

اثر کاربرد برگی ملاتونین و سدیم نیتروپروساید بر بهبود تحمل تنش دمای بالا در توت‌فرنگی رقم کردستان^۱

Effect of Melatonin and Sodium Nitroprusside Foliar Application on Improving High-Temperature Stress Tolerance of 'Kurdistan' Strawberry

حمیده منافی، بهرام بانی نسب*، مهدیه غلامی و مجید طالبی^۲

چکیده

در پژوهش حاضر اثر تیمارهای ملاتونین و نیتریک اکسید بر بهبود تحمل دمای بالا در گیاه توت‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی در سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. در این پژوهش گیاهان توت‌فرنگی رقم کردستان پس از محلول‌پاشی با غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و نیتریک اکسید با تیمارهای دمایی مختلف (۲۵، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس) به مدت ۲۴ ساعت مواجه شدند. نتیجه‌ها نشان داد تنش دمایی سبب افزایش میزان هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدئید و انباشت پرولین و کاهش درصد رطوبت نسبی آب برگ و فلورسانس کلروفیل برگ شد. تنش دمایی همچنین سبب افزایش میزان گلوکوتانیون و آسکوربیک اسید برگ و افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گاپاکول پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شد. کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید باعث کاهش خسارت‌های ظاهری و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شد. این ترکیب‌ها همچنین محتوای پرولین و درصد رطوبت نسبی برگ را افزایش و شاخص فلورسانس کلروفیل را در مقایسه با گیاهان شاهد بهبود بخشید. بنابراین، کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید از راه افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، کاهش تولید و انباشت گونه‌های فعال اکسیژن و مهار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا مانع از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش دمای بالا در گیاهان توت‌فرنگی رقم کردستان شد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، تنش اکسیداتیو، توت‌فرنگی، تنش گرما، ملاتونین، نیتریک اکسید.

مقدمه

مدل‌های مختلف هواشناسی پیش‌بینی می‌کنند که گازهای گلخانه‌ای به تدریج دمای هوای اطراف زمین را افزایش می‌دهند و منجر به گرم شدن هوای کره زمین می‌شوند. بر اساس گزارش‌ها تا اواخر قرن حاضر دمای کره زمین ۲ تا ۵ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد (۱۷). افزایش دمای مرتبط با تغییرهای اقلیمی جهان، عامل محدود کننده‌ای برای کشت و عملکرد بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌باشد. اگر گیاهان برای مدت زمانی معین در معرض دماهای بالاتر از آستانه تحمل خود قرار گیرند آسیب‌های برگشت‌ناپذیری به رشد و نمو آن‌ها وارد می‌شود. تنش دمای بالا باعث خسارت به بافت‌های گیاهی می‌شود و به گونه‌ای معنادار بر رشد و متابولیسم گیاهان اثر می‌گذارد. نشانه‌های اصلی تنش گرما در گیاهان شامل کم‌سبزیگی و بافت‌مردگی برگ‌ها و شاخه‌ها، آفتاب سوختگی اندام‌های گیاهی، پیری برگ و ریزش آن، تاخیر در تندش بذر و از دست دادن قوه نامیه، عدم تعادل

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱۱

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی و دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (bbanin@iut.ac.ir).

در فتوسنتز و تنفس و همچنین، کاهش وزن خشک ساقه، سرعت رشد نسبی و نرخ جذب و ساخت خالص می‌باشد. تنش دمایی بالا در گیاهان، تولید و واکنش گونه‌های فعال اکسیژن از جمله سوپر اکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل را شتاب می‌دهد و در نتیجه باعث تنش اکسیداتیو می‌شود (۳۴). اگرچه گیاهان عالی استراتژی‌های دفاعی توسعه یافته‌ای برای مقابله با تنش دمایی بالا دارند، اما اغلب این موارد کافی نیستند و در نتیجه دماهای بالا خسارت‌های قابل توجهی به گیاه وارد می‌سازند.

در سال‌های اخیر توجه قابل ملاحظه‌ای به کاهش اثرهای مضر دماهای بالا در گیاهان از راه کاربرد خارجی برخی از ترکیب‌های شیمیایی مانند هیدروژن پراکسید، نیتریک اکسید (۲۹) و ملاتونین (۲) صورت گرفته است. ملاتونین (N-acetyl-5-methoxytryptamin) مولکولی با ساختار حلقه‌ای ایندول و با وزن مولکولی کم است که به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی نقش مهمی در رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌ها در گیاهان ایفا می‌نماید. ملاتونین به عنوان یک جاذب برای رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و می‌تواند به طور مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن را در فضای یاخته‌ای از بین ببرد و در نتیجه باعث کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان شود (۸). مطالعه‌های مختلف نشان داده است که تیمار گیاهان با ملاتونین خارجی تحمل به تنش دمایی را بهبود می‌بخشد. در شرایط تنش دمایی بالا، گیاهان چمن‌ناوش (*Festuca arundinacea* Schreb.) تیمار شده با ملاتونین نشت یونی و سطح مالون دی‌آلدئید کمتر و کلروفیل، میزان پروتئین‌های محلول کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مقایسه با گیاهان تیمار نشده داشتند (۲).

نیتریک اکسید به عنوان پیام مولکولی در کنش‌های فیزیولوژیکی گوناگون گیاهان از جمله القای تندش و کاهش خواب‌بذر، تنظیم متابولیسم گیاه و پیری، القای مرگ یاخته، تنظیم حرکت روزنه‌ها، تنظیم فتوسنتز، عملکرد میتوکندری و تنظیم گلدهی نقش حیاتی ایفا می‌کند. ثابت شده است که نیتریک اکسید توانا به تنظیم پاسخ‌های گیاهی متعدد نسبت به انواع تنش‌های زنده و غیر زنده و کاهش برخی پیامدهای ایجاد شده توسط تنش اکسیداتیو است (۲۷). در گیاهان مختلف، تولید سریع نیتریک اکسید در طول تنش گرما مشاهده شده است. در یاخته‌های برگ توتون (*Nicotiana glauca*) و یونجه (*Medicago sativa*) قرار گرفته در معرض تنش گرما، تولید نیتریک اکسید افزایش یافت (۲۵). کاربرد سدیم نیتروپروساید و S-nitroso-N-acetylpenicillamine، که هر دو آزاد کننده نیتریک اکسید هستند، به طور قابل توجهی افزایش نشت یونی حاصل از تنش گرما، اختلال در رشد و کاهش قابلیت زیستی یاخته‌ها را در پنبه نوعی گیاه نی^۲ کاهش دادند (۲۸). پیشنهاد شده است که نقش نیتریک اکسید طی تنش گرما ممکن است از راه کاهش سطح گونه‌های فعال اکسیژن باشد، زیرا ثابت شده است که این ترکیب در فعال کردن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در طول تنش گرما نقش دارد (۲۵).

توت‌فرنگی تجاری (*Fragaria × ananassa* Duch.) از تیره وردسانان (Rosaceae) و یکی از مهم‌ترین محصولات باغی است که ارزش اقتصادی بالایی دارد و به طور گسترده در سراسر دنیا کشت می‌شود (۲۴). با اینکه توت‌فرنگی در دامنه گسترده‌ای از شرایط اقلیمی کشت می‌شود، اما دما یک عامل مهم محدود کننده برای رشد آن است. دمای بهینه برای رشد توت‌فرنگی ۲۰ تا ۲۶ درجه سلسیوس است. دماهای بالاتر و پایین‌تر از دمای بهینه باعث کاهش رشد و نمو و همچنین کاهش فتوسنتز در گیاه توت‌فرنگی می‌شود (۲۲). دمای بالا در محدوده‌ی ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس مانع از گل‌انگیزی در گیاهان توت‌فرنگی روز کوتاه و روز خنثی می‌شود، اما سبب تحریک رشد رویشی و تولید ساقه رونده می‌شود. همچنین، گزارش شده است که دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سلسیوس اثرهای منفی بر ویژگی‌های فیزیکی میوه مانند وزن، اندازه و شکل میوه دارد و در نتیجه عملکرد محصول را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد (۲۴).

