

Study of Secondary Metabolites and Morphophysiological Characters of Saffron under Poly Ethylene Glycol Elicitor

Farahnaz Tavakoli¹, Mohammad Rafieiolhossaini¹, Rudabeh Ravash^{2*}, Mahmoud Rafieian-kopaei³

¹ Department of Agronomy, Agriculture Faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

² Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekod, Iran

³ Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Sharekord, Iran

Abstract

Saffron (*Crocus sativus*) is the most perennial plant species considered as valuable medicinal and aromatic plant worldwide. Dried stigmas of saffron is commonly used as a flavor, food coloring and a drug and comprises several types of beta carotenes including a yellow pigment Crocin, a bitter-tasting substance Picrocrocin and a good perfume Safranal which not only exerts a hypoglycemic effect but also expressions antioxidant and anti-inflammatory properties. This study evaluated the effect of PEG 6000 on some secondary metabolite content and morphophysiological traits. The results showed that the highest and lowest levels of proline, relative water content, hydrogen peroxide and chlorophyll a, b and total pigments were obtained in 12% polyethylene glycol treatment and control treatment, respectively. The highest content of Crocin, Picrocrocin and Crocetin were obtained using PEG 12% by 29.04%, 24.17% and 0.04% respectively. The highest and lowest IC50 inhibitory potency was observed in 12% polyethylene glycol and control treatments, respectively. The optimum enzyme activity of superoxide dismutase, catalase and Ascorbate peroxidase was also triggered by the application of PEG 12%. The results of the present study showed that the application of polyethylene glycol elicitor improves the content of important secondary metabolites and morphophysiological characteristics of saffron plant and this solution can be suggested to increase the economic productivity of saffron.

Keywords: Crocin, Picrocrocin, Antioxidant enzymes, Hydrogen peroxide, Inhibitory power IC50

* Corresponding Author: r.ravash@gmail.com

بررسی متابولیت‌های ثانویه و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه زعفران تحت تأثیر الیستور پلی‌اتیلن گلايکول

فرحناز توکلی^۱، محمد رفیعی‌الحسینی^۱، رودابه راوش^{۲*}، محمود رفیعیان کوپایی^۳

^۱ گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۲ گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۳ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

زعفران (*Crocus sativus*) یکی از مهم‌ترین گیاهان چند ساله است که از نظر دارویی و ادویه‌ای همواره جالب توجه بوده است. کلاله خشک زعفران معمولاً به شکل طعم‌دهنده، رنگ خوراکی و دارویی استفاده می‌شود و شامل چندین بتاکاروتن از جمله رنگدانهٔ زرد کرو سین، مادهٔ با طعم تلخ پیکرو کرو سین و عطر خوب ساfranال است که نه تنها دارای اثر کاهندهٔ قند خون است، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی دارد. در پژوهش حاضر، اثر پلی‌اتیلن گلايکول بر محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی زعفران بررسی شد و نتایج نشان دادند بیشترین و کمترین میزان پرولین، محتوای نسبی آب، پراکسید هیدروژن و رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کل به ترتیب در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و تیمار شاهد حاصل می‌شود؛ همچنین اعمال پلی‌اتیلن گلايکول سبب افزایش متابولیت‌های ثانویهٔ گیاه زعفران در مقایسه با تیمار شاهد شد. بیشترین میزان کروسین (۲۹/۰۴ درصد)، پیکرو کروسین (۲۴/۱۷ درصد) و کروسین (۰/۰۴ درصد) در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول حاصل شد. بیشترین و کمترین قدرت مهارکنندگی IC₅₀ به ترتیب در تیمارهای ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و شاهد مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول به دست آمد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند کاربرد الیستور پلی‌اتیلن گلايکول سبب بهبود محتوای متابولیت‌های ثانویه و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی مهم گیاه زعفران می‌شود و می‌توان این راهکار را برای افزایش دادن بهره‌وری اقتصادی زعفران پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: کروسین، پیکرو کروسین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پراکسید هیدروژن، قدرت

مهارکنندگی IC₅₀

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: r.ravash@gmail.com، شمارهٔ تماس: ۰۹۱۳۳۱۶۳۰۱۸

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. گونه گیاهی عقیم و تریپلوئیدی است که به خانواده Iridaceae تعلق دارد و معروف‌ترین گونه جنس *Crocus* به شمار می‌آید. زعفران از دیرینه‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی است که همواره مدنظر بوده و در مطالعه‌های متعدد به آثار ضدافسردگی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی گلبرگ آن اشاره شده است (Serrano-Díaz *et al.*, 2014)؛ علاوه بر این، زعفران حاوی مواد معدنی، آب، موسیلاژ، چربی، موم، اسانس معطر و مواد مؤثره متشکل از سه هتروزید است و گلبرگ، برگ و کورم آن، منابعی از ترکیبات زیست‌فعال با فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف و کاربردهای متنوع هستند (Sanchez-Vioquea *et al.*, 2012). ترکیبات مؤثره زعفران عبارتند از: پیکروکروسین (پیش‌ساز سافرانال)، کروسین (متعلق به کاروتنوئیدها و استر گلیکوزیدی کروسین) و سافرانال (ترکیب فرار) (Amin and Hosseinzadeh, 2012). عامل اصلی رنگ‌دهی کلاله‌های زعفران، ترکیبی به نام کروسین و مشتق آن، کروسین است؛ علاوه بر کروسین، زعفران حاوی کروسین به شکل آزاد و مقادیر کمی از رنگدانه آنتوسیانین است (Rajabi *et al.*, 2015). عمده‌ترین ترکیب ایجادکننده طعم تلخ در زعفران، گلیکوزید بی‌رنگی به نام پیکروکروسین است که ماده‌ای تلخ و متبلور شونده است و از طریق هیدرولیز اسید، گلوکز و آلدئیدی به نام سافرانال تولید می‌شود (Moratalla-López *et al.*, 2019).

طی چند دهه گذشته، استفاده دارویی زعفران

به علت کاربردهای گسترده آن به شکل ادویه و عامل رنگ‌دهنده به شدت کاهش یافته است؛ با وجود این، مشخص شدن نقش زیستی برخی از فراورده‌های طبیعی زعفران در کاهش ابتلا به سرطان سبب شده است مطالعه‌ها در زمینه ویژگی‌های دارویی زعفران از سر گرفته شوند (Tajik *et al.*, 2013). کیفیت و قدرت رنگ‌دهی زعفران به کمک کمیت آنالوگ‌های کروسین آن به روش‌های مختلف مانند رنگ‌سنجی، روش‌های کروماتوگرافی مانند GC-MS و HPLC تعیین می‌شود. کیفیت ترکیبات فعال تعدادی از نمونه‌های تجاری زعفران کشورهای مختلف به روش HPLC تعیین شده است. مطالعه ترکیبات شیمیایی زعفران کشورهای مختلف همچون اسپانیا، یونان، چین، هند و ایران مشخص کرده مقادیر ترکیبات تخمین زده شده به روش‌های به کاررفته در مراحل خشک کردن، استخراج، جدا سازی و تعیین کمیت وابسته است (Abdullave and Ortega, 2007; Vahedi *et al.*, 2018). در بررسی Lozano و همکاران (۱۹۹۹)، ۱۰ ترکیب فعال زعفران در سه منطقه مختلف اسپانیا به روش HPLC و به طور کمی مطالعه شده‌اند.

امروزه، روش‌های مختلفی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی استفاده می‌شوند که استفاده از الیسیتورها، یکی از پرکاربردترین آنهاست (Luciano *et al.*, 2017). الیسیتورها، مولکول‌هایی با منشأ زیستی و غیرزیستی هستند که از طریق تحریک سیگنال‌های سلولی و برهم‌کنش‌های مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی و الیسیتور شناسایی می‌شوند

ولی امکان حمله از سوی رادیکال‌های آزاد و در نتیجه جدا شدن الکترون را دارند، در ترویج واکنش‌های اکسیداسیون نقش دارند (Mhamdi and Van Breusegem, 2018). در طول فرایندهای اکسیداتیو، اکسیژن غیررادیکالی همراه با رادیکال (OH^\ominus) نقش ترویج‌دهندگی واکنش‌های اکسیداتیو را دارند. در لایه خارجی اکسیژن، بیشتر الکترون‌ها تحرک زیادی دارند و به همین علت، واکنش‌پذیری زیادی را در واکنش‌های زیستی نشان می‌دهند. در شرایط عادی، سیستم زنده به‌طور مداوم رادیکال اکسیژن را به‌واسطه کاهش یک‌ظرفیتی مولکول اکسیژن تولید می‌کند (Kawarazaki *et al.*, 2013)؛ همچنین ممکن است رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زنده و غیرزنده به‌واسطه تعامل با مولکول اکسیژن و در حضور فلزاتی مانند آهن و مس تولید شوند. با وجود واکنش‌پذیری کم اکسیژن، رادیکال آزاد به‌شدت تحت تأثیر دیسموتاسیون واکنش‌های غیرآنزیمی مانند واکنش‌های کاتالیزشده به‌وسیله سوپراکسید دیسموتاز قرار می‌گیرد که به تولید پراکسید هیدروژن منجر می‌شود (Liu *et al.*, 2017).

گیاهان سازوکارهای حفاظتی مختلفی برای حذف یا کاهش گونه‌های فعال اکسیژن دارند که در سطوح مختلف تنش یا شرایط نامساعد محیطی مؤثر هستند؛ یکی از سازوکارهای حفاظتی یادشده، سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان هستند. گیاهانی که سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدان‌ها را دارند، مقاومت بیشتری در برابر آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز

و در نتیجه سیگنال‌هایی که سلول دریافت می‌کند، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر افزایش می‌یابد و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان سنتز می‌شوند (Bayraktar *et al.*, 2016). الیستورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت، مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی می‌کنند و سبب سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Patel and Krishnamurthy, 2013). به‌طور کلی، استفاده از الیستورها در مطالعه‌های زیست‌فناوری متابولیت‌های گیاهی با هدف کسب اطلاعات در زمینه مسیرهای بیوسنتزی منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه به‌منظور کاربرد تجاری آنها انجام می‌شود (Isah, 2019). با توجه به شرایط اقلیمی کشور ما که آب یکی از عوامل عمده محدودکننده توسعه کشاورزی است، زعفران، گیاهی کم‌توقع است که بازده اقتصادی زیادی دارد (Kheirandish and Sriramapa, 2010).

طی تنش اکسیداتیو، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل رخ می‌دهد. انواع مختلف اکسیژن فعال می‌توانند به ترکیبات حیاتی سلول مانند اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها و نوکلئیک‌اسیدها حمله کنند و این واکنش‌ها، ویژگی‌هایی مانند سیالیت غشا، انتقال یونی، فعالیت آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها را به‌طور طبیعی کاهش می‌دهند و سبب تخریب DNA هسته‌ای و میتوکندریایی و در نهایت، مرگ سلول می‌شوند. گونه‌های رادیکال آزاد به‌علت جفت‌نشدن الکترون در لایه خارجی اوربیتال اتمی یا مولکولی و گونه‌هایی که رادیکال آزاد نیستند،

آزمایش‌های بیوشیمیایی تبدیل می‌کند (Hellal *et al.*, 2018). در بسیاری از گیاهان برای ایجاد تنش از نمک پلی‌اتیلن گلیکول استفاده می‌شود که به علت نداشتن تحرک، غیر یونی و غیر سمی بودن و نداشتن قابلیت نفوذ، اسمولیت مؤثر و مناسبی در مقایسه با دیگر اسمولیت‌ها از جمله مانیتول، شکر و نمک به شمار می‌آید و به علت داشتن توانایی ایجاد شرایطی شبیه به تنش‌های محیط‌های طبیعی، کاربرد زیادی دارد. شدت تغییر پذیری گونه‌ها و حتی رقم‌های مختلف نسبت به پلی‌اتیلن گلیکول متفاوت است و لازم است پژوهش‌های لازم به منظور انتخاب رقم‌های مقاوم یا متحمل هر گیاه انجام شوند (Robin *et al.*, 2015).

اگرچه تاکنون مطالعه‌هایی در زمینه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و بیوشیمیایی برخی از اندام‌های زعفران در مناطق مختلف انجام شده‌اند، تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای دربارهٔ متابولیت‌های ثانویه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه زعفران تحت تأثیر تیمار پلی‌اتیلن گلیکول انجام نشده است؛ علاوه بر این، با توجه به اینکه ارزش اقتصادی و کیفیت زعفران به تعیین کمی ترکیبات کروسین، پیکروکروسین و کروسین آن وابسته است و کاربرد روش HPLC که روش بسیار دقیقی برای تعیین مقدار این ترکیبات است، کمتر بررسی شده است، در مطالعه حاضر به تعیین میزان ترکیبات یادشده به کمک دستگاه HPLC پرداخته و زعفران منطقه خراسان رضوی تعیین کیفیت شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر پلی‌اتیلن گلیکول بر

از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که سبب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن می‌شوند (Sarker and Oba, 2018). آنزیم کاتالاز، آنزیم پاک‌سازی‌کننده پراکسید هیدروژن است؛ در نتیجه، افزایش فعالیت این آنزیم سبب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن و حذف آن می‌شود. در شرایط طبیعی، وجود آنزیم کاتالاز برای سلول ضروری است و نقش مهمی در کسب مقاومت در برابر تنش اکسایشی ایفا می‌کند. آسکوربات پراکسیداز یکی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌هاست که در غلظت‌های زیاد درون کلروپلاست، سیتوسل، واکوئل و همچنین فضاهای آپوپلاستی سلول‌های برگ یافت می‌شود (Goli *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2013). پژوهشگران معتقدند آنزیم آسکوربات پراکسیداز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه است که نقش مهمی در احیای بسیاری از رادیکال‌های آزاد و به ویژه پراکسید هیدروژن طی فرایندهای مورفوفیزیولوژیکی گیاه ایفا می‌کند (Impa *et al.*, 2012). آسکوربات پراکسیداز وابستگی زیادی به پراکسید هیدروژن و آسکوربات دارد؛ به گونه‌ای که پیش‌بینی شده است آسکوربات نه تنها سم‌زدایی پراکسید هیدروژن را به عهده دارد، میزان پراکسید هیدروژن را در علامت‌دهی هدف کنترل می‌کند (Sekmen *et al.*, 2014).

پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، پلیمری انعطاف‌پذیر و غیر سمی است که سبب فشار اسمزی منفی می‌شود؛ همچنین تمایل به واکنش با مواد شیمیایی و زیستی ندارد و این ویژگی، آن را به یکی از مفیدترین مولکول‌ها برای ایجاد فشار اسمزی منفی در

روی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک گیاه زعفران، غلظت‌های ۸، ۱۲ و ۱۶ درصد پلی‌اتیلن گلايکول در آزمایش مقدماتی استفاده شدند و نتایج، تفاوت معناداری بین غلظت‌های ۱۲ و ۱۶ درصد نشان ندادند؛ درحالی‌که تفاوت معناداری بین غلظت‌های ۸ و ۱۲ درصد مشاهده شد و غلظت ۱۲ درصد تأثیر معناداری بر افزایش ویژگی‌های بیوشیمیایی در مقایسه با غلظت ۸ درصد داشت؛ بنابراین، غلظت ۱۲ درصد انتخاب شد. دو هفته پیش از گل‌دهی، غلظت مدنظر از الیستور پلی‌اتیلن گلايکول تهیه و در اوایل صبح روزهای آبیاری، میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر از آن در شرایط کنترل‌شده گلخانه روی هر کدام از گلدان‌ها اعمال و در قالب طرح کاملاً تصادفی و در پنج تکرار به بسترهای کشت اضافه شد. پس از دو هفته از اعمال تنش، بافت گل و برگ گیاهان از هر تیمار برداشت و به‌منظور بررسی ویژگی‌ها به آزمایشگاه منتقل شد.

ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه زعفران، پژوهشی به‌شکل گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در پنج تکرار طی سال ۱۳۹۷ در گلخانه دانشگاه شهرکرد اجرا شد؛ به این منظور، پیازهای گیاه زعفران از استان خراسان رضوی تهیه شدند. پیازها پیش از کشت به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی و سپس سه مرتبه با آب مقطر آب‌کشی و در گلدان‌هایی به عمق ۲۰ سانتی‌متر و حاوی بستر کشت خاکی لمون رسی شنی با اسیدیته ۷ تا ۸ کاشته شدند. پیش از کشت، بستر کشت با اتوکلاو استریل شد (جدول ۱). پیازها در عمق ۵ تا ۶ سانتی‌متری گلدان‌ها کشت و سپس گلدان‌ها در گلخانه‌ای با دمای ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت رو‌شنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

به‌منظور بررسی تأثیر تیمار پلی‌اتیلن گلايکول

جدول ۱- وضعیت خاک استفاده‌شده برای کشت گیاه زعفران

بور	مس	آهن	منگنز	روی	فسف	پتاسیم	کربن آلی	نیتروژن کل	شوری	بافت
(mg.kg ⁻¹)							(%)	pH	(ds.m ⁻¹)	
۲/۱۸	۱/۴۹	۳/۵۱	۹/۱۸	۰/۶۳	۸/۱	۲۱۱	۰/۹۱۶	۰/۰۸۶	۷/۷۶	۰/۶۵۹ Clay loam

۱۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و ۱/۵ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم ۱ مولار به ۰/۷۵ میلی‌لیتر از محلول رویی اضافه شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها از طریق مقایسه جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد؛ در نهایت، غلظت پراکسید هیدروژن با توجه به محتوای آب نمونه‌ها و درصد ماده خشک به شکل میکرومول بر گرم وزن

صفت‌های ارزیابی شده

پراکسید هیدروژن (H₂O₂): به‌منظور اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن، مقدار ۰/۳ گرم از نمونه گیاهی در ۳ میلی‌لیتر کلرواستیک اسید ۱ درصد هموزن شد؛ سپس نمونه‌ها به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از آن، مقدار ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم

اندازه‌گیری شد (W_i)؛ سپس قطعه‌های برگ در آب با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور و به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک نگهداری شدند و پس از گذشت زمان یادشده، وزن آنها تعیین شد (W_f). پس از خشک شدن قطعه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد (W_d)، وزن خشک آنها اندازه‌گیری و در نهایت، محتوای نسبی آب از رابطه زیر محاسبه شد (Mohsenzadeh *et al.*, 2006):

$$RWC = \frac{W_a - W_i}{W_a - W_f} \times 100$$

رنگدانه‌های فتوسنتزی: غلظت رنگیزه‌های مختلف شامل کلروفیل‌های a، b و کل در پایان دوره آزمایش با اسپکتروفتومتر و طبق روش Mousa و همکاران (۲۰۰۷) تعیین شد؛ به این منظور، ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به تدریج ساییده شد تا کلروفیل وارد محلول استونی شود و در نهایت، حجم محلول با استون ۸۰ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب نوری محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل D 6320، شرکت eppendorf، آلمان) که قبلاً با استون ۸۰ درصد تنظیم شده بود، اندازه‌گیری شد و سپس روابط زیر برای محاسبه مقدار کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل (بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت تازه برگ) استفاده شدند.

$$\text{Chl.a (mg.g}^{-1}\text{)} = [(12.7 * \text{Abs}_{663}) - (2.6 * \text{Abs}_{645})] * V/W \times 1000$$

$$\text{Chl.b (mg.g}^{-1}\text{)} = [(22.9 * \text{Abs}_{645}) - (4.68 * \text{Abs}_{663})] * V/W \times 1000$$

$$\text{Chl.total (mg.g}^{-1}\text{)} = \text{Chl.a} + \text{Chl.b}$$

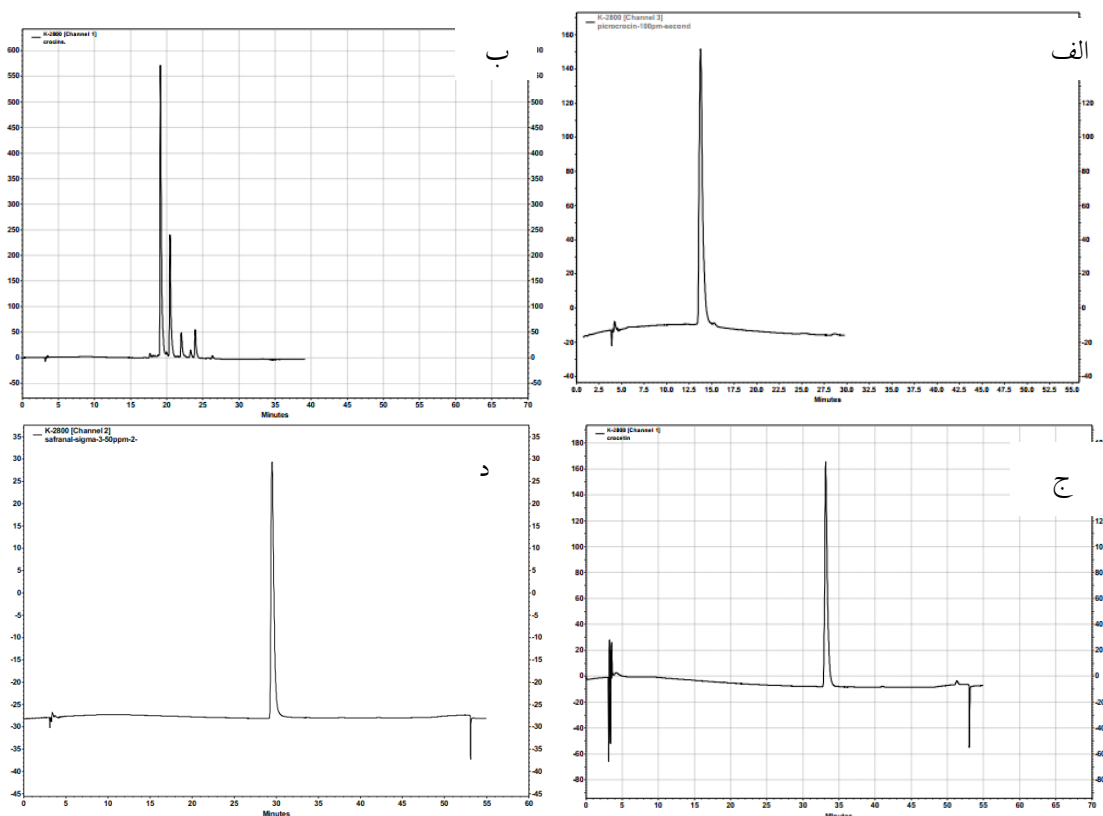
متابولیت‌های ثانویه: به منظور انجام پژوهش حاضر، دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (مدل Knauer، ساخت کشور آلمان) استفاده شد

خشک بیان شد (Loreto and Velikova, 2001).
پرولین: پرولین آزاد برگ به روش اسپکتروفتومتری (Bates *et al.*, 1973) در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مطابق روش یادشده، ابتدا ۰/۳ گرم از بافت گیاهان وزن و ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک‌اسید ۳ درصد به آن اضافه و بافت گیاهی در هاون چینی کاملاً کوبیده شد و سپس عصاره بافت با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ جداسازی شد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد تا پرولین موجود در آن آزاد شود و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g در سانتریفیوژ سیگما همگن شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره برداشته و ۲ میلی‌لیتر محلول نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر محلول استیک‌اسید گلاسیال به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در بنماری با دمای جوش حرارت داده شد. پس از گذشت یک ساعت، لوله‌ها از آب جوش خارج و بی‌درنگ درون یخ‌ساز قرار داده شدند تا واکنش حرارتی تثبیت شود. پس از سرد شدن لوله‌ها، مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله آزمایش اضافه و محتویات لوله به مدت ۵ تا ۲۰ ثانیه به شدت با هم‌زن هم زده شد؛ در نتیجه، دو فاز در هر لوله تشکیل شد که فاز رویی آن دارای تولوئن حاوی کمپلکس رنگی قرمز بود و از آن برای اندازه‌گیری پرولین استفاده شد. میزان جذب نور در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری و میزان پرولین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وزن تر به دست آمد.

محتوای نسبی آب (RWC): به منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب، ابتدا برگ‌های تر برداشت و به قطعه‌های یک سانتی‌متری تقسیم شدند و وزن آنها

میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد (Kabiri *et al.*, 2017). این رد یاب در حداکثر طول موج‌ها از جمله ۲۵۰، ۳۰۸ و ۴۴۰ نانومتر به ترتیب برای مطالعه سافرانال، پیکروکروسین و کروسین‌ها تنظیم شد. نوع ترکیبات ضدالتهابی در عصاره گل گیاه زعفران از طریق مقایسه زمان بازداری پیک‌های نمونه (شکل‌های ۲ تا ۴) با استانداردهای ترکیبات کروسین، پیکروکروسین، سافرانال و کروسین (شکل ۱) تعیین شد و مقدار هر یک از ترکیبات با محاسبه سطح زیر پیک به دست آمد.

که دارای آشکارساز با طیف‌سنج UV-Vis (DAD) و طول موج ۲۵۴ نانومتر، مدل ۲۸۰۰، نوع ماده پُرکننده Knauer Eurospher Reversed Phase C18، طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و اندازه ذرات پایه ۵ میکرومتر بود. حجم تزریق در هر بار برابر ۲۰ میکرولیتر بود. آزمایش در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. ترکیب فاز متحرک به کاررفته شامل مخلوطی از استونیتریل (A) و آب (B) بود. شیب خطی سیستم مایع استفاده شده از ۹۰ درصد استونیتریل به مدت ۵ دقیقه به ۲۰ درصد در ۲۰ دقیقه کاهش یافت. سرعت جریان برابر ۱



شکل ۱- کروماتوگرام‌های استاندارد ترکیبات مطالعه‌شده؛ الف. کروسین ثبت شده در طول موج ۴۴۰ نانومتر، ب. پیکروکروسین ثبت شده در طول موج ۲۵۰ نانومتر، ج. سافرانال ثبت شده در طول موج ۳۰۸ نانومتر، د. کروسین ثبت شده در طول موج ۴۴۰ نانومتر

قدرت مهارکنندگی IC50: به منظور تعیین درصد مهار رادیکال DPPH به وسیله عصاره از رابطه زیر استفاده شد:

$$DPPH = \frac{ODc}{(ODc - ODs) - ODc} \times 100$$

در این رابطه، ODc و ODs به ترتیب جذب شاهد و میزان جذب نمونه را نشان می‌دهند. IC50،

واحدهای SOD در یک گرم برگ تازه بیان شد (Dhindsa *et al.*, 1982).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:
مقدار ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۱ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیتته ۷ و حاوی آسکوربات ۰/۵ میلی مولار اضافه و در نهایت، پراکسید هیدروژن ۰/۵ میلی مولار برای آغاز واکنش افزوده و کاهش آسکوربات به مدت یک دقیقه ثبت شد. ضریب خاموشی $2/8 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ برای محاسبه آسکوربات پراکسیداز استفاده و میزان آن بر اساس کاهش آسکوربات بر حسب میلی مولار در یک گرم برگ تازه در مدت زمان یک دقیقه بیان شد (Asada and Nakano, 1978).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: حدود ۲۵ تا ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیتته ۷ و حاوی پراکسید هیدروژن ۲۰ میلی مولار اضافه و کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. ضریب خاموشی $3 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ برای محاسبه کاتالاز استفاده و مقدار آن بر حسب میلی مولار پراکسید هیدروژن اکسید شده در گرم وزن تازه برگ در مدت یک دقیقه بیان شد (Havir and McHale, 1987).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار SAS، مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد و رسم نمودارها با نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام شد.

نتایج

پراکسید هیدروژن: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها

غلظتی از عصاره است که توانایی مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط را دارد؛ بنابراین، هرچه میزان IC50 کمتر باشد، عصاره دارای ترکیب آنتی‌اکسیدان مؤثرتری است (Madhumitha and Saral, 2009).

عصاره‌گیری برای سنجش فعالیت آنزیمی:
به منظور تهیه عصاره آنزیمی از روش تغییر یافته Elavarthi و Martin (۲۰۱۰) استفاده شد. نمونه‌های بافت برگ گیاهان شاهد و تیمار شده تهیه شدند. مقدار ۰/۲ گرم از بافت گیاهی تازه منجمد شده در نیتروژن مایع در بافر فسفات پتاسیم ۱/۲ میلی مولار با اسیدیتته ۶/۸ و حاوی ۰/۱ میلی مولار EDTA در دمای صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد ساییده و عصاره‌گیری شد. ترکیب به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲ تا ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. عصاره آنزیمی حاصل تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:
مقدار ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۲ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیتته ۷/۸ شامل EDTA ۲ میلی مولار، ال-متیونین ۹/۹ میلی مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۵۵ میکرومولار و ۰/۲۵ درصد تریتون X-100 اضافه و در نهایت، ۲۰ میکرولیتر ریپرفلاوین ۱ میلی مولار در تاریکی به آن اضافه و مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در اتاقک نور قرار داده شد. میزان جذب نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس

در صد پلی‌اتیلن گلايکول و شاهد مشاهده می‌شود (جدول ۲).

محتوای نسبی آب: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند اثر تیمار پلی‌اتیلن گلايکول بر محتوای نسبی آب گیاه زعفران در سطح ۱ درصد معنادار است. نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان دادند اثر تیمارهای بررسی شده بر محتوای نسبی آب گیاه زعفران در سطح ۵ درصد (آزمون LSD) معنادار است؛ به طوری که بیشترین محتوای نسبی آب (۵۱/۷ درصد) در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و کمترین میزان (۴۱/۸۶ درصد) در تیمار شاهد مشاهده می‌شود (جدول ۲).

نشان دادند اثر تیمار پلی‌اتیلن گلايکول بر میزان پراکسید هیدروژن گیاه زعفران در سطح ۱ درصد معنادار است؛ به طوری که بیشترین میزان پراکسید هیدروژن (۱۷/۸۵ میکرومول بر گرم) در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و کمترین میزان آن (۱۴/۳۸ میکرومول بر گرم) در تیمار شاهد مشاهده می‌شود (جدول ۲).

پرولین: نتایج پژوهش حاضر نشان دادند محتوای پرولین در سطح احتمال ۵ درصد تحت تأثیر تیمار پلی‌اتیلن گلايکول قرار می‌گیرد؛ به طوری که بیشترین میزان (۵۳/۲ $\mu\text{mol/g}$) و کمترین میزان (۴۸ $\mu\text{mol/g}$) پرولین به ترتیب در تیمارهای ۱۲

جدول ۲- مقایسهٔ میانگین اثر پلی‌اتیلن گلايکول بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه زعفران

تیمار	پراکسید هیدروژن ($\mu\text{mol/g}$)	پرولین ($\mu\text{mol/g}$)	محتوای نسبی آب (%)
شاهد	۱۴/۳۸ ^b	۴۸ ^b	۴۱/۸۶ ^b
پلی‌اتیلن گلايکول (۱۲ درصد)	۱۷/۸۵ ^a	۵۳/۲ ^a	۵۱/۷ ^a

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد)

(۲/۶۵ میلی‌گرم در گرم) و کمترین میزان آن (۱/۹۶ میلی‌گرم در گرم) به ترتیب در تیمارهای ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و شاهد مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین میزان کلروفیل کل (۱۱/۸۸ میلی‌گرم در گرم) در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و کمترین میزان آن (۹/۴۵ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۳).

رنگدانه‌های فتوسنتزی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند اثر تیمار پلی‌اتیلن گلايکول بر میزان کلروفیل‌های a، b و کل گیاه زعفران در سطح ۱ درصد معنادار است. بیشترین میزان کلروفیل a (۸/۸ میلی‌گرم در گرم) در تیمار ۱۲ درصد پلی‌اتیلن گلايکول و کمترین میزان آن (۶/۸۵ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شاهد به دست آمد (جدول ۳)؛ همچنین بیشترین میزان کلروفیل b

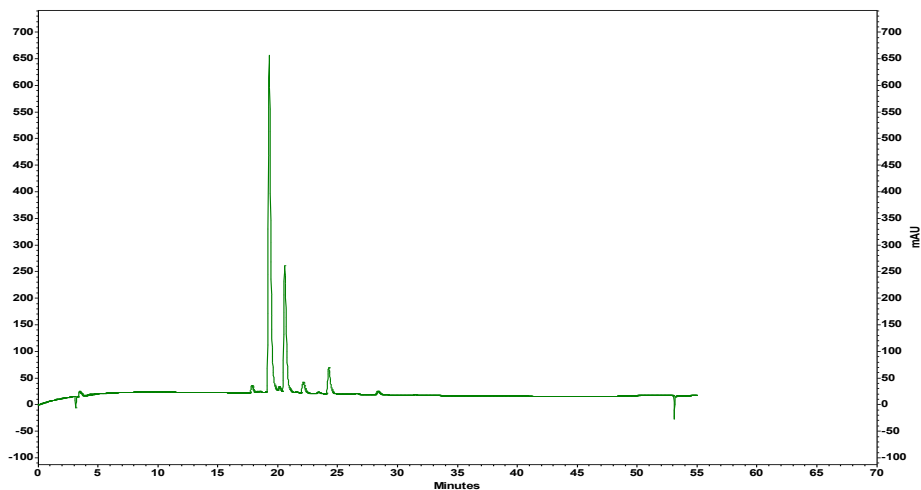
جدول ۳- نتایج مقایسهٔ میانگین اثر پلی‌اتیلن گلايکول رنگدانه‌های فتوسنتزی کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل گیاه زعفران

تیمار	کلروفیل a (mg/l)	کلروفیل b (mg/l)	کلروفیل کل (mg/l)
شاهد	۶/۸۵ ^b	۱/۹۶ ^b	۹/۴۵ ^b
پلی‌اتیلن گلايکول (۱۲ درصد)	۸/۸ ^a	۲/۶۵ ^a	۱۱/۸۸ ^a

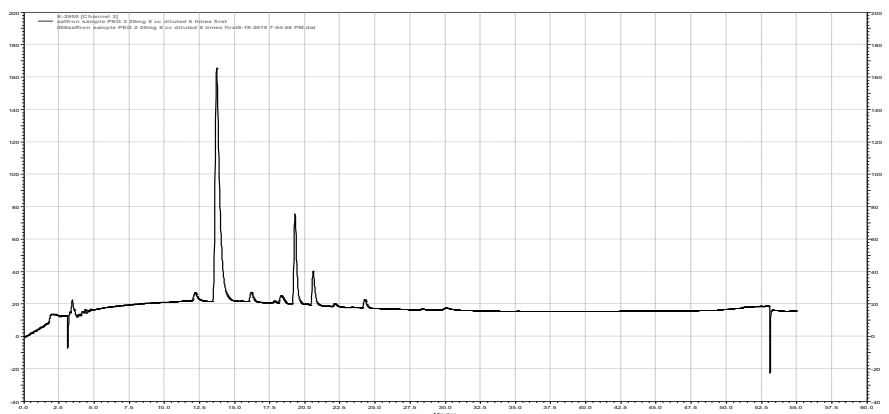
در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد).

متابولیت‌های ثانویه: با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر تیمار پلی اتیلن گلایکول بر میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و کروسستین در سطح ۱ درصد معنادار است. اعمال غلظت ۱۲ درصد پلی اتیلن گلایکول سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه زعفران در مقایسه با شاهد شد؛ به طوری که بیشترین (۲۹/۰۴ درصد) و کمترین (۲۲/۴۸ درصد) میزان کروسین کل به ترتیب در تیمارهای ۱۲ درصد پلی اتیلن گلایکول و شاهد حاصل شد. ترکیب

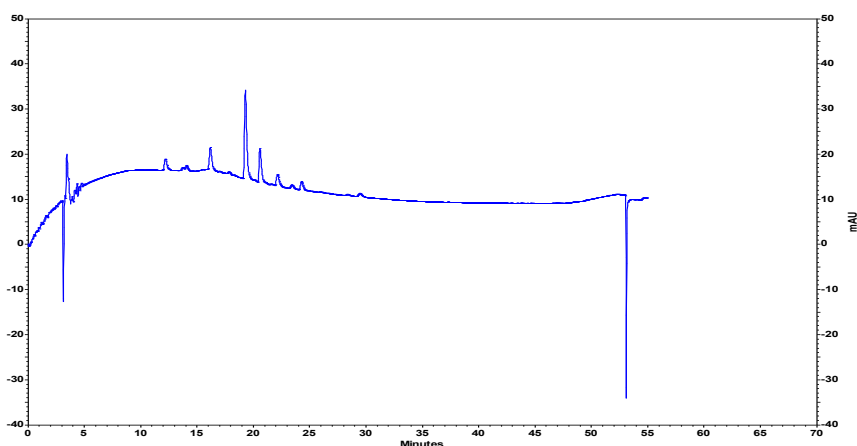
پیکروکروسین در تیمار پلی اتیلن گلایکول ۱۲ درصد دارای بیشترین میزان (۲۴/۱۷ درصد) و در تیمار شاهد دارای کمترین میزان (۱۴/۵۸ درصد) بود. در میان ترکیب‌های بررسی شده، کروسستین کمترین متابولیت ثانویه در گیاه زعفران بود؛ به طوری که بیشترین میزان آن (۰/۰۴ درصد) در تیمار ۱۲ درصد پلی اتیلن گلایکول و کمترین میزان آن (۰/۰۳ درصد) در تیمار شاهد حاصل شد (شکل ۵).



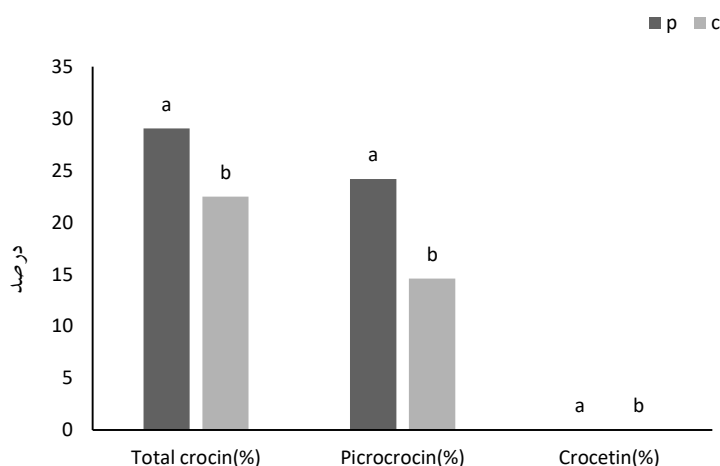
شکل ۲- کروماتوگرام نمونه زعفران (کروسین و کروسستین) تیمار شده پلی اتیلن گلایکول ثبت شده در طول موج ۴۴۰ نانومتر



شکل ۳- کروماتوگرام نمونه زعفران (پیکروکروسین) تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول ثبت شده در طول موج ۲۵۰ نانومتر



شکل ۴- کروماتوگرام نمونه زعفران (سافراناال) تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول ثبت شده در طول موج ۳۱۰ نانومتر



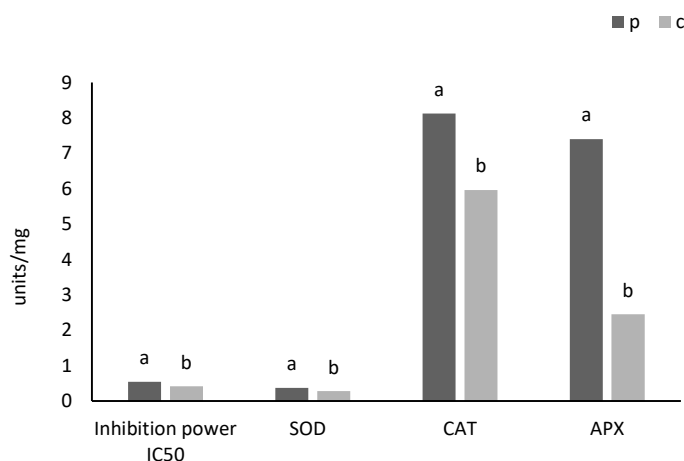
شکل ۵- مقایسه میانگین اثر تیمار پلی اتیلن گلیکول (p) و تیمار شاهد (c) بر متابولیت‌های ثانویه کروسین، پیکروکروسین و کروسین گیاه زعفران؛ در هر تیمار، میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد)

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند اثر تیمارهای شاهد و پلی اتیلن گلیکول بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه زعفران در سطح ۱ درصد معنادار است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها گو یای معنادار بودن اثر تیمارهای پلی اتیلن گلیکول و شاهد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سطح ۵ درصد با آزمون

قدرت مهارکنندگی IC50: اثر تیمارهای شاهد و پلی اتیلن گلیکول بر قدرت مهارکنندگی IC50 در سطح ۱ درصد معنادار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان دادند بیشترین و کمترین قدرت مهارکنندگی IC50 به ترتیب به تیمارهای ۱۲ درصد پلی اتیلن گلیکول (۰/۵۴Units/mg) و شاهد (۰/۴۲Units/mg) مربوط هستند (شکل ۶).

LSD بودند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ۱۲ درصد پلی اتیلن گلایکول با مقدار ۰/۳۷ Units/mg دارای بیشترین میزان و در تیمار شاهد با ۰/۲۸ Units/mg دارای کمترین مقدار بود (شکل ۶)؛ همچنین بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز با میزان ۸/۱۲ Units/mg در تیمار ۱۲ درصد پلی اتیلن گلایکول و کمترین فعالیت آن با مقدار ۵/۹۶ Units/mg در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۶). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند تیمار ۱۲ درصد پلی اتیلن گلایکول بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۷/۴ Units/mg) را در پی دارد و کمترین فعالیت این آنزیم با مقدار ۲/۴۵ Units/mg در شاهد مشاهده می‌شود (شکل ۶).

شکل ۶- مقایسه میانگین اثر تیمار پلی اتیلن گلایکول (p) و تیمار شاهد (c) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز گیاه زعفران؛ در هر تیمار، میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد)



تولید گونه‌های فعال ROS است (Das and Roychoudhury, 2014). پلی اتیلن گلایکول از طریق تقویت مسیرهای درگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش ترکیبات مؤثره گیاه زعفران می‌شود و با تأثیر بر ساختمان آنزیم‌های درگیر در مسیرهای بیوشیمیایی سنتز متابولیت‌های ثانویه، تولید این ترکیبات را بهبود می‌بخشد (Purbajanti et al., 2019).

در شرایط عادی رشد، فرایندهای متابولیکی بسیاری سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان می‌شوند و در مقابل، گیاهان سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه‌های

بحث

افزایش سطوح ترکیبات فنلی از جمله سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی گیاهان در معرض شرایط نامساعد است (Rebey et al., 2011)؛ زیرا این ترکیبات همچون پالاینده‌های گونه‌های واکنشگر اکسیژن عمل می‌کنند و سبب ثبات غشاهای سلولی و مانع پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (Ashraf et al., 2014). فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی فنل‌ها از تمایل آنها به کلاته کردن فلزات ناشی می‌شوند و می‌توانند یون‌های آهن را کلاته و مشتقات سوپراکسید را به کمک واکنش فنتون غیرفعال کنند؛ واکنش فنتون از مهم‌ترین منابع

ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با تنش اکسیداتیو ضروری است و در این زمان، گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به شکل آنزیم‌های اکسیداتیو فعال تر می‌شوند (Amirjani *et al.*, 2014). اگرچه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در خط مقدم دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند، محصول عمل آن (H_2O_2) همچنان برای سلول سمی است و باید از سلول حذف شود (Mhamdi and Van Breusegem, 2018). برخی از آنزیم‌ها نظیر کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در حذف H_2O_2 از سلول نقش دارند (Laxa *et al.*, 2019). کاتالاز مولکول H_2O_2 را به طور مستقیم حذف می‌کند و آن را به مولکول آب و اکسیژن تبدیل می‌کند؛ از این رو، آنزیم یادشده به قدرت کاهندگی نیاز ندارد و در نتیجه، سرعت فعالیت زیادی دارد؛ ولی چون تمایل آن به مولکول H_2O_2 کم است، تنها غلظت‌های زیاد H_2O_2 را حذف می‌کند و نمی‌تواند در غلظت‌های کم H_2O_2 به خوبی عمل کند. آنزیم آسکوربات پراکسیداز با تمایل زیادی که نسبت به H_2O_2 دارد، این مولکول را در غلظت‌های کم (تنش‌های ملایم) که برای کاتالاز شناسایی نمی‌شوند، حذف می‌کند (Sofa *et al.*, 2015)؛ علاوه بر این، محصول فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کلروپلاست، H_2O_2 است که آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش کلیدی در حذف آن دارد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون برای احیای مولکول H_2O_2 استفاده می‌کند (Matsuo *et al.*, 2015) و نسبت به آنزیم کاتالاز در برابر تنش

فعال اکسیژن دارند (Huang *et al.*, 2019). در شرایط نامساعد، تعادل یادشده بر هم می‌خورد و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. احتمالاً افزایش مقدار پراکسید هیدروژن در شرایط نامساعد از اختلال در تعادل یادشده ناشی می‌شود و آسیب‌های اکسیداتیو به گیاه را در پی دارد. یکی از آسیب‌های جدی تنش، خسارت به غشا و رها شدن یون‌ها از سلول به فضای بین سلولی است (Abass and Mohamed, 2011)؛ این پدیده نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که به پراکسیداسیون لپید، نفوذپذیری غشا و خسارت به سلول منجر می‌شود (Labudda, 2013). اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون لپید یکی از معمول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری آسیب‌های اکسیداتیو به غشا محسوب و به طور وسیع در گیاهان استفاده می‌شود (Anjum *et al.*, 2012).

در شرایط غیرتنش، تعادل بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جارو کردن این ترکیبات از طریق سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) وجود دارد؛ اما در شرایط تنش که مقدار جذب و ترکیب دی‌اکسید کربن به علت منع باز شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد، انرژی داخلی افزایش می‌یابد، ظرفیت انتقال الکترون فتوسنتزی به سوی سطوح بالاتر می‌رود و در پی آن، غلظت گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد که این امر سبب پراکسیداسیون لپیدها، تخریب پروتئین‌ها و اکسیداسیون DNA می‌شود؛ در ادامه، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر از ظرفیت جاروشدن آنها از طریق سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود و در نتیجه، تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد؛ بنابراین، تغییر

ROS، جارو کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، خاموش کردن اکسیژن‌یکتابی، تنظیم اسیدیتة سلولی و تنظیم نسبت $NADP^+/NADPH$ نقش دارد. گزارش شده است پرولین با پیوستن به فسفولیپیدهای غشایی و ایجاد تغییر در لایة هیدراتة اطراف ماکرومولکول‌های زیستی سبب حفظ و ثبات غشاها می‌شود (Chun et al., 2018). پرولین با جارو کردن یا کاهش دادن تولید اکسیژن‌یکتابی در کاهش آسیب نوری غشای تیلاکوئیدها مؤثر است (Wang et al., 2015). به نظر می‌رسد افزایش مقدار پرولین در تیمار پلی‌اتیلن‌گلیکول از ویژگی‌های اسمولیتی و آنتی‌اکسیدانی آن ناشی می‌شود؛ همچنین افزایش محتوای پرولین را می‌توان به عوامل گوناگونی از جمله کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین‌های سلولی، کاهش فعالیت پرولین‌اکسیداز، افزایش بیوسنتز پرولین از گلو تامات و تمایل به تجزیه پروتئین‌های سلولی به نفع تولید بیشتر آمینواسیدهایی مانند پرولین که به شکل مؤثری در تنظیم اسمزی عمل می‌کنند، مربوط دانست (Wu et al., 2017). انباشت مولکول‌های سازگاری مانند آمینواسیدهای پرولین در شرایط کم‌آبی از مهم‌ترین راهکارهای گیاهان برای تنظیم فشار اسمزی سلول و به تبع آن، حفظ تورژسانس سلول است؛ از سویی، افزایش پرولین به حفظ ساختارهای مولکولی، سم‌زدایی و پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن در سلول کمک می‌کند (Yooyongwech et al., 2013).

کلروفیل یکی از رنگیزه‌های اصلی کلروپلاست است که در فرایند فتوسنتز دخیل است. محتوای نسبی کلروفیل برگ‌های گیاه با میزان فتوسنتز آن

اکسیداتیو حساس‌تر است؛ از این رو، آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز تنها در تنش‌های ملایم و از طریق سیکل آسکوربات-گلوتاتیون عملکرد مناسبی در حذف H_2O_2 دارد. کاتالاز تنها یک کمتری به مولکول H_2O_2 دارد و بنابراین، در غلظت‌های زیاد H_2O_2 (تنش شدید)، کمتر آسیب می‌بیند و فعال‌تر از آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز عمل می‌کند. مولکول H_2O_2 در غلظت زیاد شدیداً به آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز حمله می‌کند و سبب بازدارندگی فعالیت آن می‌شود (De Carvalho, 2008). احیای نوری اکسیژن به رادیکال سوپراکسید که در کلروپلاست و به واسطه فتوسیستم I انجام می‌شود، واکنش مهلر (Mehler Reaction) نامیده می‌شود. آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با دیسموتاسیون رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن، نقش مهمی در حفاظت دستگاه فتوسنتزی در برابر تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند (Mangano et al., 2017). در پژوهش حاضر، اعمال تیمار پلی‌اتیلن‌گلیکول سبب افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد.

پلی‌اتیلن‌گلیکول با افزایش دادن بیان آنزیم‌های بیوسنتزکننده پرولین و کاهش دادن فعالیت آنزیم‌های مخرب پرولین سبب افزایش میزان پرولین در گیاه زعفران می‌شود (Kafi and Rahimi, 2011)؛ علاوه بر این، پلی‌اتیلن‌گلیکول نوعی ماده محافظ اسمزی است که در حفظ تعادل آب، حفظ ثبات پروتئین‌ها، حفظ ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تثبیت کردن غشاها و دستگاه سنتز پروتئین، منبعی برای ذخیره کربن و نیتروژن برای رشد پس از رفع تنش، کاهش دادن خطرهای ناشی از تولید

موالونیک اسید در سیتوپلاسم بیوسنتز می‌شود. مسیر مولونیک اسید با سنتز مولونات از سه مولکول استیل کوآنزیم A آغاز می‌شود و با تولید مولکول‌های ایزوپنتیل دی فسفات و ژرانیل پیروفسفات از طریق واکنش حلقوی شدن لیکوپن به واسطه آنزیم لیکوپن بتاسیکلاز، ترکیبات لیکوپن رنگی، بتاکاروتن و فیتوئن بی‌رنگ تولید می‌شوند. آنزیم بتاکاروتنئید هیدروکسیلاز هیدروکسیله شدن بتاکاروتن در مسیر مولونیک اسید را کاتالیز می‌کند که به تولید زنازانتین منجر می‌شود. عوامل رنگ (کروسین آلدهید) در زعفران از طریق شکست اکسایشی زنازانتین به وسیله آنزیم ۷ و ۸ زنازانتین کلیواژداکسیژناز به وجود می‌آیند. در زعفران، محصولات شکست اکسایشی زنازانتین به واسطه آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز ۲ در کروموپلاست کلالة گلوکزله و سپس در واکوئل مرکزی کلالة ذخیره می‌شوند. واکنش حلقوی شدن لیکوپن را ژن لکوپن بتاسیکلاز *CsLYC* کد می‌کند. هیدروکسیله شدن بتاکاروتن را ژن *CsBCH* کد می‌کند و به تولید زنازانتین منجر می‌شود. ژن *CsUGT2* در کروموپلاست کلالة آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز ۲ را کد می‌کند. مطالعه تغییرات کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه در زعفران نشان داده است ژن‌های *CsLYC*، *CsUGT2* و *CsBCH* در تنظیم تغییرات رونویسی درگیر هستند (Mir *et al.*, 2012; Ahrazem *et al.*, 2010). تنظیم و رونویسی بیان ژن‌های کاروتنوئید، سازوکار مهمی است که با استفاده از آن، بیوسنتز و انباشت کاروتنوئیدهای خاص یا مشتقات آنها طی رشد گل و رسیدگی زعفران تنظیم می‌شود. بیوسنتز

ارتباط دارد و احتمالاً حفظ محتوای کلروفیل زیاد سبب حفظ عملکرد در شرایط تنش می‌شود. در شرایط تنش ناشی از پلی اتیلن گلایکول، سبز ماندن برگ‌های گیاه به کارایی بیشتر مصرف آب و عملکرد بیشتر محصولات کشاورزی منجر می‌شود (Jangpromma *et al.*, 2010).

به‌طور کلی، سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه متأثر از متابولیت‌های اولیه است و هر عاملی که سبب تقویت فتوسنتز و متابولیت‌های اولیه شود، افزایش مقادیر متابولیت‌های ثانویه گیاه را در پی دارد؛ نتایج پژوهش حاضر در زمینه افزایش بازده متابولیت‌های ثانویه در اثر پلی اتیلن گلایکول مطلب یاد شده را تأیید می‌کنند. ترکیبات ثانویه شیمیایی در گیاهان تحت تأثیر چند ژن که بر اثر شرایط محیطی و تنش‌ها تغییر می‌کنند، سنتز می‌شوند و به نظر می‌رسد نقش مهمی در سازوکار دفاعی گیاهان دارویی در شرایط تنش دارند؛ در پژوهش حاضر نیز کاربرد پلی اتیلن گلایکول تأثیر معناداری بر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه زعفران داشت. پلی اتیلن گلایکول ممکن است از طریق تقویت مسیرهای درگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش ترکیبات مؤثره گیاه زعفران شود و با تأثیر بر ساختمان آنزیم‌هایی که در مسیرهای بیوشیمیایی سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی درگیر هستند، تولید این ترکیبات را بهبود بخشد (Purbajanti *et al.*, 2019)؛ همچنین پلی اتیلن گلایکول از طریق القای پاسخ‌های دفاعی سبب بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود. کروسین از روش غیرمولونیک اسید در پلاستیدها که مواد اولیه کاروتنوئیدها را به وجود می‌آورد و روش

اینکه سبب افزایش سنتز متابولیت‌های اولیه می‌شود، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد؛ در نتیجه، از آنجا که بسیاری از ترکیبات ثانویه در واکنش گیاهان نسبت به تنش‌ها و محرک‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارند، اهمیت مطالعه محتوای این ترکیبات در گیاه زعفران اهمیت دارد و این امر علاوه بر تعیین الگوی رشد، نقش مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه ایفا می‌کند؛ بنابراین می‌توان استفاده از این تیمار را به‌ویژه در شرایط نامساعد محیطی به تولیدکنندگان و بهره‌برداران این گیاه پیشنهاد کرد.

References

- Abass, S. M. and Mohamed, H. I. (2011) Alleviation of adverse effects of drought stress on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by exogenous application of hydrogen peroxide. *Bangladesh Journal of Botany* 41: 75-83.
- Abdullave, F. and Ortega, C. (2007) HPLC quantification of major active components from different saffron (*Crocus sativus* L) sources. *Food Chemistry* 10: 1126-1131.
- Ahrazem, O., Rubio Moraga, A., Lopez, R. C. and Gomez, L. (2010) The expression of chromoplast specific beta lycopene cyclase gene is involved in the high production of saffron precursors. *Journal of Experimental Botany* 61: 105-119.
- Amin, B. and Hosseinzadeh, H. (2012) Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia* 83: 888-895.
- Amirjani, M. R., Askari, M. and Askari, P. (2014) The effect Nano oxide Zinc on the amount of alkaloids, enzymatic and non-enzymatic antioxidants and some indicators of Physiology *Catharantus roseu*. *Cells and Tissues Journal* 5: 173-183.
- Anjum, S. A., Farrukh, M. S., Wang, L., Faisal, B. M. and Asif, S. (2012) Protective role of glycinebetaine in maize against drought-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of antioxidative system. *Australian Journal of Crop Science* 6: 576-583.
- Asada, K. and Nakano, Y. (1978) Affinity for oxygen in photoreduction of molecular oxygen and scavenging of hydrogen peroxide in spinach chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology* 28: 917-920.

نتیجه‌گیری

تنش ناشی از کاربرد پلی‌اتیلن گلایکول سبب افزایش معنادار میزان پرولین آزاد گیاه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن شد؛ بنابراین، به نظر می‌رسد میزان پرولین آزاد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشانگرهای مناسبی برای تنش هستند. کاربرد پلی‌اتیلن گلایکول محتوای متابولیت‌های ثانویه گیاه زعفران را به‌طور معناداری افزایش داد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند افزایش رشد با افزایش فتوسنتز و تخصیص کربن بیشتر، علاوه بر

- Ashraf, M. A., Rasheed, R., