروب آفتاب انجام شد.

نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز قبل از ظهور سنبله و از برگ پرچم تهیه شدند. تهیه عصاره آنزیمی براساس روش مک‌آدم و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. برای تهیه عصاره آنزیمی ابتدا محلول‌های ۰/۸ مولارکلرید پتاسیم (KCl) و بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH =۷) به‌طور جداگانه تهیه شد، به‌منظور حفظ

[1]. δ-aminolevulinic acid
[2]. δ-aminolevulinic acid dehydratase
[3]. Chlorophyllase

فعالیت آنزیم، کلیه مراحل استخراج آنزیم در ظرف یخ انجام شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسید از به روش رایموند و همکاران (۱۹۹۳) صورت گرفت. در لحظه خواندن جذب آنزیم، به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه و تغییرات جذب پلی‌فنل‌اکسیداز در فاصله زمانی ۴ دقیقه در طول موج۴۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Phamacia Biotech Novaspec II. UK) ثبت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD براساس روش گیانوپولیتیس و همکاران (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Phamacia Biotech Novaspec II. UK) قرائت گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به روش چانس و مهلی (۱۹۹۵) انجام شد. برای تعیین غلظت پرولین، روش بیتس (۱۹۷۳) به‌کار رفت. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Phamacia Biotech Novaspec II. UK) با طول موج ۵۲۰ نانومتر مقدار پرولین قرائت شد. جهت تعیین محتوای فنل کل و فلانوئید هم از روش پورمراد و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. سنجش محتوای فنل کل به روش ویلیوگلو و همکاران (۱۹۹۸) انجام گرفت.

سنجش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی ۰/۲۵ گرم برگ تازه و کاملا توسعه‌یافته را در مرحله گل‌دهی کامل برداشت و در هاون چینی خرد کرده و با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر، در محیط خنک و کم‌نور، ساییده تا به‌صورت توده یکنواختی درآید. غلظت کلروفیل a،b ، کل و کاروتنوئید با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (Lichtenthaler & Buschmann, 2001).

1. $\text{Cholorophyll a } (mg/ml) = 12.25(A663.2) - 2.79(A646.8)$

2. $\text{Cholorophyll b } (mg/ml) = 21.50(A646.2) - 5.10(A663.2)$

3. $\text{Carotenoid}(\mu g/ml) = (1000(A470) - 1.8(Chla) - 85.02(Chlb))/198$

برای اندازه‌گیری عملکرد دانه در مرحله برداشت نهایی و حذف نیم‌متر از ابتدا و انتهای هر کرت به‌صورت دستی برداشت، توزین و به‌صورت کیلوگرم در هکتار ثبت شد.

بعد از اعمال تیمارهای تنش کم‌آبی و بعد از محلول‌پاشی ملاتونین نمونه‌برداری از بافت برگ انجام و نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۸۲- درجه سلسیوس تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند، به‌منظور اطمینان از کمیت و کیفیت RNA و تعیین غلظت آن از دستگاه نانودرآپ (Thermo Scientific,2000c) استفاده گردید. برای بررسی کیفیت RNA کل استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای حذف آلودگی‌های احتمالی DNA ژنومی از RNAهای استخراج شده، تمامی RNAها با استفاده از کیت DNase1 شرکت Ferments براساس دستوالعمل شرکت سازنده تیمار گردیدند. واکنش سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت Hyper Script شرکت GeneAll مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. برای انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز در زمان واقعی، از کیت RealQ Plus 2X Master Mix Green (5000850-1250) استفاده شد، در ابتدا به‌منظور تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-Time PCR، چندین ضریب رقت درنظر گرفته شد و پس از تعیین بهترین غلظت آغازگر و cDNA، واکنش زنجیرهای پلیمراز در زمان واقعی با استفاده از دستگاه Bio-RAD Real-time PCR (MiniOpticon) انجام گرفت. پس از انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز، برای هر جفت آغازگر میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی با استفاده از روابط $2^{-\Delta\Delta CT}$ (پفافل ۲۰۰۱ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار سس[1] انجام گرفت. میانگین‌های به‌دست‌آمده با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار و در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر مقایسه آماری شدند. درنهایت نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل[2] ترسیم شدند.

1. SAS.9.4
2. Excel

جدول ۱. نام و توالی پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده برای تکثیر ژن در این تحقیق

ژن	پرایمر	توالی (5' - 3')	رفرنس توالی
TaSOD	Sod-F	5´-AAGCACCACGCCACCTAC-3´	TAU72212
	Sod-R	5´-TGGGCTTGAGGTTCTTCC-3´	
TaAPX	Apx-F	5´- CTGACAGCGTTCAAGGTAT -3´	AJ006358
	Apx-R	5´- GTTGGACGGATGGTACTGA -3´	
TaCAT	Cat-F	5´- GTTGGACGGATGGTACTGA -3´	X94352
	Cat-R	5´- AAGACGGTGCCTTTGGGT -3´	
TAPPO	PPO-F	5´-CGATCTACGCCAACAGGTCGTC-3´	AY515506
	PPO-R	5´-CACTGGAGTCAAGGTCGGTCAGCA-3´	

یافته‌های پژوهش

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر سطوح آبیاری و ملاتونین بر کلیه صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود، همچنین اختلاف بین تیمارهای اثر متقابل آبیاری با ملاتونین از لحاظ کلروفیل a، کارتنوئید، پرولین، فنل کل، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، مالون دی‌آلدهید و عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد و از لحاظ کلروفیل b در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

کلروفیل a

مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری با ملاتونین نشان داد کاربرد ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال با متوسط ۱۳/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بالاترین محتوی کلروفیل برگ پرچم را به خود اختصاص داد، بین تیمار مذکور و تیمارهای کاربرد ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین از لحاظ صفت مذکور اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.کمترین محتوی کلروفیل برگ در بین تیمارهای مورد بررسی به تیمار تنش شدید آبیاری همراه با سطح شاهد و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین به‌ترتیب با متوسط ۵/۲۵ و ۵/۵۰ میلی گرم بر گرم وزن تر اختصاص یافت (شکل ۱). کلروفیل یک رنگدانه فتوسنتزی است که نور را جذب می‌کند و برای فتوسنتز گیاهان لازم است. یکی از متداول‌ترین معیارهای مورد استفاده برای ارزیابی شدت تنش خشکی میزان کلروفیل است (کاو و همکاران، ۲۰۲۱). در مطالعهٔ احمد و همکاران (۲۰۱۹) تنش خشکی باعث کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و کاهش معنی‌دار سرعت فتوسنتزی و هدایت روزنه‌ای در ذرت شد اما محلول‌پاشی ۱۰۰ میکرومولار بر محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط مختلف آبیاری افزود.