در ایران توت‌فرنگی به عنوان محصولی که در مزرعه و گلخانه پرورش می‌یابد اغلب در طی مراحل مختلف رشدی به‌ویژه در طول روز زیر تاثیر تنش دمایی بالا (بالاتر از ۳۶ درجه سلسیوس) قرار می‌گیرد (۳۰). بر اساس اطلاعات موجود تعداد اندکی پژوهش در ایران در رابطه با اثر کاربرد ملاتونین و سدیم نیتروپروساید بر میزان سازگاری گیاهان توت‌فرنگی به تنش دمایی بالا

انجام شده است. بنابراین، در پژوهش حاضر اثر کاربرد خارجی ملاتونین و نیتریک اکسید بر افزایش تحمل به تنش دمای بالا در گیاه توت‌فرنگی از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

ماده‌های گیاهی و تیمارها

به‌منظور انجام پژوهش، نشاهای توت‌فرنگی رقم کردستان از یکی از تولیدکننده‌های تجاری نهال در استان کردستان تهیه شدند. نشاها سپس در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر که حاوی مخلوطی از پرلایت، پیت ماس و خاک با نسبت ۱:۱:۱ بود کشت شده و در گلخانه‌های پژوهشی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان با میانگین نسبی دمای روزانه و شبانه به ترتیب ۲۵ و ۲۰ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و شرایط نور طبیعی نگهداری شدند. پس از گذشت ۳ هفته از کاشت نشاها و در مرحله ۳ تا ۴ برگی گیاهان با دو ترکیب سدیم نیتروپروساید (ترکیب آزاد کننده نیتریک اکسید) و یا ملاتونین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، در سه نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت محلول‌پاشی شدند. هم‌زمان نمونه‌های شاهد با آب مقطر محلول‌پاشی شدند. گیاهان توت‌فرنگی ۲۴ ساعت پس از آخرین محلول‌پاشی، به اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۷۵ درصد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۶۲۰۰ لوکس انتقال یافتند. به منظور اعمال تیمار تنش گرمایی، دمای اتاقک رشد از ۲۵ درجه سلسیوس به صورت تدریجی هر ۲۴ ساعت ۵ درجه سلسیوس تا رسیدن به دماهای ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس افزایش یافت. گیاهان در هر محدوده دمایی به مدت ۲۴ ساعت در اتاقک رشد باقی ماندند و سپس در پایان تیمار دمایی گیاهان به گلخانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند و بی‌درنگ شاخص‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش به صورت فاکتوریل (۳×۵) در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی در سه تکرار، انجام گرفت. در هر تکرار دو بوته گیاه توت‌فرنگی برای هر سطح از تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت.

شاخص خسارت ظاهری

میزان خسارت ظاهری بر اساس ویژگی‌هایی مانند لوله شدن، کلروزه و نکروزه شدن برگ‌ها و به صورت شماره دهی از ۱ تا ۵ محاسبه شد (۲۳). در این روش عدد ۱ برای گیاهان سالم که هیچ نشانه قابل مشاهده‌ای ندارند، عدد ۲ نشان دهنده پیچ خوردن حاشیه برگ است (کمتر از ۱۰ درصد)، عدد ۳ برای گیاهان با حاشیه برگ نکروزه (کمتر از ۲۵ درصد)، عدد ۴ نشانگر کلروزه شدن برگ‌ها به میزان متوسط (کمتر از ۵۰ درصد) و عدد ۵ برای گیاهان با نکروزه شدید است (بیشتر از ۵۰ درصد) (شکل ۱).

محتوای نسبی آب برگ

برای اندازه‌گیری این صفت، برگ‌های به‌طور کامل توسعه‌یافته از هر گیاه جدا گردیده و پس از برش برگ‌ها به قطعه‌های دایره‌ای شکل با استفاده از لوله دیسک بر، وزن تر آن‌ها ثبت گردید. در ادامه نمونه‌های برگ توزین شده به پتری‌دیش‌های درب‌دار حاوی آب مقطر منتقل شدند و سپس در یخچال (با دمای ۴ درجه سلسیوس) به مدت زمان ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از این زمان نمونه‌های برگ از درون آب مقطر خارج گردیده و وزن آماس آن‌ها ثبت شد. در مرحله بعد قطعه‌های برگ به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و وزن خشک آن‌ها ثبت گردید. در پایان محتوای نسبی آب برگ به صورت درصد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۶).

$$100 \times \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})} = \text{محتوای نسبی آب برگ}$$

میزان پرولین

برای اندازه‌گیری میزان پرولین بافت برگ از روش Bates و همکاران (۴) با اندکی تغییر استفاده شد. به این منظور ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم برگ توزین شد و در هاون چینی در ۵ میلی‌لیتر محلول آبی سولفوسالیسیلیک اسید ۱۰ درصد به خوبی سائیده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. در ادامه ۲ میلی‌لیتر از روشناور با ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال ترکیب شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از خنک شدن نمونه‌ها، به هر یک ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به

مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود برداشته شد و هم‌زمان با نمونه‌های استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Shimadzu, UV-VIS 160 ساخت کشور ژاپن) در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت پرولین بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر برگ و با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.



Fig. 1. Effect of melatonin (MT) and sodium nitroprusside (SNP) foliar application on morphological responses of 'Kurdistan' strawberry plants at heat stress. (1) No visible symptoms, (2) slightly curled leaf margin (less than 10%), (3) marginal necrosis (less than 25%) of whole-plant leaves, (4) moderate necrotic areas (less than 50%) on leaves, (5) severe necrotic level (more than 50%) of the leaf area.

شکل ۱- اثر تیمارهای ملاتونین (MT) و سدیم نیتروپروساید (SNP) بر پاسخ‌های مورفولوژیکی گیاهان توت‌فرنگی رقم کردستان در تنش دمای بالا. (۱) گیاهان سالم که هیچ نشانه قابل مشاهده‌ای ندارند، (۲) پیچ خوردن حاشیه برگ (کمتر از ۱۰ درصد)، (۳) گیاهان با حاشیه برگ بافت‌مرده (کمتر از ۲۵ درصد)، (۴) کم‌سبزیگی برگ‌ها به میزان متوسط (کمتر از ۵۰ درصد) و (۵) گیاهان با بافت‌مردگی شدید (بیشتر از ۵۰ درصد).

فلورسانس کلروفیل برگ

فلورسانس کلروفیل (F_v/F_m) برگ با استفاده از دستگاه Plant Efficiency Analyzer (ساخت شرکت ELE International انگلستان) و در ساعت ۱۰ تا ۱۳ اندازه‌گیری شد. پیش از شروع اندازه‌گیری گیره‌های دستگاه به برگ‌های بالغ وصل شدند. این گیره‌ها دارای شکل خاصی هستند که دیود دستگاه به راحتی به آن‌ها وصل می‌شود. گیره‌ها دارای دریچه‌هایی هستند که با بستن آن‌ها قسمت‌های مورد نظر برگ در تاریکی قرار می‌گیرد. هر برگ به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله این گیره‌ها در شرایط تاریکی قرار داده شد. در زمان اندازه‌گیری دیود به گیره متصل شده و سپس با باز کردن دریچه گیره و فشار دادن کلید روی دیود بیشینه کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II به وسیله دستگاه اندازه‌گیری شد.

هیدروژن پراکسید (H_2O_2)

اندازه‌گیری میزان هیدروژن پراکسید به روش Loreto و Velikova (۲۱) انجام شد. بر اساس این روش ۰/۱ گرم بافت برگ در هاون چینی حاوی یک میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد همگن شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH ۷) ۱۰ میلی‌مولار حاوی ۱ میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار ترکیب شد و سپس جذب محلول حاصل در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. میزان هیدروژن پراکسید بر حسب میکرو مول بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

پراکسیداسیون لیپیدی غشا

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا بر اساس غلظت مالون دی آلدئید (MDA) در برگ‌ها اندازه‌گیری شد. به این منظور ۰/۱ گرم از بافت برگ با استفاده از نیتروژن مایع با ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد همگن شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از عصاره رویی ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها در حمام آب گرم (دمای ۹۵ درجه سلسیوس) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس بعد از خنک شدن، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب نور عصاره توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید بر حسب میکرومول در گرم وزن تر بر اساس ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه گردید (۲۶).

گلوکاتایون احیا

برای اندازه‌گیری گلوکاتایون احیا، ۰/۲ گرم بافت برگ با ۲ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید سرد ۵ درصد همگن شد. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سانتیفریوژ در ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. نیم میلی‌لیتر از روشناور به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱۰۰mM, pH ۷) حاوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA و ۵۰ میکرولیتر DTNB (۵، ۵- دی تیوبیس-۲- نیترو بنزوئیک اسید) ۳ میلی‌مولار اضافه شد. جذب عصاره در طول موج ۵۱۲ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف گلوکاتایون رسم گردید و غلظت گلوکاتایون نمونه‌های برگ با استفاده از این منحنی تعیین شد (۱).

