تاثیر اسید فولویک و ملاتونین بر فعالیت آنزیمی و ویژگی‌های فیزیولوژیک توت فرنگی رقم کاماروسا تحت تنش آبی

محمد صفا عین الدین [۱]، علی اکبرشکوهیان [۲*]، علی رسول‌زاده [۳]، آرش همتی [۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- دانشیار ، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- استاد گروه مهندسی آب ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۴- مدیر شرکت قیزیل تپراق سهند

ایمیل نویسنده مسئول : shokouhiana@yahoo.com

چکیده

به‌منظور بررسی تاثیر اسیدفولویک و ملاتونین بر عملکرد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی توت‌فرنگی رقم کاماروسا تحت تنش آبی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. عوامل آزمایشی شامل سه سطح آبیاری (ظرفیت زراعی (شاهد)، ۲۵ و ۵۰ درصد آب قابل نگهداری)، محلول‌پاشی اسید فولویک در سه سطح (شاهد (غلظت صفر)، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) و محلول‌پاشی ملاتونین در سه سطح (شاهد (غلظت صفر)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار) بود. نتایج نشان داد تنش کم آبی باعث کاهش میزان محتوای نسبی آب و عملکرد و افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نشت یونی غشا برگ گردید. همچنین نتایج نشان داد کاربرد ملاتونین و اسیدفولویک در شرایط تنش خشکی باعث افزایش محتوای نسبی آب و عملکرد و کاهش میزان نشت غشا برگ گردید. علاوه‌براین کاربرد ملاتونین و اسید فولویک میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سطوح تنش خشکی به میزان بیشتری افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد کاربرد ملاتونین و اسید فولویک یک راهکار موثر و مفید برای کاهش اثرات مضر تنش خشکی و افزایش عملکرد در گیاه توت‌فرنگی می‌باشد.

کلمات کلیدی

"آنتی‌اکسیدان"،"تنظیم‌کننده رشد"،"عملکرد "،"محتوای نسبی آب"،"نشت الکتولیت"

۱- مقدمه

توت‌فرنگی میوه‌ای نسبتا جدید است که تا ۲۵۰-۳۰۰ سال قبل به این شکل امروزی وجود نداشت و بیشتر موارد استفاده دارویی داشته است. در قرن چهاردهم در فرانسه توت‌فرنگی‌های وحشی از جنگل به زمین زراعتی منتقل شد و از آن به عنوان یک گیاه اهلی استفاده گردید. توت‌فرنگی یکی از محصولات مهم باغبانی است که به دلیل دارا بودن مقادیر قابل ملاحظه مواد معدنی، انواع ویتامین‌ها، عطر و طعم مطلوب، متابولیت‌های ثانویه و قابلیت تازه خوری، مقبولیت زیادی در میان مصرف کنندگان دارد (Mandave et al., ۲۰۱٤). با توجه به اینکه توت‌فرنگی یکی از محصولات مهم تجاری است و سطح زیر کشت و مصرف آن در جهان رو به افزایش است بنابراین افزایش عملکرد و کیفیت آن از جنبه های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. با در نظرگرفتن کمبود منابع آب به خصوص آبهای شیرین، پرورش محصولات باغی مانند توت‌فرنگی از لحاظ اقتصادی تحت شرایط خشکی دارای اهمیت فراوانی است. گونه‌های توت‌فرنگی به‌طور موفقیت‌آمیز و تجاری به دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی و اقلیمی شامل شرایط معتدله، مدیترانه‌ای، نیمه‌گرمسیری و حتی در ارتفاعات مناطق گرمسیری سازگاری داشته و پرورش داده می‌شود، با این حال، تولید توت‌فرنگی به‌وسیله دامنه‌ای از تنش‌های زنده و غیرزنده محدود می‌شود. گیاه توت‌فرنگی به دلیل داشتن ریشه‌های سطحی، حساسیت زیادی به کمبود رطوبت از خود نشان می‌دهد (Li et al., ۲۰۱۰). سیستم ریشه سطحی، سطح برگ وسیع و محتوای آب بالای میوه‌های توت‌فرنگی به معنای این است که توت‌فرنگی مقادیر زیادی آب مصرف می‌کند.

توت‌فرنگی یکی از محصولاتی است که به طور کلی برای تولید مطلوب به آبیاری نیاز دارد. این گیاه در حین گلدهی و رسیدن میوه به تنش خشکی بسیار حساس است. این مشکل ممکن است کشت آن را محدود کند. پژوهش‌های مختلفی روی تغییر فیزیولوژیکی و ریخت شناسی توت‌فرنگی در پاسخ به تنش آبی وجود دارد. در توت‌فرنگی کم آبیاری به طور کلی با کاهش اندازه میوه و عملکرد همراه است (Li et al., ۲۰۱۰).استفاده از ترکیبات یا تنظیم‌کننده‌های رشد به‌صورت برونزا در بسیاری از موارد در کاهش اثرات تنش‌های محیطی موثر بوده است. امروزه استفاده از ترکیباتی که بتوانند اثرات تنش‌های محیطی را کاهش دهند، از لحاظ تئوری و کاربردی اهمیت فراوانی دارند.اسید فولویک فعال‌ترین ترکیب هیومیکی بوده و باعث حل‌شدن مواد معدنی در آب شده و به‌راحتی عناصر غذایی را از طریق یک ترکیب به گیاه منتقل می‌نماید. همچنین اسید فولویک می‌تواند ویتامین‌ها، ایزوآنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی را در خود حل نموده و از این طریق باعث بهبود رشد و نمو گیاه گردد (Samavat and Malakouti, ۲۰۰۵). علاوه‌براین اسید فولویک نقش مستقیمی در بیوسنتز برخی اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک دارد و بر همین اساس محققان معتقد هستند که مشتقات اسید فولویک نقش بسیار مهمی در فرایندهای متابولیسمی سلول‌های زنده برعهده دارد (Daneshvar Hakimi Maibodi et al., ۲۰۱۵). مهم‌ترین نقش اسید فولویک در گیاه هدایت مواد غذایی است. این ترکیب موجب می‌شود، تمامی مواد غذایی مورد نیاز گیاه به راحتی توسط ریشه‌ها جذب گردد. این خاصیت اسید فولویک در محلول پاشی هم وجود دارد و باعث جذب بهتر کودها از این طریق نیز می‌شود. ماده مذکور همچنین موجب

تحریک متابولیسم گیاه، افزایش تقسیم سلولی و طویل شدن سلول و افزایش فعالیت آنزیم به عنوان کاتالیزور در تنفس گیاه می‌گردد (Abbas and Hammad, ۲۰۱۷).اسید فولویک به دو طریق گیاه را در برابر تنش‌های غیرزنده و به‌خصوص تنش‌های اسمزی مقاوم می‌سازد. اسیدفولیک از طرفی با افزایش بیان ژن‌های انتقال‌دهنده مواد، موجب تسریع جذب مواد غذایی و افزایش غلظت شیره سلولی می‌گردد و از طرف دیگر با جذب مواد فولویکی در سیتوپلاسم موجب ایجاد فشار اسمزی لازم جهت مقابله با تنش‌های اسمزی از جمله شوری، خشکی و یخبندان می‌شود (Olivares et al., ۲۰۱۵).یکی دیگر از ترکیباتی که در ایجاد تحمل در برابر تنش کم آبی در گیاه موثر است، ملاتونین می‌باشد (Li et al., ۲۰۲۱). در سال ۱۹۹۵ که اولین گزارش از وجود ملاتونین در گیاهان گزارش شد، ملاتونین مورد توجه قرار گرفت و در غلظت‌های پیکوگرم تا میکروگرم در گیاهان گزارش شد (Tan et al., ۲۰۱۲). حضور ملاتونین در اندام‌های مختلف گیاهی مثل ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر شناسایی شده است. تجمع بالای ملاتونین در محصولات باغبانی نه تنها برای سلامتی انسان مفید است بلکه به دلیل نقش مفید این ماده در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده برای خود این محصولات نیز مفید می‌باشد. ملاتونین به عنوان یک مولکول ایندول آمینی بی خطر و مفید نه تنها یک هورمون محرک و سیگنالینگ است بلکه تجمع آن در بافت‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده در جهت کاهش تنش‌های مختلف از جمله شوری و سرما و پاتوژن موثر است و به طور مستقیم فعالیت آنتی اکسیدانی نیز دارد (Arnao and Hernandez-Ruiz, ۲۰۱۵). ملاتونین به‌عنوان خط اول دفاع و حسگر داخلی تنش اکسیداتیو در گیاهان گزارش شده است (Tan et al., ۲۰۱۲). ملاتونین اثرات منفی تنش خشکی را در گیاه گوجه فرنگی کم کرده و سبب افزایش قدرت ریشه، کاهش اثرات تنش‌های دیگر مرتبط با خسارت به مرکز واکنش فتوسیستم ۲ و حفظ ظرفیت فتوسنتزی گیاه، به حداقل رساندن اثرات منفی تنش خشکی توسط تنظیم سیستم آنتی اکسیدانی و کاهش محتوای مواد سمی سلول گردیده است (Liu et al., ۲۰۱۵).بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر ملاتونین و اسید فولویک بر عملکرد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی توت‌فرنگی در شرایط تنش خشکی می‌باشد.

