مقایسه تأثیر متقابل تنش خشکی و سالیسیلیک اسید در برگ جمعیتهای مختلف زعفران مزروعی (*Crocus Sativus* L.)

فاطمه اصل زعیم[۱]، وحید نیکنام[۱*]، حسن ابراهیم زاده معبود[۱] و گل اندام شریفی[۲]

[۱] **تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، قطب تبارزائی موجودات زنده ایران**

[۲] **تهران، بنیاد دانشنامه نگاری ایران**

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۳

چکیده

خشکی از جمله مهمترین تنش های محیطی است که با برهم زدن تعادل اسمزی گیاهان، موجب کاهش رشد و عملکرد آنها می شود. سالیسیلیک اسید یک تنظیم کننده رشد داخلی با ماهیت فنولی می باشد که اثر محافظتی را در برابر شرایط تنشی در گیاه القا می کند. در این پژوهش به منظور بررسی بهبود تحمل به خشکی در سه جمعیت از زعفران مزروعی از تیمار سالیسیلیک اسید در دو غلظت ۰/۵ و۱ میلی مولار استفاده شد. در پاسخ به تنش خشکی وزن تر هر سه جمعیت کاهش یافت و استفاده از سالیسیلیک اسید در شرایط تنش شدید (۱۰٪ و ۲۰٪ PEG) وزن تر هر سه جمعیت را افزایش داد. تحت شرایط تنش، محتوای مالون دی آلدهید، آب اکسیژنه و فعالیت آنزیم های پاداکساینده (کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز) افزایش یافت و تیمار سالیسیلیک اسید باعث کاهش این پارامترها شد. با توجه به کاهش شاخص های تنش (مالون دی آلدهید و پراکسید هیدروژن) تحت تأثیر سالیسیلیک اسید می توان گفت که استفاده از این ترکیب می تواند در بهبود اثرات مخرب تنش نقش داشته باشد. با توجه به اینکه در بین سه جمعیت مورد مطالعه، جمعیت آریان شهر کمترین آسیب را از نظر کاهش وزن تر متحمل شده و همچنین آنزیم های پاداکساینده در این جمعیت، با یک روند تدریجی و ملایمی افزایش یافته اند، می توان گفت این جمعیت سازوکار موثرتری را در مقابله با تنش، نسبت به دو جمعیت دیگر اتخاذ کرده است. سالیسیلیک اسید در هر سه جمعیت تاثیر مشابهی داشته است.

واژه های کلیدی: زعفران مزروعی، تنش خشکی، سالیسیلیک اسید، آنزیم های پاداکساینده، مالون دی آلدهید.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۳۶۳۷، پست الکترونیکی: vniknam@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

زعفران مزروعی(*Crocus sativus* L.) گیاهی از خانواده زنبقیان (*Iridaceae*) است که به عنوان گرانترین محصول کشاورزی و دارویی جهان جایگاه ویژه ای در بین محصولات صنعتی وصادراتی ایران دارد. در حال حاضر، ایران بزرگترین تولید کننده و صادر کننده زعفران در جهان است (۷). تنش خشکی یکی از تنش های متداول است که رشد و تولید مثل گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث تغییرات متابولیسمی و اکسایشی در آنها می شود (۹).

تنش خشکی از طریق کاهش آب گیاه باعث تولید انواع اکسیژن‌های فعال (ROS) مانند سوپراکسید($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن(H_2O_2)، بنیان هیدروکسیل ($OH^{\bullet-}$) و اکسیژن منفرد می‌شود (۳۶ و ۴۱). افزایش بیش از حد انواع اکسیژن فعال و به دنبال آن بر هم خوردن تعادل بین واکنش‌های اکسیداسیون- احیا می‌تواند منجر به تنش اکسایشی در یاخته های گیاهی شود (۴۷). به منظور کم

کردن آسیب‌های ناشی از تنش‌های اکسایشی، گیاهان مجهز به سازگان دفاعی پاد اکسایشی هستند که ترکیب‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربات و گلوتاتیون و همچنین ترکیب‌های آنزیمی مانند سوپر اکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و پلی فنل اکسیداز (PPO) را شامل می شوند. عموماً با القای تنش‌های اکسایشی، فعالیت سازگان های پاداکسایشی گیاه نیز افزایش می‌یابد (۵۰ و ۵۸).

حساسیت گیاه و آسیب وارد شده به غشاء با اندازه گیری محتوای مالون دی آلدهید(MDA) که حاصل قرارگرفتن اسیدهای چرب غیراشباع درمعرض تنش است، مشخص می‌شود. افزایش تنش با ایجاد تغییر دراسیدهای چرب غیراشباع بر ساختار و ویژگیهای غشاء سلولی اثرگذاشته و باعث افزایش تولید رادیکالهای آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها و اختلال در تراوایی غشاء سلولی و در نتیجه تراوش اسمولیتها درگیاهان حساس می‌شود (۲۱ و ۳۲).

سالیسیلیک اسید (SA) یک ترکیب فنولی است که جزء تنظیم کننده های رشد گیاهی به شمار می آید و در میان ترکیبات فنولی مشتقات بنزوئیک و سینامیک اسیدها دارای اثراتی روی متابولیسم و بیوسنتز و همچنین فعالیت های اکسایشی و فعالیت های زیستی نظیر رشد و نمو، فتوسنتز، تنفس، جذب و انتقال یون ها، تغییر فعالیت برخی آنزیم های مهم و ساختار کلروپلاست می باشد (۱۷، ۳۹ و ۵۶). اثرات متعدد فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سالیسیلیک اسید بر گیاهان گزارش شده است (۴۸). نتایج Bideshki و Arvin نشان داد که سالیسیلیک اسید می تواند به صورت یک تنظیم کننده رشد بالقوه برای بهبود رشد و تولید محصول گیاه تحت شرایط محدودیت آب خاک عمل نماید (۱۴). این اثرات شامل تاثیر بر جذب یونی، نفوذپذیری غشا، تنفس میتوکندریایی و غیره است (۱۲، ۲۴ و ۲۵). همچنین، سالیسیلیک اسید یک مولکول علامتی مهم برای تنظیم پاسخ های گیاه به تنش ها است (۲۰و ۵۱). Nemeth و همکاران، نقش سالیسیلیک اسید را در پاسخ به تنش های غیرزیستی نشان دادند. آنها گزارش دادند که یک غلظت مشخص از سالیسیلیک اسید می تواند باعث افزایش مقاومت به یک نوع تنش و همزمان کاهش مقاومت به تنش دیگر شود (۴۴). این پاسخ های متناقض نشان می دهند که تنش های متفاوت از مسیرهای مستقل یا وابسته به سالیسیلیک اسید عمل می کنند و این مولکول اثر یکسانی در همه گونه ها ندارد. به همین جهت مطالعه زمان و مقدار استفاده از سالیسیلیک اسید از اهمیت زیادی برخوردار است (۸). استعمال خارجی سالیسیلیک اسید باعث تعدیل اثرات تنش خشکی بر گیاه جو می شود (۲۲). تیمار جوانه های گندم تحت تنش خشکی با سالیسیلیک اسید افزایش کلی در محتوای آب، وزن خشک، فعالیت کربوکسیلازی روبیسکو، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کلروفیل کل را در مقایسه با جوانه های تیمار ندیده نشان داده است (۳۰). Senaratna و همکاران (۵۳) بیان کردند سالیسیلیک اسید در نخود وگوجه فرنگی با فعال کردن سازوکارهای دفاعی پاداکسایندگی باعث تحمل به تنش می شوند. Janda و همکاران نشان دادند که پیش تیمار با سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم های پاداکساینده در ذرت شد (۳۵).

نتایجی که تاکنون از مطالعات به دست آمده است نشان می دهد که سالیسیلیک اسید در تنظیم پاسخ گیاهان به تنش خشکی نقش داشته و بیان می کند که سالیسیلیک اسید می تواند بعنوان یک تنظیم کننده رشد بالقوه برای بهبود رشد گیاهان تحت تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرد (۵۴). Kang و همکاران نشان دادند که غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید موجب افزایش رشد در گیاهچه های گندم می شود در حالیکه غلظت های بالای سالیسیلیک اسید (۳-۲ میلی مولار) باعث بازدارندگی از رشد و کاهش تحمل خشکی می شود (۳۷). Senaratna و همکاران نیز بیان کردند که غلظت های ۰/۵ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک

اسید نقش موثری را در کاهش اثرات مخرب تنش خشکی در گوجه فرنگی و لوبیا دارند (۵۳). در پژوهش حاضر نیز همین دو غلظت سالیسیلیک اسید برای بررسی اثر بهبوددهندگی آن استفاده شد.

