

مقاله پژوهشی

تأثیر سطوح مختلف شوری بر خصوصیات فیزیولوژیکی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و برخی ترکیبات فلاونوئیدی در کشت هیدروپونیک گیاه زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)

فاطمه سادات مسلمی^۱، آتوسا وزیری^{۱*} و گل اندام شریفی^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران، ^۲ پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی، پژوهشکده دانشنامه نگاری، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۳/۲۵)

چکیده

استفاده از گیاهان متحمل به شوری در نواحی خشک و نیمه خشک دنیا از جمله ایران یکی از راه های دستیابی به عملکرد بالا است. هدف این تحقیق بررسی تأثیر تیمارهای مختلف شوری در کشت هیدروپونیک بر خصوصیات فیزیولوژیکی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و نیز میزان کمی ترکیبات فلاونوئیدی کامفرول و کوئرستین در گیاه زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) است. بدین منظور بنه های گیاه زعفران در گلدان های حاوی پرلیت کاشته شد و در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی با ۱/۲ محلول غذایی هوگلند حاوی غلظت های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم آبیاری شد. براساس نتایج به دست آمده، اثر تنش شوری بر میزان کلروفیل a و b در سطح پنج درصد معنی دار نبود. میزان کاروتنوئید و گلوکز در تیمار ۶۰ میلی مولار به ترتیب افزایش معنی دار ۲۷ و ۵۶ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت. تأثیر شوری بر میزان اسید آمینه پرولین برگ معنی دار نبود. درصد نسبی آب نیز در ۱۵۰ میلی مولار با ۲۰ درصد کاهش، بیشترین کاهش را نسبت به تیمار شاهد داشت فعالیت آنزیم PAL نیز در تنها در ۱۵۰ میلی مولار افزایش معنی دار ۵۰ درصدی نسبت به شاهد داشت. میزان کامفرول در تمام غلظت ها به غیر از ۱۵۰ میلی مولار و میزان کوئرستین نیز تنها در غلظت ۱۵۰ میلی مولار افزایش معنی دار (۱۰۰ درصد) نسبت به تیمار شاهد نشان داد به نظر می رسد با توجه به نتایج آزمایش آستانه تحمل گیاه زعفران به نمک در محدوده ۶۰ تا ۹۰ میلی مولار بوده و مکانیسم های دفاعی عنوان شده در این محدوده و بالاتر از آن به گیاه جهت تحمل به نمک کمک می نمایند.

کلمات کلیدی: تنش شوری، فنیل آلانین آمونیلایز، کامفرول، کوئرستین، زعفران زراعی

مقدمه

جوانه زنی، قدرت، کمیت و کیفیت گیاه می شود و تهدید جدی برای صنعت کشاورزی بشمار می رود. شناسایی ارقام مقاوم به شوری راهکار مناسبی برای جلوگیری از خسارت است. شوری خاک بر فرایندهایی همچون محتوای آب، رنگ دانه ها، چربی ها، جذب مواد مغذی و متابولیسم اثر می گذارد (هاشمی و عمادی، ۱۳۹۴). به دلیل خسارت شدید تنش شوری بر رشد و نمو گیاهان، مطالعات قابل توجهی در بررسی فرایندهای

تنش شوری وضعیتی است که در آن به دلیل وجود نمک مازاد در خاک، رشد گیاه محدود می شود. از عوامل ایجادکننده این تنش می توان به شوری خاک، آبیاری با زهکشی ضعیف و آب شور اشاره کرد (هاشمی و عمادی، ۱۳۹۴). شوری یکی از عوامل مهم کاهش محصولات کشاورزی است که موجب بروز مشکلات فیزیولوژیکی، متابولیکی، کاهش رشدونمو،

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: a_vaziri@pnu.ac.ir

فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برای کمک در جهت سازگاری گیاهان به تنش انجام شده است (هاشمی و عمادی، ۱۳۹۴). زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) از گرانترین محصولات غذایی و دارویی دنیاست (سبزواری، ۱۳۷۴). از ویژگی‌های مهم گیاه زعفران نیاز آب و غذایی بسیار اندک آن در مقایسه با سایر محصولات زراعی و باغی است، لذا گیاه بسیار مناسبی برای قرارگرفتن در الگوی کاشت مناطق خشک و نیمه‌خشک است (کافی و همکاران، ۱۳۸۱). در ایران زعفران کاری از جنبه‌های مختلف نظیر بهره‌وری آب، اشتغال و صادرات غیرنفتی موردتوجه است (Behdani, 2011). زعفران از جمله محصولات صادراتی است که در صورت توجه به فرایندهای تولید و فرآوری برای افزایش تولید و صادرات آن می‌تواند ارز قابل‌توجهی را نصیب کشور نماید، لذا باید روش‌های مدرن، جایگزین روش‌های سنتی در مناطق مختلف تولید زعفران شود تا محصول از کیفیت بالاتری برخوردار گردد. سطح زیرکشت زعفران در سال‌های اخیر به‌شدت افزایش یافته است، به‌طوری‌که در ۳۰ سال گذشته، سطح زیرکشت این محصول از حدود ۲۵ هزار هکتار در سال ۱۳۶۰ به حدود ۸۸ هزار هکتار در سال ۱۳۹۳ رسیده که نشان از افزایش ۳/۵ برابری آن دارد (Agricultural statistics, 2015). با این وجود، در بین سال‌های ۱۳۶۰ تا ۱۳۹۳ عملکرد زعفران به ازای هر واحد سطح زیرکشت کاهش محسوسی یافته است. به‌طوری‌که از ۵/۱ کیلوگرم در سال ۱۳۶۰ به ۳/۲ کیلوگرم در سال ۱۳۹۳ رسیده است. کاهش عملکرد زعفران از جنبه‌های متفاوتی اتفاق افتاده و اساساً متأثر از عواملی مانند سوء مدیریت در بخش کشاورزی، اقتصادی، فرآوری پس از برداشت و نیز خشک‌سالی‌های اخیر بوده است (کوچکی و همکاران، ۱۳۹۵). در صورت عدم‌توجه به عوامل ذکرشده، عملکرد زعفران در سال‌های آینده نیز ممکن است بیش از پیش کاهش یابد. کشت زعفران تحت شرایط کنترل‌شده در بسترهای هیدروپونیک می‌تواند روشی موفقیت‌آمیز باشد. با توجه به اینکه در این روش، محیط رشد، تغذیه گیاه، نور، دما، آبیاری و بسیاری از عوامل دیگر به دقت کنترل می‌شود، عملکرد بالاتر و کیفیت

بهرتر محصول امکان‌پذیر خواهد بود، گیاهان برای مقابله با اثرات تنش شوری فرآیندهای مختلفی را به‌کار می‌گیرند. برخی از این فرآیندها شامل تنظیمات اسمزی توسط تجمع املاح سازگار مانند پرولین و یا ساکاریدهای محلول، افزایش سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها جهت حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تغییرات در مکانیسم تنظیمی برای انتقال یون است (Rajaei et al., 2009). در شرایط تنش، ترکیباتی اسمزی ساخته می‌شوند که در حفظ فعالیت سوخت‌وساز بافت‌ها نقش دارد. این پاسخ درنهایت منجر به ترمیم، هموستازی سلولی، سم‌زدایی و بقا تحت تنش خواهد شد (Rajaei et al., 2009). پراکسیداسیون لیپیدها توسط ROS منجر به تولید مالون دآلدئید (MDA) می‌شود (Yasar et al., 2008). مالون دآلدئید تولیدشده می‌تواند به آذیم‌ها و غشاءهای گیاهی آسیب رساند، موجب افزایش نشت الکترولیت‌ها شود و به همین سبب به‌عنوان یک شاخص زیستی برای تخمین میزان آسیب دیدگی غشاء تحت تنش در نظر گرفته می‌شود (Zhou and Leul, 1999; Miller et al., 2010). فرآیند فتوسنتز تعیین‌کننده اصلی رشد و عملکرد گیاهان است و توانایی حفظ آن در شرایط تنش‌های محیطی برای حفظ ثبات عملکرد مهم است. کل محتوای کلروفیل تحت تیمار شوری کاهش و مقاومت روزنه‌ای افزایش می‌یابد. یکی از اثرات شوری در گیاه کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌باشد که ناشی از کاهش محتوای کلروفیل، کاهش جذب CO₂ و ظرفیت فتوسنتزی است (جوادپور و همکاران، ۱۳۹۲). بررسی رنگیزه‌ها در گیاه ذرت تیمار شده نشان می‌دهد که کاهش مقدار کلروفیل a در طی تیمار شوری دلیل عمده کاهش ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II بوده است. مقدار کلروفیل a در مراکز واکنش، یکی از عوامل تعیین‌کننده کارایی عملی یا ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II است (Oxborough, 2004).