۲- روش انجام تحقیق

این آزمایش در شهرستان بستان‌آباد استان آذربایجان شرقی انجام شد. این شهرستان در ۴۵ کیلومتری شرق تبریز واقع است و از نظر جغرافیایی بین ۴۶ درجه و ۳۰ دقیقه و ۴۷ درجه و ۱۴ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۳۲ دقیقه و ۳۸ درجه و ۴ دقیقه عرض شمالی قرار گرفته است. ارتفاع شهرستان بستان‌آباد از سطح آزاد دریا ۱۷۴۰ متر و متوسط بارندگی سالانه آن ۳۲۰ میلی‌متر می‌باشد. برای اجرای آزمایش نشاهای توت‌فرنگی رقم کاماروسا در مهرماه از یک گلخانه تجاری پرورش توت‌فرنگی در شهر ارومیه تهیه و در سینی‌های کشت به گلخانه انتقال یافت. کاماروسا یک رقم روزکوتاه و زودرس است و در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای کشت می‌شود. در یک بررسی صورت- گرفته برای صفات وزن میوه، تعداد گل و میوه رقم کاماروسا بیشترین مقادیر را در شرایط تنش داشت و می‌توان این رقم را به عنوان یک رقم متحمل به خشکی معرفی نمود (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۷). بررسی‌های آزمایشگاهی در آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی و علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. این بررسی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ فاکتور در ۴ تکرار انجام شد. فاکتورها شامل تنش کم‌آبی در سه سطح { ظرفیت زراعی (شاهد)، ۲۵ و ۵۰ درصد آب قابل نگهداری}، اسید فولویک (تولید شرکت مرک) در سه سطح (شاهد، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی- گرم بر لیتر) و ملاتونین (تولید شرکت سیگما آلدریچ) در سه سطح (شاهد، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار) بودند. نحوه اعمال تیمارهای ملاتونین و اسید فولویک به این صورت بود که بعد از استقرار کامل گیاهان و سرمادهی بوته‌ها در سه مرحله از طریق محلول‌پاشی استفاده شدند. مرحله اول پس از استقرار کامل بوته (۱۵ رو بعد از کاشت)، مرحله دوم ۱۰ روز بعد از تیمار اول و مرحله سوم ۱۰ روز بعد از مرحله دوم محلول‌پاشی انجام گرفت. لازم به ذکر است گیاهان شاهد با استفاده از آب مقطر محلول پاشی گردیدند. اعمال تنش کم‌آبی سه هفته بعد از محلول‌پاشی گیاهان با ملاتونین و اسید فولویک صورت گرفت. نحوه اعمال تنش آبی بر گیاهان مورد نظر به این صورت بود که ابتدا برای به حداقل‌رساندن تاثیر رطوبت بر وزن خاک درون گلدان، آن را کاملاً خشک نموده، سپس برای ایجاد زهکش کافی در گلدان‌ها مقدار یکسانی از شن درشت پس از توزین در کف آنها ریخته شد. سپس گلدان‌ها بر روی ترازویی (Scale MH, Chine) با دقت یک دهم گرم قرار گرفته و مخلوط خاکی موردنظر در همه آن‌ها ریخته شد. سپس یکی از گلدان‌ها را به‌طور تصادفی انتخاب و خاک داخل آن کاملاً غرقاب و به وسیله پلاستیک پوشانیده شد و اجازه داده شد تا آب ثقلی آن خارج شود. بعد از آنکه رطوبت خاک به ظرفیت زراعی رسید، گلدان به مدت یک هفته و تا زمانی که وزن گلدان ثابت شد، به صورت روزانه توزین و یادداشت‌برداری شد. سپس خاک داخل گلدان در یک ظرف همراه با خاک درون آن و در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت خشک شده وسپس دوباره خاک همراه ظرف توزین و تفاوت این دو جرم (قبل از آون و بعد از آون، جرم آب (Mw) خاک درون گلدان در آخرین مرحله آزمایش را نشان داد. جرم ظرف از جرم نمونه خاک همراه با ظرف بعد از آون کسر شده و جرم خاک خشک (Ms) محاسبه گردید. در نهایت رطوبت جرمی (θm) با استفاده از معادله زیر به دست آمد.

$$\theta m = Mw/Ms \qquad (۱)$$

بعد از به دست آوردن رطوبت در مرحله آخر آزمایش، با توجه به این که اختلاف جرم گلدان‌ها در هر روز متوالی نشانگر مقدار آب تبخیر شده می‌باشد و مقدار خاک خشک در هر مرحله ثابت است، لذا با اضافه‌کردن اختلاف جرم گلدان‌ها در هر دوره زمانی، اندازه‌گیری و مقدار Mw با توجه به رابطه (رطوبت جرمی (θm)) رطوبت در آن مرحله به دست آمد. با به دست آمدن جرم گلدان و رطوبت جرمی، رابطه خطی بین آنها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. در موقع اعمال سطوح تنش با داشتن جرم گلدان، رطوبت گلدان‌ها توسط رابطه رگرسیونی محاسبه شد. برای اعمال تنش از معادله زیر محاسبه شدبرای اعمال تنش از معادله زیر محاسبه شد (Cavvaza et al., ۲۰۰۷).

$$I=AW\times MAD \quad (۲)$$

که در آن، I مقدار آب آبیاری، AW آب قابل نگهداری در خاک و MAD حداکثر تخلیه مجاز آب است. شایان ذکر است به جای MAD، سه سطح تنش یعنی شاهد (نگهداری رطوبت در حد ظرفیت زراعی)، تخلیه ۲۵ درصد و ۵۰ درصد آب قابل نگهداری قرار داده شد و رطوبت خاک برای این سطوح محاسبه گردید. به‌طوری‌که وقتی رطوبت گلدان‌ها به این مقدار رسید، بیانگر آن است که آب قابل نگهداری محاسبه شده، تخلیه گردیده است. با اندازه‌گیری جرم گلدان‌ها رطوبت آن‌ها در سطح تنش ثابت نگهداشته شد. به منظور خارج کردن اثر رشد از گلدان‌های بدون گیاه استفاده گردید. در پایان آزمایش میزان صفاتی مانند محتوای نسبی آب، عملکرد، نشت الکترولیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی محاسبه گردید.

۲-۱- اندازه‌گیری نشت یونی (EL)

برای اندازه‌گیری نشت یونی (EL) نمونه‌های برگی در داخل لوله‌های آزمایشگاهی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دی‌یونیزه قرار داده شدند. هدایت الکتریکی اولیه ($EC_۱$) بعد از قرارگرفتن لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه ECسنج اندازه‌گیری شد. سپس لوله‌های آزمایش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت اتوکلاو شدند و بعد از آن هدایت الکتریکی ثانویه ($EC_۲$) اندازه‌گیری شد و میزان EL با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Nanjo et al., ۱۹۹۹).

$$EL = (EC_۱/EC_۲) * ۱۰۰$$

۲-۲- محتوای نسبی آب

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب ابتدا وزن نمونه‌های برگی تعیین گردید (FW). سپس نمونه‌های برگی به‌مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار گرفتند و پس‌ازگذشت این مدت وزن اشباع نمونه‌های برگی اندازه‌گیری شد (TW). وزن خشک نمونه‌های برگی (DW) نیز بعد از قرارگیری نمونه‌های برگی به‌مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و محتوای نسبی آب (RWC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Sairam and Srivastava, ۲۰۰۲).

$$\%RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW}$$

۲-۳- آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از نمونه‌های برگی نگهداری‌شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. جهت تهیه عصاره آنزیمی ابتدا ۰/۲ گرم از هر نمونه گیاهی با استفاده از ازت مایع در هاون چینی به خوبی پودر شد. سپس دو میلی‌لیتر بافر استخراج به آن افزوده و هضم گردید. سپس نمونه‌ها در تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردردقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها، عصاره حاصله به تیوب‌های جدید منتقل و از آن برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز استفاده شد (Stancheva et al., ۲۰۱۰).

۲-۳-۱- فعالیت آنزیم کاتالاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۶۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی را با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار در حمام یخ مخلوط کرده و منحنی تغییرات جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید (Aebi, ۱۹۸۳).

۲-۳-۲- فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی را در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج که شامل بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و گایاکول ۱۰ میلی‌مولار بود، در حمام یخ مخلوط و منحنی تغییرات در طول موج ۴۲۵ نانومتر قرائت شد (Rao, ۱۹۹۶).

۲-۳-۳- فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از هیدروژن پراکسید ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت شد و با استفاده از ضریب خاموشی میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد (Nakano and Asada, ۱۹۸۱).

۲-۳-۴- فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از طریق آزمون فیتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی یک میلی‌لیتر برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شامل ۸۳۵ مایکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۳۳ مایکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم ۰/۷۵میلی‌مولار، ۳۳ مایکرولیتر ریبوفلاوین و ۳۳ مایکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد به‌وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Giannopolitis and Ries, ۱۹۷۷).

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. رسم اشکال و برخی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

۳- نتایج

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد میزان عملکرد به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثرات ساده سطوح آبیاری، اسید فولویک، ملاتونین، اثرات دوگانه سطوح آبیاری در اسید فولویک، سطوح آبیاری در ملاتونین و اسید فولویک در ملاتونین ($P<۰،۰۱$) و اثر سه گانه سطوح آبیاری در اسید فولویک در ملاتونین ($P<۰،۰۵$) قرار گرفت. در مورد محتوای نسبی آب تنش خشکی، محلول‌پاشی ملاتونین، اثر متقابل دوگانه سطوح اسید فولویک در ملاتونین و اثر متقابل سه گانه سطوح آبیاری در اسید فولویک در ملاتونین تاثیر معنی‌داری ($P<۰،۰۱$) بر میزان محتوای نسبی آب داشتند. همچنین محلول-پاشی اسید فولویک و اثر متقابل دوگانه سطوح آبیاری در اسید فولویک تاثیر معنی‌داری ($P<۰،۰۵$) بر میزان محتوای نسبی آب داشتند؛ همچنین، اثر متقابل دوگانه سطوح آبیاری در اسید فولویک و اسید

فولویک در ملاتونین و اثر متقابل سه گانه سطوح آبیاری در اسید فولویک و ملاتونین تاثیر معنی‌داری ($P<۰,۰۱$) بر میزان نشت الکترولیت‌ها داشتند و اثر متقابل دوگانه سطوح آبیاری در ملاتونین نیز تاثیر معنی‌داری ($P<۰,۰۵$) بر میزان نشت الکترولیت داشتند. با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به‌طور معنی‌داری ($P<۰,۰۱$) تحت اثرات اصلی تنش خشکی، ملاتونین، اثرات متقابل دوگانه (به جز اسید فولویک در ملاتونین) و اثر متقابل سه گانه این تیمارها قرار گرفت. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز تغییر معنی‌داری ($P<۰,۰۱$) نسبت به سطوح آبیاری، اسید فولویک، ملاتونین و اثرات متقابل دوگانه این عوامل (به جز سطوح آبیاری در ملاتونین) داشت. فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز به‌طور معنی‌داری ($P<۰,۰۱$) تحت تأثیر سطوح آبیاری، اسید فولویک، ملاتونین و اثرات متقابل دوگانه (به جز سطوح آبیاری در اسید فولویک) و سه گانه تیمارهای مذکور قرار گرفت. همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز طبق نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها به‌طور معنی‌داری ($P<۰,۰۱$) تحت تأثیر سطوح آبیاری ، محلول‌پاشی اسید فولویک، اثر متقابل دوگانه سطوح آبیاری در ملاتونین و اسید فولویک در ملاتونین و اثر متقابل سه گانه سطوح آبیاری در اسید فولویک در ملاتونین قرار گرفت (جدول ۱).