همانطور که گفته شد زعفران، گیاه بومی ارزشمند و از مهم ترین محصولات کشاورزی کشور محسوب می شود. هرچند گیاه زعفران دارای مقاومت نسبی به خشکی است، لیکن نباید در شرایط تنش خشکی قرار گیرد زیرا تنش خشکی بر عملکرد ماده خشک و عملکرد اقتصادی زعفران مستقیما اثر منفی دارد.

تاکنون درباره تأثیر تنش خشکی در گیاه زعفران مطالعاتی انجام شده است. Mzabri و همکاران (۴۲) در شرق مراکش اثر تنش خشکی را بر رشد و نمو گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) بررسی کردند. همچنین، صفری و همکاران(۴) نشان دادند در شرایط تنش رطوبتی، مصرف سوپرجاذب به مقدار مناسب می تواند با افزایش ظرفیت رطوبتی خاک موجب تعدیل اثرات ناشی از تنش خشکی شود و عملکرد زعفران را در مناطق خشک و کویری بهبود بخشد. هدف از انجام پژوهش حاضر، مقایسه تاثیر تنش خشکی و سالیسیلیک اسید روی سه جمعیت مختلف زعفران مزروعی (نطنز، دیهوک و آریان شهر) است.

ازآنجا که استان خراسان، از نظر وسعت بسیار پهناور و از نظر اقلیمی بسیار متنوع است و زعفران در نقاط مختلف این استان و همچنین در بعضی استان های دیگر کشت می شود و لذا، زعفران در هر منطقه به سازگاری نسبی با شرایط آن منطقه رسیده است نمی توان اثر تنش خشکی و سالیسیلیک اسید را بر پارامترهای رشدی گیاه تنها در یک نقطه جغرافیایی بررسی کرد و نتایج آن را به نقاط دیگر تعمیم داد. لذا، در این پژوهش سعی شده است تا سه نقطه جغرافیایی مختلف با فاصله نسبتاً زیاد از هم انتخاب و اثر تنش و عامل بهبود دهنده تنش به طور همزمان با عامل جغرافیایی مورد بررسی و مقایسه قرار گیرد.

مواد و روشها

کشت بنه ها و اعمال تیمارهای خشکی و سالیسیلیک اسید: در این پژوهش از بنه های زعفران جمعیت های دیهوک، آریان شهر و نطنز که از طریق کشاورزان شهرستانهای طبس (از توابع استان یزد)، قاینات (از توابع استان خراسان جنوبی) و نطنز (از توابع استان اصفهان) تهیه شده بود استفاده شد. بنه های جمعیت دیهوک از روستای دیهوک شهرستان طبس و از مزرعه ای ۷ ساله، بنه های جمعیت آریان شهر از روستای آریان شهر شهرستان قاینات و از مزرعه ای ۷ساله، بنه های جمعیت نطنز از شهرستان نطنز و از مزرعه ای ۸ ساله و در خرداد ماه ۱۳۹۱ جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شده و در شهریور ماه به منظور حذف عوامل خارجی خاک، در بستر پرلیت کاشته شدند و در شرایط گلخانه ای ۱۶ ساعت روشنایی/ ۹ ساعت تاریکی و دمای روزانه و شبانه (۲۵ / ۱۸) قرار گرفتند.

در این آزمایش بنه های متوسط با وزن تقریبی ۸ تا ۱۲ گرم جداسازی شد و تعداد ۲ بنه در هر گلدان در عمق ۷ سانتی متری گلدان و با ۴ تکرار کاشته شدند. آبیاری گلدان‌ها تا مرحله جوانه زنی بنه ها که حدود ۱۰ روز طول کشید، تنها با آب وپس از جوانه زنی بصورت یک روز در میان و با محلول غذایی ۱/۲ هوگلند صورت گرفت. تنش خشکی به مدت یک ماه و با غلظت های مختلف پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG6000) (۰، ۵٪، ۱۰٪، ۲۰٪) اعمال شد. پس از گذشت ۲ هفته از اعمال تنش، از سالیسیلیک اسید در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی مولار به تعداد دوبار و با فاصله یک هفته به صورت افشانه روی برگها استفاده شد. پس از تیمار با این تنظیم کننده، گیاهان به منظور سنجش و مشاهده اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برداشت شدند.

اندازه گیری وزن تر: اندازه گیری وزن تر برگها بلافاصله بعد از نمونه برداری و با استفاده از ترازوی دیجیتال صورت گرفت.

اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی: پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه گیری محتوای MDA تعیین می‌شود (۳۵). مقدار ۰/۲ گرم از بافت تر برگ در ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد (w/v) سائیده شد. سپس همگنای حاصل در سانتریفیوژ یخچال دار Beckman مدل J-12 با شتاب ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی لیتر از روشناور، ۲ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA)۲۰٪ (w/v) حاوی ۰/۵ ٪ تیوباربیتوریک اسید (TBA) (w/v) اضافه کرده، مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار داده و سپس سریعاً در حمام یخ سرد شد. بعد از سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه جذب روشناور در ۵۳۲ نانومتر و جذب غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-160, Shimadzu, Tokyo, Japan) در مد Photometric خوانده شد. در نهایت مقدار مالون دی آلدهید که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است براساس نانومول درگرم وزن تر و با استفاده از رابطه ذیل محاسبه گردید(۵۶).

$$\text{MDA} = \frac{(532\text{nm} - 600\text{nm})}{(\text{quvete diameter} \times \text{quenching factor})} \times \text{dilution factor}$$

اندازه گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2): براساس روش Velikova و همکاران، ۱ گرم بافت تر در حمام یخ با ۵ میلی لیتر TCA۰/۱٪ (w/v) هموژنیزه شد و سپس در ۴ درجه سانتی گراد درg ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ۰/۵ میلی لیتر از محلول روشناور به ۰/۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی مولار با *p*H=7 و ۱میلی لیتر پتاسیم یدید اضافه شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه ها به وسیله مقایسه جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد (y=0.212x با R2=0.99) آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی لیتر محاسبه شد. در نهایت غلظت پراکسید هیدروژن نمونه ها براساس میکرومول پراکسید هیدروژن به ازای گرم وزن تر محاسبه شد (۶۱).

استخراج و سنجش مقدار پروتئین های محلول: به منظور سنجش فعالیت آنزیم ها و تهیه عصاره آنزیمی،۰/۳ گرم بافت تر برگ در ۴درجه سانتیگراد با ۵ میلی لیتر بافر استخراج Tris-HCl یک مولار (*p*H=۶/۸) ساییده و همگن شد. سپس همگنای حاصل در سانتریفوژ یخچال دار Beckman مدل J-21 با شتاب g ۱۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. حجم روشناور جدا شده اندازه گیری و در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای بررسی کمی پروتئین ها و آنزیم ها از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160 استفاده شد. بررسی کمی پروتئین ها با روش برادفورد (۱۵) و با کمک منحنی استاندارد (با استفاده از آلبومین سرم گاوی در محدوده صفر تا ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر) انجام شد.

سنجش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) (EC 1.15.1.1)

فعالیت این آنزیم با قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) تعیین شد. مخلوط واکنش محتوی بافر فسفات۵۰ میلی مولار با *p*H=۷/۵، متیونین ۱۳ میلی مولار Na-EDTA ۰/۱ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم(NBT) ۷۵μM، ریبوفلاوین ۷۵ μM و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره می باشد. در دو لوله آزمایش ۳ میلی لیتر از محلول فوق بدون عصاره آنزیمی ریخته، یکی در دستگاه دور از نور و دیگری در حضور نور فلوئورسنت به عنوان شاهد قرار داده شد. هر دو دقیقه یک بار جذب محلول در مد photometric و طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu خوانده شد. این روش براساس تبدیل NBT به فورمازان در حضور نور و تشکیل رنگ

بود. درصورتیکه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در محیط وجود داشت ، از انجام واکنش مذکور ممانعت کرده و تشکیل و ظهور رنگ را کاهش می داد. پس از ۱۸ دقیقه جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu و طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. تفاوت بین جذب هر عصاره پس از ۱۸ دقیقه و جذب مخلوط بدون آنزیم نشان دهنده بازداشت واکنش خود به خودی تشکیل فورمازان توسط سوپراکسید دیسموتاز بود. فعالیت این آنزیم بر حسب واحد آنزیمی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین (Unit mg^{-1}protein) محاسبه شد (۲۳).