کلروفیل b

نتایج مقایسات میانگین نشان داد محلول‌پاشی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار تحت شرایط آبیاری نرمال به‌ترتیب با متوسط ۳/۰۶، ۳/۳۱ و ۳/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بالاترین محتوی کلروفیل b را به خود اختصاص داد. اختلاف بین تیمار مذکور و تیمار محلول‌پاشی ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در این بررسی کمترین محتوی کلروفیل به‌ترتیب با متوسط ۱/۳۷ و ۱/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به سطح آبیاری تنش شدید همراه با تیمار شاهد و محلول‌پاشی ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختصاص یافت. نتایج مقایسات میانگین همچنین نشان داد تحت شرایط تنش ملایم آبیاری محلول‌پاشی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرو مولار ملاتونین محلول‌پاشی ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین توانست به‌صورت معنی‌داری بر محتوی کلروفیل b بیافزاید (شکل ۲). فاتحی و محمدی (۲۰۱۹) نشان دادند تنش خشکی منجر به کاهش کلروفیل a، کلروفیل b، کل و عملکرد در ارقام متحمل و حساس گندم شد که کاهش در رقم متحمل نیک‌نژاد کمتر بود. محمدی و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند محلول‌پاشی ملاتونین از تخریب و تجزیه کلروفیل در برگ گیاه سویا کاست.

محتوی کارتنوئید

محلول‌پاشی ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال با متوسط ۴/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بالاترین مقدار صفت مذکور را به خود اختصاص داد، اختلاف بین تیمار مذکور و

محلول‌پاشی ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار تحت شرایط آبیاری نرمال ازنظر محتوی کارتنوئید معنی‌دار نبود. کمترین محتوی کارتنوئید در مطالعه حاضر با متوسط ۱/۶۴ و ۱/۷۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به تیمار شاهد محلول‌پاشی و محلول‌پاشی ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختصاص یافت (شکل ۳). گزارش شده است که تیمار ملاتونین از فعالیت آنزیم (Pao) Pheophorbide-a oxygenase (آنزیم‌های کلیدی در تجزیه کلروفیل) جلوگیری به‌عمل می‌آورد (تورک و همکاران، ۲۰۱۴ و وانگ و همکاران، ۲۰۱۴). و درنتیجه موجب حفظ و افزایش محتوای کلروفیل، به‌تعویق انداختن پیری برگ، حفظ ثبات و عملکرد PSII و درنهایت افزایش سرعت فتوسنتز تحت شرایط تنش اسمزی خواهد شد (تورک و همکاران، ۲۰۱۴).

محتوی پرولین

محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌مولار ملاتونین تحت شرایط تنش شدید بیشترین و تیمار شاهد محلول‌پاشی تحت شرایط آبیاری نرمال کمترین محتوی کلروفیل برگ را به خود اختصاص دادند، نتایج همچنین نشان داد تحت شرایط آبیاری نرمال محلول‌پاشی سطوح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین، تحت شرایط تنش ملایم محلول‌پاشی ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار و تحت شرایط تنش شدید محلول‌پاشی کلیه سطوح ملاتونین توانست به‌صورت معنی‌داری بر محتوی کلروفیل در مقایسه با تیمار شاهد بیفزاید (شکل ۴).

تجمع پرولین در گیاه تحت شرایط تنش رطوبتی به‌دلیل کارکردهای مختلف این ماده موجب افزایش مقاومت در گیاه می‌شود (هامورکو و همکاران، ۲۰۲۰). گزارش شده است که تحت شرایط تنش کم‌آبی پرولین و قندهای محلول در گیاهان نقش تنظیم اسمزی، انتقال سیگنال، حفظ تعادل ردوکس و ثبات ساختار سلولی را در گیاهان را برعهده دارند (دو و همکاران،۲۰۲۰). چندین مطالعه نشان داده‌اند که پرولین و قندهای محلول در تحمل به خشکی و سازگاری در طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی نقش دارند (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۹؛ لی و همکاران، ۲۰۲۰a و ابید و همکاران، ۲۰۱۸). در مطالعه نوبل آموا و سیو (۲۰۲۱) با تشدید تنش کم‌آبی بر محتوی پرولین برگ گندم افزوده شد.

محتوی فنل

نتایج نشان داد با افزایش شدت تنش کم‌آبی به‌صورت معنی‌داری بر محتوی فنل کل افزوده شد، همچنین محلول‌پاشی ملاتونین تحت شرایط تنش کم‌آبی بر محتوی فنل کل افزود. در این مطالعه محلول‌پاشی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش کم‌آبی شدید بالاترین محتوی فنل کل را به خود اختصاص داد. کمترین مقدار فعالیت فنل در این مطالعه به سطوح شاهد و محلول‌پاشی ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختصاص یافت. در این تحقیق کاربرد ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تحت شرایط آبیاری نرمال و کلیه سطوح ملاتونین تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی به‌صورت معنی‌داری بر محتوی فنل کل افزودند (شکل ۵).

مطالعهٔ همزمان ملاتونین، سالسیلات و جیبرلین روی اسانس و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه پرتقال تلخ ثابت کرد که اعمال همزمان این تنظیم‌کننده‌های رشد بر فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی و نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تأثیر مثبت می‌گذارد (پان و همکاران، ۲۰۱۷).