یکی دیگر از پاسخ‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، تجمع متابولیت‌های ثانویه است (Ramawat, 2007). کامفرول یک فلاونول شناخته شده است که از انگور، توت‌فرنگی، کلم بروکسل، سیب و دیگر میوه‌ها و سبزیجات جدا شده است. در زعفران کامفرول معروف به حضور در

القای تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند. ترکیبات فنلی با حلقه آروماتیک دی‌هیدروکسی مثل کافئیک اسید، کوئرستین، کامفرول یا لوتین گلیکوزیدها دارای ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی هستند و پخش آن‌ها در سلول‌های گیاهی برای عملکرد آنتی‌اکسیدانی ضروری است (Agati et al., 2012). در این تحقیق کوشش بر آن بود که تأثیر تیمارهای مختلف شوری در کشت هیدروپونیک و شرایط کنترل‌شده بر خصوصیات فیزیولوژیکی، فعالیت آنزیم PAL و نیز میزان کمی ترکیبات فلاونوئیدی کامفرول و کوئرستین گیاه زعفران بررسی شود.

مواد و روش‌ها

بنه زعفران مزروعی (*Crocus sativus* L.) در اواخر شهریورماه ۱۳۹۷ از شهرستان قائنات واقع در استان خراسان جنوبی تهیه و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام‌نور تهران منتقل گردید. جهت افزایش احتمال گلدهی، بنه‌هایی با وزن بالاتر از ۸ گرم انتخاب شد. بنه‌ها با قارچ‌کش کاربندازیم ۱٪ (Carbendazim) (۲۵ گرم در ۲/۵ لیتر آب) به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و پس از خشک‌شدن در هوای آزاد، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت به قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. در هر گلدان پنج بنه کاشته شد و آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و هر تیمار شامل پنج تکرار بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد آزمایشگاه قرار داده شد. رژیم حرارتی برای القای گلدهی براساس مقدار گزارش‌شده توسط Molina و همکاران (۲۰۰۵)، دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه انتخاب گردید. رژیم نوری به صورت ۸/۱۶ ساعت (به ترتیب روشنایی و تاریکی) و رطوبت نسبی ۶۰٪ به کار گرفته شد.

تیمار شوری: گلدان‌ها در اواخر شهریورماه به مدت دو هفته و به صورت یک روز در میان با آب به منظور جوانه‌زدن آبیاری شد. پس از جوانه‌زدن گیاه و مشاهده برگ‌های سبز زعفران در اواسط مهرماه، گلدان‌ها به مدت یک هفته با محلول غذایی ۱/۲ هوگلند آبیاری شد. پس از اینکه برگ‌های سبز زعفران به حد کافی رشد کرد، تیمار شوری با شش غلظت

کلاله‌ها است (Straubinger et al., 1997; Carmona et al., 2007) اما اخیراً گلیکوزیدهای کامفرول در گلبرگ‌های زعفران نیز شناسایی شده‌اند (Vignolini et al., 2008; Serrano-Diaz et al., 2014). گلیکوزیدهای کامفرول در واقع متابولیت‌های ثانویه طبیعی در گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بخشی از رژیم غذایی انسانی هستند (Hadizadeh et al., 2003). کامفرول در حفاظت بدن علیه آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و دیگر رادیکال‌های آزاد اهمیت دارد و به طور گسترده در جلوگیری از سرطان و دیگر بیماری‌های حاد نقش دارد (Zeka et al., 2015). کوئرستین نیز یک فلاونول با منشأ گیاهی است که در میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها و دانه‌ها یافت می‌شود. همچنین به عنوان ترکیب مکمل‌ها، نوشیدنی‌ها و غذاها استفاده می‌شود. کوئرستین فلاونوئیدی است که به صورت گسترده در طبیعت پراکنده شده است. نتایج تحقیقات نشان داده است که گلبرگ‌های زعفران منبع خوبی برای کوئرستین هستند (Zeka et al., 2015). مطالعات اخیر در برخی گیاهان نشان داده است که تنش شوری موجب تغییر در محتوای این دو ترکیب فلاونوئیدی می‌شود (Rossi et al., 2014; Hassanein et al., 2016; Kim et al., 2019; Xu et al., 2020). در گیاهان، فلاونوئیدها توسط مجموعه آنزیم‌های مختلفی که در طرف سیتوزولی غشای شبکه آندوپلاسمی وجود دارند، سنتز می‌شوند. اولین مراحل برای بیوسنتز فلاونوئید در مسیر فنیل پروپانوئید گنجانده شده است. فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) اولین آنزیم متعهد در مسیر فنیل پروپانوئید است که منجر به تولید لیگنین، لیگنان و فلاونوئیدها مانند کامفرول و کوئرستین می‌شود. این آنزیم تشکیل ترانس سینامیک اسید از فنیل آلانین را با از دست دادن هم‌زمان آمونیاک کاتالیز می‌کند. درواقع آنزیم PAL، به عنوان پلی بین متابولیسم اولیه و بیوسنتز محصولات طبیعی، یک محل بالقوه برای تنظیم مسیر فنیل پروپانوئید است (Bate et al., 1994). فعالیت آنزیم PAL می‌تواند توسط انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی شامل UV-B، زخم، سرما، آب‌سزیک اسید و سالیسیلیک اسید القا شود (Xu et al., 2012). تنش‌های غیرزیستی عموماً موجب تولید ROS می‌شوند (Pastori and Foyer, 2002) و بنابراین موجب

سنجش قندهای محلول: ۰/۵ میلی لیتر از عصاره های به دست آمده مرحله قبل با ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و بعد از اضافه کردن یک میلی لیتر فنل ۵٪ و پنج میلی لیتر سولفوریک اسید غلیظ جذب آن ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر بعد از ۳۰ دقیقه خوانده شد (Kochert, 1978).

محتوای نسبی آب: محتوای نسبی آب گیاه با استفاده از روش Cameron و همکاران (۱۹۹۹) تعیین شد. برای این منظور یک گرم برگ سبز زعفران در یک استوانه مدرج حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده شد و این ظرف برای مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از این مدت برگ ها به دقت توسط دستمال کاغذی خشک شده و بلافاصله وزن آماس آن ها مورد سنجش قرار گرفت. سپس برگ ها را در پاکتی کاغذی قرار داده و برای مدت ۲۴ ساعت در آن با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از این مدت وزن خشک برگ ها تعیین شد. محتوای نسبی آب با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$$RWC (\%) = [(FW-DW) / (TW-DW)] \times 100$$

در فرمول فوق FW بیانگر وزن برگ تازه، TW نشان دهنده وزن آماس و DW معادل وزن خشک برگ است.

سنجش پراکسیداسیون لیپید: میزان پراکسیداسیون لیپیدی جوان ترین برگ گیاه چه از طریق اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید (MDA) با استفاده از روش Heath و Packer (۱۹۶۸) تعیین شد. به این منظور، ۰/۱ گرم بافت گیاهی تازه در یک میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل در rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. یک میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد (حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید) به ۴۰۰ میکرو لیتر از عصاره شفاف گیاهی (بعد از سانتریفیوژ) اضافه شد. مخلوط به دست آمده در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت. سپس دوباره در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس TBA-

صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم (NaCl) تهیه و به صورت ۱۰۰ میلی لیتر ترکیب هوگلند و غلظت NaCl مورد نظر (۰/۵ میلی لیتر محلول هوگلند و ۰/۱۷ گرم NaCl با آب به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد تا غلظت ۳۰ میلی مولار نمک به دست آید) به هر گلدان با فاصله سه روز در میان تیمار شد. جهت جلوگیری از شوک اسمزی، نمک در هر بار آبیاری به صورت پلکانی از ۳۰ میلی مولار اعمال شد تا به غلظت مورد نظر برسد. برای جلوگیری از تجمع نمک و املاح محلول هوگلند در گلدان ها، پس از هر سه مرتبه اعمال تیمار شوری (پس از یک هفته)، با محلول آب-مقطر شستشو داده شد. دو هفته بعد در اواخر آبان ماه گل ها برداشت شد. کلاله های زعفران پس از اندازه گیری وزن تر جهت اندازه گیری وزن خشک به آن منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

سنجش رنگیزه های فتوسنتزی: میزان کلروفیل a، کلروفیل b براساس روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) اندازه گیری شد. ۱۰۰ میلی گرم از بافت تر برگ از هر تیمار وزن شد و سپس با استفاده از دو میلی لیتر استون ۸۰ درصد حجمی در محیطی تاریک و در روی یخ درون هاون چینی ساییده شد تا در نهایت محلولی همگن به دست آمد. عصاره حاصل در دور ۲۵۰۰g در دمای چهار درجه سانتی گراد مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. حجم محلول روشنار به کمک استون ۸۰ درصد در لوله های آزمایش به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس جذب محلول به دست آمده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV-160A، ساخت کشور ژاپن، در سه طول موج ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و از استون ۸۰ درصد به عنوان محلول شاهد استفاده گردید. میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید طبق فرمول برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

$$Chl\ a = (12/25 \times A_{663} - 2/79 \times A_{646})$$

$$Chl\ b = (21/21 \times A_{646} - 5/1 \times A_{663})$$

$$Car = (1000 \times A_{470} - 1/8 \times chl\ a - 85/02 \times chl\ b) / 198$$

که در آن Chl a، Chl b و Car به ترتیب بیانگر کلروفیل a و

b و کاروتنوئید و A نشان دهنده جذب است.

اسید سینامیک را تولید کند، بنابراین فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیم با $\mu\text{mol cinnamic acid}/\text{min}$ و فعالیت ویژه آنزیمی به صورت $\mu\text{mol cinnamic acid}/\text{mg protein}/\text{min}$ بیان شد (Wang et al., 2006).