آسکوربیک اسید

برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید از روش Liu و همکاران (۲۰) با اندکی تغییر استفاده شد. به این منظور ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی توزین و با ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۶ درصد قطعه‌های برگ به‌طور کامل ساییده شدند. محلول حاصل در ۱۵۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید. عصاره رویی حاصل برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید به کار گرفته شد. مخلوط واکنش (۳ میلی‌لیتر) شامل پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (۷/۴ pH)، آب دیونیزه، TCA ۱۰ درصد، فسفریک اسید (H₃PO₄) ۴۴ درصد، کلراید آهن (FeCl₃) ۳ درصد، ۲، ۲- دی پیریدیل ۴ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره رویی بود. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. جذب رنگ حاصل در طول موج ۵۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت آسکوربیک اسید در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد آسکوربیک اسید محاسبه شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

در ابتدا بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷) که حاوی ۲ میلی‌مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، ۰/۲ درصد تریتون و ۵۰ میلی‌مولار تریس بود، تهیه گردید. سپس ۰/۱ گرم از برگ‌های پودر شده با استفاده از نیتروژن مایع در ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات به خوبی همگن شد. عصاره حاصل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g سانتیفریوژ شدند. فاز رویی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به کار گرفته شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس مهار در کاهش فتوشیمیایی NBT (نیتروبلوترازولیوم) با توجه به روش گزارش شده توسط Krantev و همکاران (۱۶) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش ترکیبی از ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH ۷/۸)، ۲۰۰ میکرولیتر NBT ۰/۰۵ میلی‌مولار، ۴۰۰ میکرولیتر متیونین ۱۰ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر ریبولوین ۰/۰۰۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به داخل لوله‌های آزمایش منتقل شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در زیر نور لامپ فلورسانس ۱۵ وات قرار گرفتند. بعد از خاموش کردن لامپ واکنش متوقف شد و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی که دارای بیشینه شدت رنگ بود به عنوان شاهد و از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی نور ندیده برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش Cohen و همکاران (۷) انجام شد. برای این منظور داخل کوت ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH ۷) ریخته شد و به آن ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی برگ و مقدار ۳/۸ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳۵ درصد اضافه شد. بی‌درنگ تغییرهای جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر در بازه زمانی ۶۰ ثانیه خوانده شد. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز از تقسیم فعالیت حجمی کاتالاز بر میزان پروتئین عصاره محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از H₂O₂ با روش Zhou و همکاران (۳۷) اندازه‌گیری شد. به این منظور به ۳ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول، ۳/۸ میکرولیتر H₂O₂ و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. بی‌درنگ تغییرهای جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر و مدت زمان ۱۲۰ ثانیه خوانده شد.

هر یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته می شود که موجب اکسید شدن یک میکرومول گایاکول در هر دقیقه می شود.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، با روش Cakmak و Marschner (۵) و بر اساس میزان اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۷)، ۴/۵۱ میکرولیتر H_2O_2 ، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرهای جذب بر زمان، در مدت یک دقیقه ثبت گردید.

تجزیه های آماری

تجزیه واریانس داده های مربوط به هر صفت به کمک نرم افزار آماری SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگین ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. نمودارها و جدول ها با نرم افزار Excel 2019 رسم شد.

نتایج و بحث

شاخص خسارت ظاهری

نتیجه ها نشان داد دما و کاربرد ترکیب های شیمیایی (ملاتونین و نیتریک اکسید) اثر معنی داری بر شاخص خسارت ظاهری گیاهان داشت (جدول ۱). با افزایش دما شاخص خسارت ظاهری افزایش و نشانه هایی مانند پیچش، کم سبزیگی و بافت مردگی برگ ها گسترش یافت. پس از اعمال تیمارهای دمای بالا، در آن گروه از گیاهان که تیمارهای ترکیب های شیمیایی را دریافت نکرده بودند (شاهد) خسارت های ظاهری دمای بالا مشهود بود در حالی که در گیاهان تیمار شده با ملاتونین و یا نیتریک اکسید (به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار) بروز آسیب ها اندک بود؛ به گونه ای که کمترین خسارت ظاهری مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین (۱/۱۱) و نیتریک اکسید (۱/۱۸) بود که بدون تفاوت معنی دار نسبت به هم باعث کاهش حدود ۵۰ درصدی خسارت ظاهری نسبت به تیمار شاهد (۲/۲۳) شدند (شکل ۱ و جدول ۱). برهمکنش تنش دمایی و کاربرد ترکیب های شیمیایی نیز نشان داد هر چند در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاربرد خارجی ملاتونین و یا نیتریک اکسید اثری بر شاخص خسارت ظاهری نداشت، اما در هر دو دمای ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس استفاده از این ترکیب های شیمیایی (به ویژه غلظت ۱۰۰ میکرومولار) باعث کاهش معنی دار خسارت ظاهری نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۱).

در پژوهش حاضر، تنش دمایی با ظهور خسارت های ظاهری در گیاهان همراه بود و کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید سبب کاهش این نشانه ها شد. ملاتونین و نیتریک اکسید با تعدیل انباشت رادیکال های آزاد مانند هیدروژن پراکسید، مهار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش کارایی فتوسنتز II، آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش گرما و در نتیجه نشانه های گرمادگی مانند لوله شدن، کلروزه و نکروزه شدن برگ ها را کاهش می دهند (۱۳، ۲۷). مطالعه های پیشین نشان داد که ملاتونین با فعال سازی ساخت سایتوکاینین و مشارکت در مسیرهای پیام های مهار تولید آبسزیک اسید در گیاهان از پیری ناشی از دمای بالای برگ ها جلوگیری می کند (۳۵). این نتیجه ها با یافته های Jahan و همکاران (۱۳) در گوجه فرنگی و Li و همکاران (۱۹) در ذرت همخوانی دارد. آن ها نشان دادند کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید باعث کاهش صدمه های دمایی و بهبود درصد بقای دانه های این گیاهان در تنش دمای بالا شدند.

محتوای نسبی آب برگ

نتیجه های حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که دما، کاربرد ترکیب های شیمیایی (ملاتونین و نیتریک اکسید) و برهمکنش این دو، اثر معنی داری بر درصد رطوبت نسبی برگ داشت (جدول ۱). درصد رطوبت نسبی برگ با افزایش دما از ۲۵ به ۳۵ و سپس ۴۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۴/۴۶ درصد و ۹/۸۹ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت. در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس تفاوت معنی داری در محتوای رطوبت نسبی برگ بین گیاهان تیمار شده با نیتریک اکسید و ملاتونین با نمونه های شاهد مشاهده نشد. در مقابل در شرایط دمایی ۴۰ درجه سلسیوس همه تیمارهای نیتریک اکسید و ملاتونین سبب افزایش معنی دار محتوای نسبی آب برگ شد. در این دما بیشترین درصد محتوای آب نسبی برگ (۷۹/۷۴ درصد) مربوط به

کاربرد ۱۰۰ میلی مولار ملاتونین بود که سبب افزایش ۱۸/۸۷ درصدی محتوای آب نسبی برگ نسبت به نمونه‌های شاهد شد (جدول ۱).

جدول ۱- اثر کاربرد برگ‌گی ملاتونین (MT) و سدیم نیتروپروساید (SNP) بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه توت‌فرنگی رقم کردستان در تنش دمایی بالا.

Table 1. Effect of melatonin (Mel) and sodium nitroprusside (SNP) foliar application on some physiological parameters of 'Kurdistan' strawberry plants at heat stress.

تیماها Treatments		ویژگی‌ها Parameters			
دما Temperature (°C)	ترکیب شیمیایی Chemical compounds (µM)	خسارت ظاهری Injury symptom	محتوای نسبی آب برگ RWC (%)	هیدروژن پراکسید H ₂ O ₂ (µmolg ⁻¹ FW)	مالون دی‌آلدئید MDA (µmolg ⁻¹ FW)
25	0	1 e	81.12 a-d	2.24 g	1.82 cd
	50 Mel	1 e	83.67 a	2.38 e-g	1.89 cd
	100 Mel	1 e	82.79 ab	2.29 f-g	1.84 cd
	50 SNP	1 e	82.19 a-c	2.48 d-g	1.77 d
	100 SNP	1 e	80.41 a-e	2.31 fg	1.73 d
35	0	2.16 b	76.15 fg	3.11 bc	2.22 c
	50 Mel	1.83 bc	78.76 c-f	2.66 d-f	2.06 cd
	100 Mel	1.25 de	80.02 a-f	2.41 e-g	1.78 d
	50 SNP	1.66 cd	77.88 d-f	2.74 c-e	1.93 cd
	100 NP	1.41 c-e	79.08 b-f	2.41 e-g	1.85 cd
40	0	3.53 a	67.08 i	3.65 a	3.17 a
	50 Mel	1.58 cd	71.65 h	3.11 bc	2.78 ab
	100 Mel	1.08 e	79.74 b-f	2.61 d-g	1.90 cd
	50 SNP	1.33 de	73.95 gh	3.16 b	2.69 b
	100 SNP	1.14 e	77.15 fg	2.81 b-d	2.16 cd
میانگین برای دما Means for temperature (°C)					
	25	1 b	82.03 a	2.34 c	1.81 b
	35	1.66 a	78.37 b	2.66 b	1.97 b
	40	1.73 a	73.91 c	3.07 a	2.54 a
میانگین برای ترکیب‌های شیمیایی Means for chemical compounds (µM)					
	0	2.23 a	74.78 c	3 a	2.40 a
	50 Mel	1.47 b	78.02 b	2.72 bc	2.25 ab
	100 Mel	1.11 c	80.84 a	2.44 d	1.84 d
	50 SNP	1.33 bc	78.01 b	2.79 ab	2.13 bc
	100 SNP	1.18 c	78.88 ab	2.51 cd	1.91 cd
معنی داری Significance					
	دما	***	***	***	***
	Temperature				
	ترکیب شیمیایی	***	***	***	***
	Chemical compounds				
	دما × ترکیب شیمیایی	***	**	*	*
	Temperature × Chemical compounds				

Mean values (means ± SE) followed by the same letter-case within each column are not significantly different in 5% level of probability using LSD test. ***, **, and * indicate significance at 0.001, 0.01, and 0.05 levels of probability, respectively.