محتوی فلانوئید

در این مطالعه سطح آبیاری ملایم و شدید محتوی فلانوئید برگ را در مقایسه با شرایط آبیاری نرمال به‌ترتیب ۴۹/۱۹ و ۱۰۱/۳۰ درصد افزایش داد (شکل ۶). افزایش قابل‌توجهی در سطح فلاونوئیدها به‌دنبال تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند زخم، خشکسالی، سمیت فلزات و تنش کمبود عناصر غذایی مشاهده شده است (گیل و توتیجا، ۲۰۱۰).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

نتایج مقایسات میانگین نشان داد اگرچه محلول‌پاشی سطح ۱۵۰ میکرومولار تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی بالاترین مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به خود اختصاص داد اما اختلاف بین تیمار مذکور و تیمارهای محلول‌پاشی ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین معنی‌دار نبود، در این بررسی تیمار شاهد تحت شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار فعالیت این آنزیم را به خود اختصاص داد. نتایج مقایسات میانگین نشان داد تحت شرایط آبیاری نرمال، محلول‌پاشی ۲۰۰ میکرومولار، تحت شرایط تنش ملایم محلول‌پاشی هر چهار سطح ملاتونین و تحت شرایط تنش شدید محلول‌پاشی سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار در مقایسه با تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری بر مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید

دیسموتاز افزودند (شکل ۷). برای مقابله با آسیب اکسیداتیو، گیاهان یک مکانیسم دفاعی مؤثر از آنتی‌اکسیدان‌ها (آنزیمی/ غیرآنزیمی) ازجمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پلی‌فنل اکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکروبات پراکسیداز (APX) ایجاد کرده‌اند (سیو و همکاران، ۲۰۱۷ و وانگ و همکاران، ۲۰۱۶). مطالعات قبلی گزارش کردند که کاربرد ملاتونین در محصولات مختلف به وضوح تحمل تنش آن‌ها را با محافظت از دستگاه فتوسنتزی، افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی و بهبود ظرفیت نگهداری آب افزایش می‌دهد (سیو و همکاران، ۲۰۱۷ و فلیتا- سوریانو و همکاران،۲۰۱۷).

فعالیت آنزیم کاتالاز

براساس نتایج مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل، محلول‌پاشی سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش کم‌آبی بالاترین و تیمار شاهد محلول‌پاشی تحت شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز را به خود اختصاص داد. نتایج نشان داد تحت شرایط تنش ملایم و تنش شدید کاربرد کلیه سطوح ملاتونین بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز افزود درحالی‌که تحت شرایط آبیاری نرمال تنها اختلاف بین تیمار شاهد و محلول‌پاشی ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین معنی‌دار نبود و دیگر سطوح به‌صورت معنی‌داری بر مقدار فعالیت این آنزیم افزودند (شکل ۸). با این‌حال، محلول‌پاشی ملاتونین سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در مطالعه حاضر افزایش داد. در مطالعه‌ای بر روی گندم تحت شرایط سمیت عنصر بور گزارش شد. بالاترین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکروبات پراکسیداز به بالاترین سطح سمیت عنصر بور و محلول‌پاشی ملاتونین اختصاص داشت (ال-هوکیل و همکاران، ۲۰۲۱). در مطالعه‌ای بر روی گندم، خشکی باعث کاهش کلروفیل، کاروتنوئید، محتوای آب، وزن خشک برگ و ریشه، نسبت R-S، MSI و افزایش MDA، EL، پرولین، قند محلول، تجمع H2O2 و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT، و APX) شد (آموا و سیو،۲۰۲۱).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

در بین تیمارهای محلول‌پاشی ملاتونین سطح ۱۰۰ میکرومولار بالاترین و تیمار شاهد کمترین مقدار فعالیت آسکروبات پراکسیداز را به خود اختصاص دادند بین دیگر سطوح ملاتونین از لحاظ مقدار فعالیت این آنزیم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۱۰). در مطالعه‌ای بر روی لیموترش، جعفری و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند تنش خشکی بر سطوح SOD، POD، GR و APX در برگ‌های گیاهان تیمار شده و تیمار نشده با ملاتونین اثر گذاشت. آن‌ها مشاهده کردند که گیاهان تحت تنش شدید خشکی (به‌ویژه در ۴۰ درصد FC) فعالیت SOD، GR و APX بالاتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند.

پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی (مالون دی‌آلدهید)

در بررسی حاضر با تشدید تنش کم‌آبی بر مقدار پراکسیداسیون چربی‌های غشاء (مالون دی‌آلدهید) سلولی گندم افزوده شد درحالی‌که محلول‌پاشی سطوح ملاتونین به‌خصوص سطوح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تحت شرایط تنش ملایم و شدید از مقدار پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی کاست، در این مطالعه محلول‌پاشی ۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال کمترین و تیمار شاهد و محلول‌پاشی ۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی بالاترین مقدار پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی را به خود اختصاص دادند (شکل ۱۱). گزارش شده است که ملاتونین از طریق بهبود حالت رودکس سلول، کاهش اکسیژن‌های فعال واکنش‌پذیر (ROS) و همچنین گونه‌های فعال نیتروژن موجب بهبود پایداری غشاء بیولوژیکی در سلول می‌شود، ملاتونین می‌تواند خود را بین سرهای قطبی اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی قرار دهد، درنتیجه سطح پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و سیالیت طبیعی غشاء را حفظ کند (لیو و همکاران، ۲۰۲۱).
کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها تحت شرایط تنش کم‌آبی دراثر محلول‌پاشی ملاتونین در مطالعات دیگری نیز به اثبات رسیده است (جعفری و همکاران، ۲۰۲۲ و احمد و همکاران، ۲۰۲۰).

عملکرد دانه

مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل ازنظر عملکرد دانه نشان داد محلول‌پاشی ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال به‌ترتیب با متوسط ۷۹۵۴/۵ و ۷۵۹۳/۷ کیلوگرم در هکتار

بالاترین عملکرد دانه را به خود اختصاص دادند درحالی‌که کمترین عملکرد دانه با متوسط ۳۵۱۶/۹ تن در هکتار به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) تحت شرایط تنش شدید آبی اختصاص یافت. براساس نتایج تحقیق حاضر نشان داد کاربرد سطوح ۵۰، ۱۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش ملایم و محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌مولار ملاتونین تحت شرایط تنش شدید آبی توانست عملکرد دانه را به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با شاهد هر سطح آبیاری افزایش دهد و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد پرولامین تحت شرایط تنش نرمال نداشته باشد (شکل ۱۲). ملاتونین ژن تولیدکننده فرودوکسین (PetF) و اثر بازداری تنش بر این ژن را متوقف نمود. کاهش بیان ژن PetF ممکن است بر پاک‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ایجادشده در طی فتوسنتز و یا نتایج تنش شامل تأخیر در رشد و تجمع H_2O_2در تنش تأثیر بگذارد (وی و همکاران، ۲۰۱۹). فرودوکسین میزان کاهش آسکوربات و محافظت از تخریب کلروفیل را تنظیم می‌کند (حیدری، ۲۰۱۸). تان و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند محلول‌پاشی ملاتونین تحمل به شرایط تنش را در گیاهان افزایش و کاهش عملکرد و اجزای عملکرد ناشی از رشد در شرایط تنش غیرزنده را تعدیل می‌نماید. گزارش شده است که ملاتونین با از بین بردن مستقیم اکسیژن‌های فعال واکنش‌گر (ROS) یا با تعدیل فعالیت و تولید آنزیم‌ها آنتی اکسیدانت و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (لی و همکاران، ۲۰۱۸). طبق گزارشات، ملاتونین قادر به افزایش عملکرد و کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از کمبود آب در سویا (کاو و همکاران، ۲۰۲۱) و ذرت (رن و همکاران، ۲۰۲۱) بود.

خصوصیات مرتبط با بیان ژن

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مرتبط با بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد اثر سطح آبیاری بر مقدار بیان ژن‌های آسکروبات پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در سطح احتمال یک درصد و بر مقدار بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. بین سطوح ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار بیان ژن هر چهار آنزیم مورد بررسی اختلاف معنی‌دار وجود داشت، همچنین اختلاف بین متقابل تیمارهای برهمکنش آبیاری با ملاتونین بر مقدار بیان ژن‌های آسکروبات پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در سطح احتمال یک درصد و بر مقدار بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول ۳).

مقدار بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز

مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز نشان داد با تشدید تنش کم‌آبی بر مقدار بیان ژن مذکور افزوده شد، همچنین کاربرد ملاتونین نیز اثر هم‌افزایی بر بیان ژن مذکور داشت، در این مطالعه محلول‌پاشی ۱۵۰ میکرومولار تحت شرایط تنش شدید رطوبتی بالاترین مقدار بیان نسبی سوپراکسید دیسموتاز را به خود اختصاص داد که با افزایش تحمل به خشکی ارتباط دارد. اختلاف بین تیمار مذکور و تیمار کاربرد سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تحت شرایط تنش شدید ازنظر مقدار بیان ژن مذکور معنی‌دار نبود. در مطالعه حاضر تیمار شاهد محلول‌پاشی در شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز را به خود اختصاص داد. در این بررسی تحت شرایط آبیاری نرمال محلول‌پاشی ۱۵۰ میکرومولار، تحت شرایط تنش کم‌آبی ملایم محلول‌پاشی سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار و تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی محلول‌پاشی سطوح ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین توانست به‌صورت معنی‌داری مقدار بیان نسبی ژن‌های سوپر اکسید دیسموتاز را در مقایسه با تیمار شاهد در هر دو آبیاری افزایش دهد (شکل ۱۳). فاتحی و محمدی (۱۳۹۸) نشان دادند که سطوح بیان ژن‌های CAT، APX، SOD و P5C5 در تنش خشکی افزایش یافت. افزایش بیان ژن آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکروبات پراکسیداز در واکنش به تنش کم‌آبی در مطالعات دیگری نیز به اثبات رسیده است که با افزایش تحمل به خشکی ارتباط داشته است (راجا و همکاران، ۲۰۲۰).

مقدار بیان ژن آسکروبات پراکسیداز

بالاترین مقدار بیان نسبی ژن آسکروبات پراکسیداز به تیمارهای محلول‌پاشی سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختصاص داشت، در این بررسی کمترین مقدار بیان ژن آنزیم مذکور به تیمار شاهد محلول‌پاشی تحت شرایط آبیاری نرمال اختصاص داشت، لازم به ذکر است که بین تیمار مذکور و هر چهار سطح ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مقایسات میانگین همچنین حاکی

از آن بود که تحت شرایط تنش ملایم سطوح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار و تحت شرایط تنش شدید سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروملار در مقایسه با تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری بر مقدار بیان ژن این آنزیم افزودند (شکل ۱۲).

به خوبی شناخته شده است که گیاهان می‌توانند، دربرابر زیان‌های اکسیداتیو به‌وسیله تنظیم سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در جهت توازن ترکیباتی مانند، رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و هیدروژن پراکسیداز، از خودشان محافظت کنند (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷). ملاتونین با کاهش واکنش فنتون، صدمات اکسیداتیو در مولکول‌های حیاتی از جمله DNA پروتئین‌ها و لیپیدها را کاهش می‌دهد، این ترکیب با حفظ فعالیت فتوشیمیایی غشاهای کلروپلاستی و واکنش‌های کربوکسیلاسیون در فتوسنتز و ثبات عملکرد فتوسیستم II موجب کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود. افزایش بیان ژن‌های MnSOD، APX و GPX در ارقام گندم تحت شرایط تنش کم‌آبی در مطالعه احمدی و ابوقداره (۲۰۱۹) نیز گزارش شده است که همسو با نتایج تحقیق حاضر است. در مطالعه دیگر بر روی گندم دوروم گزارش شد مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در واکنش به تنش کم‌آبی به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان دادند (حسنپور لیسکوکیلای و همکاران، ۲۰۱۵).

بیان ژن پلی فنل اکسیداز

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ مقدار بیان ژن پلی‌فنول اکسیداز نشان داد هریک از تیمارهای آبیاری واکنش مختلفی به سطوح ملاتونین نشان دادند به‌طوری‌که تحت شرایط آبیاری نرمال محلول‌پاشی ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار و تحت شرایط تنش شدید هر چهار سطح محلول‌پاشی ملاتونین توانستند به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش دهند، تحت شرایط تنش ملایم بین تیمار شاهد و تیمارهای محلول‌پاشی ملاتونین اختلاف معنی‌داری دیده نشد. لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر محلول‌پاشی سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش شدید بالاترین و سطح شاهد و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار بیان ژن مذکور را به خود اختصاص دادند (شکل ۱۴). در بررسی اثر کیتوزان در بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در القای مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشه گندم قاضی محسنی و صباغ (۲۰۱۶) نشان دادند سطوح بیان mRNA ژن‌های بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز و اگزالات اکسیداز به‌صورت قابل‌توجهی در تیمار کیتوزان افزایش نشان داد. آن‌ها اظهار داشتند که کیتوزان با القای مقاومت سیستمیک اکتسابی مقاومت گیاهان را علیه قارچ‌های بیماری زا تحت‌تاثیر قرار می‌دهد.

کاتالاز

نتایج نشان داد محلول‌پاشی سه سطح ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین بالاترین و تیمار شاهد محلول‌پاشی تحت شرایط آبیاری نرمال کمترین مقدار بیان ژن کاتالاز را به خود اختصاص دادند. در این بررسی اگرچه شرایط تنش کم‌آبی بر مقدار بیان ژن کاتالاز افزود اما محلول‌پاشی ۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش ملایم و هر چهار سطح محلول‌پاشی ملاتونین تحت شرایط تنش شدید کم‌آبی این افزایش را در مقایسه با تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری افزایش داد (شکل ۱۵). در مطالعه اثر ملاتونین بر بیان ژن‌های مقاومت به سرما در گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد ژن‌های SAM تحت‌تأثیر تیمارهای ملاتونین قرار گرفتند. نتایج برهمکنش پروتئینی و نواحی پروموتور ژن‌هایSAM نشان داد که این ژن‌ها در فرایندهای مختلفی درگیر هستند و نقش مهمی در تنظیم مسیرهای پایین دست مرتبط به پاسخ به تنش و تنظیم رشد گیاهان برعهده دارند (مظلومی، ۲۰۲۰).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مهم‌ترین صفت در گندم، عملکرد دانه است، این صفت برآیند کلیه خصوصیات کمی و کیفی در این محصول است. در این بررسی سطوح ۵۰، ۱۰ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین تحت شرایط تنش ملایم و محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌مولار ملاتونین تحت شرایط تنش شدید آبی توانست عملکرد دانه را به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با شاهد هر سطح آبیاری افزایش دهد، همچنین کاربرد ملاتونین توانست مقدار بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش دهد. می‌توان نتیجه گرفت تیمار ملاتونین احتمالاً با بهبود خصوصیات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مقدار پراکسیداسیون لیپدهای غشائی و آسیب تنش اکسیداتیو به ساختار سلول به‌خصوص رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت شرایط تنش کم‌آبی را کاهش داده است، ماندگاری رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت شرایط تنش کم‌آبی مقدار فتوسنتز را افزایش می‌دهد،

افزایش فتوسنتز موجب افزایش تولید فتوآسمیلات‌ها و انتقال آن به مخازن می‌شود، مجموع این فرایندها توانسته است اثر مثبتی بر افزایش عملکرد دانه تحت شرایط تنش کم‌آبی داشته باشد.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات زراعی مورد بررسی تحت تیمارهای آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	پرولین	فنل کل	فلانوئید
تکرار	۳	۱/۴۶	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۰۰۴	۳۷/۲۵	۳۰/۲۵
آبیاری	۲	۱۳۳/۲۱**	۹/۰۱**	۱۳/۲۱**	۰/۱۱۷**	۳۶۹۴/۳۵**	۳۹۲۱/۱۲**
خطای اول	۶	۱/۴۳	۰/۰۵	۰/۰۸	۰/۰۰۰۵	۸۴/۳۴	۸۱/۳۰
ملاتونین	۴	۵/۲۵**	۰/۴۱**	۰/۵۲**	۰/۰۷۷**	۱۸۴/۶۷**	۳۴۶/۱۳**
آبیاری × ملاتونین	۸	۴/۵۹**	۰/۲۸*	۰/۴۶**	۰/۰۲۳**	۱۳۶/۶۹**	۵۵/۹۶ns
خطا	۳۶	۱/۲۵	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۰۰۶	۳۲/۴۳	۳۳/۸۳
ضریب تغییرات	–	۱۲/۲۱	۱۳/۹۸	۹/۲۴	۱۷/۳۱	۲۰/۸۴	۱۴/۱۴

ns، * و ** به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد آماری

ادامه جدول ۲. تجزیه واریانس صفات زراعی مورد بررسی تحت تیمارهای آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین

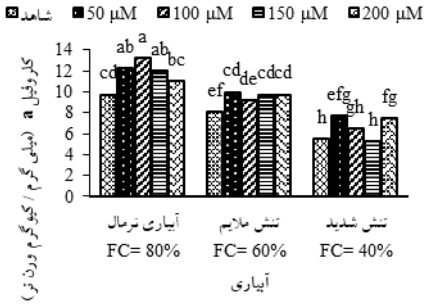
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		سوپراکسیددیسموتاز	کاتالاز	آسکروبات پراکسیداز	مالون دی آلدهید	عملکرد دانه
تکرار	۳	۷۶۸۴/۵	۲۷۱/۵۶	۷۱۰/۳	۵/۲۰	۰/۷۷
آبیاری	۲	۲۴۹۸۴/۲*	۹۰۰۸/۶۶**	۳۰۷۹۳/۱**	۸۲۳/۸۲**	۲۱/۴۸**
خطای اول	۶	۴۴۶۰/۲	۲۱۴/۸۰	۴۶۱/۲	۱۰/۰۱	۰/۳۶
ملاتونین	۴	۱۴۹۶۳/۳**	۲۵۶۸/۲۲**	۵۴۶۹/۸**	۸۰/۰۸**	۷/۶۰**
آبیاری × ملاتونین	۸	۷۵۷۶/۹**	۶۶۱/۷۸**	۷۲۵/۰ns	۳۸/۵۳**	۲/۶۷**
خطا	۳۶	۱۵۲۹/۷	۱۷۶/۴۵	۴۴۶/۴	۸/۹۱	۰/۷۷
ضریب تغییرات	–	۱۸/۶۵	۱۶/۳۱	۲۲/۹۳	۱۴/۸۷	۱۶/۹۴

ns، * و ** به ترتیب عدم معنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد آماری

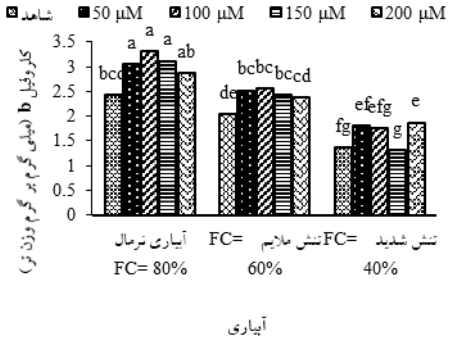
جدول ۳. تجزیه واریانس خصوصیات مرتبط با بیان ژن‌های آنتی اکسیدان تحت تیمارهای آبیاری و ملاتونین

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		سوپراکسید دیسموتاز	آسکروبات پراکسیداز	کاتالاز	پلی فنل اکسیداز
تکرار	۳	۵۹۱/۶۶	۲۵۶/۷	۲/۷۱	۹۳۱/۴۰
آبیاری	۲	۳۲۲۲/۳۰*	۱۴۴۵۴/۴**	۱۸۲/۷۲**	۳۶۹۴/۳۵**
خطای اول	۶	۳۳۷/۴۱	۱۳۵/۸	۲/۱۴	۸۴/۳۴
ملاتونین	۴	۱۴۳۶/۷۶**	۱۱۶۲/۴**	۳۱/۱۷**	۱۸۴/۶۷**
آبیاری × ملاتونین	۸	۳۹۰/۷۶*	۱۳۳۴/۴**	۸/۷۸**	۱۳۶/۶۹**
خطا	۳۶	۱۴۹/۸۸	۱۸۳/۶	۱/۷۶	۳۲/۴۳
ضریب تغییرات	–	۱۹/۲۶	۲۴/۱۶	۱۴/۶۳	۱۴/۲۱

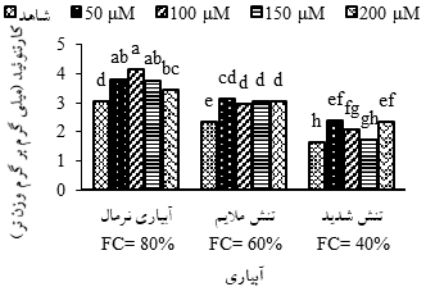
ns، * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد آماری



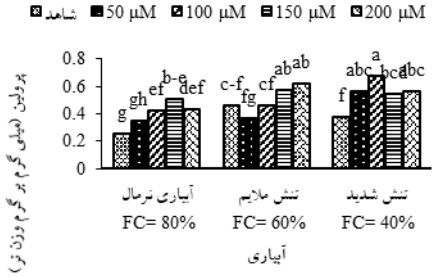
شکل ۱. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر محتوی کلروفیل a



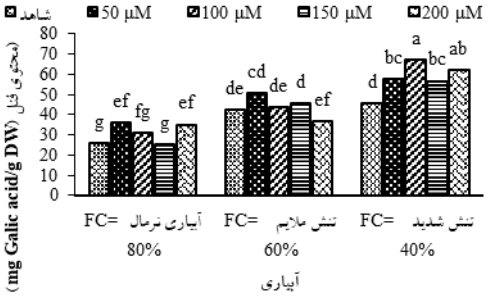
شکل ۲. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر محتوی کلروفیل b



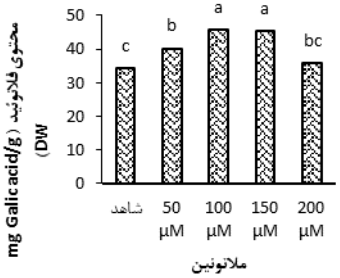
شکل ۳. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر محتوی کارتنوئید



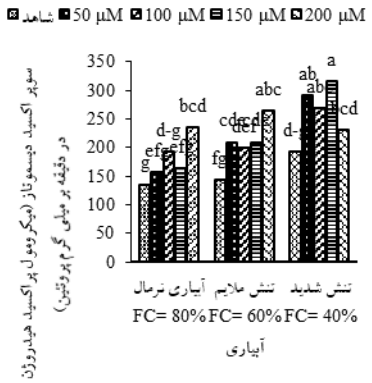
شکل ٤. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر محتوی پرولین



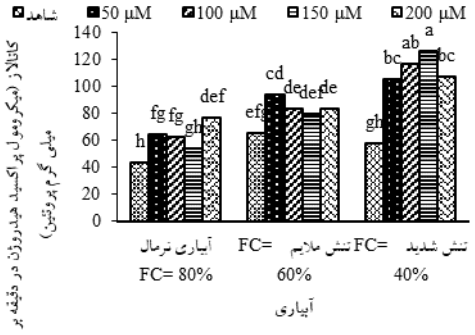
شکل ۵. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر محتوی فنل کل



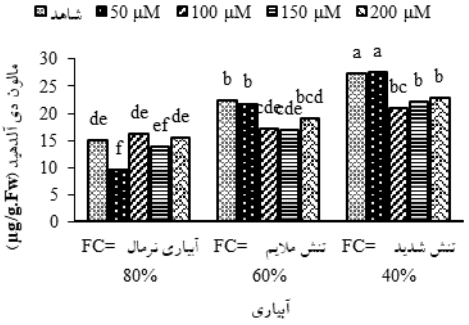
شکل ٦. مقایسه میانگین تیمارهای آبیاری از نظر محتوی فلانوئید



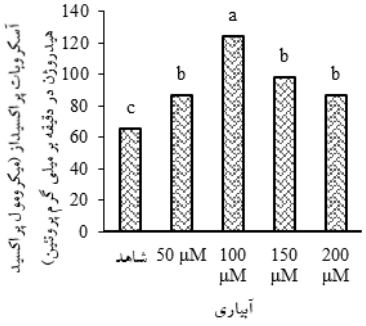
شکل ۷. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز



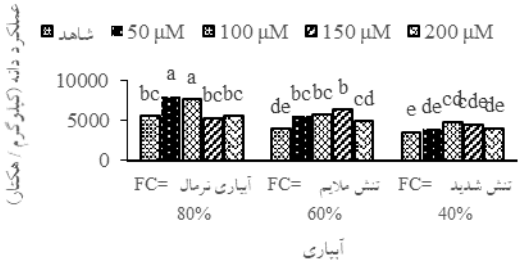
شکل ۸. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز



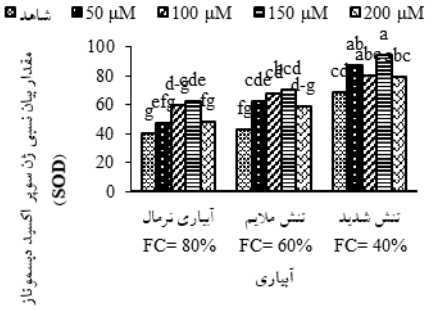
شکل ۹. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار فعالیت آنزیم مالون دی‌آلدهید



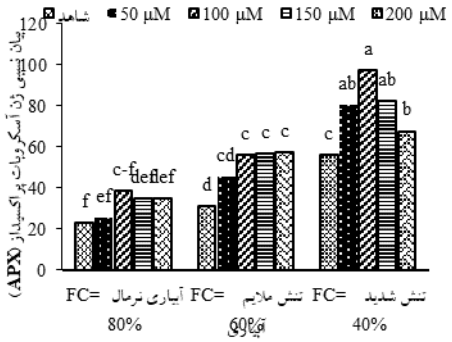
شکل ۱۰. مقایسه میانگین تیمارهای محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار فعالیت آنزیم آسکروبات پراکسیداز