مواد و حلال‌های شیمیایی: مواد شیمیایی استاندارد کوئرتستین و کامفرول از شرکت Sigma Chemical (سنت لوئیس، MO، USA) و حلال‌های با درجه HPLC مانند کلروفرم، متانول و آب از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد.

استخراج: ۵۰۰ میلی گرم گل‌های خشک پودر شده زعفران در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به حالت معلق در آمد و سپس با استفاده از اسید فرمیک به $\text{pH} = 2.0$ رسید و به مدت یک شبانه روز در آزمایشگاه قرار داده شد. پس از استخراج، نمونه‌ها برای از بین بردن بقایای گیاه از صافی عبور داده شد و سپس تحت شرایط خلأ در دمای اتاق تبخیر شد. مواد باقی مانده دوباره در $\text{EtOH} / \text{H}_2\text{O}$ (70:30) حل شده و با اسید فرمیک به $\text{pH} 2.0$ و حجم سه میلی لیتر رسید (Vignolini et al., 2008).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): دستگاه کروماتوگرافی مایع ساخت شرکت Waters (USA) متشکل از یک ماژول جداکننده waters 2695 و یک PDA Detector waters 996 برای آنالیز HPLC استفاده شد. ستون مورد استفاده EurospHer 100-5 C18 به طول ۱۵ سانتی متر و قطر ۴/۶ میلی متر بود که توسط ماتریس فاز معکوس Waters (۳/۵) میکرومتر (تجهیز شده بود. شستشو در یک سیستم گرادیان با متانول به عنوان فاز آلی (حلال A) و آب مقطر (حلال B) با سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه انجام شد. قله‌ها در طول موج ۱۹۵-۴۰۰ نانومتر به تصویر کشیده شد. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود و دما در ۲۵ درجه سانتی گراد حفظ شد. جمع آوری داده‌ها و ادغام با نرم افزار Millennium 32 انجام گردید.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بررسی‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS23 تجزیه واریانس آنوای یک طرفه (one way ANOVA) انجام

MDA بود. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت مالون دی‌آلدئید از ضریب خاموشی ($0.155 \text{ cm}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) استفاده شد و مقادیر با واحد $\mu\text{mol. g}^{-1} \text{ FW}$ بیان گردید.

سنجش پرولین: برای سنجش اسید آمینه پرولین نیز از هر تیمار نمونه‌هایی را به صورت تازه برداشت کرده و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه قرار داده شد. جهت سنجش پرولین روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انتخاب شد. جهت خواندن میزان جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری، تلولن به عنوان شاهد قرار داده شد و برای سنجش میزان پرولین میزان جذب فاز فوقانی در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

استخراج پروتئین: مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ‌ها را توزین کرده و در ۶/۵ میلی لیتر بافر Tris-Hcl ۵۰ میلی مولار ($\text{pH} = 8.8$) روی ظرف حاوی یخ با استفاده از هاون چینی ساییده شد و عصاره به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰۰g در چهار درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی از رسوب جدا شد. این محلول حاوی آنزیم PAL بود (Wang et al., 2006).

روش سنجش فعالیت آنزیم PAL: برای سنجش فعالیت PAL در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی لیتر محلول فنیل آلانین (۱۰ میلی مولار)، ۰/۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر، ۰/۱ میلی لیتر از پروتئین استخراج شده و یک میلی لیتر از بافر Tris-Hcl ۵۰ میلی مولار ($\text{pH} = 8.8$) اضافه شد و نمونه کنترل تمام ترکیبات به جز پروتئین استخراج شده را شامل می شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، انکوبه شدند. سپس ۰/۵ میلی لیتر از HCL (۶ مولار) برای غیرفعال کردن آنزیم PAL به نمونه‌ها اضافه شد. شستشوی نمونه‌ها با ۱۵ میلی لیتر از اتیل استات در پنج مرحله انجام شد. سپس نمونه‌ها در معرض جریان هوا تبخیر شدند. به رسوب حاصل سه میلی لیتر از NaOH (۰/۰۵ مولار) اضافه شد و رسوب کاملاً در آن حل شد. جذب نمونه‌ها به وسیله دستگاه نانودرآپ اندازه گیری شد. از آنجا که یک واحد آنزیم PAL مقداری از آنزیم است که در طی یک دقیقه، یک میکرومول

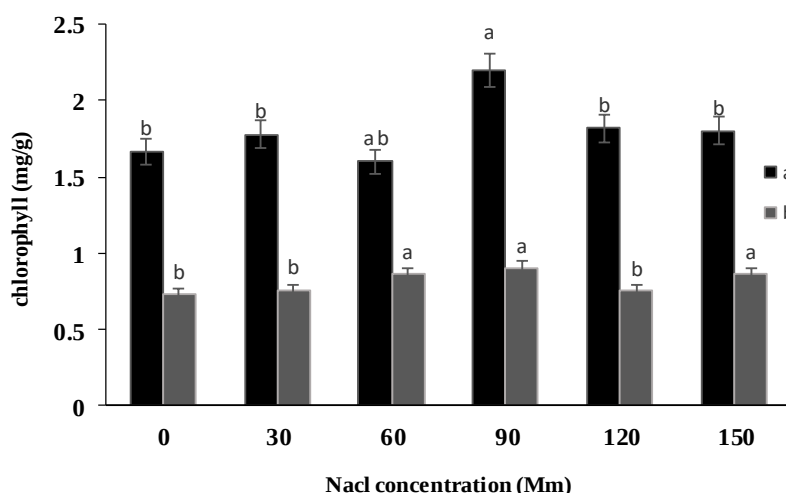
شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون Duncan انجام و سطوح معنی‌داری تیمارها در سطح $P \leq 0.05$ محاسبه گردید برای رسم شکل از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد.

نتایج و بحث

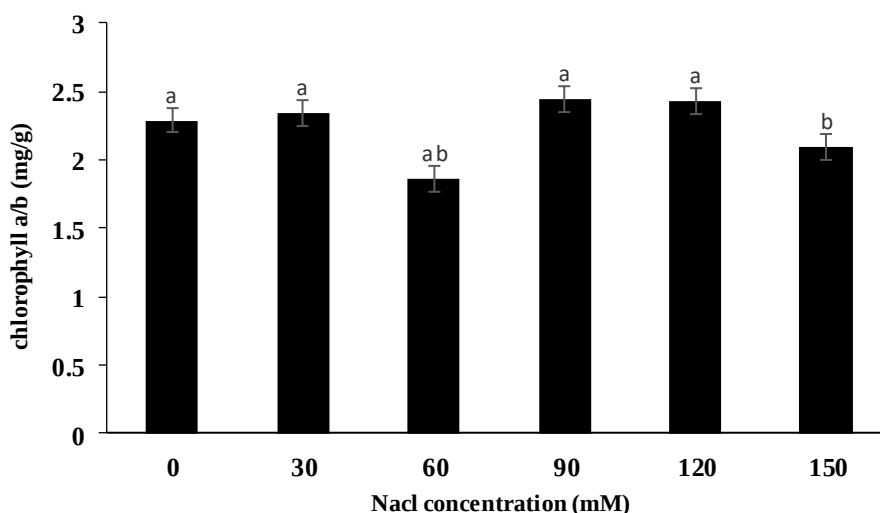
اثر سطوح مختلف تنش شوری بر رنگیزه‌های برگ زعفران: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که شوری تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر محتوای کلروفیل a و b نداشت (شکل ۱). کمترین مقدار کلروفیل a در تیمار شاهد به میزان ۰/۶۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه و بیشترین میزان آن در تیمار با هدایت الکتریکی ۹۰ میلی‌مولار به میزان ۲/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود. کمترین مقدار کلروفیل b نیز در تیمار شاهد به میزان ۰/۷۳ میلی‌گرم بر گرم نمونه تر بود و بیشترین مقدار آن با ۰/۸۳ میلی‌گرم بر گرم ماده تر در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد. نسبت کلروفیل a به b نیز معنی‌دار نبود و فقط در ۶۰ میلی‌مولار به کمترین مقدار خود رسید (شکل ۲). به‌طورکلی با افزایش شوری تا حد ۹۰ میلی‌مولار، میزان کلروفیل b افزایش و بعد از آن مقداری کاسته شد. این نتایج با نتایج صالحی و همکاران (۱۳۸۳) مطابقت دارد. نتایج تحقیقات این پژوهشگران نشان داد که با اعمال تنش شوری متوسط میزان کلروفیل برگ گندم افزایش یافت، ولی با تداوم شرایط و افزایش بیشتر شدت تنش شوری میزان کلروفیل برگ با شیب ملایمی کاهش یافت. در آزمایش انجام‌شده بر روی گیاه زعفران توسط رستمی و همکاران (۱۳۹۳) نیز غلظت کلروفیل‌ها تحت اثر شوری با آب آبیاری قرار نگرفت و میزان کلروفیل a و b تا غلظت ۶۰ میلی‌مولار افزایش و پس از آن کاهش یافت. کاهش سطح کلروفیل در گیاهانی که تحت شوری هستند به‌عنوان یک علامت معمول تنش اکسیداتیو در نظر گرفته شده است (Smirnoff and Cumbes, 1989) و به‌دلیل مهار سنتز کلروفیل همراه با فعال‌شدن تخریب آن توسط آنزیم کلروفیل‌لاز رخ می‌دهد (Santos, 2004). کاهش محتوای کلروفیل در نتیجه سنتز آهسته یا تجزیه سریع، نشان داد که یک مکانیسم محافظت‌کننده نوری وجود دارد که از طریق کاهش محتوای

کلروفیل جذب نور را کاهش می‌دهد (Elsheery and Cao, 2008). همچنین کاهش ظرفیت فتوسنتزی گیاه زعفران می‌تواند ناشی از کاهش محتوای نسبی آب برگ‌ها باشد (نقی‌زاده و همکاران ۱۳۹۳). کاهش محتوای نسبی آب در برگ‌ها می‌تواند با کاهش آب سلول، سرعت واکنش‌ها را نیز کاهش دهد و از طرف دیگر موجب بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش سرعت فتوسنتز شود. همچنین کاهش محتوای آب در گیاه می‌تواند مانع از انتقال سریع مواد فتوسنتزی به بنه شده و لذا این موضوع به‌صورت بازخورد منفی عمل کرده و ظرفیت فتوسنتزی را کاهش داده باشد. یکی دیگر از دلایل احتمالی این امر رقابت و پیشی‌گرفتن گلوتامین کیناز (آنزیم کاتالیزکننده پرولین) به هنگام تنش شوری از آنزیم گلوتامات لیگاز (اولین آنزیم مسیر بیوسنتز کلروفیل) است که موجب می‌شود تا پیش‌ساز گلوتامات (پیش‌ساز مسیر سنتز کلروفیل و پرولین) بیشتر به مصرف پرولین برسد و بنابراین بیوسنتز کلروفیل با محدودیت مواجه می‌شود (Bybordi et al., 2010؛ رستمی و همکاران، ۱۳۹۳).

اثر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان کاروتنوئید موجود در برگ زعفران در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (شکل ۳). با افزایش شدت تنش شوری، میزان کاروتنوئید موجود در برگ افزایش یافت به‌طوری‌که کمترین آن در تیمار شاهد به میزان ۸/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و بیشترین مقدار آن در تیمار ۶۰ میلی‌مولار به میزان ۱۰/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که ۲۷ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد که مشابه با نتایج به‌دست‌آمده توسط رستمی و همکاران (۱۳۹۳) بود که میزان کاروتنوئیدها در شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بیشترین افزایش را نشان داد. محققان فوق چند علت عمده برای این افزایش مطرح کردند که از جمله خشکی فیزیولوژیکی حاصل از تنش شوری که ممکن است موجب محدودیت در جذب آب شود و از سوی دیگر افزایش جذب نمک توسط گیاه، سبب اختلال در کارکرد سلولی و آسیب رساندن به فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل فتوسنتز و تنفس می‌شود (Leopold and Willing, 1984). همچنین علت دیگر آن



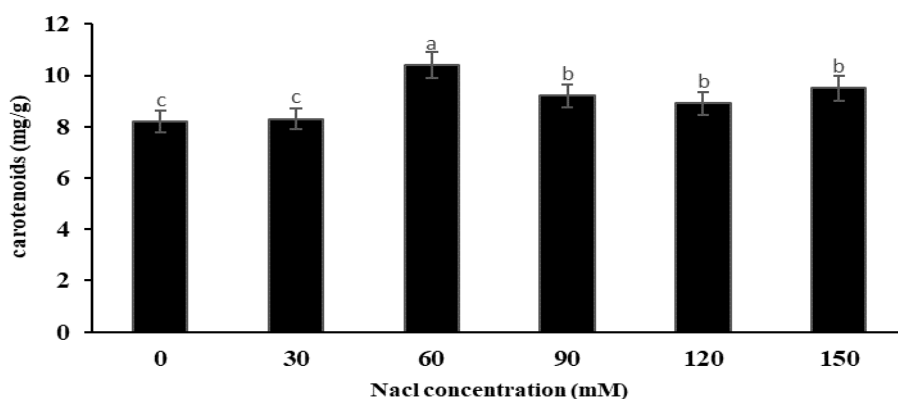
شکل ۱- اثر سطوح مختلف تنش شوری بر محتوای کلروفیل. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.



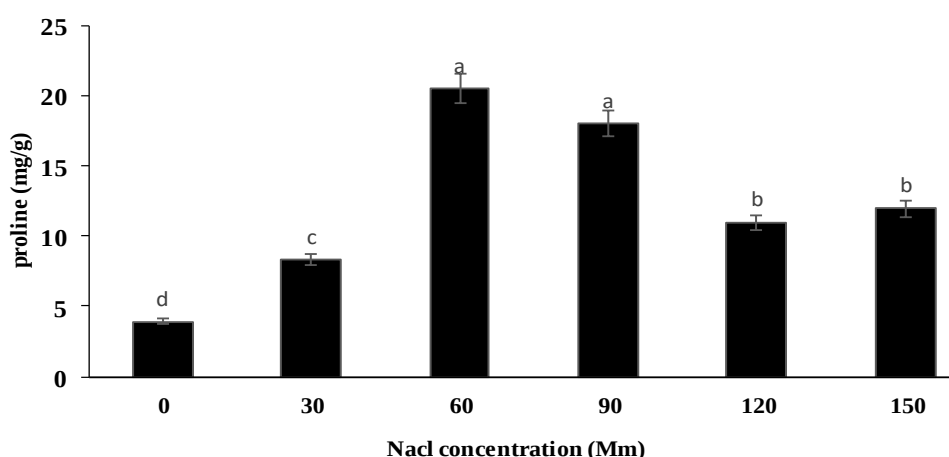
شکل ۲- اثر سطوح مختلف تنش شوری بر نسبت کلروفیل a/b. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

شوری بر میزان پرولین برگ زعفران در سطح پنج درصد معنی دار بود (شکل ۴). کمترین میزان پرولین برگ (۳/۹ میلی گرم بر گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد و با افزایش تنش شوری میزان پرولین به تدریج افزایش یافت و بیشترین میزان (۲۰/۵ میلی گرم بر گرم) آن ۶۰ میلی مولار بود و پس از آن کاهش در میزان پرولین مشاهده شد. Al-saady و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیق مشابهی بر روی گیاه شنبلله مشاهده کردند که میزان پرولین با افزایش تنش شوری تا ۸۰

می تواند این باشد که تنش شوری موجب تجزیه بتاکاروتن شده و در چرخه گزانتوفیل ها فرآیند د-پوکسیداسیون موجب افزایش مقدار زاگزانتین می شود. این فرآیندها در حفاظت از بازدارندگی نوری مؤثر و با تأثیر مثبت روی سیالیت غشاهای تیلاکوئیدی موجب کاهش در نفوذپذیری غشاها در برابر ROS تیلاکوئیدها شده و افزایش کاروتنوئیدها توان مقابله با شرایط تنشی در گیاه را افزایش می دهد (Misra et al., 2006).
اثر شوری بر محتوای پرولین: اثر سطوح مختلف تنش



شکل ۳- اثر سطوح مختلف شوری بر محتوای کاروتنوئید. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.



شکل ۴- اثر سطوح مختلف شوری بر محتوای پرولین. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

این یافته‌ها نشان می‌دهد که یک سطح شوری بحرانی وجود دارد. همان‌طور که در چغندر قند، گندم و گونه‌های دیگر یافت می‌شود (Mari et al., 2018)، پرولین فقط به آرامی جمع می‌شود تا زمانی که گیاه به سطح شوری بحرانی برسد. بیش از این غلظت نمک، منجر به واکنش بیشتر و تجمع پرولین در مقادیر بسیار زیاد می‌شود. بنابراین، زعفران در غلظت ۳۰ میلی مولار NaCl به سطح شوری بحرانی خود نرسیده است و ۶۰ میلی مولار غلظت نمک به عنوان سطح شوری بحرانی در مطالعه ما در نظر گرفته شده است. این توضیح با یافته‌های

میلی مولار افزایش یافت و پس از آن کاهش پیدا کرد. همچنین در آزمایشی که بر روی گیاه برنج صورت گرفت مشاهده شد که میزان پرولین تا ۵۰ میلی مولار نمک افزایش یافت و با افزایش شوری به میزان ۱۰۰ میلی مولار کاهش پیدا کرد (Lutts et al., 1999). رستمی و همکاران (۱۳۹۳) نیز نتایج مشابهی را بر روی گیاه زعفران مشاهده کردند به طوری که میزان پرولین در غلظت ۴۰ میلی مولار به بیشترین حد خود رسید و پس از آن کاهش پیدا کرد. در آزمایش کنونی نیز پس از حداکثر افزایش در ۶۰ میلی مولار شوری، میزان پرولین کاهش یافت و

گونه‌های گیاهی در معرض شوری گزارش شده است (Dubey and Singh, 1999; Flowers, 2004; Pattanagul and Thitisaksakul, 2008). به گفته Stoop و Pharr (۱۹۹۴) به نظر می‌رسد افزایش استخر گلوکز ناشی از شوری در دم برگ‌های کرفس، به دلیل کاهش تقاضای کربن باشد. اعتقاد بر این است که تحت تنش شوری، تجمع قندها به همراه سایر املاح سازگار به تنظیم اسمزی کمک می‌کند (Dubey and Singh, 1999) که به گیاهان این امکان را می‌دهد که ذخیره را برای حمایت از متابولیسم پایه در محیط تحت تنش به حداکثر برسانند (Hurry et al., 1995). بیان رویسکو را می‌توان با مقدار بیش از حد قندهای سیتوپلاسم سرکوب کرد (Sawada et al., 1992; Koch, 1996). بنابراین، کاهش فتوسنتز و تغییرات متابولیکی توسط تجمع قند می‌تواند به حساسیت نمک کمک کند که رشد رقم حساس به نمک را در شرایط تنش نمکی محدود می‌کند. در گیاه زعفران نیز رستمی و همکاران (۱۳۹۳) بیان داشتند که افزایش غلظت قندهای محلول می‌تواند یک پاسخ نسبت به تغییرات میزان محتوای نسبی آب (RWC) و پتانسیل آب برگ‌ها ارزیابی شود، زیرا افزایش در غلظت ساکارز و سطح قندهای محلول تحت شرایط تنش شوری به سبب بهبود وضعیت آب برگ در القای تحمل به شوری نقشی مهم بازی می‌نماید و می‌تواند از کاهش شدید میزان پتانسیل آب و همچنین محتوی نسبی آب برگ جلوگیری کند. آغاسی و همکاران (۱۳۹۰) نیز گزارش کردند قندهای محلول از اسمولیت‌های سازگار هستند که در شرایط تنش شوری تجمع یافته و به عنوان عوامل حفاظتی در گیاه گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) عمل می‌کنند.