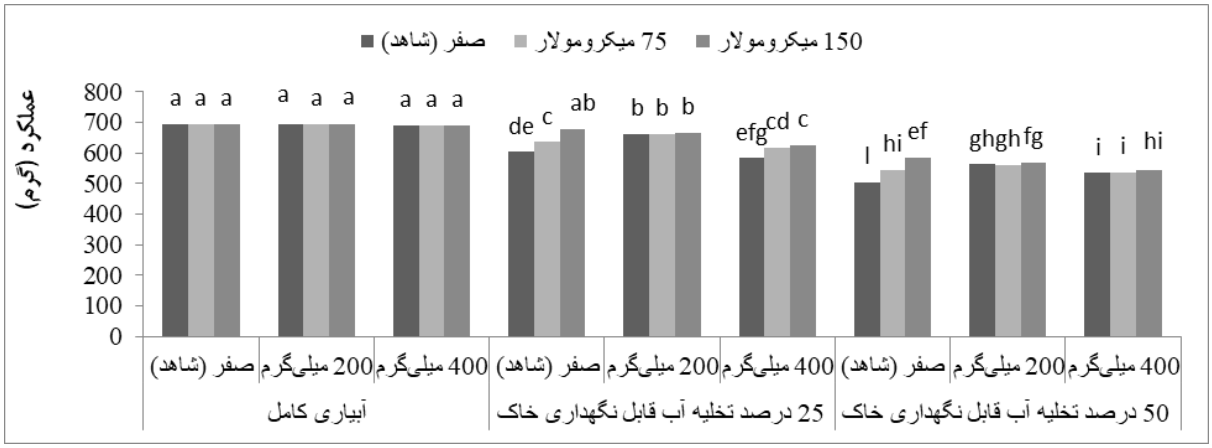
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر محلول‌پاشی اسید فولویک و ملاتونین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ توت‌فرنگی رقم کاماروسا تحت سطوح آبیاری

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	محتوای نسبی آب	نشت الکترولیت	عملکرد
سطوح آبیاری	۲	۱۵/۵۳**	۰/۰۸**	۱۲/۶۶**	۴/۷۳**	۸۷۷۹/۲۰**	۱۸۸۳۷/۹۱**	۱۴۱۰۹۷/۵۱**
اسید فولویک	۲	۰/۶۴^{ns}	۰/۰۹**	۰/۱۷**	۰/۴۲**	۸/۰۳*	۷۱/۱۶**	۴۹۹۷/۰۱**
سطوح آبیاری× اسید فولویک	۴	۳/۵۹**	۰/۰۲*	۰/۰۴^{ns}	۰/۰۲^{ns}	۴/۲۶*	۲۳/۱۹**	۱۶۰۷/۹۲**
ملاتونین	۲	۱۳/۲۳**	۰/۰۵**	۰/۳۰**	۰/۲۰^{ns}	۱۰/۵۰**	۲۶/۵۴*	۴۱۷۰/۶۴**
سطوح آبیاری× ملاتونین	۴	۲/۳۷**	۰/۰۱^{ns}	۰/۵۲**	۰/۲۷*	۱/۷۲^{ns}	۱۳/۸۲*	۱۰۵۶/۳۴**
اسید فولویک × ملاتونین	۴	۰/۲۷^{ns}	۰/۰۳**	۰/۲۵**	۰/۸۱**	۳۸/۵۶**	۸۳/۹۳**	۱۴۲۳/۴۳**
سطوح آبیاری× اسید فولویک × ملاتونین	۸	۱/۸۷**	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۳۰**	۰/۷۰**	۶/۷۸**	۲۸/۳۰**	۴۴۴/۸۰*
خطای آزمایشی	۸۱	۰/۲۹	۰/۰۰۷	۰/۰۲۳	۰/۰۷	۱/۶۴	۵/۳۰	۱۶۱/۴۵
ضریب تغییرات (٪)		۶/۷۴	۱۴/۱۲	۱۱/۵۵	۱۲/۸۶	۱۶/۸۷	۱۲/۵۹	۱۴/۷۸

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

۱-۳- عملکرد

مقایسه میانگین‌های اثرات سه جانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک و ملاتونین نشان دادند بیشترین مقدار عملکرد (۶۹۳/۵۴ گرم) از ترکیب تیماری آبیاری کامل با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. هر چند بین تیمار آبیاری کامل و سطوح مختلف مصرف اسید فولویک و ملاتونین و ترکیب تیماری ۲۵ درصد آب قابل نگهداری با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین در این خصوص تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین کمترین عملکرد (۵۰۴/۷۸ گرم) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری در تیمارهای بدون مصرف اسید فولویک و ملاتونین بدست آمد. نتایج بیان کننده این موضوع است که با کاربرد این ترکیبات در سطوح مختلف آبیاری میزان عملکرد گیاهان افزایش یافته است (شکل ۱). گزارشات متعددی مبنی بر کاهش عملکرد گیاهان تحت تاثیر تنش خشکی بیان شده است. با توجه اینکه عملکرد نهایی گیاه تحت تاثیر فرآیندهای متفاوت گیاهی از قبیل: رشد، فتوسنتز، انتقال مواد و غیره می‌باشد، به منظور رسیدن به عملکرد مطلوب هماهنگی بین این فرآیندها و ایجاد شرایط بهینه از جمله رطوبت کافی ضروری است. هر کدام از این عوامل در صورت اینکه تحت تاثیر تنش خشکی قرار بگیرند کاهش عملکرد را در پی خواهند داشت (Farooq et al., ۲۰۱۲). محققین زیادی گزارش کرده‌اند که تنش خشکی منجر به کاهش معنی‌دار عملکرد در توت‌فرنگی می‌شود (Adak et al., ۲۰۱۸). براساس گزارشات سایر محققین کاربرد ملاتونین از طریق بهبود جنبه‌های رشدی، فتوسنتزی و آنتی‌اکسیدانی منجر به بهبود عملکرد گیاهان در شرایط تنش خشکی می‌شود (Janas and Posmyk, ۲۰۱۳, Sadak et al., ۲۰۲۰). همچنین کاربرد اسید فولویک بر روی گوجه‌فرنگی به‌صورت محلول‌پاشی منجر به افزایش عملکرد شده است (Suh et al., ۲۰۱٤). علاوه‌براین محلول‌پاشی اسید فولویک تأثیر مثبتی بر روی رشد برنج و وزن آن داشت (khang, ۲۰۱۱). گزارشات مذکور نتایج تحقیق حاضر را تایید می‌کنند.



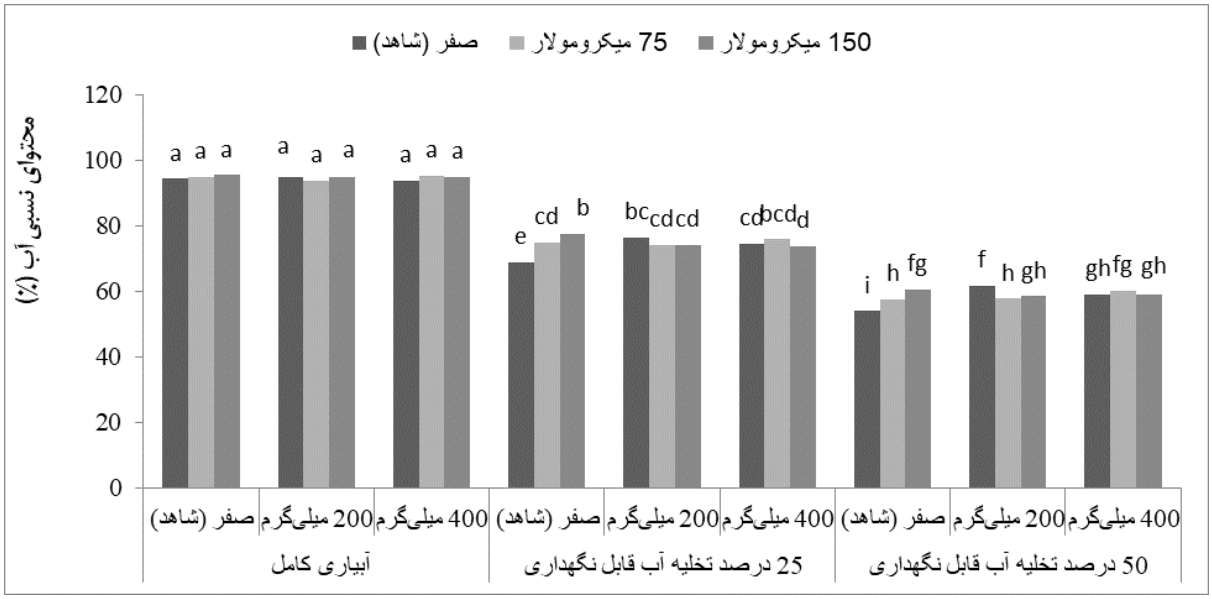
شکل۱- مقایسه میانگین عملکرد (گرم) تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) و سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک).

حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

۲-۳- محتوای نسبی آب

مقایسه میانگین‌های اثرات سه جانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک و ملاتونین نشان دادند بیشترین مقدار محتوای نسبی آب (۹۵/۳۵ درصد) از ترکیب تیماری آبیاری کامل با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. هر چند بین تیمار آبیاری کامل و سطوح مختلف مصرف اسید فولویک و ملاتونین در این خصوص تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین کمترین مقدار محتوای نسبی آب (۵۳/۹۲ درصد) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری در تیمارهای بدون مصرف اسید فولویک و ملاتونین بدست آمد. نتایج نشان می‌دهد کاربرد اسید فولویک و ملاتونین در سطوح مختلف آبیاری باعث حفظ محتوای نسبی آب بالا شده است (شکل ۲). گزارش شده است تنش خشکی منجر به کاهش محتوی نسبی آب برگ، آسیب به گیاه و کاهش رشد آن می‌شود (Bajji et al., ۲۰۰۱). نتایج این مطالعه نشان داد افزایش شدت تنش خشکی منجر به کاهش محتوای نسبی آب گردید. درحالیکه کاربرد ملاتونین و اسید فولویک در سطوح مختلف آبیاری میزان محتوای نسبی آب را افزایش دادند. تحقیقات مختلف نشان دادند که تنش خشکی منجر به کاهش محتوای آب نسبی در توت‌فرنگی (Sun et al., ۲۰۱۵) و انگور (Ghaderi et al., ۲۰۱۱) گردید. همچنین گزارش‌های مختلفی وجود دارد که نشان می‌دهد کاربرد ملاتونین (Zhao et al., ۲۰۲۱, Ahmad et al., ۲۰۲۲, Eisa et al., ۲۰۲۳) و اسید فولویک (AM et al., ۲۰۱۵, Dinler et al., ۲۰۱۶, Yang et al., ۲۰۱۹) در شرایط تنش خشکی باعث افزایش محتوای نسبی آب می‌شود. نتایج حاصل از این بررسی با گزارشات ارایه شده مطابقت دارند.

افزایش محتوای نسبی آب توسط ملاتونین می‌تواند به‌دلیل نقش آن در افزایش قدرت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، کاهش تنش اکسایشی، افزایش همبستگی و پایداری غشاء و تعدیل تنظیم اسمزی باشد (Zhang et al., ۲۰۱٤). همچنین مشخص شده است ملاتونین می‌تواند با استفاده از مکانیزم‌های محافظ دوگانه کاهش مقدار آبسزیک اسید و هیدروژن پراکسید وضعیت آب و کارایی مصرف آب را بهبود بخشد (Zhang et al., ۲۰۱٤). اسید فولویک نیز حاوی پتاسیم می‌باشد و پتاسیم موجود در اسید فولویک به‌عنوان عامل تأثیرگذار در تنظیمات اسمزی نقش دارد و با افزایش میزان انتقال آسیمیلات‌ها و حفظ پتانسیل اسمزی میزان مقاومت گیاهان را به تنش خشکی افزایش می‌دهد (Aksu and Altay, ۲۰۲۰). علاوه‌براین مولکول‌های اسید فولویک (بخش ریز مولکول از اسید) که به درون بافت‌های گیاهی نفوذ می‌کنند، با پیوند به مولکول‌های آب تعریق و تعرق گیاه را کاهش داده و به حفظ آب در درون گیاه کمک می‌کنند (پروازی شندی و همکاران، ۱۳۹۲).

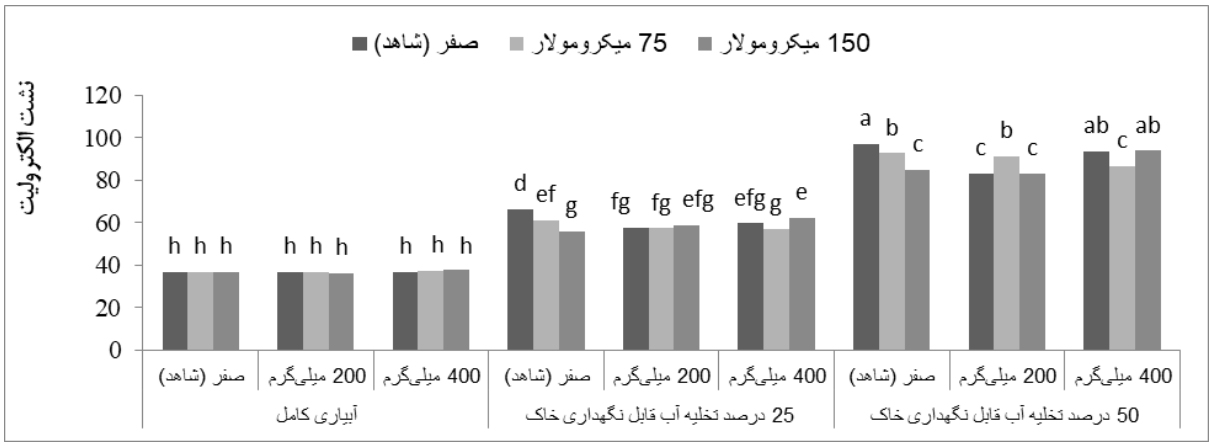


شکل ۲- مقایسه میانگین محتوای نسبی آب (٪) تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) و سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک)

حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

۳-۳- نشت الکترولیت

مقایسه میانگین‌های اثرات سه جانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک و ملاتونین نشان دادند بیشترین میزان نشت الکترولیت (۹۶/۹۳) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری در تیمارهای بدون مصرف اسید فولویک و ملاتونین بدست آمد. همچنین کمترین میزان نشت الکترولیت (۳۶/۱۸) از ترکیب تیماری آبیاری کامل با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. هر چند بین تیمار آبیاری کامل و سطوح مختلف مصرف اسید فولویک و ملاتونین در این خصوص تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طورکلی کاربرد اسید فولویک و ملاتونین در سطوح مختلف آبیاری میزان نشت الکترولیت را کاهش داد (شکل ۳).

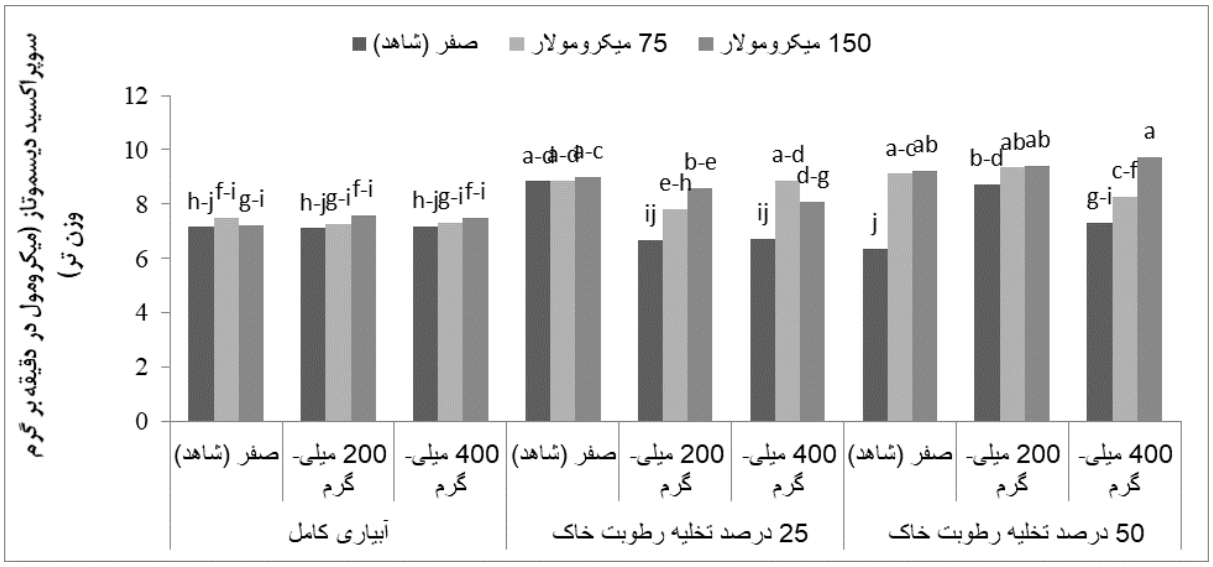


شکل ۳- مقایسه میانگین نشت الکترولیت تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) و سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک)

حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

۴-۳- سوپر اکسید دیسموتاز

مقایسه میانگین‌های اثرات سه جانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک و ملاتونین نشان دادند که بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (۹۶/۹۳ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. بین این تیمار و تیمارهای ترکیب ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین و ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج نشان می‌دهد کاربرد اسید فولویک و ملاتونین در سطوح مختلف آبیاری باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز شده است. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (۳۶/۱۸ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری آبیاری کامل با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک حاصل شد. هر چند بین این تیمار و تیمار آبیاری کامل بدون مصرف اسید فولویک و ملاتونین در این خصوص تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴).