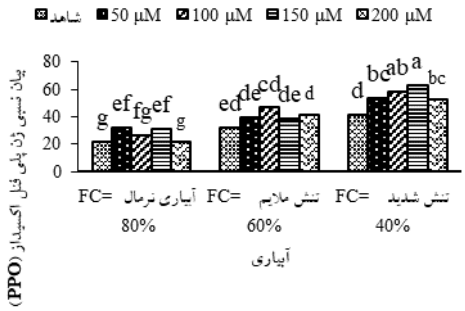
شکل ۱۱. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر عملکرد دانه



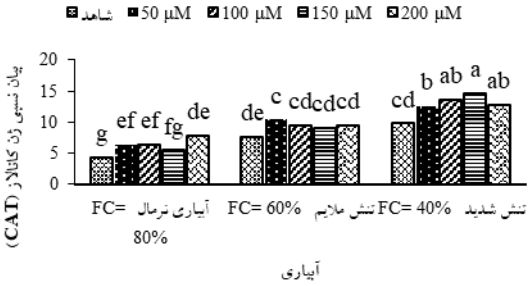
شکل ۱۲. مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار بیان ژن آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز



شکل ۱۳. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار بیان ژن آنزیم آسکروبات پراکسیداز



شکل ۱٤. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر آبیاری و مقدار بیان ژن آنزیم پلی فنل اکسیداز



شکل ۱۵. مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل آبیاری و محلول‌پاشی ملاتونین از لحاظ اثر بر مقدار بیان ژن آنزیم کاتالاز

References

Abid, M., Ali, S., Qi, L. K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., ... & Dai, T. (2018). Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific reports*, *8*(1), 4615.

Ahmad, S., Kamran, M., Ding, R., Meng, X., Wang, H., Ahmad, I., ... & Han, Q. (2019). Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. *PeerJ*, *7*, e7793.

Ahmad, S., Su, W., Kamran, M., Ahmad, I., Meng, X., Wu, X., ... & Han, Q. (2020). Foliar application of melatonin delay leaf senescence in maize by improving the antioxidant defense system and enhancing photosynthetic capacity under semi-arid regions. *Protoplasma*, *257*, 1079-1092.

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki-Ourang S, Mehrabi AA, Sidique KHM. (2018). Wild relatives of wheat: *Aegilops–Triticum* accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. Acta Physiologiae Plantarum 40:90.

Al-Huqail, A.A., M. N. Khan, H. M. Ali, M. H. Siddiqui, A. A. Al-Huqail, F. M. AlZuaibr, M. A. Al-Muwayhi., N. Marraiki, L.A. Al-Humaid. (2021). Exogenous melatonin mitigates boron toxicity in wheat. Ecotoxicology and Environmental Safety. 201: 1-12

Arnao M.B., and Hernández-Ruiz J. (2014). Melatonin: Plant growthregulator and/or biostimulator during stress? Trends in Plant Science 19: 789–797.

Bajwa, V.S.; Shukla, M.R.; Sherif, S.M.; Murch, S.J.; Saxena, P.K. (2014). Role of melatonin in alleviating cold stress inArabidopsis thaliana. J. Pineal Res., 56, 238–245.

Cao, L.; Qin, B.; Zhang, Y.X. (2021). Exogenous application of melatonin may contribute to enhancement of soybean drought tolerance via its

effects on glucose metabolism. Biotechnol. Biotechnol. Equip., 35, 964–976.

Cen, H.; Wang, T.; Liu, H.; Tian, D.; Zhang, Y.W. (2020). Melatonin application improves salt tolerance of alfalfa (Medicago sativa L.) by enhancing antioxidant capacity. Plants, 9, 220.

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 DOI 10.1016/j.plaphy.2017.06.014.

Du Y, Zhao Q, Chen L, Yao X, Zhang W, Zhang B, Xie F. (2020). Efect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. Plant Physiol Biochem 146:1–12. https://doi.org/ 10.1016/j.plaphy.2019.11.003.

Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, Kuča K, Jaćević V .(2020). The signifcance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. Front Plant Sci 11:552969.

FAO World Food and Agriculture. Statistical Yearbook. Available online: http://www.fao.org/3/i3107e/i3107e. pdf (accessed on 20 May 2022).

Fatehi F, and Mohammadi H. (2019). Physiological response and expression of genes involved in drought tolerance in tolerant and susceptible bread wheat cultivars. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2019; 8 (2) :200-216 URL: http://gebsj.ir/article-1-331-fa.html (in Persian)

Fleta-Soriano E, Díaz L, Bonet E, Munné-Bosch S. (2017). Melatonin may exert a protective role against drought stress in maize. Journal of Agronomy and Crop Science 203:286_294 DOI 10.1111/jac.12201.

Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K. (2010). *Sekiguchi lesion* gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *Journal of Biological Chemistry* 285, 11308–11313.

Ghazimohseni, V and Seyed Kazem Sabbagh. (2016). Effect of chitosan on gene expression and activity of enzymes involved in resistant induction to fusariuse of wheat. Iranian Journal of Plant Protection, 46 (2), 363-371(*in Persian*)

Gill, S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy. 2010.08.016

Hamurcu M, Khan MK, Pandey A, Ozdemir C, Avsaroglu ZZ, Elbasan F, Omay AH, Gezgin S. (2020). Nitric oxide regulates watermelon (Citrullus lanatus) responses to drought stress. 3 Biotech 10:1–14.

Hassanpour Lescokelaye, K., J. Ahmadi, J. Daneshyan and S. Hatami. (2015). Changes in Chlorophyll, Protein and Antioxidant Enzymes on Durum Wheat under Drought Stress. Journal of Crop Breeding, 7(15): 76-87

Heydari, H. (2018). The effect of pyridoxine, pantothenic acid and zinc foliar application on quantitative and qualitative traits of green beans. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture Shahrood University of Technology, Iran .

Jafari, M.; Shahsavar, A.R.; Talebi, M.; Hesami, M. (2022). Exogenous Melatonin Protects Lime Plants from Drought Stress-Induced Damage by Maintaining Cell Membrane Structure, Detoxifying ROS and Regulating Antioxidant Systems. Horticulturae, 8, 257. https://doi.org/10.3390/

Kang S, Kang K, Lee K, Back KW. (2007). Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Reports* 26, 2009–2015.

Li B, Feng Y, Zong Y, Zhang D, Hao X, Li P .(2020a). Elevated CO2-induced changes in photosynthesis, antioxidant enzymes and signal transduction enzyme of soybean under drought stress. Plant Physiol Biochem 154:105–114. https://doi.org/10.1016/j. plaphy.2020.05.039.

Li, Z.G.; Xu, Y.; Bai, L.K.; Zhang, S.Y.; Wang, Y. (2018). Melatonin enhances thermotolerance of maize seedlings (Zea mays L.) by modulating antioxidant defense, methylglyoxal detoxification, and osmoregulation systems. Protoplasma, 256, 471–490.

Liu, J., Wang, W., Wang, L., and Sun, Y. (2015). Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato. Plant. Growth. Regul. 77: 317-326.

Liu, J.; Sun, J.; Pan, Y.; Yun, Z.; Zhang, Z.; Jiang, G.; Jiang, Y. (2021) Endogenous melatonin generation plays a positive role in chilling tolerance in relation to redox homeostasis in litchi fruit during refrigeration. Postharvest Biol. Technol., 178, 111554.

Maria Janas, K., and Maria Posmyk, M. (2013). Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application. Acta. Physiol. 35: 3285-3292

Mazlomi, F. (2020). Studying the effects of melatonin on tomato seedlings under cold stress,

Master's Thesis of Shahrood University. (*in Persian*)

Mohammadi Y, Baradaran Firouzabadi M, Gholami A, Makarian H. (2020). The effect of vitamins B group and melatonin foliar application on yield and some of physiological traits of soybean (Glycine max). Journal of Plant Process and Function; 9 (35) :359-376

Noble Amoah, J., Seo, W. Y., (2021). Efect of progressive drought stress on physio-biochemical responses and gene expression patterns in wheat. Biotech. 11: 440-428

Outoukarte, I.; El Keroumi, A.; Dihazi, A.; Naamani, K. (2019). Use of morpho-physiological parameters and biochemical markers to select drought tolerant genotypes of durum wheat. J. Plant Stress Phys., 1–7.

Pan, Y.; Yuan, M.; Zhang, W.; Zhang, Z. E. (2017). Ect of low temperatures on chilling injury in relation to energy status in papaya fruit during storage. Postharvest Biol. Technol., 125, 181–187.

Pour-Aboughadareh , Alireza , Marouf Khalili, Peter Poczai and Tiago Olivoto .(2022). Stability Indices to Deciphering the Genotype-by-Environment Interaction (GEI) Effect: An Applicable Review for Use in Plant Breeding Programs.plants.pp,1-24.

Raja V, Qadir SU, Alyemeni MN, Ahmad P. (2020). Impact of drought and heat stress individually and in combination on physio-biochemical parameters, antioxidant responses, and gene expression in Solanum lycopersicum. 3 Biotech. 10:1–18

Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule. *Progress in Brain Research* 181, 127–151.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L., and Galano, A. (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. Molecules, 20: 7396-7437.

Ren, J.; Yang, X.; Ma, C.; Wang, Y.; Zhao, J. (2021). Melatonin enhances drought stress tolerance in maize through coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation. Plant Physiol. Biochem., 167, 958–969

Riga P, Medina S, Garcia-Flores LA, Gil-Izquierdo A. (2014). Melatonin content of pepper and tomato fruits: effects of cultivar and solar radiation. *Food Chemistry* 156, 347–352.

Sallam, A., A. M. Alqudah, M. F. A. Dawood, P. S. Baenziger and A. Börner. (2019). Drought Stress Tolerance in Wheat and Barley: Advances in Physiology, Breeding and Genetics Research. International Journal of Molecular Sciences.20 (3137): 1-36

Sarrou E, Therios I, Dimassi-Theriou K. (2014). Melatonin and other factors that promote rooting and sprouting of shoot cuttings in *Punica granatum* cv. Wonderful. *Turkish Journal of Botany* 38, 293–301.

Sharma, P.; Sareen, S.; Saini, M. (2017). Shefali Assessing genetic variation for heat stress tolerance in Indian bread wheat genotypes using morpho-physiological traits and molecular markers. Plant Genet. Resour., 15, 539–547.

Singh-Gill S, Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance incrop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909- 930.

Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ, Estebanzubero E, Zhou Z, Reiter RJ.(2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. Molecules 20:18886_18906

Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales Corral, S., and Reiter, R.J.(2011). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. J. Exp. Bot. 63: 577-597

Turk, H., S. Erdal, M. Genisel, O. Atici, Y. Demir, and D. Yanmis. (2014). The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. Plant Growth Regul. 74: 139-152.

Weeda S, Zhang N, Zhao X, Ndip G, Guo Y, Buck GA, Fu C, Ren SX. (2014). Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS One* 9, e93462–e93462.

Wei, Z.(2019). Melatonin increases the performance of Malus hupehensis after UV-B exposure. Plant Physiol Biochem 139, 630–641.

Yang XL., Xu H., Li D., Gao X., Li TL., and Wang R. (2018). Effect of melatonin priming on photosynthetic capacity of tomato leaves under low-temperature stress. Photosynthtica 56(3): 884-892.

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.

Zhang Y.P., Xu S., Yang S.J., and Chen Y.Y.(2017). Melatonin alleviates cold-induced

oxidative damage by regulation of ascorbate–glutathione and proline metabolism in melon seedlings (*Cucumis melo* L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 92(3): 313-324.

Zhang, N., Q. Sun, H. Zhang, Y. Cao, S. Weeda, S.H. Ren, and Y.D. Guo. (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. J Exp. Bot. 66: 647-56.

Zhang, Q.; Liu, X.; Zhang, Z.; Liu, N.; Li, D.; Hu, L. (2019). Melatonin improved waterlogging tolerance in alfalfa (Medicago sativa) by reprogramming polyamine and ethylene metabolism. Front. Plant Sci., 10, 44.

Zhang, Y.-J.; Yang, J.-S.; Guo, S.-J.; Meng, J.-J.; Zhang, Y.-L.; Wan, S.-B.; He, Q.-W.; Li, X.-G. (2011). Over-expression of the Arabidopsis CBF1 gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance. Plant Biol., 13, 362–367.