سنجش فعالیت پراکسیداز(POD)(EC 1.11.1.7): فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس روش Abeles در یک مخلوط واکنش حاوی ۰/۴ میلی لیتر H_2O_2 ۳ درصد، ۰/۲ میلی لیتر بنزیدین ۲۰ میلی مولار، ۴ میلی لیتر بافر استات سدیم ۰/۲ مولار (*p*H=۴/۸) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم اندازه گیری شد. تغییرات جذب بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu ، مد Kinetic و طول موج ۵۳۰ نانومتر هر ۱۵ ثانیه به مدت ۶۰ ثانیه خوانده شد. فعالیت پراکسیداز بر حسب میکرومول بنزیدین اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد(۹).

سنجش فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO)(EC 1.14.18.1): به منظور سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Raymond و همکاران استفاده شد. در این روش مخلوطی از ۲/۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۲ مولار با pH =۶/۸ و مقدار ۰/۲ میلی لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار با۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به یک لوله آزمایش که در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشت افزوده و بلافاصله تغییرات جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu و طول موج ۴۳۰ نانومتر با فاصله زمانی ۴۰ ثانیه در مدت ۴ دقیقه خوانده شد. فعالیت این آنزیم بر حسب هر میکرومول پیروگالل اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین (Unit mg^{-1}protein) محاسبه شد(۴۹).

سنجش فعالیت کاتالاز(CAT)(EC 1.11.1.6): فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس تجزیه H2O2 توسط اندازه گیری تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه و با فواصل زمانی ۱۵ ثانیه انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۶۲۵ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (*p*H=7)، ۷۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳٪ و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم بر حسب هر میکرومول H2O2 تجزیه شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین (Unit mg^{-1}protein) محاسبه شد (۱۰).

آنالیز آماری داده ها: تمام آزمایش ها در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. مقایسه همه میانگین ها و میانگین داده ها در سطح خطای ۵٪ با آزمون دانکن (DMRT) توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۱۹) صورت گرفت و اعدادی که حروف مشابه دارند از نظر آماری تفاوت معنی دار نداشتند.

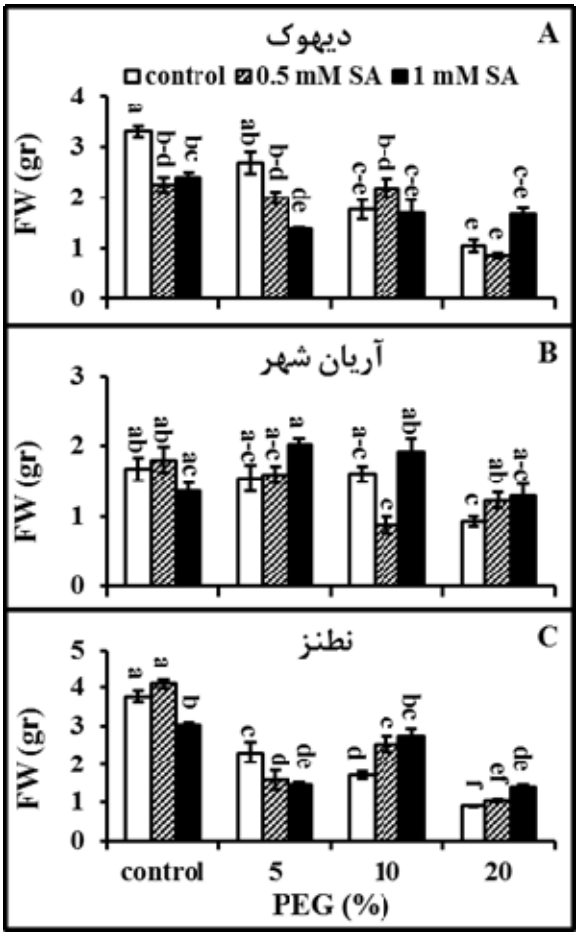
نتایج

وزن تر: تغییرات وزن تر جمعیت های دیهوک، آریان شهر و نطنز در نمودار ۱ نشان داده شده است.

با افزایش تنش خشکی، وزن تر در هر سه جمعیت کاهش پیدا می کند. در جمعیت آریان شهر، غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در تیمار های ٪۵ و ٪۱۰ PEG و درجمعیت نطنز، غلظت ۱۰٪ منجر به افزایش ناچیز وزن تر گیاهان شد، که از نظر آماری معنادار نبود. غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید نیز با افزایش تنش خشکی باعث کاهش وزن تر شده است. در نمونه های فاقد سالیسیلیک اسید نیز با افزایش تنش خشکی روند کاهشی در وزن تر مشاهده می شود.

مالون دی آلدهید (MDA): تغییرات محتوای مالون دی آلدهید جمعیت های دیهوک، آریان شهر و نطنز در نمودار

۲ نشان از اثر معنی دار تنش خشکی روی محتوای مالون دی آلدهید داشت. به طوری که در هر سه جمعیت، مالون دی آلدهید با افزایش غلظت PEG افزایش یافت که این افزایش در غلظت ۲۰٪ PEG بسیار چشمگیر بود. بطورکلی، تیمار سالیسیلیک اسید در هر دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی مولار باعث افزایش مالون دی آلدهید در سه جمعیت مورد مطالعه شد، اما، محتوای کلی مالون دی آلدئید نسبت به نمونه های فاقد سالیسیلیک اسید کاهش نسبی داشت.



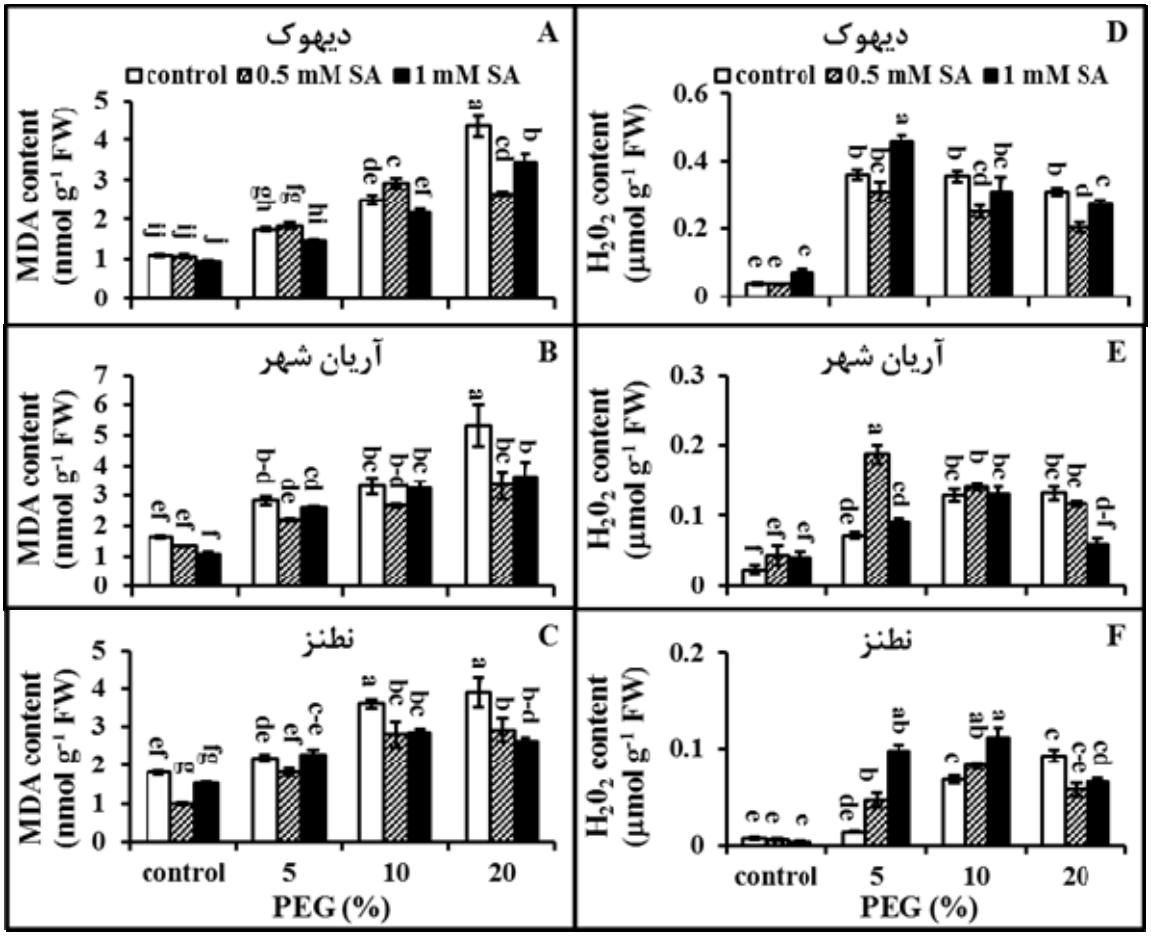
نمودار۱- اثر غلظت های مختلف PEG در حضور سالیسیلیک اسید بر روی وزن تر سه جمعیت دیهوک (A)، آریان شهر (B) و نطنز (C) گیاه زعفران. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشند (P≤(۰/۰۵.