در هر ستون میانگین‌های با حرف‌های مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD ندارند. ***, **, و * به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ می‌باشند.

دمای بالا سبب افزایش تعرق و در نتیجه کاهش رطوبت نسبی و همچنین کاهش آماس برگ‌ها می‌گردد. یاخته‌های گیاهی برای مقابله با کمبود آب، اسمولیت‌هایی مانند پرولین را درون خود انباشت می‌دهند. افزایش محتوای نسبی آب برگ در گیاهان تیمار شده با ملاتونین و نیتریک اکسید در تنش دمای بالا به احتمال به دلیل افزایش انگیزش ساخت پرولین و بهبود ظرفیت جذب آب توسط یاخته‌ها و در نتیجه حفظ تعادل آب یاخته‌ای می‌باشد. این نتیجه‌ها با یافته‌های Jahan و همکاران (۱۳) در گیاه گوجه‌فرنگی همسویی دارد.

پرولین

با توجه به نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها دما و کاربرد نیتریک اکسید و ملاتونین اثر معنی‌داری بر پرولین برگ داشت، اما این فاکتور زیر تاثیر برهمکنش دما و کاربرد این ترکیب‌ها قرار نگرفت (شکل ۲-الف). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش دما میزان پرولین برگ به طور معنی‌دار افزایش یافت به گونه‌ای که در دمای ۴۰ درجه سلسیوس میزان پرولین (۱۳/۵۷ میکرومول بر گرم وزن تازه) ۹۲ درصد بیشتر از گیاهان در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۲-الف). نتیجه‌ها همچنین نشان داد کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار ملاتونین و هر دو غلظت نیتریک اکسید سبب افزایش معنی‌دار میزان پرولین برگ توت‌فرنگی نسبت به نمونه‌های شاهد شدند. در مجموع، بیشترین میزان پرولین برگ مربوط به تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین (۱۱/۰۸ میکرومول بر گرم وزن تازه) و ۱۰۰ میکرومولار نیتریک اکسید (۱۰/۸۲ میکرومول بر گرم وزن تازه) بود که بدون تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر به ترتیب سبب افزایش ۲۳ و ۲۰ درصدی میزان پرولین برگ نسبت به گیاهان شاهد شدند (شکل ۲-الف). تنظیم‌کننده‌های اسمزی از جمله پرولین با مشارکت در تنظیم اسمزی یاخته‌ها، تثبیت فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن و حفظ یکپارچگی غشاها نقش مهمی در گیاهان در برابر تنش ایفا می‌کنند. پرولین به عنوان یک محافظ اسمزی نقش مهمی در حفظ آماس یاخته‌ها در شرایط تنش دارد و ساخت پروتئین‌های مهمی را که در پاسخ به تنش ضروری هستند، آسان می‌سازد (۱۲). ملاتونین با افزایش بیان ژن مسئول زیست‌ساخت پرولین (*P5CS*) و نیتریک اکسید با افزایش فعالیت آنزیم‌های مسئول ساخت پرولین و جلوگیری از فعالیت آنزیم پرولین دهیدروناز که تجزیه‌کننده پرولین است، سبب افزایش انباشت پرولین در شرایط تنش‌زا می‌شوند (۱۳). مقدار پرولین در گیاهان گوجه‌فرنگی و توت‌فرنگی نیز که به ترتیب با ملاتونین و سدیم نیتروپرو ساید تیمار شدند، زیر تنش دمای بالا و شوری به میزان قابل توجهی نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (۱۳، ۱۴).

فلورسانس کلروفیل برگ

دما و کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید اثر معنی‌داری بر میزان فلورسانس کلروفیل برگ داشت، اما این فاکتور زیر تاثیر برهمکنش دما و کاربرد ترکیب‌های شیمیایی قرار نگرفت (شکل ۲-ب). مقایسه میانگین‌ها نشان داد فلورسانس کلروفیل برگ توت‌فرنگی رقم کردستان تنها در دمای ۴۰ درجه سلسیوس کاهش معنی‌دار نشان داد به گونه‌ای که ۴/۸۲ درصد کمتر از مقدار آن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۲-ب). بررسی اثر تیمارهای شیمیایی نیز نشان داد تنها کاربرد غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و نیتریک اکسید سبب جلوگیری از کاهش معنی‌دار فلورسانس کلروفیل برگ شد.

مطالعه فلورسانس کلروفیل ابزاری قدرتمند و پر کاربرد برای بررسی وضعیت عملکرد فتوسیستم II است. کاهش این شاخص بر اثر افزایش دما در آزمایش حاضر نشان‌دهنده آسیب وارد شده به مرکز واکنش فتوسیستم II و اختلال در عملکرد کمپلکس‌های برداشت‌کننده نور است که می‌تواند به دلیل افزایش انباشت هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید تولید شده زیر تاثیر تنش دمای بالا باشد (۳۶). در پژوهش حاضر، همبستگی منفی بین فلورسانس کلروفیل با مقادیر هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید (به ترتیب $r^2 = 0.90, p < 0.001$ و $r^2 = 0.94, p < 0.001$) مشاهده شد که این یافته‌ها می‌تواند به تائید این فرضیه کمک نماید.

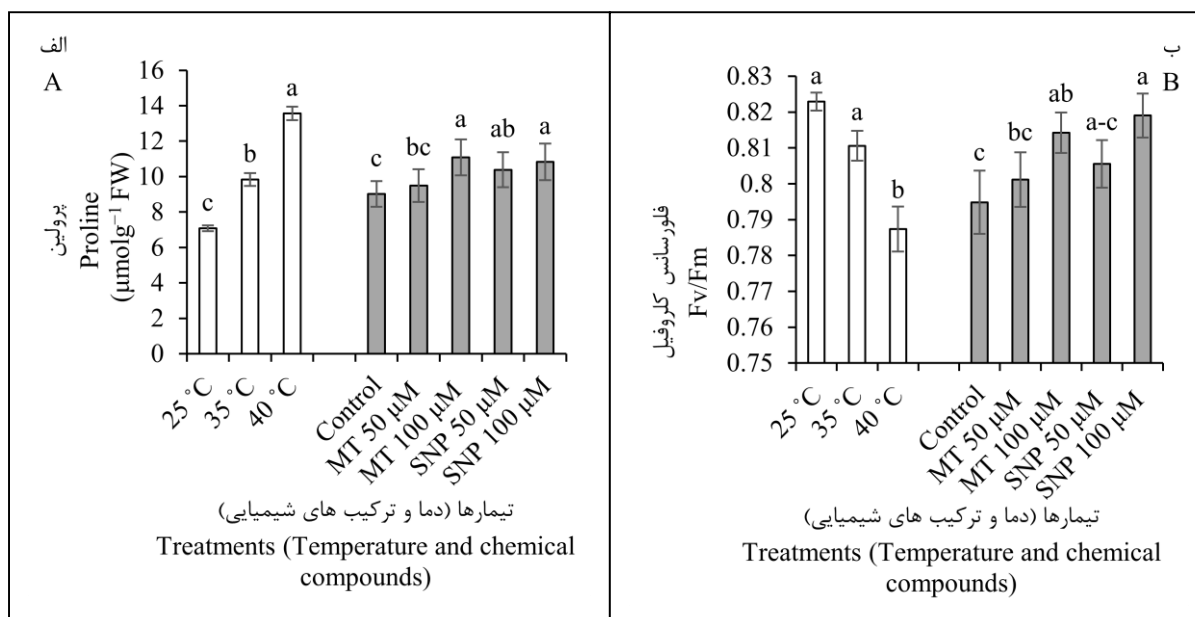


Fig. 2. Effect of melatonin (MT) and sodium nitroprusside (SNP) foliar application on leaf proline content (A) and maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m) (B) in 'Kurdistan' strawberry plants at heat stress. Mean values followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$).