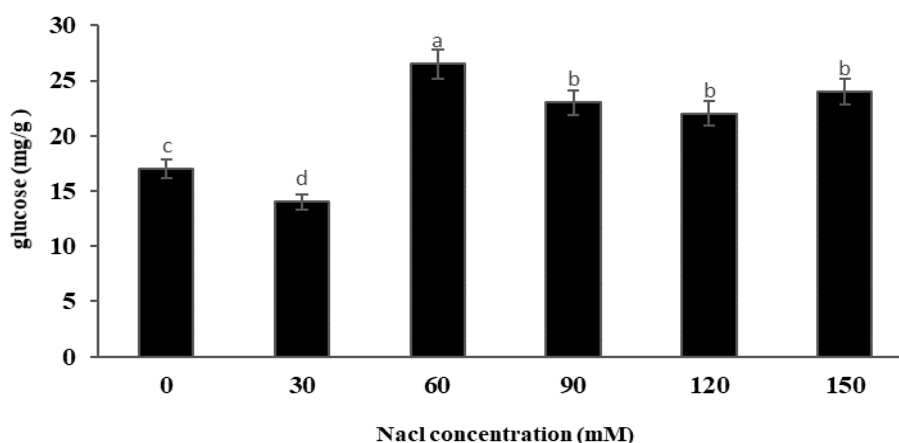
اثر سطوح مختلف تنش شوری بر محتوی نسبی آب برگ

زعفران: اثر تیمارهای آزمایشی بر محتوی نسبی آب برگ زعفران در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (شکل ۶). افزایش میزان شوری موجب شد که محتوی نسبی آب برگ کاهش یابد و بیشترین کاهش (۲۰ درصد) در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد. مطالعات متعدد نشان داده است که تنش شوری

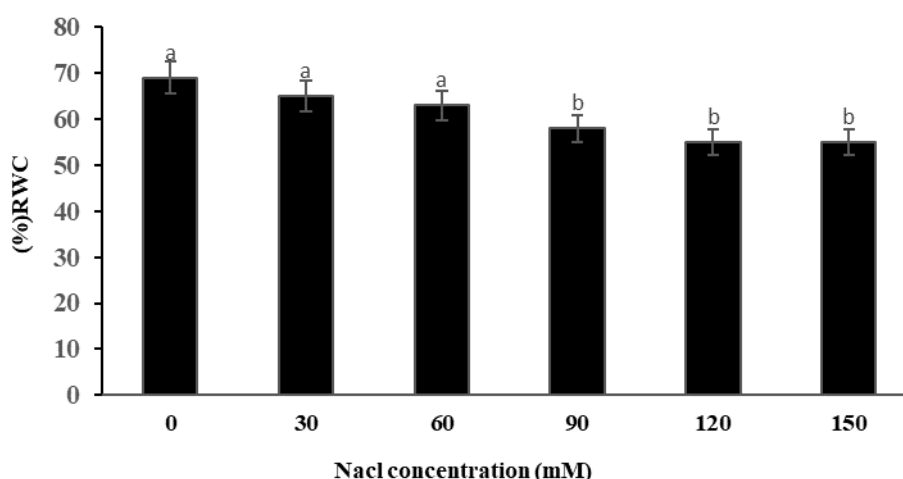
توماس و هاردی نیز سازگار است (Hartzendorf and Rolletschek, 2001) افزایش محتوای پرولین در شرایط تنش شدید می‌تواند از پروتئین‌ها در برابر یون‌های نمک محافظت کرده و از تجزیه پروتئین‌ها، غشاها و ساختارهای زیر سلولی جلوگیری کند. مقادیر بیشتر NaCl بیشتر از اینکه تعادل بین هموستازی یونی ایجاد کند، در جهت ایجاد تنش عمل می‌کند (Munns and Tester, 2008). از طرفی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده روند افزایش غلظت پرولین در پاسخ به تنش شوری به صورت خطی نبود و با افزایش شدت تنش (۹۰ میلی‌مولار) به تدریج واکنش تدافعی گیاه کاهش یافت که این امر ممکن است به این دلیل باشد که اعمال غلظت‌های بالای سطح بحرانی شوری می‌تواند متابولیسم گیاه را دچار اختلال کند و گیاه نتواند سازوکار دفاعی مناسبی از خود نشان دهد زیرا هر گونه گیاهی با توجه به تحملی که نسبت به یک تنش دارد تا سطح مشخصی پاسخ‌های مقاومتی ایجاد می‌کند و چنانچه شدت تنش از سطح مشخصی بالاتر رفت، پاسخ‌های مقاومتی گیاه نیز ضعیف‌تر می‌شود (رستمی و همکاران، ۱۳۹۳). علت دیگر می‌تواند به دلیل استفاده بیشتر از پرولین نسبت به سنتز آن باشد که ناشی از تنش شوری است. افزایش تجمع پرولین تحت تنش نمک ممکن است به دلیل تجزیه پروتئین غنی از پرولین یا سنتز جدید پرولین باشد (Tewari and Singh, 1991). پرولین بعد از تنش به سرعت شکسته می‌شود که ممکن است عامل‌هایی را فراهم کند که موجب حمایت از چرخه فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری شود و انرژی (ATP) لازم برای برگشت از حالت تنش را فراهم کند (Satoh et al., 2002).

اثر سطوح مختلف شوری بر محتوای قندها: نتایج حاصل

از تجزیه واریانس نشان داد که سطوح مختلف تنش شوری تأثیر معنی‌داری بر میزان گلوکز موجود در زعفران داشت ($P \leq 0.05$) (شکل ۵). براساس نتایج موجود در نمودار میزان گلوکز در تمام تیمارها به غیر از تیمار ۳۰ میلی‌مولار، نسبت به شاهد افزایش نشان داد و بیشترین میزان آن در سطح تنش شوری ۶۰ میلی‌مولار مشاهده شد. افزایش تجمع قندها در بسیاری از



شکل ۵- اثر سطوح مختلف شوری بر محتوای قندها. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

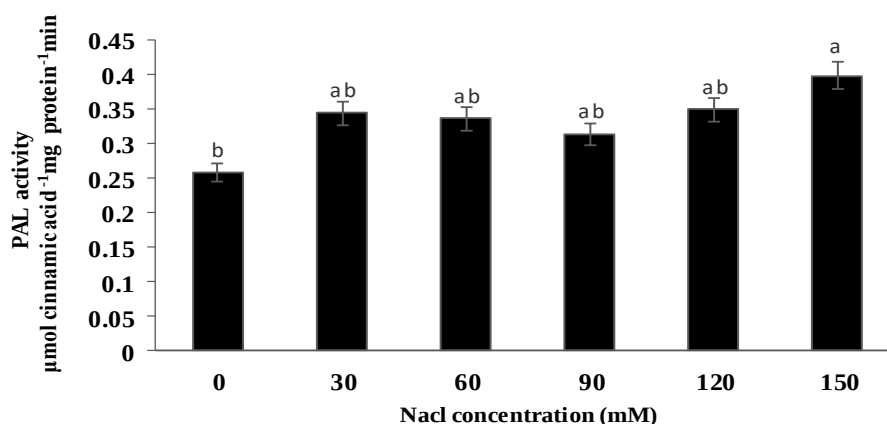


شکل ۶- اثر سطوح مختلف تنش شوری بر محتوای آب زعفران. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

(Suarez and Medina, 2008).

کاهش محتوای نسبی آب در برگ‌های تیمار داده شده با غلظت‌های مختلف شوری در زعفران می‌تواند ناشی از کاهش پتانسیل آب برگ باشد. در واقع، کاهش نسبی آب برگ‌ها نشان‌دهنده ظرفیت کمتر جذب آب است که این ویژگی به دلیل نحوه رشد زعفران است زیرا این گیاه در طول فصل سرد به رشد خود ادامه می‌دهد و به منظور جلوگیری از خسارت تنش یخبندان، محتوای نسبی آب خود را در سطح پایینی حفظ می‌کند (Avarseji *et al.*, 2013).