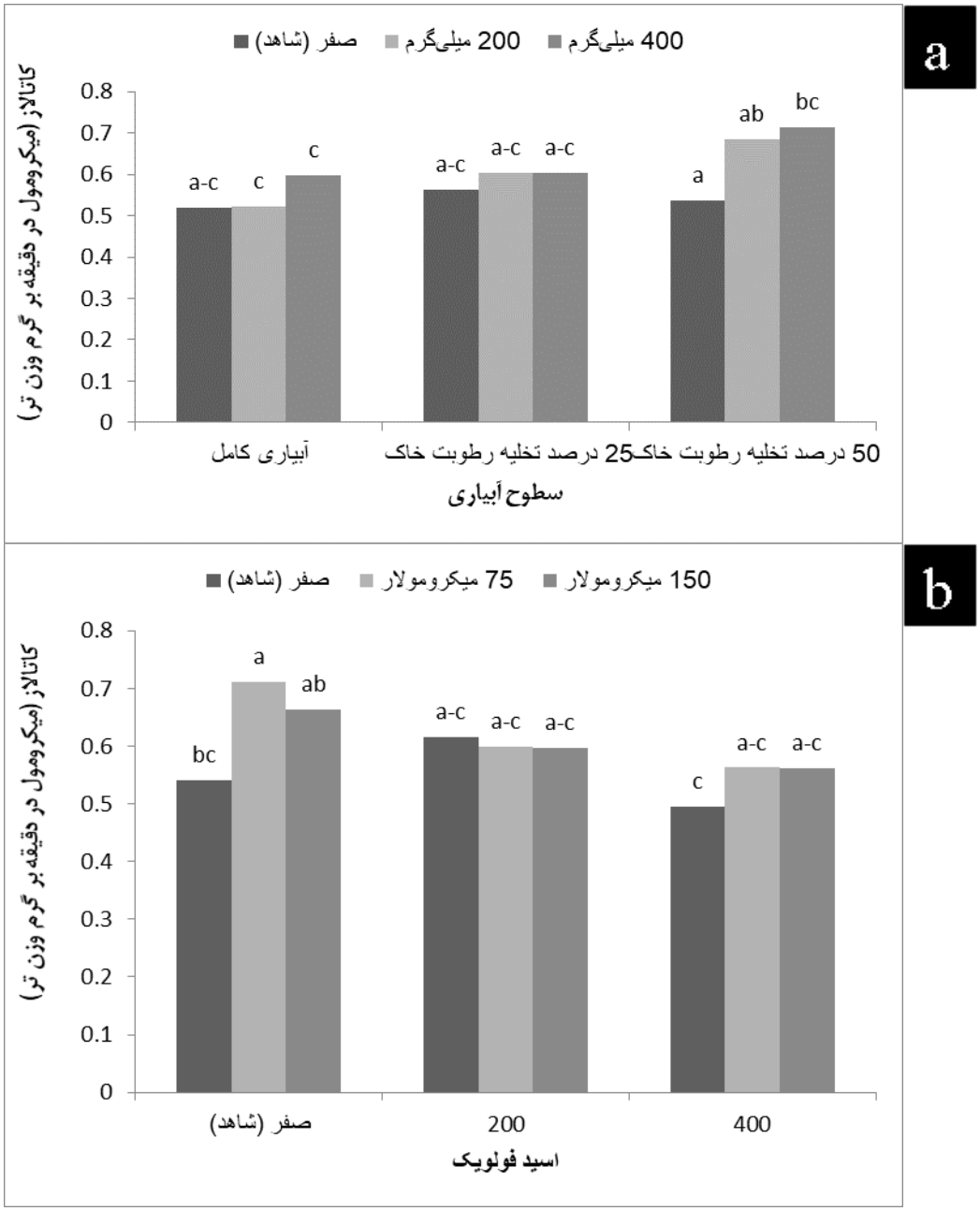


شکل ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) و سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک)
حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

۵-۳- کاتالاز

مقایسه میانگین‌های اثرات دوجانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک نشان دادند بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۷۱۴۶ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک حاصل شد. بین این تیمار و ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۵۱۹۲ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری آبیاری کامل بدون مصرف اسید فولویک حاصل شد. بین این تیمار و تیمارهای آبیاری کامل با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ترکیب تیماری ۲۵ درصد آب قابل نگهداری با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. به‌طور کلی نتایج نشان داد کاربرد کود زیستی اسید فولویک در سطوح مختلف آبیاری باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید (شکل 5a).

همچنین مقایسه میانگین‌های اثرات دوجانبه اسید فولویک در ملاتونین نیز نشان دادند بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۷۱۰۸ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک با ۷۵ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. بین این تیمار و ترکیب تیماری ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۴۹۴۶ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری بدون مصرف اسید فولویک و ملاتونین حاصل شد. بین این تیمار و ترکیب تیماری ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک بدون مصرف ملاتونین، ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین بدون مصرف اسید فولویک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل 5b).



شکل ۵- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک) (a) و اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) (b)

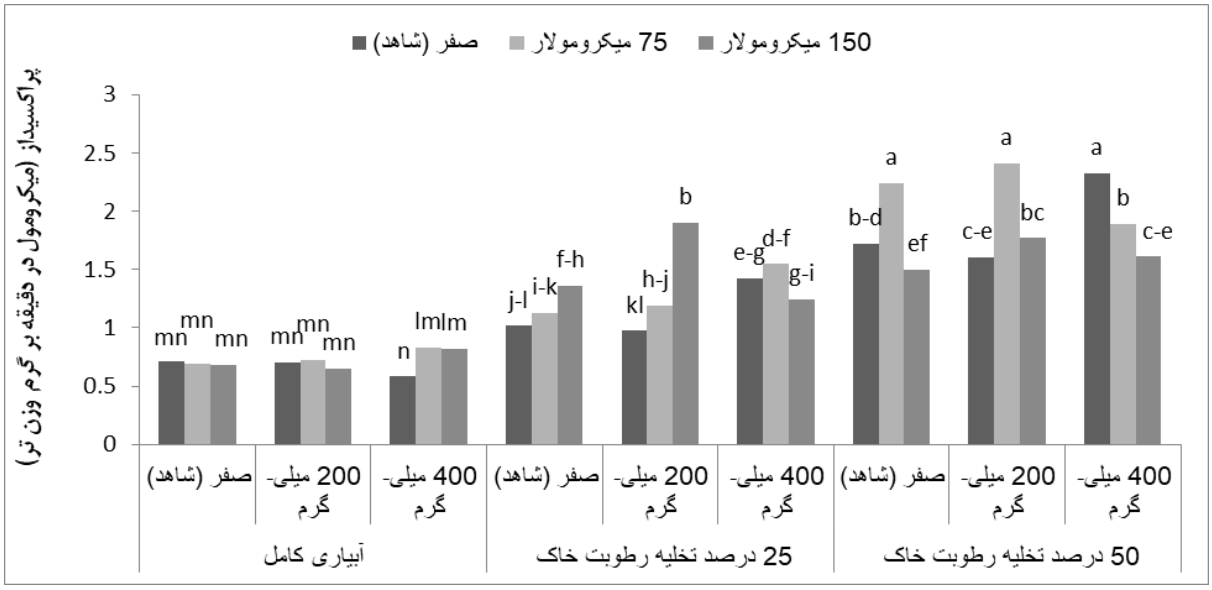
حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

۶-۳- پراکسیداز

مقایسه میانگین‌های اثرات سه جانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک و ملاتونین نشان دادند بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۲/۴۱۱ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۷۵ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. بین این تیمار و تیمارهای ترکیب ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و بدون مصرف ملاتونین و ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۷۵ میکرومولار ملاتونین و بدون مصرف اسید فولویک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج بیان کننده این موضوع است که با کاربرد این ترکیبات در سطوح مختلف آبیاری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافته است.

همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۰/۵۸ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری آبیاری کامل با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک حاصل شد. هر چند بین این تیمار و تیمار آبیاری کامل با

مصرف غلظت‌های مختلف اسید فولویک و ملاتونین (به غیر از ترکیب تیماری آبیاری کامل ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۷۵ و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین) در این خصوص تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. (شکل ۶).



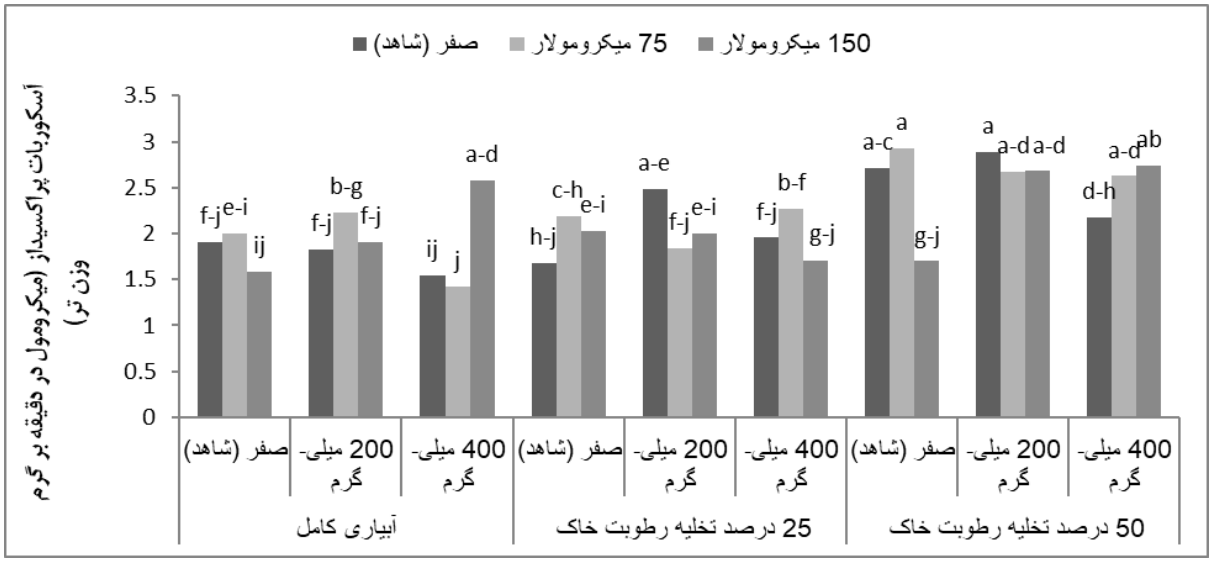
شکل ۶- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) و سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک)

حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

۷-۳- آسکوربات پراکسیداز

مقایسه میانگین‌های اثرات سه جانبه سطوح مختلف آبیاری با کاربرد اسید فولویک و ملاتونین نشان دادند بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۲/۹۲۹ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۷۵ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. بین این تیمار و تیمارهای ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۲۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک بدون مصرف ملاتونین و ترکیب تیماری ۵۰ درصد آب قابل نگهداری با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج بیان کننده این موضوع است که با کاربرد این ترکیبات در سطوح مختلف آبیاری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است.

همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱/۴۲۶ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) از ترکیب تیماری آبیاری کامل با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و ۷۵ میکرومولار ملاتونین حاصل شد. هر چند بین این تیمار و تیمار آبیاری کامل با ۴۰۰ میلی‌گرم اسید فولویک و تیمار آبیاری کامل با ۱۵۰ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی‌داری در ارتباط با افزایش فعالیت این آنزیم وجود نداشت (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر) تحت تاثیر اثرات متقابل سطوح اسید فولویک (شاهد (۰) ، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ملاتونین (شاهد (۰)، ۷۵ و ۱۵۰ میکرو مولار) و سطوح مختلف آبیاری (۱۰۰ ، ۲۵ و۵۰ درصد آب قابل نگهداری خاک)

حروف متفاوت در هر ستون بیان کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها درسطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

تنش‌های محیطی باعث تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شوند (Liang et al., ۲۰۱۹). در همین حال، اگر این ROS حذف نشود، باعث آسیب اکسیداتیو به غشای سلولی، پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم‌ها، RNA و DNA می‌شود (Sen and Puthur, ۲۰۲۱). مقدار متوسطی از ROSها برای فعال کردن مسیرهای پاسخ به تنش و دفاع ضروری است، اما ROS بیش از حد به غشای زیستی آسیب زده، نفوذپذیری را افزایش و در نهایت منجر به تخریب اندامک‌ها و مرگ سلولی می‌شود (Cui et al., ۲۰۱۷). سیستم غشایی گیاه یکی از اولین مکان‌هایی می‌باشد که در اثر تنش شدید دچار آسیب می‌شود (Cui et al. ۲۰۱۸) و میزان مالون‌دی‌آلدهید و نشت غشا از شاخص‌های مهم نشان‌دهنده‌ی میزان پایداری غشا هستند. تخریب سیستم غشایی منجر به افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و نشت الکترولیت‌ها (EL) می‌شود. گیاهان نیز در مقابل تولید گونه‌های فعال اکسیژن،آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تولید می‌کنند تا با از بین بردن ROS اضافی و حفظ تعادل سلولی، تأثیر منفی ناشی از تنش را کاهش دهند (Khan et al., ۲۰۱۹). در بررسی حاضر، تمامی پاسخ‌های فوق می‌توانند افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را تحت کم‌آبیاری توضیح دهند. در بررسی‌هایی تحت تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز برگ‌های توت‌فرنگی افزایش داشت (Sun et al., ۲۰۱۵) که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت دارد. طی بررسی‌هایی محققین نشان دادند که گیاهان توت‌فرنگی با تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطوح متابولیت‌های اسمزی فعال به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. این تغییرات پاسخ بیوشیمیایی می‌تواند باعث سازگاری با تنش خشکی شود و ظرفیت گیاهان را برای تحمل شرایط کم آبی بهبود بخشد (Sun et al., ۲۰۱۵). در بررسی حاضر محلول‌پاشی بوته‌های توت‌فرنگی توسط ملاتونین، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی افزایش بیشتری نسبت به سطوح خشکی نشان دادند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی که نتیجه اثرات رادیکال‌های آزاد هستند، نشان دهنده آسیب تنش در سطح سلولی می‌باشد. بنابراین سطح مالون دی‌آلدهید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، اغلب به‌عنوان یک شاخص برای آسیب اکسیداتیو بکار می‌رود (Antoniou et al., ۲۰۱۷). افزایش مالون دی‌آلدهید نشان‌دهنده این است که تحت تنش خشکی ساختار غشاء آسیب دیده و لیپیدهای آن آزاد شده است و از طرفی با وجود ترکیبات گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که تحت تنش زیاد می‌شود این لیپیدها اکسیده شده و مالون دی آلدهید تولید می‌شود. بنابراین وجود سیستم آنتی‌اکسیدان قوی باعث تقلیل ترکیبات ROS شده و به نوعی می‌تواند باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شود (Zafari et al., ۲۰۱۲). گزارش شده است که ملاتونین با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و از بین بردن مستقیم ROSها منجر به کاهش نشت الکترولیت و محتوای مالون دی آلدهید می‌شود (Ye et al., ۲۰۱۶; Cherono et al., ۲۰۲۱). همچنین نشان داده شده است که ملاتونین نشت الکترولیت و محتوای MDA را در خیار (*Cucumis sativus* L.) و بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) تحت تنش خشکی متوسط و شدید کاهش می‌دهد (Zhang et al., ۲۰۱۳; Naghizadeh et al., ۲۰۱۹).

مشخص شده است که تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی، فولات‌ها می‌توانند به‌طور غیرمستقیم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را با فعال کردن چرخه سم‌زدایی ROS گلوتاتیون-آسکوربات (Gorelova et al., ۲۰۱۷) یا مستقیماً از طریق کارایی بالای خود در مهار ROS و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی افزایش دهند (Cui et al., ۲۰۱۸). مطالعات متعدد قبلی در مورد رونوشت و متابولوم تأیید کردند که متابولیسم فولات در گیاهان به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر شرایط مختلف تنش قرار می‌گیرد. با این حال، اطلاعات در مورد نقش فولات‌ها به‌طور خاص در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های مختلف محیطی هنوز بسیار محدود است (Gorelova et al., ۲۰۱۷). اظهار شده است که فولات‌ها ممکن است نقش کلیدی در متابولیسم ROS و تنظیم تنش اکسیداتیو در گیاهان از طریق مشارکت احتمالی آنها در تولید NADPH ایفا کنند که برای سم‌زدایی ROS استفاده می‌شود. در بررسی‌هایی محققین نشان دادند که به موازات افزایش غلظت اسید فولویک فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز افزایش یافت (Ibrahim et al., ۲۰۲۱) که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت دارد.

۴- نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج بررسی حاضر نشان داد استفاده از ملاتونین و اسید فولویک ممکن است یک رویکرد کارآمد برای بهبود تحمل بوته‌های توت‌فرنگی تحت تنش خشکی باشد. ملاتونین و اسید فولویک در ابتدا به تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بوته‌های توت‌فرنگی کمک کرده که با کاهش نشت الکترولیت منجر به کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی می‌شوند. استفاده از ملاتونین و اسید فولویک همچنین باعث افزایش محتوای نسبی آب شدند. روی هم رفته، محلول‌پاشی ملاتونین و اسید فولویک نقش محافظتی بر بوته‌های توت‌فرنگی رشد یافته در شرایط تنش خشکی دارند و باعث افزایش عملکرد بوته‌های توت‌فرنگی در این شرایط می‌شوند. بر این اساس توصیه می‌شود برای بهره‌وری بهتر در کشت توت فرنگی در شرایط کم‌آبیاری از غلظت‌های مناسب ملاتونین و اسید فولویک استفاده شود.

منابع

- پروازی شندی، س.، پازکی، ع.، اصغرزاده، ا.، آزادی، ا. ۱۳۹۲. اثر دور آبیاری، باکتری‌های محرک رشد و اسید هیومیک بر عملکرد و اجزای عملکرد گندم رقم کویر. فصلنامه دانش نوین کشاورزی پایدار . جلد نهم، شماره ۳.

- قاسمی، ح.، امیری فهلیانی، ر.، کاوسی، ب.، دهداری، م. ۱۳۹۷. واکنش برخی ارقام توت فرنگی (*Fragaria×ananasa* Duch.) به کم آبیاری از نظر سطح برگ و برخی ویژگی‌های کمّی و کیفی میوه. مجله علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای، شماره ۳۳، ص ۳۸-۲۵.
- Abbas, N.A., Hammad, H.S. ۲۰۱۷. The effect of vernalization and sprayed gibberellins and humic acid on the growth and production of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitat*). Journal of Environmental Science and Pollution Research, ۳(۲), ۱۸۱-۱۸۵.
- Adak, N., Gubbuk, H., Tetik, N. ۲۰۱۸. Yield, quality and biochemical properties of various strawberry cultivars under water stress. Journal of the Science of Food and Agriculture, ۹۸(۱), ۳۰٤-۳۱۱.
- Aebi, H.E. ۱۹۸۳. Catalase. Methods of enzymatic analysis.
- Ahmad, S., Wang, G.Y., Muhammad, I., Farooq, S., Kamran, M., Ahmad, I., Zeeshan, M., Javed, T., Ullah, S., Huang, J.H., Zhou, X. B. ۲۰۲۲. Application of melatonin-mediated modulation of drought tolerance by regulating photosynthetic efficiency, chloroplast ultrastructure, and endogenous hormones in maize. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, ۹(۱), ۱-۱٤.
- Aksu, G., Altay, H. ۲۰۲۰. The effects of potassium applications on drought stress in sugar beet. Sugar Tech, ۲۲(٦), ۱۰۹۲-۱۱۰۲.
- AM, A., AM, A., AE, A. ۲۰۱٥. Effect of kaolin and fulvic acid antitranspirants on tomato plants grown under different water regimes. Alexandria science exchange Journal, ۳٦(April-June), ۱٦۹-۱۷۹.
- Antoniou, C., Chatzimichail, G., Xenofontos, R., Pavlou, J.J., Panagiotou, E., Christou, A., Fotopoulos, V. ۲۰۱۷. Melatonin systemically ameliorates drought stress-induced damage in M edicago sativa plants by modulating nitro-oxidative homeostasis and proline metabolism. Journal of Pineal Research, ٦۲(٤), .e۱۲٤۰۱.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J. ۲۰۱٥. Functions of melatonin in plants: a review. Journal of pineal research, ٥۹(۲), ۱۳۳-۱٥۰.
- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M. ۲۰۰۱. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. Plant Science, ۱٦۰(٤), ٦٦۹-٦۸۱.
- Cavazza, L., Patruno, A., Cirillo, E. ۲۰۰۷. Field capacity in soils with a yearly oscillating water table. Biosystems Engineering, ۹۸(۳), ۳٦٤-۳۷۰.
- Cherono, S., Ntini, C., Wassie, M., Mollah, M.D., Belal, M.A., Ogutu, C., Han, Y. ۲۰۲۱. Exogenous application of melatonin improves drought tolerance in coffee by regulating photosynthetic efficiency and oxidative damage. Journal of the American Society for Horticultural Science, ۱٤٦(۱), ۲٤-۳۲.
- Cui, G., Zhao, X., Liu, S., Sun, F., Zhang, C., Xi, Y. ۲۰۱۷. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. Plant Physiology and biochemistry, ۱۱۸, ۱۳۸-۱٤۹.
- Cui, S., Lv, X., Li, W., Li, Z., Liu, H., Gao, Y., Huang, G. ۲۰۱۸. Folic acid modulates VPO۱ DNA methylation levels and alleviates oxidative stress-induced apoptosis in vivo and in vitro. Redox biology, ۱۹, ۸۱-۹۱.
- Daneshvar Hakimi Maibodi, N., Kafi, M., Nikbakht, A., Rejali, F. ۲۰۱٥. Effect of foliar applications of humic acid on growth, visual quality, nutrients content and root parameters of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Journal of Plant Nutrition, ۳۸(۲), ۲۲٤-۲۳٦.
- Dinler, B.S., Gunduzer, E., Tekinay, T. ۲۰۱٦. Pre-treatment of fulvic acid plays a stimulant role in protection of soybean (Glycine max L.) leaves against heat and salt stress. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica, ٥۸(۱).
- Eisa, E.A., Honfi, P., Tilly-Mándy, A., Gururani, M.A. ۲۰۲۳. Exogenous Application of Melatonin Alleviates Drought Stress in Ranunculus asiaticus by Improving Its Morphophysiological and Biochemical Attributes. Horticulturae, ۹(۲), ۲٦۲.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K.H.M. ۲۰۱۲. Drought stress in plants: an overview. Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features, ۱-۳۳.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N.S.M.A., Fujita, D.B.S.M.A., Basra, S.M.A. ۲۰۰۹. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Sustainable agriculture, ۱٥۳-۱۸۸.

- Ghaderi, N., Talaie, A.R., Ebadi, A., Lessani, H. ۲۰۱۱. The physiological response of three Iranian grape cultivars to progressive drought stress.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. ۱۹۷۷. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant physiology, ۵۹(۲), ۳۰۹-۳۱٤.
- Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C., Van Der Straeten, D. ۲۰۱۷. Folates in plants: research advances and progress in crop biofortification. Frontiers in chemistry, ۵, ۲۱.
- Ibrahim, M.F.M., Ibrahim, H.A., Abd El-Gawad, H.G. ۲۰۲۱. Folic acid as a protective agent in snap bean plants under water deficit conditions. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, ۹٦(۱), ۹٤-۱۰۹.
- Janas, K.M., Posmyk, M.M. ۲۰۱۳. Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application. Acta physiologiae plantarum, ۳۵, ۳۲۸۵-۳۲۹۲.
- Khan, M.N., Zhang, J., Luo, T., Liu, J., Rizwan, M., Fahad, S., Xu, Z., Hu, L. ۲۰۱۹. Seed priming with melatonin coping drought stress in rapeseed by regulating reactive oxygen species detoxification: Antioxidant defense system, osmotic adjustment, stomatal traits and chloroplast ultrastructure perseveration. Industrial Crops and Products, ۱٤۰, ۱۱۱۵۹۷.
- Khang, V.T. ۲۰۱۱. Fulvic foliar fertilizer impact on growth of rice and radish at first stage. Omonrice, ۱۸, ۱٤٤-۱٤۸.
- Li, H., Li, T., Gordon, R.J., Asiedu, S.K., Hu, K. ۲۰۱۰. Strawberry plant fruiting efficiency and its correlation with solar irradiance, temperature and reflectance water index variation. Environmental and Experimental Botany, ٦۸(۲), ۱٦۵-۱۷٤.
- Li, Z., Su, X., Chen, Y., Fan, X., He, L., Guo, J., Wang, Y., Yang, Q. ۲۰۲۱. Melatonin improves drought resistance in maize seedlings by enhancing the antioxidant system and regulating abscisic acid metabolism to maintain stomatal opening under PEG-induced drought. Journal of Plant Biology, ٦٤, ۲۹۹-۳۱۲.
- Liang, D., Ni, Z., Xia, H., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., Lin, L., Deng, Q., Luo, X. ۲۰۱۹. Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit seedlings under drought stress. Scientia Horticulturae, ۲٤٦, ۳٤-٤۳.
- Liu, J., Wang, W., Wang, L., Sun, Y. ۲۰۱۵. Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato. Plant growth regulation, ۷۷, ۳۱۷-۳۲٦.
- Mandave, P.C., Pawar, P.K., Ranjekar, P.K., Mantri, N., Kuvalekar, A.A. ۲۰۱٤. Comprehensive evaluation of in vitro antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. Scientia Horticulturae, ۱۷۲, ۱۲٤-۱۳٤.
- Naghizadeh, M., Kabiri, R., Hatami, A., Oloumi, H., Nasibi, F., Tahmasei, Z. ۲۰۱۹. Exogenous application of melatonin mitigates the adverse effects of drought stress on morpho-physiological traits and secondary metabolites in Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica*). Physiology and Molecular Biology of Plants, ۲۵, ۸۸۱-۸۹٤.
- Nakano, Y., Asada, K. ۱۹۸۱. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, ۲۲(۵), ۸٦۷-۸۸۰
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. ۱۹۹۹. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in Arabidopsis thaliana. FEBS letters, ٤٦۱(۳), ۲۰۵-۲۱۰.
- Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P. ۲۰۱۵. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. Scientia Horticulturae, ۱۸۳, ۱۰۰-۱۰۸.
- Rao, G.N. ۱۹۹٦. New diet (NTP-۲۰۰۰) for rats in the National Toxicology Program toxicity and carcinogenicity studies. Fundamental and Applied Toxicology, ۳۲(۱), ۱۰۲-۱۰۸.
- Sadak, M.S., Abdalla, A.M., Abd Elhamid, E.M., Ezzo, M.I. ۲۰۲۰. Role of melatonin in improving growth, yield quantity and quality of *Moringa oleifera* L. plant under drought stress. Bulletin of the National Research Centre, ٤٤(۱), ۱-۱۳.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C. ۲۰۰۲. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science, ۱٦۲(٦), ۸۹۷-۹۰٤.

- Samavat, S., Malakooti, M. ۲۰۰۵. The necessity of using organic acids to increase the quality and quantity of agricultural products. Technical Journal, ٤٦٣. Sana Press, Tehran, Iran. (In Persian)
- Sen, A., Puthur, J.T. ۲۰۲۱. Halo-and UV-B priming-mediated drought tolerance and recovery in rice seedlings. Plant Stress, ۲, ۱۰۰۰۱۱.
- Stancheva, I., Geneva, M., Hristozkova, M., Markovska, Y., Salamon, I. ۲۰۱۰. Antioxidant capacity of sage grown on heavy metal-polluted soil. Russian Journal of Plant Physiology, ٥٧(٦), ۷۹۹–۸۰۵.
- Suh, H.Y., Yoo, K.S., Suh, S.G. ۲۰۱٤. Effect of foliar application of fulvic acid on plant growth and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Horticulture, Environment, and Biotechnology, ٥٥, ٤٥٥-٤٦١.
- Sun, C., Li, X., Hu, Y., Zhao, P., Xu, T., Sun, J., Gao, X. ۲۰۱٥. Proline, sugars, and antioxidant enzymes respond to drought stress in the leaves of strawberry plants. Horticultural Science and Technology, ٣٣(٥), ٦٢٥-٦٣٢.
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R.J. ۲۰۱۲. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. Journal of experimental botany, ٦٣(٢), ٥٧٧-٥٩٧.
- Yang, W., Li, P., Guo, S., Song, R., Yu, J. ۲۰۱۹. Co-application of soil superabsorbent polymer and foliar fulvic acid to increase tolerance to water deficit maize: photosynthesis, water parameters, and proline. Chilean journal of agricultural research, ٧٩(٣), ٤٣٥-٤٤٦
- Ye, J., Wang, S., Deng, X., Yin, L., Xiong, B., Wang, X. ۲۰۱٦. Melatonin increased maize (*Zea mays* L.) seedling drought tolerance by alleviating drought-induced photosynthetic inhibition and oxidative damage. Acta physiologiae plantarum, ٣٨(٢), ٤٨.
- Zafari, S., Niknam, V., Musetti, R., Noorbakhsh, S.N. ۲۰۱۲. Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). Acta Physiologiae Plantarum, ٣٤, ٥٦١-٥٦٨.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y. D. ۲۰۱٤. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. Journal of Experimental Botany. ٦٦(٣):٦٤٧-٦٥٦.
- Zhang, N., Zhao, B., Zhang, H.J., Weeda, S., Yang, C., Yang, Z.C., Ren, S., Guo, Y.D. ۲۰۱۳. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of pineal research, ٥٤(١), ١٥-٢٣.
- Zhao, C., Guo, H., Wang, J., Wang, Y., Zhang, R. ۲۰۲۱. Melatonin enhances drought tolerance by regulating leaf stomatal behavior, carbon and nitrogen metabolism, and related gene expression in maize plants. Frontiers in Plant Science, ١٢, ٧٧٩٣٨٢.