شکل ۲- اثر کاربرد برگ‌گی ملاتونین (MT) و سدیم نیتروپروساید (SNP) بر میزان پرولین (الف) و بیشینه کارایی کوانتومی سیستم نوری دو (ب) در گیاهان توت‌فرنگی رقم کردستان زیر تنش دمایی بالا. میانگین‌های با حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

در پژوهش حاضر، کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید موجب افزایش فلورسانس کلروفیل برگ گیاه توت‌فرنگی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس شد. این نتیجه‌ها با یافته‌های Yang و همکاران (۳۳) در داوودی (*Chrysanthemum morifolium* L.) و Xu و همکاران (۳۲) در گوجه‌فرنگی که نشان دادند کاربرد نیتریک اکسید و ملاتونین باعث افزایش فلورسانس کلروفیل برگ در شرایط تنش دمایی بالا شد، همخوانی دارد. نیتریک اکسید و ملاتونین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از انباشت رادیکال‌های آزاد مانند هیدروژن پراکسید، حفظ یکپارگی غشای یاخته‌ای و در نتیجه کاهش خسارت به فتوسیستم II موجب افزایش عملکرد این فتوسیستم شده است. همچنین، حفظ عملکرد فتوسیستم II ممکن است به اثر ملاتونین و نیتریک اکسید در مهار تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش محتوای کلروفیل برگ مرتبط باشد (۳۳). از طرفی دیگر نیتریک اکسید می‌تواند با تنظیم بیان ژن *psbA* نقش مهمی در حفاظت از فتوسیستم II ایفا کند و کارایی فتوشیمیایی این فتوسیستم را بهبود ببخشد (۱۱).

هیدروژن پراکسید و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد در گیاهانی که تیمارهای ملاتونین و نیتریک اکسید را دریافت نکردند (شاهد) با افزایش دما هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید برگ نیز افزایش معنی‌داری یافت به گونه‌ای که در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به ترتیب افزایش ۶۲/۹۴ و ۷۴/۱۷ درصدی نسبت به شاهد (دمای ۲۵ درجه سلسیوس) نشان دادند (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها همچنین بیانگر آن بود که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید تاثیری بر مقادیر هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید برگ نداشت (جدول ۱). این در حالی است که در دماهای ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سبب کاهش معنی‌دار هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید برگ‌های گیاه توت‌فرنگی نسبت به گیاهان شاهد شدند (جدول ۱). کمترین میزان هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید برگ در بالاترین سطح تیمار دمایی اعمال شده (۴۰ درجه سلسیوس) مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و نیتریک اکسید بود که بدون تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر به ترتیب سبب کاهش ۲۸/۴۹ و ۲۳/۰۱ درصدی هیدروژن پراکسید و ۴۰/۰۶ و ۳۱/۸۶ درصدی مالون دی‌آلدئید نسبت به گیاهان تیمار نشده، شدند (جدول ۱).

در مطالعه حاضر، تنش دمایی بالا در نمونه‌های تیمار نشده سبب انگیزش تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید و افزایش انباشت مالون دی آلدئید برگ شد که با کاربرد هر دو ترکیب نیتریک اکسید و ملاتونین به میزان قابل توجهی کاهش یافت. در تایید این نتیجه‌ها گزارش شده است که نیتریک اکسید با تنظیم مکانیزم‌های هومئوستازی واکنش‌های اکسایش-کاهش یاخته‌ای، افزایش تبدیل رادیکال سوپر اکسید به آب و اکسیژن و همچنین با افزایش فعالیت آنزیم‌های مهارکننده هیدروژن پراکسید، گیاه را از آسیب اکسیداسیون محافظت می‌کند (۱۸). انباشت هیدروژن پراکسید و مالون دی آلدئید در گیاهان چچم (*Lolium perenne* L.) تیمار شده با نیتریک اکسید، زیر تنش دمایی به میزان قابل توجهی کاهش یافت (۱۰). مکانیزم اصلی کاهش انباشت هیدروژن پراکسید در نمونه‌های تیمار شده با ملاتونین به این دلیل است که این ترکیب به عنوان یک دهنده الکترون عمل کرده و گونه‌های فعال اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید را سم‌زدایی می‌نماید (۲).

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

مقادیر گلوتاتیون و آسکوربیک اسید برگ توت‌فرنگی تغییرهای مشابهی را با افزایش دما نشان دادند. این تغییرها به گونه‌ای بود که مقادیر این آنتی‌اکسیدان‌ها با افزایش دما به ۳۵ درجه سلسیوس به تدریج افزایش یافت و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به بیشینه مقدار (به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) رسید (شکل ۳). نتیجه‌ها همچنین نشان داد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید اثری بر گلوتاتیون و آسکوربیک اسید برگ نداشت (شکل ۳). در مقابل، در شرایط تنش دمایی (۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس) همه غلظت‌های ملاتونین و نیتریک اکسید سبب افزایش معنی‌دار مقدار گلوتاتیون برگ گیاهان نسبت به گیاهان شاهد شدند (شکل ۳-الف). همچنین، آسکوربیک اسید برگ در تیمارهای دمایی ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس در واکنش به کاربرد هر دو غلظت ملاتونین و تنها غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیتریک اکسید افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (شکل ۳-ب).

دمای بالا منجر به تنش اکسیداتیو، آسیب به ماکرومولکول‌های زیستی (پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک) و غشا در اثر انباشت بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۳۴). بنابراین، افزایش تحمل به تنش دمایی با تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی ارتباط دارد. یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌های دفاعی گیاهان برای مقابله با آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله انباشت بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش دمایی، افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌باشد. سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربیک اسید و گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکورات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز است. در پژوهش حاضر، غلظت آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند گلوتاتیون احیا و آسکوربیک اسید برگ توت‌فرنگی در سطوح مختلف دماهای بالا افزایش یافت. گلوتاتیون احیا نقش‌های متعددی دارد و با مهار اکسیداسیون آنزیم‌ها و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، گیاهان را از تنش دمایی بالا محافظت می‌کند (۹). آسکوربیک اسید به دلیل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی یکی از عوامل اصلی محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های اکسیداتیو است. نتیجه‌های آزمایش حاضر گویای آن است که کاربرد هر دو نوع ترکیب ملاتونین و نیتریک اکسید در تنش دمایی بالا منجر به افزایش غلظت گلوتاتیون احیا و آسکوربیک اسید در برگ گیاهان توت‌فرنگی شد. هم‌راستا با این یافته‌ها، نتیجه‌های مشابهی در دیگر گیاهان مانند گوجه‌فرنگی گزارش شده است (۳۱). نیتریک اکسید نقش مهمی در چرخه‌ی آسکورات-گلوتاتیون ایفا می‌کند. نیتریک اکسید با افزایش زیست‌ساخت گلوتاتیون و یا افزایش تشکیل سیستمین که پیش ماده سازنده گلوتاتیون است، در افزایش سطح گلوتاتیون یاخته‌ها نقش دارد (۲۵). افزایش غلظت گلوتاتیون در تنظیم فعالیت آنزیم‌های منویدروآسکورات ردوکتاز و دهیدروآسکورات ردوکتاز نقش دارد که می‌تواند مسئول تشکیل آسکوربیک اسید باشد (۳۱). همچنین، سطوح بالاتر گلوتاتیون و آسکوربیک اسید در گیاهان تیمار شده با ملاتونین نشان می‌دهد که ملاتونین یک واسطه در مسیرهای مختلف آنتی‌اکسیدانی مانند چرخه آسکورات-گلوتاتیون است و استفاده از آن می‌تواند توانایی آنتی‌اکسیدانی گیاهان توت‌فرنگی را بهبود بخشد.

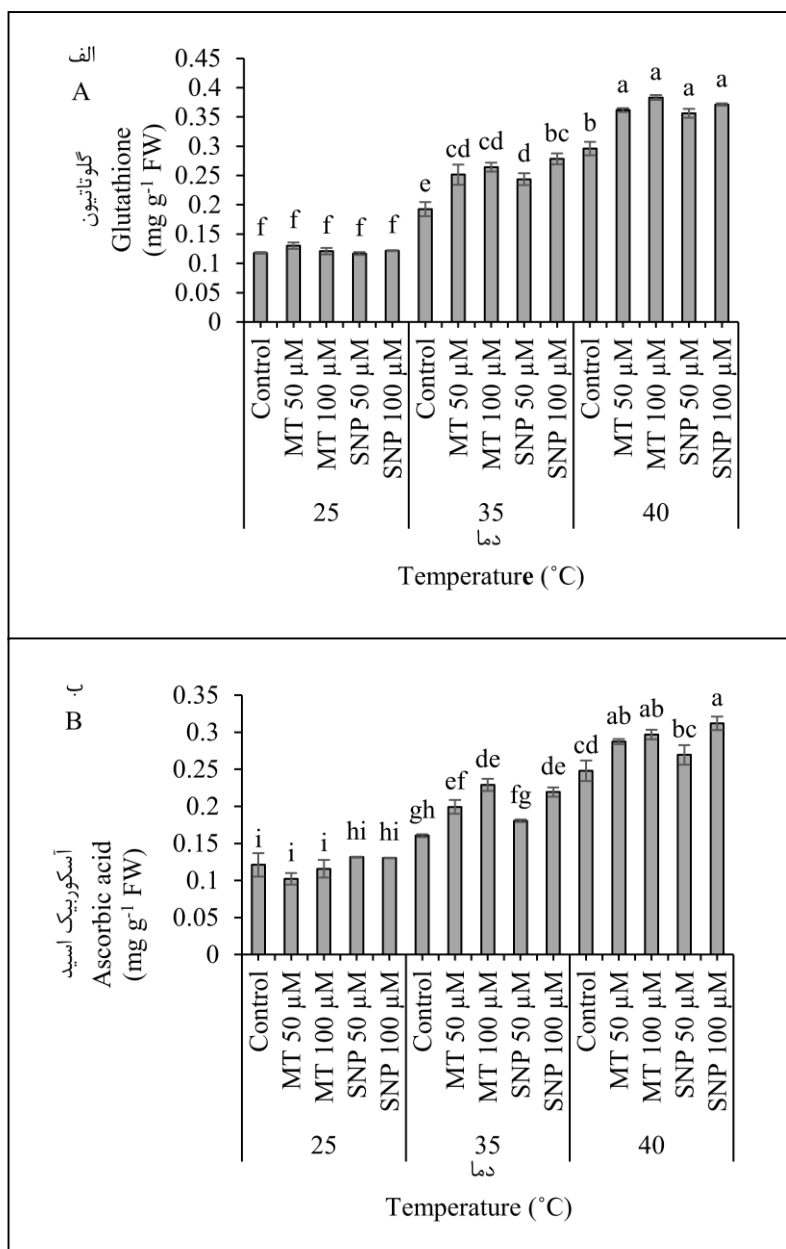


Fig. 3. Effect of melatonin (MT) and sodium nitroprusside (SNP) foliar application on leaf reduced glutathione (B) and ascorbic acid content (A) in 'Kurdistan' strawberry plants at heat stress. Mean values followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$).

شکل ۳- اثر کاربرد برگ‌گی ملاتونین (MT) و سدیم نیتروپروساید (SNP) بر میزان گلویتاتیون احیای برگ (الف) و میزان آسکوربیک اسید (ب) در برگ‌های گیاهان توت‌فرنگی رقم کردستان زیر تنش دمایی بالا. میانگین‌های با حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

در همه تیمارها با افزایش دما فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید اثری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ نداشت (شکل ۴). این در حالی است که در شرایط تنش دمایی (۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس) کاربرد همه غلظت‌های ملاتونین و نیتریک اکسید سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ نسبت به گیاهان شاهد شدند. در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کاربرد نیتریک اکسید موثرتر از تیمارهای ملاتونین بود به گونه‌ای که بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این دما مربوط به کاربرد ۱۰۰

میکرومولار نیتریک اکسید بود که باعث افزایش ۹۱ درصدی فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد شد. در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نیز بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و نیتریک اکسید مشاهده شد (شکل ۴- الف).

بر خلاف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، در گیاهانی که تیمارهای ملاتونین و نیتریک اکسید را دریافت نکردند (شاهد) با افزایش دما فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به ترتیب به میزان ۵۸/۷۵ و ۶۱/۱۴ در صد نسبت به کاربرد ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین و ۵۶/۹۳ و ۶۴/۹۵ درصد نسبت به کاربرد ۱۰۰ میکرومولار نیتریک اکسید کاهش یافت (شکل‌های ۴- ب و ج). برهمکنش دما و کاربرد ترکیب‌های شیمیایی نشان داد هرچند در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید اثری بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نداشت، اما در شرایط تنش دمایی (۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس) کاربرد غلظت‌های مختلف ملاتونین و نیتریک اکسید سبب افزایش فعالیت هر دو این آنزیم‌ها در برگ توت‌فرنگی شدند (شکل‌های ۴- ب و ج).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز همانند فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش دما افزایش یافت. نتیجه‌ها نشان داد در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تیمارهای ۵۰ میکرومولار نیتریک اکسید و ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به گیاهان شاهد شدند. در دمای ۴۰ درجه سلسیوس کاربرد هر دو غلظت ملاتونین و غلظت ۵۰ میکرومولار نیتریک اکسید نیز باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد شدند. نتیجه‌ها همچنین نشان داد هر چند در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ملاتونین و نیتریک اکسید بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مشاهده نشد، اما در دمای ۴۰ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم در تیمارهای ملاتونین به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای نیتریک اکسید بود (شکل ۴- د).

در آزمایش حاضر، دمای بالا منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاه توت‌فرنگی شد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاع آنتی‌اکسیدانی است و رادیکال سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید تبدیل می‌نماید. در ادامه هیدروژن پراکسید توسط آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و یا گایاکول پراکسیداز در قسمت‌های مختلف یاخته به آب و اکسیژن تجزیه می‌شود (۳). نتیجه‌های حاصل از آزمایش حاضر نشان داد که تیمار گیاهان با ملاتونین و نیتریک اکسید موجب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گیاهانی که این تیمارها را دریافت نکرده بودند شد. ملاتونین افزون بر از بین بردن مستقیم بسیاری از رادیکال‌های آزاد به عنوان یک سیگنال مولکولی در سطح یاخته‌ای عمل کرده و فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌نماید (۸). مطالعه‌های پیشین نیز نقش ملاتونین در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای افزایش تحمل به شرایط نامساعد محیطی در گیاهانی مانند فلفل (۱۵) را نشان داده است. عملکرد آنتی‌اکسیدانی نیتریک اکسید در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از دمای بالا به دلیل حفظ هومئوستازی ردوکس یاخته‌ای و توانایی آن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد مضر می‌باشد (۳۳). بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در طول دوره تنش دمایی یکی از پاسخ‌های محافظتی رایج ایجاد شده به وسیله نیتریک اکسید در اغلب گونه‌های گیاهی است. به عنوان مثال تیمار گیاه گندم معمولی با ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز محلول شد که با تحمل ساقه‌پوش‌های گیاه به دمای بالا (به مدت ۱۰ دقیقه شوک دمایی) در ارتباط مثبت بودند (۲۵).

تجزیه به مولفه‌های اصلی

تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که دو مولفه اول در مجموع ۹۰/۴۶ درصد از کل تغییرهای صفتهای اندازه‌گیری شده در گیاهان توت‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های مختلف ملاتونین و نیتریک اکسید که در معرض دماهای بالا قرار گرفتند را توجیه کردند (شکل ۵).

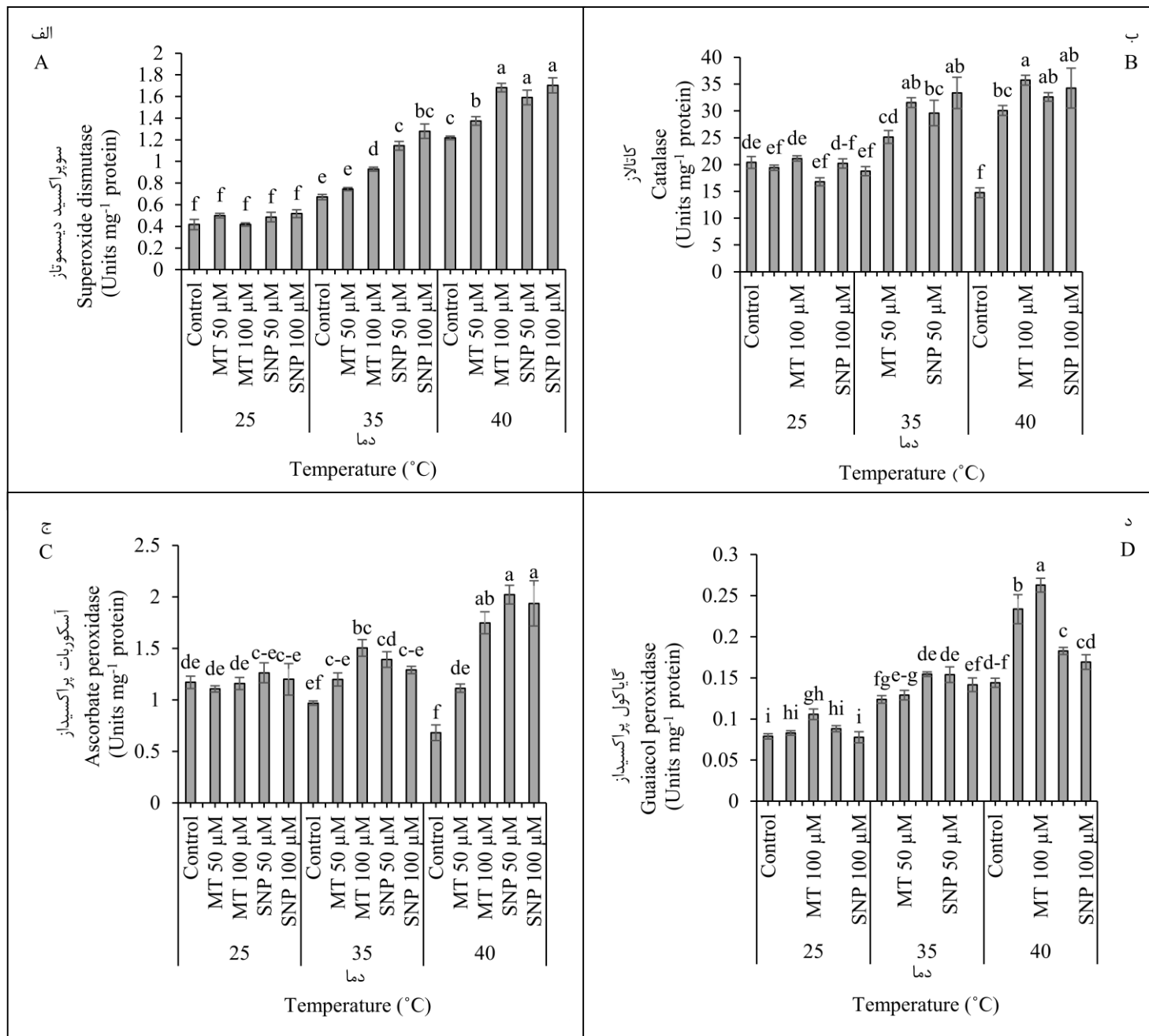


Fig. 4. Effect of melatonin (MT) and sodium nitroprusside (SNP) foliar application on superoxide dismutase (A), catalase (B), ascorbate peroxidase (C), and guaiacol peroxidase (D) activities in the leaves of 'Kurdistan' strawberry plants at heat stress. Mean values followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$).

شکل ۴- اثر کاربرد برگ‌گی ملاتونین (MT) و سدیم نیتروپروساید (SNP) بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (الف)، کاتالاز (ب)، آسکوربات پراکسیداز (ج) و گایاکول پراکسیداز (د) گیاهان توت‌فرنگی رقم کردستان در تنش دمایی بالا. میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

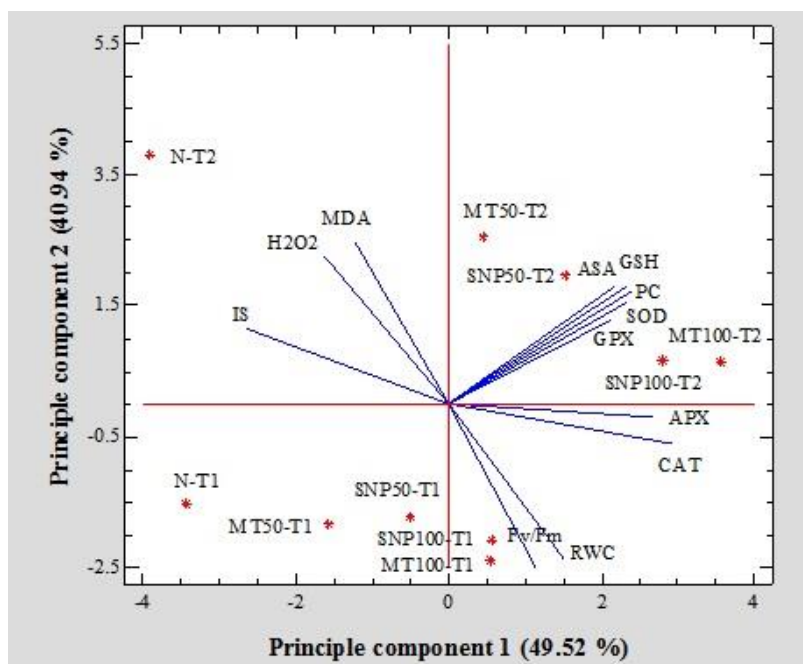


Fig. 5. Principal component analysis (PCA) of investigated parameters. IS: Injury symptoms, RWC: Relative leaf water content, PC: Proline, F_v/F_m : Chlorophyll fluorescence, H_2O_2 : Hydrogen peroxide, MDA: Malondialdehyde, GSH: Glutathione, ASA: Ascorbic acid, SOD: Superoxide dismutase, CAT: Catalase, APX: Ascorbate peroxidase and GPX: Guaiacol peroxidase of strawberry plants (cv. Kurdistan) treated with melatonin (MT) and sodium nitroprusside (SNP) at heat stress. (N-T1: control plants at 35 °C, MT50-T1: 50 μ M melatonin at 35 °C, MT100-T1: 100 μ M melatonin at 35 °C, SNP50-T1: 50 μ M SNP at 35 °C, SNP100-T1: 100 μ M SNP at 35 °C, N-T2: control plants at 40 °C, MT50-T2: 50 μ M melatonin at 40 °C, MT100-T2: 100 μ M melatonin at 40 °C, SNP50-T2: 50 μ M SNP at 40 °C, SNP100-T2: 100 μ M SNP at 40 °C.

شکل ۵- تجزیه به مولفه‌های اصلی پارامترهای ارزیابی شده. IS: خسارت ظاهری، RWC: محتوای نسبی آب برگ، PC: مقدار پرولین، F_v/F_m : فلورسانس کلروفیل، H_2O_2 : هیدروژن پراکسید، MDA: مالون دی آلدئید، GSH: گلوتاتیون، ASA: آسکوربیک اسید، SOD: سوپراکسید دیسموتاز، CAT: کاتالاز، APX: آسکوربات پراکسیداز، GPX: گایاکول پراکسیداز گیاه توت فرنگی رقم کردستان تیمار شده با ملاتونین (MT) و سدیم نیتروپروساید (SNP) در تنش دمایی بالا N-T1: گیاهان شاهد در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، MT50-T1: ۵۰ میکرومولار ملاتونین در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، SNP50-T1: ۵۰ میکرومولار SNP در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، SNP100-T1: ۱۰۰ میکرومولار SNP در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، MT50-T2: ۵۰ میکرومولار ملاتونین در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، N-T2: گیاهان شاهد در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، MT100-T2: ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، SNP50-T2: ۵۰ میکرومولار SNP در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، SNP100-T2: ۱۰۰ میکرومولار SNP در دمای ۴۰ درجه سلسیوس.

به طوری که این دو مولفه به ترتیب ۴۹/۵۲ و ۴۰/۹۴ درصد از این سهم را به خود اختصاص دادند. بنابراین، نمودار بای پلات بر اساس دو مولفه اصلی اول که بخش قابل توجهی از تغییرها را توجیه کردند، ترسیم شد. مقادیر بردار ویژه برای مولفه اول نشان داد که صفتهای مرتبط با تحمل گیاه به تنش دمایی بالا مانند محتوای رطوبت نسبی، میزان پرولین، شاخص فلورسانس کلروفیل و فعالیت آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی و غیر آنزیمی وزنه‌ی مثبت و بیشتری در این مولفه دارند. مقادیر شاخص خسارت ظاهری، هیدروژن پراکسید و مالون دی آلدئید که نشانگر تاثیرهای نامطلوب دمایی بالا و تنش اکسیداتیو می‌باشند، در این مولفه منفی و بزرگ است، اما همین صفتهای در مولفه دوم دارای مقادیر مثبت بزرگ‌تری بودند. شیوه پراکنش تیمارها بر اساس مولفه‌های اول و دوم در شکل ۵ حاکی از آن است در گیاهانی که تیمار ترکیب‌های شیمیایی را دریافت نکرده بودند از نظر مولفه دوم دارای مقادیر بالا و از نظر مولفه اول دارای مقادیر پایین می‌باشند. این در حالی است که تیمارهای ملاتونین و نیتریک اکسید به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار زیر تنش دماهای بالا بیشترین مقدار از مولفه اول و مقدار بسیار کمتری از مولفه دوم را به خود اختصاص دادند (شکل ۵).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر تنش دمایی بالا سبب ایجاد آسیب‌های مورفولوژیکی مانند پیچش، کلروزه و نکروزه شدن برگ‌ها گردید و کاربرد ملاتونین و نیتریک اکسید منجر به کاهش این آسیب‌ها شد. این ترکیب‌ها موجب افزایش عملکرد فتوشیمیایی فتوسیستم II، به‌ترتیب افزایش ۲۲/۹۷ و ۲۰/۰۹ درصدی مقدار پرولین در مقایسه با گیاهان شاهد و حفظ محتوای آب نسبی برگ‌ها شد. ملاتونین و نیتریک اکسید از راه ممانعت از انباشت هیدروژن پراکسید و به‌ترتیب کاهش ۲۳/۳۳ و ۲۰/۴۲ درصدی ساخت مالون دی‌آلدئید نسبت به گیاهان تیمار نشده، کاهش آسیب اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی اثرهای نامطلوب دمایی بالا بر نشاهای توت‌فرنگی را کاهش داد.

Reference

منابع

1. AL-Huqail, A.A., S.A. AL-Rashed, M.M. Ibrahim, G.A. EL-Gaaly, and M.I. Qureshi. 2017. Arsenic induced eco-physiological changes in Chickpea (*Cicer arietinum*) and protection by gypsum, a source of sulphur and calcium. *Sci. Hort.* 217:226–233.
2. Alam, M.N., L. Zhang, L. Yang, M.R Islam, Y. Liu, H. Luo, P. Yang, Q. Wang, and Z. Chan. 2018. Transcriptomic profiling of tall fescue in response to heat stress and improved thermotolerance by melatonin and 24-epibrassinolide. *BMC Genom.* 19:1–14.
3. Arora, A., R.K. Sairam, and G.C. Srivastava. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82:1227–1238.
4. Bates, L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39:205–207.
5. Cakmak, I. and H. Marschner. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98:1222–1227.
6. Chen, Y-E., J-M. Cui, Y-Q. Su, S. Yuan, M. Yuan, and H-Y. Zhang. 2015. Influence of stripe rust infection on the photosynthetic characteristics and antioxidant system of susceptible and resistant wheat cultivars at the adult plant stage. *Front. Plant Sci.* 6:1–11.
7. Cohen, G., D. Dembiec, and J. Marcus. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 34:30–38.
8. Ding, F., B. Liu, and S. Zhang. 2017. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. *Sci. Hort.* 219:264–271.
9. Ding, X., Y. Jiang, L. He, Q. Zhou, J. Yu, D. Hui, and D. Huang. 2016. Exogenous glutathione improves high root-zone temperature tolerance by modulating photosynthesis, antioxidant and osmolytes systems in cucumber seedlings. *Sci. Rep.* 6:1–12.
10. Dong, Y., L. Xu, Q. Wang, Z. Fan, J. Kong, and x. Bai. 2014. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. *J. Plant Interact.* 9:402–411.
11. Graziano, M., M.V. Beligni, and L. Lamattina. 2002. Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.* 130:1852–1859.
12. Iyer, S. and A. Caplan. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.* 116:203–211.
13. Jahan, M.S., S. Shu, Y. Wang, Z. Chen, M. He, M. Tao, J. Sun, and S. Guo. 2019. Melatonin alleviates heat-induced damage of tomato seedlings by balancing redox homeostasis and modulating polyamine and nitric oxide biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 19:1–16.
14. Jamali, B., S. Eshghi, and B. Kholdebarin. 2014. Response of strawberry 'Selva' plants on foliar application of sodium nitroprusside (nitric oxide donor) under saline conditions. *J. Hort. Res.* 22:139–150.
15. Kaya, A. and Z.B. Doganlar. 2019. Melatonin improves the multiple stress tolerance in pepper (*Capsicum annuum*). *Sci. Hortic.* 256:108509.
16. Krantev, A., R. Yordanova, T. Janda, G. Szalai, and L. Popova. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J. Plant Physiol.* 165:920–931.
17. Lal, P.N., T. Mitchell, P. Aldunce, H. Auld, R. Mechler, A. Miyan, L.E. Romano, and S. Zakaria. 2012. National systems for managing the risks from climate extremes and disasters. In: *Managing the risks of extreme events and disasters to Advance climate change adaptation* (Field, C.B., V. Barros, T.F. Stocker, D. Qin, D.J. Dokken, K.L. Ebi, M.D. Mastrandrea, K.J. Mach, G.-K. Plattner, S.K. Allen, M. Tignor, and P.M. Midgley (eds.)). A special report of working groups I and II of the intergovernmental panel on climate change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA, pp. 339-392.
18. Lamattina, L., C. García-Mata, M. Graziano, G. Pagnussat. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:109–136.

19. Li, Z.G., S.Z. Yang, W.B. Long, G.X. Yang, and Z.Z. Shen. 2013. Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environ.* 36:1564–1572.
20. Liu, T., L. Zhu, J. Wang, J. Wang, and H. Xie. 2015. The genotoxic and cytotoxic effects of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in soil on *Vicia faba* seedlings. *J. Hazard. Mater.* 285:27–36.
21. Loreto, F. and V. Velikova. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127:1781–1787.
22. Maughan, T.L., B.L. Black, and D. Drost. 2015. Critical temperature for sub-lethal cold injury of strawberry leaves. *Sci. Hort.* 183:8–12.
23. McNellie, J.P., J. Chen, X. Li, and J.Yu. 2018. Genetic mapping of foliar and tassel heat stress tolerance in maize. *Crop Sci.* 58:2484–2493.
24. Palencia, P., F. Martínez, J.J. Medina, and J. López-Medina. 2013. Strawberry yield efficiency and its correlation with temperature and solar radiation. *Hort. Bras.* 31:93–99.
25. Parankusam, S., S.S. Adimulam, P. Bhatnagar-Mathur, and K.K. Sharma. 2017. Nitric oxide (NO) in plant heat stress tolerance: Current knowledge and perspectives. *Front. Plant Sci.* 8:1–18.
26. Shafeiee ,M. and P. Ehsanzadeh. 2019. Physiological and biochemical mechanisms of salinity tolerance in several fennel genotypes: Existence of clearly-expressed genotypic variations. *Ind. Crops Prod.* 132:311–318.
27. Siddiqui, M.H., M.H. Al-Whaibi, and M.O. Basalah. 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248:447–455.
28. Song, L., W. Ding, J. Shen, Z. Zhang, Y. Bi, and L. Zhang. 2008. Nitric oxide mediates abscisic acid induced thermotolerance in the calluses from two ecotypes of reed under heat stress. *Plant Sci.* 175:826–832.
29. Uchida, A., A.T. Jagendorf, T. Hibino, T. Takabe, and T. Takabe. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 163:515–523.
30. Vaghefi, S.A., M. Keykhai, F. Jahanbakhshi, J. sheikholeslami, A. Ahmadi, H. Yang, and K.C. Abbaspour. 2019. The future of extreme climate in Iran. *Sci. Rep.* 9:1464.
31. Wu, X., W. Zhu, H. Zhang, H. Ding, and H.J. Zhang. 2011. Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Physiol. Plant.* 33:1199–1209.
32. Xu, W., S.Y. Cai, Y. Zhang, Y. Wang, G.J. Ahammed, X-J. Xia, K. Shi, Y-H. Zhou, J-Q. Yu, R.J. Reiter, and J. Zhou. 2016. Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants. *J. Pineal Res.* 61:457–469.
33. Yang, W., Y. Sun, S. Chen, J. Jiang, F. Chen, W. Fang, and Z. Liu. 2011. The effect of exogenously applied nitric oxide on photosynthesis and antioxidant activity in heat stressed chrysanthemum. *Biol. Plant.* 55:737–740.
34. Yin, H., Q. Chen, and M.Yi. 2008. Effects of short-term heat stress on oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regul.* 54:45–54.
35. Zhang, J., Y. Shi, X. Zhang, H. Du, B. Xu, and B. Huang. 2017. Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environ. Exp. Bot.* 138:36–45.
36. Zhang, K., B.H. Chen, H.A.O. Yan, Y.A.N.G. Rui, and Y.A. Wang. 2018. Effects of short-term heat stress on PSII and subsequent recovery for senescent leaves of *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe. *J. Integr. Agric.* 17: 2683–2693.
37. Zhou, Z., K. Guo, A. Elbaz, and Z. Yang. 2009. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environ. Exp. Bot.* 65:27–34.

Effect of Melatonin and Sodium Nitroprusside Foliar Application on Improving High-Temperature Stress Tolerance of 'Kurdistan' Strawberry

H. Manafi, B. Baninasab*, M. Gholami and M. Talebi¹

An experiment was conducted to examine whether the foliar application of melatonin (MA) and nitric oxide (NO) would improve thermo-tolerance of strawberry plants subjected to high-temperature stress. For this purpose, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications, in the college of Agriculture, Isfahan University of Technology was performed. The strawberry plants cv. Kurdistan were exposed to various temperatures (25, 35, and 40 °C) for 24 hours after pre-treatment with 0, 50, and 100 μM MA and NO. Heat stress significantly induced hydrogen peroxide and malondialdehyde content and increased proline accumulation, whereas reduced relative water content (RWC) and the maximal efficiency of PSII photochemistry (Fv/Fm). In addition, heat stress increased glutathione and ascorbic acid contents and enhanced superoxide dismutase and guaiacol peroxidase activities, and reduced catalase and ascorbate peroxidase activities. Treatment with MA and NO decreased heat injury symptoms and induced antioxidant enzyme systems and increased non-enzymatic antioxidant contents. Melatonin and NO increased proline content, RWC, and improved Fv/Fm compared with the non-treated plants. These results suggested that in strawberry, MA and NO alleviate heat-induced oxidative damage by modulating antioxidant pathways, decreasing reactive oxygen species, and inhibiting lipid peroxidation.

Keyword: Enzymatic and non-enzymatic antioxidants, Heat stress, Melatonin, Nitric oxide, Oxidative stress, Strawberry.

1. Ph.D. Student, Professor and Associate Professor, Department of Horticulture and Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

* Corresponding author, Email: (bbanin@iut.ac.ir).