موجب کاهش محتوای آب نسبی می‌شود (Munns *et al.*, 2006). وضعیت آب عامل اصلی تأثیرگذار در رشد و نمو گیاهان است. کاهش پتانسیل آب خارجی موجب جمع شدن خالص املاح در سلول‌ها می‌شود که پتانسیل اسمزی سلول را برای حفظ فشار تورژسانس کاهش می‌دهد (Navarro *et al.*, 2003). در پژوهش حاضر، مشاهده شد که میزان نسبی آب در برگ‌های گیاه زعفران با افزایش شوری به سطوح منفی‌تر تنظیم می‌شود که این یک واکنش معمول به شوری است و مشابه آن برای سایر گونه‌ها گزارش شده است (Navarro *et al.*, 2003; Munns *et al.*, 2006).

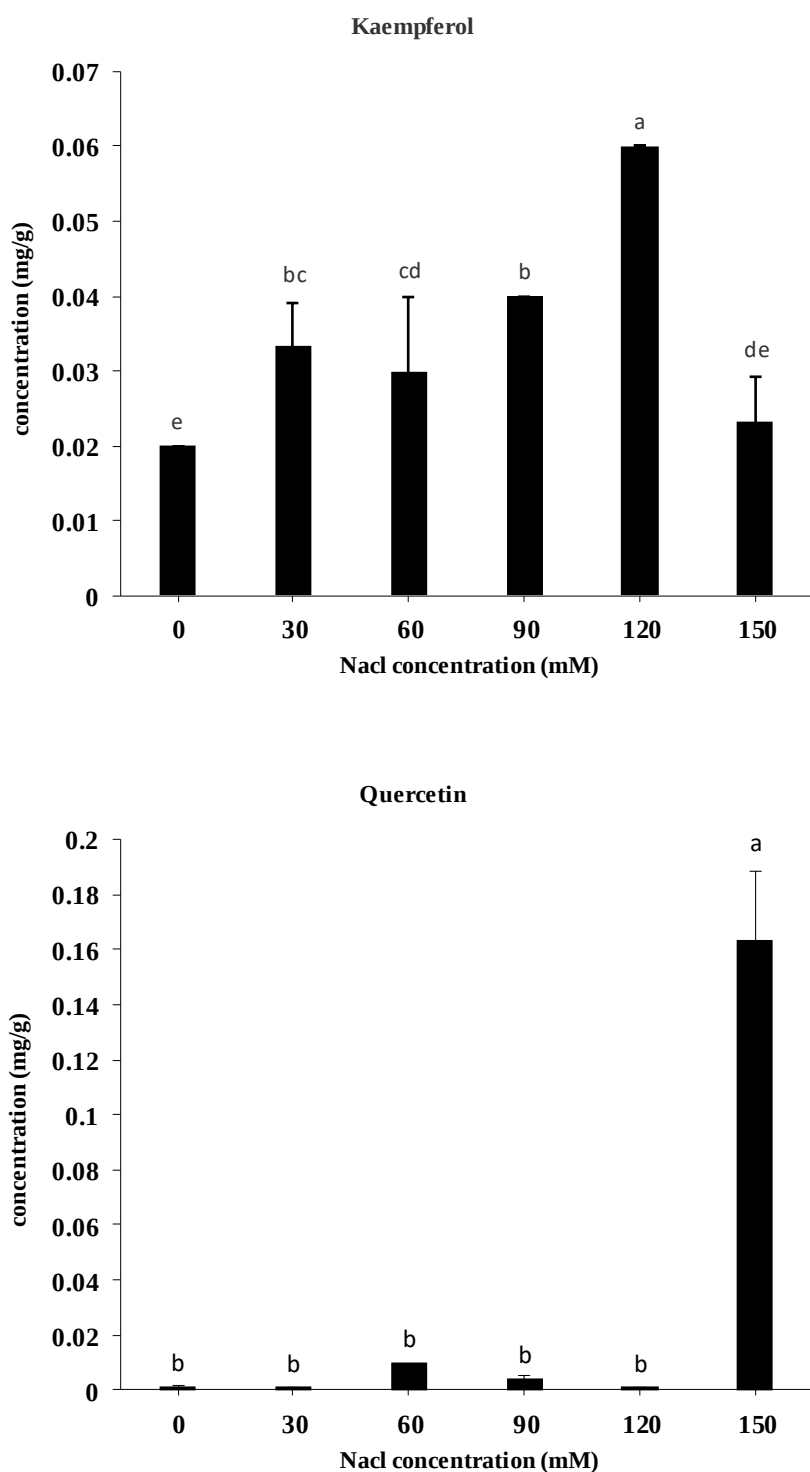


شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف شوری بر فعالیت آنزیم PAL در برگ زعفران. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد.

افزایش فعالیت PAL ممکن است در راستای نقش این آنزیم در پاسخ گیاه به تنش نمکی باشد. به نظر می‌رسد کنترل فعالیت PAL یکی از عناصر مهم در تنظیم این مسیر باشد. همچنین فعالیت افزایش یافته PAL با تجمع ترکیبات فنیل پروپانوید در بافت‌های چندین گونه گیاهی در ارتباط است. در پژوهشی دیگر که توسط Valifard و همکاران (۲۰۱۵) بر روی دو گونه گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) صورت گرفت فعالیت آنزیم پس از تیمار شوری افزایش یافت و این افزایش با افزایش تجمع ترکیبات فنلی در این گیاهان همراه بود. در این تحقیق نیز افزایش فعالیت آنزیم PAL با افزایش دو ترکیب فنلی کامفرول و کوئرستین همراه بود. بنابراین، با توجه به اثرات ثابت‌شده ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی این دو ترکیب فنلی در گیاه زعفران، افزایش فعالیت PAL که یک آنزیمی کلیدی در مسیر بیوسنتز این دو ترکیب است، دور از انتظار نیست.

تأثیر تنش شوری بر میزان کامفرول و کوئرستین: غلظت‌های مختلف شوری تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر میزان کامفرول و کوئرستین داشت (شکل ۸). میزان کوئرستین در تیمارهای ۶۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار به نسبت به شاهد و سایر تیمارها افزایش معنی‌دار نشان داد ($P \leq 0.05$). میزان کامفرول

تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنزیم PAL: غلظت‌های مختلف شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد گردید (شکل ۷)، هر چند این افزایش در بین گروه‌های تیماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نبود و فقط تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P \leq 0.05$). در آزمایشی مشابه، Gao و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت PAL را در لپه‌ها، محور زیرلپه و ریشه‌چه گیاهان *Jatropha curcas* L. تحت غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بررسی کردند که نتایج نشان داد با افزایش غلظت شوری فعالیت PAL به تدریج تا غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش می‌یابد و این افزایش در محور زیرلپه نسبت به دو اندام دیگر بیشتر بود و در غلظت ۲۰۰ به حداکثر خود رسید که این افزایش می‌تواند پاسخی به آسیب سلولی ناشی از غلظت‌های بالاتر NaCl باشد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که در گیاهچه *Jatropha curcas* L.، افزایش فعالیت PAL می‌تواند به پیامد این آنزیم در پاسخ گیاه به تنش شوری مربوط باشد. آن‌ها همچنین نشان دادند فعالیت PAL قویاً وابسته به اندام گیاهان و غلظت NaCl است. افزایش فعالیت PAL ممکن است به عنوان پاسخ به آسیب سلولی تحریک‌شده توسط غلظت‌های بالاتر NaCl رخ دهد. ظاهراً در گیاه زعفران،



شکل ۸- مقایسه میزان کامفرول و کوئرستین در زعفران به روش HPLC. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می باشد.

نیز به غیر از شوری ۱۵۰ میلی مولار، در بقیه تیمارها با تیمار شاهد تفاوت معنی دار نشان داد ($P \leq 0.05$) و بیشترین افزایش فلاونوئیدها خانواده بزرگی از ترکیبات پلی فنلی هستند که در تیمارهای ۹۰ و ۱۲۰ میلی مولار نمک مشاهده شد.

توسط گیاهان سنتز می‌شوند و از لحاظ ساختاری از ماده فلاونون مشتق می‌شوند. بسیاری از مطالعات نشان داده که فلاونوئیدها مانند روتین، کامفرول، کوئرستین، آپیزین و غیره به دلیل خواص ضدالتهاب، خواص ضدحساسیت، ضدترومبیت، محافظت‌کننده کبدی، ضداسپاسم و ضدسرطان آن بسیار مشهور هستند (Maheshkumar and Kirti, 2012). در مطالعات قبلی گزارش شده بود که فلاونوئیدها ترجیحاً در گیاهانی که تحت شرایط تنش شدید، از جمله تنش نمکی قرار دارند، تجمع می‌یابند تا ROS را از بین ببرند (Agati et al., 2011, 2012) و به همین دلیل بیوسنتز چنین ترکیباتی عموماً در گیاهان در معرض شوری، تحریک می‌شود (Navarro et al., 2006). هر چند تجمع ترکیبات فنلی تحت تنش شوری ممکن است در گونه‌های گیاهی مختلف متفاوت باشد این بدان معنی است که تنش نمک یک روش مؤثر برای تقویت تجمع فلاونوئیدها در گیاهان است که ممکن است کیفیت گیاهان دارویی مانند زعفران را بهبود بخشد. Shao و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که تیمار نمک متوسط (میلی‌مولار $143 \leq$) با القای تجمع ترکیبات گیاهی فعال زیستی، کیفیت خواص دارویی گیاه *Andrographis paniculata* را بهبود می‌بخشد. در مطالعه‌ای که توسط Xu و همکاران (۲۰۲۰) صورت گرفت، سطح کامفرول و کوئرستین در نهال‌های *Apocynum venetum* تحت تنش نمک، به‌طور خاص در ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl افزایش پیدا کرد درحالی‌که سطح سایر فلاونوئیدها مانند هیپروزاید، ایزوکوئرستین و دی‌هیدرو کوئرستین همراه با مقدار کل فلاونوئیدها، با تنش نمک کاهش یافت. آن‌ها نتیجه گرفتند که غلظت بالای نمک موجب تحریک تجمع ترکیبات با خواص دارویی می‌شود. این ترکیبات دارویی به‌طور انتخابی تحت تنش نمک انباشته می‌شوند از سوی دیگر Rossi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند محتوای کامفرول و کوئرستین در برگ‌های زیتون رقم مقاوم (Frantoio) در بالاترین تیمار NaCl (۱۲۰ میلی‌مولار) افزایش یافت. بنابراین نتیجه گرفتند که رقم متحمل به نمک Frantoio از طریق افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در اندام‌های حساس‌تر مانند

برگ، با سمیت ناشی از شوری مقابله می‌کند. در تحقیق حاضر نیز در برگ‌های زعفران میزان کامفرول در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار و میزان کوئرستین در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نمک به‌طور مشابه با غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک در رقم متحمل Frantoio افزایش نشان داد. هر چند تاکنون در گیاه زعفران مانند سایر گیاهان زراعی، آستانه دقیق تحمل به شوری و یا ارقام مقاوم و حساس به شوری شناسایی و معرفی نشده‌اند اما، با توجه به نتایج فوق، می‌توان احتمال داد که زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) یک رقم متحمل به نمک باشد. در واقع، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند ترکیبات فنلی معمولاً در گونه‌هایی که به‌خوبی با محیط‌های شور تطبیق می‌شوند یا گونه‌ها و ژنوتیپ‌هایی که مقاوم به نمک هستند افزایش یافته و یا در غلظت‌های بالا حضور دارند (Jabeen and Ahmad, 2013; Wani et al., 2013; Reginato et al., 2014). همچنین مطرح شده است که تجمع ترکیبات فلاونوئیدی در پاسخ به تیمار نمک علیرغم تغییر در میزان ترکیبات فرعی دیگر، پیش از هر چیز توسط افزایش در سطوح سه ترکیب اصلی: kaempferol-3-O-glucopyranoside و Quercetin-3-O-glucopyranoside ایجاد می‌شود و افزایش سطوح این سه ترکیب منعکس‌کننده تغییرات در محتوای فنل کل و ترکیبات فلاونوئیدی است (Hassanein et al., 2016). درنهایت اینکه، شواهد در حال افزایش نشان می‌دهد که فلاونوئیدها در گیاهان عالی این پتانسیل را دارند که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری خدمت کنند (Winkel-Shirley, 2002; Babu et al., 2003; Tattini et al., 2006; Agati et al., 2011, 2012). بنابراین افزایش فلاونوئیدها در اثر تنش‌های غیرزیستی موجب افزایش سطوح حفاظتی گیاه در مقابل تنش‌ها می‌گردد (Dixon and Paiva, 1995; Grace and Logan, 2000).

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های آزمایش و نتایج آن به‌نظر می‌رسد آستانه تحمل گیاه زعفران در محدوده ۶۰ تا ۹۰ میلی‌مولار است و گیاه زعفران برای مقابله با سطوح بالای نمک از مکانیسم‌های

باشد زیرا بر طبق گزارشات پیشین، افزایش این ترکیبات در پاسخ به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در گیاهان مقاوم به شوری صورت می‌گیرد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه پیام‌نور تهران و دانشگاه شهید بهشتی تهران بابت حمایت از این تحقیق تقدیر و تشکر داریم.

تحمل به شوری از جمله تنظیم اسمزی از طریق تجمع پرولین و کربوهیدرات‌های محلول و نیز افزایش میزان رنگیزه‌های کاروتنوئیدی استفاده می‌کند، از سوی دیگر فعالیت آنزیم PAL و میزان تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند کامفرول و کوئرستین در غلظت‌های بالای نمک در گیاه زعفران افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت سطوح عملکردی ترکیباتی مانند کامفرول و کوئرستین به‌طور فعال در تحمل به تنش شوری در گیاهان نقش دارد و افزایش محتوای این ترکیبات در گیاه زعفران زراعی می‌تواند نشان‌دهنده تحمل این گیاه به نمک

منابع

- آغاسی یزدی، ن.، عباسپور، ح. و محمودزاده، ه. (۱۳۹۰) بررسی اثر تنش شوری بر جوانه‌زنی و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*). دومین همایش ملی علوم و تکنولوژی بذر، مشهد، ایران.
- جوادپور، ز.، موحدی دهنوی، م. و بلوچی، ح. (۱۳۹۲) ارزیابی پارامترهای فتوسنتزی، محتوا و فلورسانس کلروفیل برگ ارقام گلرنگ تحت تنش شوری. نشریه الکترونیک تولید گیاهان زراعی ۲: ۵۶-۳۵.
- رستمی، م.، محمد پرست، ب. و گلفام، ر. (۱۳۹۳) اثر سطوح مختلف تنش شوری بر برخی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.). نشریه زراعت و فناوری زعفران ۳: ۱۹۳-۱۷۹.
- سبزواری، ع. (۱۳۷۴) زعفران طلای سرخ کویر، نشریه بانک کشاورزی.
- صالحی، م.، کوچکی، ع. و نصیری محلاتی، م. (۱۳۸۳) میزان نیتروژن و کلروفیل برگ به‌عنوان شاخصی از تنش شوری در گندم. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۱: ۳۳-۲۵.
- کافی، م.، راشد محصل، م. ح.، کوچکی، ع. و ملایابی، ع. (۱۳۸۱) زعفران، فناوری تولید و فراوری، انتشارات زبان و ادب، مشهد.
- کوچکی، ع.، کرباسی، ع. و سیدی، س. م. (۱۳۹۵) بررسی برخی دلایل کاهش عملکرد زعفران در طی ۳۰ سال اخیر (مقاله مروری). نشریه زراعت و فناوری زعفران ۵: ۱۲۲-۱۰۷.
- نقی‌زاده، م.، غلامی شبستری، م.، و شمس‌الدین، م. (۱۳۹۳) بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک سه توده بومی زعفران (*Crocus sativus* L.) ایران به تنش شوری. نشریه زراعت و فناوری زعفران ۳: ۱۳۶-۱۲۷.
- هاشمی، ع. و عمادی، م. (۱۳۹۴) اثرات تنش شوری در گیاهان. همایش بین‌المللی پژوهش‌های کاربردی در کشاورزی، تهران، ایران.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Tattini, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196: 67-76.
- Agati, G., Biricolti, S., Guidi, L., Ferrini, F., Fini, A. and Tattini, M. (2011) The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in vulgare leaves. *Journal of Plant Physiology* 168: 204-212.
- Agricultural Statistics, (2015) Department of Planning and Economy (from 2002 to 2015). <http://www.maj.ir/>. [in Persian].
- Al-Saady, N. A., Khan, A. J., Rajesh, L. and Esehie, H. A. (2012) Effect of salt stress on germination, proline metabolism and chlorophyll content of fenugreek (*Trigonella foenum-gracium* L.). *Journal of Plant Sciences* 7: 176.
- Avarseji, Z., Kafi, M., Sabet Teimouri, M. and Orooji, K. (2013) Investigation of salinity stress and potassium levels on morphophysiological characteristics of saffron. *Journal of Plant Nutrition* 36: 299-310.
- Babu, T. S., Akhtar, T. A., Lampi, M. A., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G. and Greenberg, B. M. (2003) Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant and Cell Physiology* 44: 1320-1329.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W. and Elkind, Y. (1994) Quantitative

- relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 7608-7612.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39: 205-207.
- Behdani, M. A. (2011) SAFFRON (*Crocus sativus* L.). In: *Future Crops*. (ed. Peter, P. K. V.) Pp. 203-208. Daya Publishing House, New Delhi.
- Bybordi, A., Tabatabaei, S. J. and Ahmadv, A. (2010) Effect of salinity on the growth and peroxidase and IAA oxidase activities in canola. *Journal Food Agriculture Environment* 8: 109-112.
- Cameron, R. W. F., Harrison-Murray, R. S. and Scott, M. A. (1999) The use of controlled water stress to manipulate growth of container-grown *Rhododendron* cv. Hoppy. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74: 161-169.
- Carmona, M., Sanchez, A. M., Ferreres, F., Zalacain, A., Tomas-Barberan, F. and Alonso, G. L. (2007) Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chemistry* 100: 445-450.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085.
- Dubey, R. S. and Singh, A. K. (1999) Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants. *Biologia Plantarum* 42: 233-239.
- Elsheery, N. I. and Cao, K. F. (2008) Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 769-777.
- Flowers, T. J. (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55: 307-319.
- Gao, S., Ouyang, C., Wang, S., Xu, Y., Tang, L. and Chen, F. (2008) Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Plant Soil Environment* 54: 374-381.
- Grace, S. C. and Logan, B. A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355: 1499-1510.
- Hadizadeh, F., Khalili, N., Hosseinzadeh, H. and Khair-Aldine, R. (2003) Kaempferol from saffron petals. *Chemistry Preprint Archive* 2003: 234-239.
- Hartzendorf, T. and Rolletschek, H. (2001) Effects of NaCl-salinity on amino acid and carbohydrate contents of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* 69: 195-208.
- Hassanein, R. A., Marzouk, M. M., El-Khawas, S. A. and Soliman, W. M. (2016) Effect of sea water and mannitol on total phenolics, flavonoid constituents and antioxidant activity of Kaff Maryam (*Anastatica hierochuntica* L.). *Open Access Original Research. The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)* 12: 247-254.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hurry, V. M., Strand, A., Tobiaeson, M., Gardestrom, P. and Oquist, G. (1995) Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. *Plant Physiology* 109: 697-706.
- Jabeen, N. and Ahmad, R. (2013) The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1699-1705.
- Kim, N. S., Kwon, S. J., Cuong, D. M., Jeon, J., Park, J. S. and Park, S. U. (2019) Accumulation of phenylpropanoids in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under salt stress. *Agronomy* 9: 739.
- Koch, K. E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology* 47: 509-540.
- Kochert, G. (1978) Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. *Handbook of Phycological Methods, Phycological and Biochemical Methods* 95.
- Leopold, A. C. and Willing, R. P. (1984) Evidence for toxicity effects of salt on membranes. In: *Salinity Tolerance in Plants* (eds. Staples, R. and Toenniessen, G. H.) Pp. 67-76. New York, Wiley.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lutts, S., Majerus, V. and Kinet, J. (1999) NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105: 450-458.
- Maheshkumar, S. K. and Kirti, S. L. (2012) Determination of total flavonoids content and quantification of rutin in *Momordica tuberosa* (Roxb) Cogn. fruits by RP-HPLC. *Asian Journal of Traditional Medicines* 7: 222-224.
- Mari, A. H., Rajpar, I., Tunio, S. and Ahmad, S. (2018) Ions accumulation, proline content and juice quality of sugar beet genotypes as affected by water salinity. *Journal of Animal and Plant Sciences* 28.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-yilmaz, S. and Mittler, R. O. N. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33: 453-467.

- Misra, A. N., Latowski, D. and Strzalka, K. (2006) The xanthophyll cycle activity in kidney bean and cabbage leaves under salinity stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 102-109.
- Molina, R. V., Valero, M. and Navarro, Y. (2005) Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae* 103: 361-379.
- Munns, R., James, R. A. and Lauchli, A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C. and Martinez, V. (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96: 66-73.
- Navarro, J. M., Garrido, C., Martinez, V. and Carvajal, M. (2003) Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. *Plant Growth Regulation* 41: 237-245.
- Oxborough, K. (2004) Imaging of chlorophyll a fluorescence: Theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55: 1195-1205.
- Pastori, G. M. and Foyer, C. H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129: 460-468.
- Pattanagul, W. and Thitisaksakul, M. (2008) Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology (IJB)* 46: 736-42.
- Rajaei, S. M., Niknam, V., Seyedi, S. M., Ebrahimzadeh, H. and Razavi, K. (2009) Contractile roots are the most sensitive organ in *Crocus sativus* to salt stress. *Biologia Plantarum* 53: 523-529.
- Ramawat, K. G. (2007) *Biotechnology: Secondary Metabolites*. CRC Press.
- Reginato, M. A., Castagna, A., Furlan, A., Castro, S., Ranieri, A. and Luna, V. (2014) Physiological responses of a halophytic shrub to salt stress by Na₂SO₄ and NaCl: Oxidative damage and the role of polyphenols in antioxidant protection. *AoB Plants* 6: 1-13.
- Rossi, L., Borghi, M., Francini, A., Xie, D. Y. and Sebastiani, L. (2014) Metabolic profiling and gene expression analyses in salt-stressed olive trees (*Olea europaea* L.) cultivars 'leccino' and 'frantoio.' *International Conference for Olive Tree and Olive Products*. Amman.
- Santos, C. V. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae* 103: 93-99.
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) ACTCAT, a novel cis-acting element for proline and hypo osmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 709-719.
- Sawada, S., Usuda, H. and Tsukui, T. (1992) Participation of inorganic orthophosphate in regulation of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance. *Plant and Cell Physiology* 33: 943-949.
- Shao, Y. H., Gao, J. L., Wu, X. W., Li, Q., Wang, J. G., Ding, P. and Lai, X. P. (2015) Effect of salt treatment on growth, isoenzymes and metabolites of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 35.
- Serrano-Diaz, J., Sanchez, A. M., Martinez-Tome, M., Winterhalter, P. and Alonso, G. L. (2014) Flavonoid determination in the quality control of floral bioresidues from *Crocus sativus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 3125-3133.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q. J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.
- Stoop, J. M. H. and Pharr, D. M. (1994) Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients. *Plant Physiology* 106: 503-511.
- Straubinger, M., Jezussek, M., Waibel, R. and Winterhalter, P. (1997) Two kaempferol sophorosides from *Crocus sativus*. *Natural Product Letters* 10: 213-216.
- Suarez, N. and Medina, E. (2008) Salinity effects on leaf ion composition and salt secretion rate in *Avicennia germinans* (L.) *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 131-140.
- Tattini, M., Remorini, D., Pinelli, P., Agati, G., Saracini, E., Traversi, M. L. and Massai, R. (2006) Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist* 170: 779-794.
- Tewari, T. N. and Singh, B. B. (1991) Stress studies in lentil (*Lens esculenta* Moench). *Plant and Soil* 136: 225-230.
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Niazi, A. and Moghadam, A. (2015) Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in 'Salvia' species. *Australian Journal of Crop Science* 9: 656-665.

- Vignolini, P., Heimler, D., Pinelli, P., Ieri, F., Sciullo, A. and Romani, A. (2008) Characterization of by-products of saffron (*Crocus sativus* L.) production. *Natural Product Communications* 3: 1934578X0800301203.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. X. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
- Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S. and Fariduddin, Q. (2013) Salt-induced modulation in growth, photosynthesis and antioxidant system in two varieties of *Brassica juncea*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20: 183-193.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 218-223.
- Xu, F., Deng, G., Cheng, S., Zhang, W., Huang, X., Li, L. and Li, J. (2012) Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*. *Molecules* 17: 7810-7823.
- Xu, Z., Zhou, J., Ren, T., Du, H., Liu, H., Li, Y. and Zhang, C. (2020) Salt stress decreases seedling growth and development but increases quercetin and kaempferol content in *Apocynum venetum*. *Plant Biology* 22: 813-821.
- Yasar, F., Ellialtioglu, S. and Yildiz, K. (2008) Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 782-786.
- Zeka, K., Ruparelia, K. C., Continenza, M. A., Stagos, D., Veglio, F. and Arroo, R. R. J. (2015) Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia* 107: 128-134.
- Zhou, W. and Leul, M. (1999) Uniconazole-induced tolerance of rape plants to heat stress in relation to changes in hormonal levels, enzyme activities and lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* 27: 99-104.

Effect of different salinity levels on physiological characteristics, phenylalanine ammonia lyase activity and some flavonoid compounds in hydroponic cultivation of saffron (*Crocus sativus* L.)

Fateme Sadat Moslemi¹, Atousa Vaziri^{1*}, Golandam Sharifi²

¹ Department of biology, Payame Noor University, ² Department of Basic Sciences, Encyclopedia Research Center, Institute for Humanities and Cultural Studies
(Received: 23/12/2020, Accepted: 15/06/2021)

Abstract

The use of salt tolerant plants in arid and semi-arid regions of the world, including Iran, is one of the ways to achieve high yields. The aim of this study was to investigate the effect of different salinity treatments in hydroponic culture on physiological characteristics, phenylalanine-ammonialyase (PAL) activity and also the small amount of flavonoid compounds kaempferol and quercetin in cultivated saffron (*Crocus sativus* L.). For this purpose, saffron corms were planted in pots containing perlite and irrigated in controlled laboratory conditions with ½ Hoagland nutrient solutions containing concentrations of 0, 30, 60, 90, 120 and 150 mM sodium chloride. Based on the obtained results, the effect of salinity stress was not significant on chlorophyll a and b levels at 5% level. Meanwhile, carotenoids and glucose levels in the 60 mM treatment had a significant increase of 27% and 56%, respectively, compared to the control treatment. The effect of salinity on leaf amino acid proline was not significant. The relative water content (RWC) in 150 mM with a decrease of 20%, had the highest decrease compared to the control treatment. The activity of PAL enzyme in only 150 mM had a significant increase of 50%. The amount of kaempferol in all concentrations except 150 mM and the amount of quercetin in only 150 mM showed a significant increase (100%) compared to the control treatment. It seemed that according to the test results, the tolerance threshold of saffron plant to salt was in the range of 60 to 90 mM and the defense mechanisms mentioned in this range and above helped the plant to tolerate salt.

Keywords: Salinity stress, Phenylalanine ammonia lyase, Kaempferol, Quercetin, Saffron

Corresponding author, Email: a_vaziri@pnu.ac.ir