Effect of Melatonin and Fulvic acid on enzymatic activity and physiological properties of strawberry cv Camarosa under drought stress

Mohamad Safa [۱], Ali Akbar Shokouhian [۲]*, Arash Hemati [۳], Ali rasoulzadeh [٤]

[۱] Ph.D. student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili E-mail: mohamadsafa٦٦@yahoo.com

[۲] Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili (Corresponding Author),Phone number: ۰۹۱٤٤٥٥۲٦۲۸ E-mail: shokouhiana@yahoo.com

[۳] Professor of Water Engineering Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Phone number:۰۹۱٤۱٥٦٥۳۱۳ E-mail: rasoulzadeh@uma.ac.ir

[۴] Manager of Qizil Toprag Sahand Company Phone number:۰۹۱۴۸۴۰۰۰۴۶ E-mail: hemati.arash@yahoo.com

* Corresponding Author email: aliakbarshokouhiana@gmail.com

Abstract

Introduction

Drought stress as a non-biological stress in nature has several dimensions and affects plants at different levels. During prolonged drought stress, the amount of water in the plant cells decreases and causes thorogenesis, which eventually leads to plant death. The concentration of solutions in the cytosol and extracellular matrices increases due to drought stress in plants and cell development decreases as a result, which leads to growth inhibition and failure to reproduce. Subsequently, the plant withers with the accumulation of abscisic acid and compatible osmolytes such as proline. Overproduction of reactive oxygen species and formation of scavenging compounds of radicals such as ascorbate and glutathione take place at this stage. Drought stress also affects stomatal closure, physiological traits, gas exchange, reduced transpiration, and reduced carbon assimilation (photosynthesis). Drought stress also affects stomatal closure, physiological traits, gas exchange, transpiration reduction, and carbon assimilation reduction (photosynthesis). Negative effects on mineral metabolism and nutrition (absorption and transport of nutrients) reduce leaf area and change the distribution of assimilates between organs. Strawberry are one of the most popular fruits in the world and a rich source of photosynthetic compounds and vitamins. For this reason, it is classified as a staple food that plays a role in biological activities that affect human health. Organic matter is essential for fertility and preservation of soil biological, chemical and physical properties. Recently, much attention has been paid to the possibility of using organic matter to improve plant growth. Humic substances (humic acid and folic acid) are among the organic substances that are used as growth regulators under suitable irrigation conditions and drought. In recent years, the number of studies on melatonin in plants has increased significantly. The wide range of functions in different organisms indicates the potential of this substance in plant physiology. Its role as an anti-stress agent against stressors such as water, salinity, low temperature and high temperature, UV and toxic chemicals has been analyzed. The antioxidant role and growth promoter (among other melatonin functions in the plant) is very important. Melatonin is a polar molecule with diverse physiological and cellular functions. Melatonin has received a great deal of attention in recent years, as research has shown that melatonin is widely found in the leaves, roots, stems, fruits, and seeds of all plant species.To date, numerous applications of fulvic acid and melatonin in agriculture, food industry and animal sciences have been proposed, but unfortunately few studies have been conducted on the simultaneous use of fulvic acid and melatonin in agriculture, which necessitates research in this area. Therefore, considering the economic importance and increasing demand for small fruits, especially strawberries, in this study, the effect of fulvic acid and melatonin on the biochemical properties of strawberries under water stress was investigated.

Materials and methods

This experiment was performed in Bostanabad city (East Azerbaijan province) in Iran. Strawberry seedlings (Kamarosa cultivar) were obtained from a commercial strawberry growing greenhouse in Urmia in October and transferred to the greenhouse in cultivation trays. Laboratory studies were performed in the laboratories of the Department of Horticulture and Soil Science, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University. This experiment was performed as a factorial experiment in a completely randomized design with ۳ factors in ٤ replications. Factors include water stress at three levels of ۱۰۰ (full irrigation (control), ۲۵ and ۵۰٪, maintainable water drain), fulvic acid at three levels (control, ۲۰۰ and ٤۰۰ mg/l) and melatonin at three levels (control, ۷۵ and ۱۵۰ µM). After complete establishment and cooling of plants, melatonin and fulvic acid were applied to the treatments in three stages through foliar application. The first stage was performed after complete establishment of the plant (۱۵ days after planting), the second stage was performed ۱۰ days after the initial time of treatment and the third stage was performed ۱۰ days after the second stage of foliar application. It should be noted that distilled water was used to treat the plants in the control group.In order to apply water stress to the plants, at first the soil is completely dried (to decrease the effect of moisture on the weight of the soil in the pot), then the same amount of coarse sand was poured on the floor after weighing to create sufficient drainage in the pots. The pots were then placed on a scale (accurate to one tenth of a gram) and the soil mixture was poured into all of them. Then one of the pots was selected randomly and the soil inside it was completely submerged and covered with plastic and allowed the gravity water to come out. Because this part of the soil moisture is useless for the plant and must be drained. The pot was weighed and taken daily for a week (until the weight of the pot was fixed) after the soil moisture reached the field capacity. Then the soil inside the pot was emptied in a special container and the mass of the container along with the soil inside it was recorded and dried in an oven at ۱۰۵ ° C for ۲٤ hours. After removing from the oven, the soil with the container was weighed again and the difference between these two masses (before the oven and after the oven) showed the mass of water (Mw) of the soil in the pot in the last stage of the experiment. The mass of the container was deducted from the mass of the soil sample along with the container after the oven and the mass of dry soil (Ms) was calculated. Finally, the mass moisture content (θm) was obtained using the following equation.

$$\theta m = \frac{Mw}{Ms} \qquad (1)$$

Measurement and amount of Mw according to the relationship between humidity (mass moisture (θm)) at that stage, was obtained after obtaining moisture in the last stage of the experiment and adding the mass difference of the pots in each time period. (Given that the difference in the mass of the pots on each successive day indicates the amount of water evaporated and the amount of dry soil at each stage is constant). By obtaining the mass of the pot and the mass moisture, a linear relationship between them was drawn by Excel software. The moisture content of the pots was calculated by the regression relationship with the mass of the pots at the stress levels. To apply stress, the following equation was calculated:

$$I = AW \times MAD \qquad (2)$$

Where (I) is the amount of irrigation water, (AW) water retention in the soil and (MAD) the maximum allowable drainage of water.It is noteworthy that three levels of stress, namely control (moisture retention at field capacity), ۲۵٪ drainage and ۵۰٪ water retention were placed instead of MAD and soil moisture was calculated for these levels. Thus, when the humidity of the pots reaches this value, it indicates that the calculated storage water has been drained. Their moisture content was kept constant at the stress level by measuring the mass of the pots and plantless pots were used to remove the growth effect.

Results

Analysis of variance of data showed that the effect of drought stress and its interactions with fulvic acid and melatonin treatment on yield, RWC, electrolyte leakage and antioxidant enzymes activity were statistically significant. The interactions between treatments (drought stress, fulvic acid and melatonin) were statistically significant and only the triple effects of catalase were not statistically significant. The results showed that the drought satress (۲۵ and ۵۰٪, maintainable water drain) without the application of fulvic acid and melatonin decreased yield, RWC and increased electrolyte leakage. But application of fulvic acid and melatonin increased the yield and RWC under drought stress conditions. Furthermore, the application of fulvic acid and melatonin reduced the oxidative damage (electrolyte leakage) in the plants through increased enzymatic activity under drought stress conditions. Generally, the highest and lowest yield was obtained in control plants (full irrigation) with foliar spraying with melatonin (۱۵۰ µM) and ۵۰٪, maintainable water drain which were ٦٩٣,٥٤ and ٥٠٤,٧٨ g, respectively. The highest and lowest ascorbate peroxidase activity was obtained in ۵۰٪, maintainable water drain with foliar spraying melatonin (۷۵ µM) and control plants (full irrigation) with foliar spraying melatonin (۷۵ µM) and fulvic acid (٤٠٠ mg/l) which were ٢,٩٢٩ and ١,٤٢٦ µmol min^{-1} gFW^{-1}, respectively. The highest and lowest peroxidase activity was obtained in ۵۰٪, maintainable water drain with foliar spraying melatonin (۷۵ µM) and fulvic acid (۲۰۰ mg/l) and control plants (full irrigation) with foliar spraying fulvic acid (٤٠٠ mg/l) which were ٢,٤١١ and ٠,٥٨ µmol min^{-1} gFW^{-1}, respectively. The highest and lowest superoxide dismutase activity was obtained in ۵۰٪, maintainable water drain with foliar spraying melatonin (۱۵۰ µM) and fulvic acid (٤٠٠ mg/l) and control plants (full irrigation) with foliar spraying fulvic acid (۲۰۰ mg/l) which were ٩٦,٩٣ and ٣٦,١٨ µmol min^{-1} gFW^{-1}, respectively. The highest and lowest level electrolyt leakage leaves also were observed in ۵۰٪, maintainable water and control plants (full irrigation) with foliar spraying melatonin (۱۵۰ µM) and fulvic acid (۲۰۰ mg/l) which were ٩٦,٩٣ and ٣٦,١٨ respectively. The highest and lowest relative water content (RWC) were obtained control plants (full irrigation) with foliar spraying with melatonin (۱۵۰ µM) and ۵۰٪, maintainable water drain which were ٩٥,٣٥ and ٥٣,٩٢٪, respectively. The highest and lowest catalase activity was obtained in ۵۰٪, maintainable water drain with foliar spraying fulvic acid (٤٠٠ mg/l) and control plants (full irrigation) which were ٠,٧١٠٨ and ٠,٤٩٤٦ µmol min^{-1} gFW^{-1}, respectively.

Conclusion

Overall, the results of the present study suggest that the use of melatonin and fulvic acid may be an effective approach to improve the yield of strawberry plants under drought stress. Melatonin and fulvic acid helped to strengthen the antioxidant enzymes system of strawberry plants, which reduced the oxidative damage. Also, foliar application of melatonin and fulvic acid had a protective role on strawberry plants grown under drought stress and its optimal concentration will be useful in increasing drought tolerance in many crops.

Keywords: "Antioxidant", "Electrolyte leakage", "Growth Regulator", "Relative Water Content" and "Yield"