پراکسید هیدروژن: تغییرات محتوای پراکسید هیدروژن سه جمعیت دیهوک، آریان شهر و نطنز در نمودار ۲ ارائه شده است. در هر سه جمعیت پراکسید هیدروژن با افزایش سطح خشکی، افزایش یافت. تیمار سالیسیلیک اسید در کل باعث افزایش و سپس با شدید شدن تنش باعث کاهش پراکسید هیدروژن در گیاهان تنش دیده هر سه جمعیت مورد مطالعه شد.

کاتالاز: نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در نمودار ۳ ارائه شد. همانطور که مشاهده می شود با افزایش سطح خشکی در هر سه جمعیت فعالیت آنزیم کاتالاز بطور معنی داری افزایش یافت ولی این افزایش در جمعیت آریان شهر معنی دار نبود. سالیسیلیک اسید در غلظت های ۰/۵ و ۱ میلی مولار، در هر سه جمعیت در مجموع اثر کاهش دهندگی بر فعالیت این آنزیم داشت. هرچند در مواردی افزایش فعالیت این آنزیم نیز مشاهده شد. اما روند کلی اثر سالیسیلیک اسید با افزایش تنش خشکی اثر مهارکنندگی فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان می‌دهد.

افزایش سطح خشکی باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان تنش دیده در هر سه جمعیت مورد مطالعه شد. سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۵ میلی مولار باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در دو جمعیت دیهوک و نطنز و کاهش فعالیت این آنزیم در جمعیت آریان شهر شد. در غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید نیز، سوپراکسید دیسموتاز در دو جمعیت دیهوک و نطنز افزایش جزیی و در جمعیت آریان شهر، افزایش و سپس کاهش داشته است.

پلی فنل اکسیداز: تغییرات فعالیت پلی فنل اکسیداز در نمودار ۳ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود با افزایش سطح خشکی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بطور معنی داری در هر سه جمعیت مورد مطالعه افزایش یافت. سالیسیلیک اسید بطور کلی در تنش های ملایم تر باعث افزایش و سپس باعث کاهش فعالیت پلی فنل اکسیداز در گیاهان تنش دیده شد.



نمودار۲- اثر غلظت های مختلف PEG در حضور سالیسیلیک اسید بر روی محتوای مالون دی آلدهید و هیدروژن پراکسید سه جمعیت دیهوک، آریان شهر و نطنز گیاه زعفران. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشند.(۰/۰۵ ≥P).

سوپراکسید دیسموتاز: تغییرات فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در نمودار ۴ آورده شده است.

پراکسیداز: تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمودار ۴ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود با افزایش سطح خشکی فعالیت پراکسیداز در هر سه جمعیت مورد مطالعه افزایش یافت به طور کلی سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در همه سطوح خشکی شد.

در جمعیت آریان شهر و نطنز غلظت ۱میلی مولار سالیسیلیک اسید باعث افزایش و سپس کاهش فعالیت پراکسیداز شد . اما، در جمعیت دیهوک غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید فعالیت آن را افزایش داد.

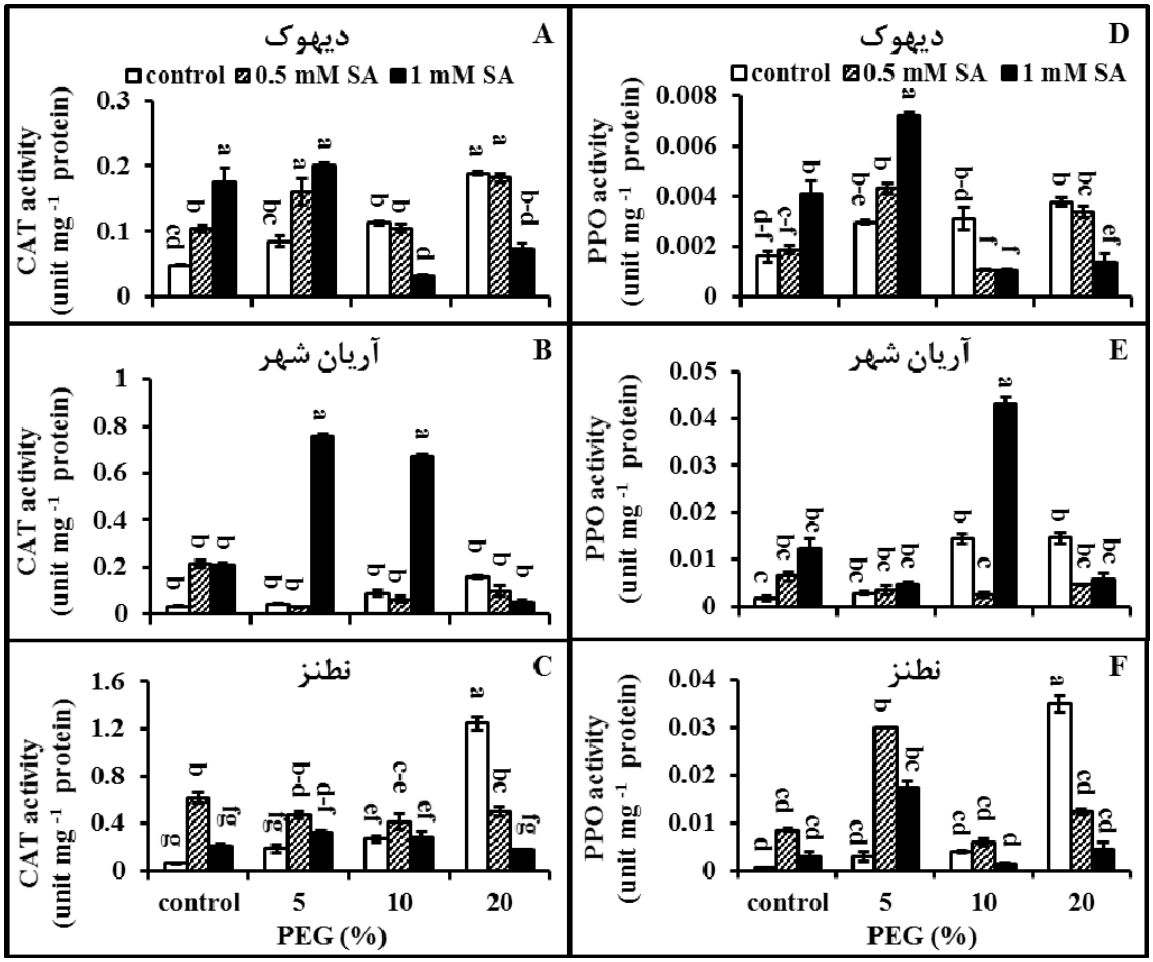
بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، با افزایش سطح خشکی وزن تر برگ در هر سه جمعیت مورد آزمایش کاهش یافت که با نتایج غلامی و همکاران و همچنین با نتایج ثابت تیموری و همکاران همخوانی دارد (۱). آنها برای نشان دادن اثر تنش خشکی بر زعفران، دو تیمار بدون آبیاری و با ظرفیت زراعی را مقایسه کردند و گزارش کردند که فقدان رطوبت کافی در محیط رشد ریشه باعث کاهش معنی دار وزن تر و خشک شد.

تاثیر تنش خشکی و اثر بهبود بخشی سالیسیلیک اسید در گیاهان زیادی بررسی شده است که نتایج آنها در بخش اثر

سالیسیلیک اسید با زعفران همخوانی زیادی تدارد. برای مثال Rane و همکاران (۴۷) نشان دادند وزن تر در برگ و ساقه گندم تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد. نتایج مشابه در گیاه بامیه (*Abelmoschus esculentum*) مشاهده شد (۱۳). Gomez بیان کرد، مقدار زیتوده گندم که تحت تنش خشکی کاهش پیدا کرد به کمک تیمار با سالیسیلیک اسید به حالت اول خود برگشت (۲۶). Coronado و همکاران گزارش کردند که تیمار با محلول سالیسیلیک اسید بصورت افشانه بر قسمتهای هوایی سویا باعث افزایش چشمگیر قسمتهای هوایی آن، چه در شرایط گلخانه ای و چه درطبیعت شد (۱۸). در این مطالعه نیز سالیسیلیک اسید اثر ترمیمی خاصی بر وزن تر و بازگشت آن به حالت اول در شرایط تنش خشکی نشان نداد.

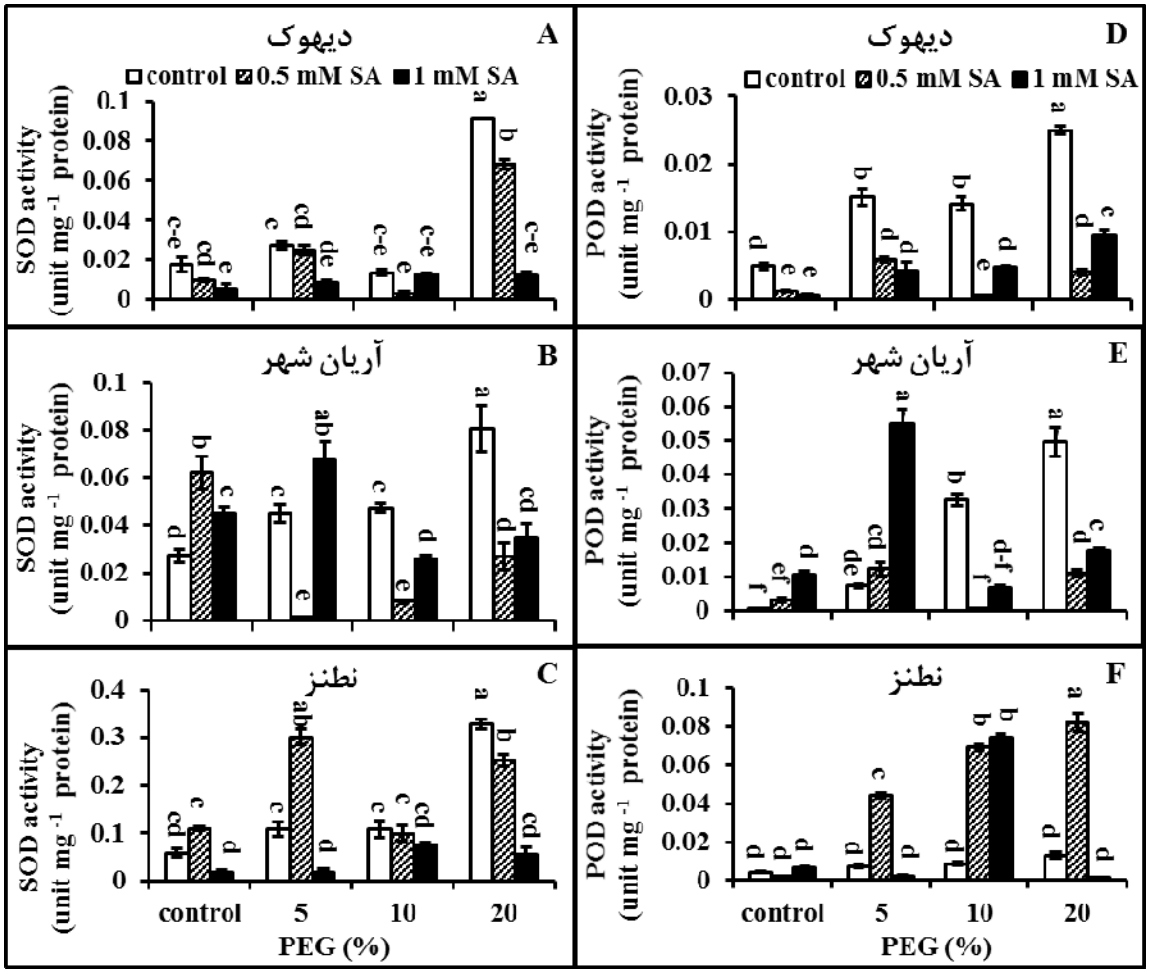
در سه جمعیت مورد مطالعه حاضر، محتوای مالون دی آلدهید با افزایش تنش خشکی افزایش یافت که این نتیجه با نتایج Hassanpour و همکاران در گیاه *Mentha pulegium* یا پونه معطر و با نتایج Yang و همکاران در گیاه *Agrostis stolonifera* مبنی بر اینکه افزایش تنش خشکی موجب افزایش مالون دی آلدهید می شود، مطابقت داشت (۲۹ و ۶۲).



نمودار۳- اثر غلظت های مختلف PEG در حضور سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت کاتالاز و پلی فنل اکسیداز (unit mg^{-1} protein) برگ سه جمعیت دیهوک، آریان شهر و نطنز گیاه زعفران. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشند.(۰/۰۵)≥P.

در مقایسه سه جمعیت مورد مطالعه، محتوای مالون دی آلدهید در هر سه جمعیت تقریبا بطور یکسانی افزایش پیدا کرد. در هر سه جمعیت مورد مطالعه تیمار با سالیسیلیک اسید بطور کلی باعث کاهش محتوای مالون دی آلدهید نسبت به نمونه های فاقد سالیسیلیک اسید شد. این گزارش با نتایج Gunes و همکاران در ذرت و نتایج دانشمند و همکاران در گیاه گلرنگ همخوان بود (۲۷)(۳). یافته های دانشمند و همکاران در دو رقم گیاه گلرنگ نشان می دهد که غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید(غلظت مالون دی آلدهید) می گردد(۳)

همچنین Hayat و همکاران گزارش کردند که تیمار گیاه گوجه فرنگی تحت تنش خشکی با سالیسیلیک اسید باعث کاهش قابل توجه مالون دی آلدهید در این گیاه شد (۳۱). کاهش آسیب غشای یاخته‌ای در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید می تواند نمایانگر مسئله القاء سازگان های محافظت کنندگی گیاه منجمله دفاع پاداکسایشی بوسیله سالیسیلیک اسید باشد. سازگان دفاع پاداکسایشی با از بین بردن رادیکال‌های آزاد به کمک محافظت کننده های اسمزی مانند پرولین و یا توسط آنزیم‌های پاداکساینده می تواند خسارت ناشی از این گونه‌های فعال را کاهش دهد و در نتیجه منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشا و کاهش مالون دی آلدهید شود.



نمودار۴- اثر غلظت های مختلف PEG در حضور سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز وپراکسیداز (unit mg^{-1} protein) برگ سه جمعیت دیهوک، آریان شهر و نطنز گیاه زعفران. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن می باشند.(P≤۰/۰۵)

این گونه بنظر می‌رسد که سالیسیلیک اسید با حذف رادیکال‌های آزاد، از اکسایش چربی‌های غشائی جلوگیری نموده و باعث افت محتوای مالون دی آلدهید شده است(۴۳). از طرف دیگر استفاده از ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید در برگ *Arabidopsis thaliana* موجب تولید و تجمع پراکسید هیدروژن شد که از طریق افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باعث افزایش مالون دی آلدهید گردید که با نتیجه مشاهده شده در افزایش محتوای مالون دی آلدئید با افزایش شدت تنش خشکی مطابقت داشت(۴۴).

در پژوهش حاضر مشاهده شد که با افزایش تنش خشکی محتوای H_2O_2 افزایش پیدا کرد که با نتایج خزایی و همکاران در گیاه فلفل شیرین مطابقت دارد(۲). Zlatev و همکاران (۶۰) نیز مشاهده نمودند که در ارقام تحت تنش خشکی لوبیا محتوای هیدروژن پراکسید نسبت به گیاهان دیگر بیشتر بود. مشابه نتایج تحقیق حاضر، بر اساس یافته های Srivalli و همکاران(۵۳) نیز در برنج تحت شرایط خشکی با کاهش پتانسیل آب برگ، محتوای هیدروژن پراکسید افزایش یافت و این ترکیب از طریق پراکسیداسیون لیپیدها موجب آسیب به غشای سلولی شد(۵۳). در پژوهش حاضر، هر دو غلظت سالیسیلیک اسید تحت تنش خشکی ابتدا باعث افزایش و سپس با اثر مهارکنندگی باعث کاهش غلظت پراکسید هیدروژن در هر سه جمعیت شد. طبق برخی گزارش ها سالیسیلیک اسید با از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن به طور مستقیم یا توسط آنزیم‌ها سبب کاهش تولید پراکسید هیدروژن شد(۴۳).

با افزایش تنش خشکی فعالیت آنزیم کاتالاز در هر سه جمعیت مورد آزمایش افزایش یافت که حاکی از شدت یافتن تنش اکسایشی در این شرایط است. Zlatev و همکاران (۶۰) نیز مشاهده کردند که قطع آبیاری در برخی ارقام لوبیا موجب افزایش بسیار زیاد فعالیت کاتالاز شد. طبق گزارش Srivalli و همکاران(۵۳) نیز در دانه رست های برنج در شرایط تنش کمبود آب آنزیم های جاروب کننده مانند کاتالاز در پاسخ به ازدیاد پراکسید هیدروژن افزایش یافت. در جمعیت دیهوک و آریان شهر ما شاهد افزایش تدریجی فعالیت کاتالاز همراه با افزایش تنش خشکی بودیم، ولی در جمعیت نطنز این افزایش ناگهانی و چشمگیر بود. تیمار سالیسیلیک اسید در هر سه جمعیت مورد مطالعه باعث کاهش فعالیت کاتالاز در گیاهان تحت تنش شد. هر چند موارد استثنایی هم وجود دارد، مثلاً در جمعیت دیهوک در غلظت های ۵٪ و۲۰ ٪ PEG و تیمار ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید یا در جمعیت آریان شهر در غلظت های ۵٪ و ۱۰٪ PEG و تیمار ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید افزایش فعالیت کاتالاز مشاهده شد. طبق تفسیر برخی از محققان سالیسیلیک اسید می تواند تجمع هیدروژن پراکسید را در پاسخ فوق حساسیت باعث شود و این تجمع می تواند براساس مهار فعالیت کاتالازها باشد (۵۳ و ۱۷). در بعضی از تیمار های سالیسیلیک اسید فعالیت کاتالاز افزایش پیدا کرد که با آن دسته از نتایج تحقیقات که نشان می دهند سالیسیلیک اسید به عنوان یک گهرمایه احیا کننده عمل می کند (۴۱) و نیز می تواند به عنوان تعدیل کننده عمل کاتالاز عمل کرده و به هیچ عنوان آنرا مهار نمی کند، نیز تطابق دارد (۱۹). همچنین در مطالعات پیشین، تعدادی از پروتئین های متصل شونده به سالیسیلیک اسید مانند کاتالاز شناسایی شد (۵۰). طبق برخی از گزارش های دیگر در بعضی از نمونه‌ها نیز، سالیسیلیک اسید می تواند در تولید انواع فعال اکسیژن دخیل باشد(۱۱). افزایش فعالیت کاتالاز در اثر پیش تیمار با سالیسیلیک اسید قبل از مواجهه با تنش های خشکی در گیاه حنا با نتایج فرحبخش و پسندی پور (۶) همخوانی دارد. بر اساس نتایج آنها افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کاتالاز موجب افزایش مقاومت گیاه حنا به تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی شده است. از آنجا که کاتالاز یک آنزیم تجزیه کننده پراکسید هیدرژن است، افزایش فعالیت

کاتالاز و کاهش مقدار پراکسید هیدرژن تحت تیمار سالیسیلیک اسید در هماهنگی با یکدیگر است. همچنین براساس نظر Unyayar و همکاران (۵۷) پراکسید هیدرژن در غلظت های پایین می تواند نقش پیام را در فرایندهای انتقال پیام بازی کند و باعث فعال سازی ژن های وابسته به مقاومت شود، لذا، افزایش مقدار آن تحت شرایط تنش را می توان به نقش آن در افزایش مقاومت گیاه نسبت داد.

طبق نتایج پژوهش حاضر در هر سه جمعیت مورد مطالعه زعفران در سطوح تنش متوسط و بالا فعالیت آنزیم PPO افزایش یافت که با نتایج Hassanpour و همکاران در گیاه *Mentha pulegium* یا پونه معطر مطابقت داشت (۲۹). همچنین خزایی و همکاران گزارش کردند که با افزایش سطح خشکی در گیاه فلفل شیرین(*Capsicum annuum* .L) فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بطور معنی داری افزایش یافته است(۲). غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در سطوح پایین خشکی فعالیت این آنزیم را افزایش داده و در سطوح بالاتر باعث کاهش فعالیت این آنزیم شد.

در بررسی حاضر افزایش سطح خشکی باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در هر سه جمعیت مورد مطالعه شد که با یافته های Torabi و همکاران مبنی بر افزایش فعالیت این آنزیم با افزایش تنش خشکی در دو گونه از *Salicornia* و با نتایج Hayat و همکاران در برگ گوجه فرنگی تحت تنش خشکی مطابقت داشت (۵۶ و ۳۱). طبق گزارش Maleki و همکاران نیز تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ، بنه و ریشه زعفران تحت تنش خشکی شد (۳۸). تاثیر سالیسیلیک اسید در تعدیل پاسخ گیاه و کاهش فعالیت آنزیم‌ها در محدوده وسیعی از تنش‌های اکسایشی گزارش شده است (۳۳). بطور کلی تنش اکسایشی حاصل افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن درون سلولی است. افزایش آنزیم‌های پاداکساینده ممکن است راهی برای تحمل گیاه به تنش‌های محیطی باشد و از آنجایی که مصرف ۰/۵ و۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید سبب کاهش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به عدم مصرف آن می شود می توان نتیجه گرفت که ممکن است این ماده بطور مستقیم در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش داشته و با پاکسازی این گونه‌های فعال، می تواند از افزایش فعالیت آنزیم جلوگیری کند. در گیاهان جمعیت های دیهوک و نطنز، سالیسیلیک اسید منجر به افزایش فعالیت آنزیم SOD شده است. با افزایش فعالیت این آنزیم سمیت زدایی یون سوپر اکسید افزایش و آسیب‌های حاصله از آن در گیاه کاهش می یابد چراکه کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید مقاومت به تنش شوری و خشکی را در گیاهان افزایش می‌دهد (۵۵). بنابراین سالیسیلیک اسید می تواند با افزایش مقاومت گیاهچه‌ها به خشکی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی برای مقابله با تنش عمل کند (۳۳).

طبق نتایج مطالعه حاضر با افزایش تنش خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. در جمعیت نطنز این افزایش، تدریجی بوده و از نظر آماری معنی دار نیست. افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ گیاه گوجه فرنگی تحت تنش خشکی توسط Hayat و همکاران گزارش شده است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (۳۱). بررسی فعالیت این آنزیم در برگهای اسفناج و برگ‌های *Sedum album* تحت شرایط تنش آبی صورت گرفته که حاکی از افزایش فعالیت این آنزیم بود (۱۶). در مطالعه ملکی و همکاران نیز فعالیت پراکسیداز در برگ، بنه و ریشه زعفران تحت تنش خشکی افزایش یافت (۴۰). در هر سه جمعیت گیاه زعفران در پاسخ به انواع اکسیژن فعال ترکیبات پاداکساینده آنزیمی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در برگ‌ها افزایش فعالیت نشان دادند. تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۵ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش تنش خشکی شد. در غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید فعالیت این آنزیم در جمعیت دیهوک

افزایش و در جمعیت آریان شهر و نطنز ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داد.

نتایج کلی حاکی از آن است که تیمار سالیسیلیک اسید تا حدودی سبب بالا بردن توان پاداکسایندگی گیاه در مقابله با تنش خشکی می شود. با این حال به نظر می‌رسد برای نتیجه‌گیری بهتر در مورد تاثیر تیمار این ماده روی تخفیف اثرات تنش خشکی، به کار بردن دامنه وسیع‌تری از غلظت، بررسی تاثیر پیش تیمار بنه های زعفران با این ماده، بررسی تاثیر این ماده روی گل دهی زعفران و انتخاب پارامترهای مناسبتر برای اندازه گیری انجام شود. به طور کلی تیمار سالیسیلیک اسید سبب بهبود آسیب‌های ناشی از تنش خشکی نظیر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی غشا (افزایش مالون دی آلدهید) و افزایش پراکسید هیدروژن شد که این تاثیر در هر سه جمعیت تقریبا یکسان بود. بنابراین می توان گفت که تیمار این ماده می تواند راهکار مناسبی برای کاهش اثرات ناشی از تنش خشکی در زعفران باشد.

نظر به نقش مشاهده شده سالیسیلیک اسید در کاهش محتوای مالون دی آلدئید و در نتیجه تعدیل اثرات منفی حاصل از تنش خشکی، استفاده از این ترکیب در مناطق نیمه خشک و خشک توصیه می شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد که تنش خشکی باعث تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه جمعیت زعفران مورد مطالعه شده است. همانطور که از نتایج بر می آید، با وجود افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز با افزایش شدت تنش، مقدار پراکسید هیدرژن نیز روند افزایشی در شدت های بالای تنش نشان می دهد که می تواند موید عدم کفایت فعالیت این آنزیم ها برای پاکسازی گیاه از پراکسید هیدرژن و عدم تجمع آن باشد. در مجموع، سالیسیلیک اسید در گیاهان فاقد PEG و تنش های خشکی ملایم یعنی غلظت های ۵٪ و ۱۰٪ PEG بیشتر بی تأثیر یا تشدید کننده تأثیر تنش بوده است در حالی که در غلظت های بالاتر از ۱۰٪ PEG اثرات بهبود بخشی سالیسیلیک اسید و مقابله با تنش محسوس تر و معنی دار تر می شود. ظاهراً گیاه در تنش های ملایم هنوز قادر به ایجاد علائم (سیگنال های) لازم برای راه اندازی آبشار علامت دهی سالیسیلیک اسید نبوده و این ماده در مسیرهای دیگری مصرف می شود. اما با بالا رفتن تنش، سازوکارهای دفاعی گیاه راه اندازی شده و برای سازگاری از سالیسیلیک اسید بهره می برد.. Khan و همکاران در مقاله مروری خود با جمع بندی نتایج تحقیقات متنوع به اهمیت سالیسیلیک اسید در افزایش تحمل خشکی در گیاهان اشاره کردند (۳۸)..Illyas و همکاران نیز نشان دادند کاربرد جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید موجب افزایش تحمل خشکی در گیاه گندم می شود و در این خصوص اثر جاسمونیک اسید از سالیسیلیک اسید بیشتر است (۳۴). درباره زعفران نیز می توان در پژوهش های بعدی اثر سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید را در افزایش تحمل خشکی با هم مقایسه کرد.

Hara و همکاران بیان می کنند که در کل، سالیسیلیک اسید در غلظت های پایین باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی می شود اما در غلظت های بالا مرگ یاخته یا حساسیت نسبت به تنش های غیر زیستی را موجب می شود (۲۸) همچنین، Ullah و همکاران بیان کردند که سالیسیلیک اسید موجب القای تولید اشکال واکنشگر اکسیژن در بافت های فتوسنتزی می شود. لذا، احتمالاً غلظت های بالای این ماده سبب تنش اکسیداتیو شدیدی می شود که تحمل تنش غیر زیستی را کاهش می دهد و استفاده آن در غلظت های پایین (۰/۵ و ۱ میلی مولار) که در پژوهش حاضر نیز استفاده شد، موجب تخفیف اثرات منفی ناشی از تنش خشکی خواهد شد(۵۹).

منابع

۱- ثابت تیموری، م.، اورسجی، ز. و اروجی، ک. ۱۳۸۹. اثر تنش خشکی، اندازه و پوشش بنه بر خصوصیات مورفواکوفیزیولوژیکی زعفران در شرایط گلخانه. نشریه بوم شناسی کشاورزی، جلد ۲، شماره ۲: ۳۳۴-۳۲۳.

۲- خزائی، ز.، سیاری، م. ۱۳۹۴. اثر کاربرد برگی ۵-آمینولولینیک اسید بر رشد و برخی فاکتورهای فیزیولوژیکی و عملکرد فلفل شیرین(*Capsicum annuum L.*) در شرایط تنش خشکی. مجله پژوهشهای گیاهی(مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۵: ۹۶۱-۹۵۲.

۳- دانشمند، ف.، آروین، م. ج.، کرامت، ب. ۱۳۹۳. تغییرات ایجاد شده توسط سالیسیلیک اسید در گیاهان گلرنگ *Carthamus tinctorius L.* تحت تنش شوری. مجله پژوهش های گیاهی(مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۲: ۲۱۵-۲۰۴.

۴- صفری، م.، خواجویی نژاد، غ.، مقصودی مود، ع.، محمدی نژاد، ق. ۱۳۹۶. اثر مقادیر و روش کاربرد سوپرجاذب در زراعت زعفران (*Crocus sativus* L.) تحت تأثیر سطوح آبیاری. نشریه پژوهش های زعفران (دو فصلنامه)، جلد پنجم، شماره دوم، پاییز و زمستان، ۲۴۶-۲۳۱.

۵- غلامی توران پشتی، م.، مقصودی مود، ع. الف.، فرحبخش، ح. ۱۳۸۴. اثر دو سطح آبیاری بر برخی از روابط آبی سه توده بومی زعفران *Crocus sativus* L. ایران. دومین کنفرانس سراسری آبخیزداری و مدیریت منابع آب و خاک. کرمان، ایران، ۱۷۸۷-۱۷۸۰.

۶- فرحبخش، ح.، پسندی پور، الف. ۱۳۹۶. پاسخ فیزیولوژیکی گیاه دارویی- صنعتی حنا (*Lowsonia inermis* L.) به کاربرد اسید سالیسیلیک تحت تنش خشکی. فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۶، شماره ۱۹.

۷- کافی، م. ۱۳۸۱. زعفران: فناوری تولید و فرآوری. زبان و ادب. مشهد، ۲۷۹ص.

8. Abbasi, A, Shekari, F., Mustafavi, S. H. (2015). Effect of paclobutrazole and salicylic acid on antioxidants enzyme activity in drought stress in wheat. A. investigaciones. 33(4): 5-13.

9. Abeles F.B., Biles C.L. (1991) Characterization of peroxidase in lignifying peach fruit endocarp. *Journal of Plant Physiology*. 95: 269-273.

10. Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymoogyl. 105: 121–126.

11. Alvarez M. E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death disease resistance. *Plant Molecular Biology*. 44: 429-44.

12. Barkosky R.R., Einhellig F.A. (1993) Effects of salicyclic acid on plant water relationship. *Journal of Chemical Ecology*. 19: 237-247.

13. Bhatt R. M., Srinivasa Roa N. K. (2005). Influence of pod load on response of okra to water stress. *Indian Journal of Plant Physiolo*gy10: 54–59.

14. Bideshki A. and M.J. Arvin (2010). Effect of salicylic acid (SA) and drought stress on growth,bulb yield and allicin content of garlic (*Allium sativum*) in field. *Plant Ecophysiology* 2:73-79.

15. Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

16. Castillo F. J., (1992) Peroxidase and stress In: Plant Peroxidase, 1980-1990: Topics and Detailed Literature on molecular ,Biochemical and Physiological Aspects (Penel C., Gaspar T. and Greppin H., eds.). Univ. Geneva, Switzerland, pp. 187-203.

17. Conrath U., Chen Z., Ricigliano J.R., Klessig D.F. (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-ichloroisonicotinec acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceeding of National Academy of Sciences. USA*. 92(16):7143-7.

18. Coronado MAG., Lopez CT., Saavedra AL. (1998) Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology Biochemistry*. 8:563–5.

19. Durner J., and Klessing D.F. (1996) Salicylic Acid is a modulator of tobacco and mammalian catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 28492-2850.

20. Einhellig F.A. (1989) Interactive effects of allelochemicals and environmental stress in Phytochemical ecology: allelochemicals. In: Chou C.H. and Waller G.R. (eds), Mycotoxins and Insect Pheromones and Allelomones., Taiwan, pp. 101-118, *Academia sinica Monograph Series* 9.

21. Elkahoui S., Hernandez J.e.A, Abdelly C., Ghrir R., Limam F. (2005) Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*. 168: 607-613.

22. Fayez,K.A.,andBazaid,S.A.(2014).Improving drought and salinity tolerance in

barleybyapplicationofsalicylicacidandpotassiumnitrate. *Journal of Saudian Society of Agricuktural Sciences.* 13, 45–55.

23.Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide Dismutase: Π. Purification and Quantitative Relationship with water soluble protein in seedlings. *Plant physiology*. 59:315-318.

24.Glass A.D.M. (1973) Influence of Phenolic Acids on Ion Uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. *Plant Physiology*. 51:1037-1041.

25.Glass A.D.M. (1974) Influence of Phenolic Acids On Ion Uptake IV. Depolarization of Membrane Potentials. *Plant Physiology*. 54: 855-858.

26.Gomez L., Blanca L., Antonio C.S. (1993) Evidence of the beneficent action of the acetyl salicylic acid on wheat genotypes yield under restricted irrigation. Proceeding of scientific meeting on Forestry, Livestock and Agriculture Mexico, p. 112.

27.Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Guneri Bagci E., Cicek, N.(2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Plant Physiology*. 164: 728-736.

28.Hara,M.,Furukawa,J.,Sato,A.,Mizoguchi,T.,andMiura,K.(2012).“Abioticstress and roleofsalicylicacidinplants,”in *Abiotic Stress Responses in Plants*, edsA. Parvaiza and. N.V.Prasad (NewYork,NY:Springer), 235–251.

29.Hassanpour H., Khavari Nejad R.A., Niknam V. (2012) Effect of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium L.*). *Acta Physiologia Plantarum* 34:1537-1549.

30.Hayat S., Fariduddin Q., Ali B., Ahmad A. (2005) Effect of Salicylic acid on growth and Enzyme activities of Wheat Seedlings. *Acta Agronomica Hungarica.* 53:433-437.

31. Hayat S., Hasan S.A., Fariduddin Q., Ahmad A. (2008) Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *Journal of Plant Interactions*. *3*: 297–304.

32.Heath R.L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stochiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.

33.Horváth E., Janda T., Szalai G., Páldi E. (2002) *In vitro* salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isoenzymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Science.* 163:1129-1135.

34.Ilyas, N., Gull, R., Mazhar, R., Saeed M., Kanwal, S., Shabir, S. and Bibi, F. (2017). Influence of Salycilic acid and Jasmonic acid on Wheat under drought stress.Communications in soil Science and plant analysis. 48 (22):2715-2723.

35.Janda T., Szalai G., Tari I., Paldi E. (1999) Hydroponic treatment With salicylic acid decrease the effects of chilling injury in Maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180.

36.Kalefetog˘lu T., Ekmekci Y. (2005) The effects of drought on plants and tolerance mechanisms (Review). *G.U. Journal of Science.* 18(4):723–740.

37.Kang,G.,Li,G.,Xu,W.,Peng,X.,Han,Q.,Zhu,Y.,etal.(2012).Proteomics reveals the effectsofsalicylicacidongrowthandtolerancetosubsequentdroughtstress in wheat. *Journal of Proteome Research.* 11, 6066–6079.

38. Khan. M.I R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N.A. and Khan, N.A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. 6: 462.

39.Kvaratsskhhelia M., Simun J.G. and Thornneleys N.F. (1997) Salicylic Acid is a reducing substrate and not an inhibitor of ascorbic proxidase. *Journal of Biological Chemistry*.22: 20998-2100.

40.Maleki M., Ebrahimzade H., Gholami M., Niknam V. (2011) The effect of drought stress and exogenous abscisic acid on growth, protein content and antioxidative enzyme activity in saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Biotechnology* 10(45): 9068-9075.

41.Mateo A., Funck D., Mühlenbock P., Kular B., Mullineaux P.M. , Karpinski S. (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1795-1807.

42. Mzabri, I., Legsayer, M., Aliyat, F. , Maldani, M., Kouddane, N. E. & Boukroute, A. , Bekkouch, I. and Berrichi, A. (2017). Effect of Drought Stress on the Growth and Development of Saffron (*Crocus Sativus*. L) in Eastern Morocco. *Atlas Journal of Biology*. 364-370.

43.Neill S.J., Desikan R., Clark A. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of experimental Botany* 53:1237-1247.

44. Nemeth, M.; Janda, T.; Horvath, E.; Paldi, E.; Szalai, G. 2002. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science.* 162: 569-574.

45.Noctor , Foyer C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annual Reviews Plant Physiol. Plant Molecular Biology. 49: 249-279.

46.Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P., Murr D.P., Watkins C.B. (1997) Influence of salicylic acid on H2O2 production, oxidative stress, and H2O2-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H2O2. *Plant Physiology*. 115:137-149

47.Rane J., Maheshwari M., Nagarajan S. (2001) Effect of pre-anthesis water stress on growth, Photosynthesis and yield of six wheat cultivars differing in drought tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology* 6: 53–60.

48.Raskin I. (1992) Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology,Plant Mol. Biol., 43: 439–63.

49.Raymond J., Rakariyatham N., Azanza J.L. (1993) Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*. 34:927–931.

50.Ruffer M., Steipe B. , Zenk M.H. (1995) Evidence against specific binding of Salicylic Acid to plant Catalase. *FEBS Letters.* 397:175-18.

51.Sakhabutdinova A.R., Fatkhutdinova D.R, Bezrukova M.V., Shakirova F.M. (2003) Salicylic acid prevents damaging action of stress factors on wheat plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* (special issue) : 314–319.

52.Sanchez-Casas,P. and Klessig,D.F.(1994).A salicylicacid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiology.* 106: 1675–1679.

53.Senaratna T., Touchell D., Bunn E, Dixon K. (2000) Acetylsalicylic acid and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157–161.

54.Singh B., Usha K., (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat ‘s seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation* 39: 137–141.

55.Srivalli B., Sharma G., Khanna-Chopra R. (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiology Plantarum* 119:503-512.

56.Stewart, R.R C., Bewley, J. D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65: 245.

57.Tari I., Csiszár J., Szalai G., Horváth F., Pécsváradi A., Kiss G., Szepesi Á., Szabó M., Erdei L. (2002) Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Bioogical Szegediensis.* 46(3- 4):55-56.

58.Torabi S., Niknam V. (2011) Effects of Iso-osmotic Concentrations of NaCl and Mannitol on some Metabolic Activity in Calluses of Two *Salicornia* species. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. 47 (6): 734-742.

59.Ullah, A., Manghwar, H., Shaban M., Hamid Khan, Aamir Akbar, A., Ali, U., Ali E. and Fahad, Sh. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. Environmental Science and Pollution Research.Published online 3 October.

60.Unyayar, S., Kele, Y. and Cekic, F. O. (2005) The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. Plant Soil and Environmen. 51: 57-64.

61.Velikova V., Yordanov I., Edreva A., (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. J. *Plant Sci*. 151: 59-66.

62.Yang Z., Yu J., Merewitz E., Huang B., (2012) Differential Effects of Abscisic Acid and Glycine Betaine on Physiological Responses to Drought and Salinity Stress for Two Perennial Grass Species. *Journal of American Society of Horticultural Science.* 137(2):96–106.

63.Zlatev Z.S., Lidon F.C., Ramalho J.C. (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* 50:389-394.

Comparative study of drought stress and salicylic acid effects on different accessions of saffron (*Crocus Sativus* L.)

Aslezaeem F.[1], Niknam V.[1], Ebrahimzadeh H.[1] and Sharifi G.[2]

[1] **School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Basic Sciences Dept., Iranian Institute for Encyclopedia Research, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Drought causes osmotic imbalance and inhibits plant growth and productivity. Salicylic acid (SA) is an endogenous growth regulator with phenolic nature, which participates in the regulation of physiological processes in plants. SA is an important plant growth regulator because of its promoting role in plant growth and development under environmental stresses. In this research, we used two concentrations of salicylic acid (0.5 mM and 1 mM) for three accessions of saffron under drought stress in order to study drought resistance improvement. The results showed that fresh weight (FW) reduced in three accessions of saffron under drought stress. Foliar spray of salicylic acid increased FW in three accessions under severe stresses (PEG 10% and 20%). Under drought stress, content of MDA and H_2O_2 and antioxidant enzymes (CAT, PPO, SOD and POX) activities increased while SA reduced these parameters. Due to foliar spray of SA and decreased parameters of stress (MDA and H_2O_2), we can conclude that the use of SA decrease the effects of stress and improve the plants growth. According to our results, among the examined accessions of saffron, Aryanshahr accession had the lowest level of damage in FW and also, antioxidant enzymes in this accession have increased gradually and moderately. So, we can say that, this accession compared to the others, has a more effective mechanism against drought stress but salicylic acid has the same effect in all the three accessions.

Key words: Saffron, Drought stress, SA, Antioxidant enzymes, MDA.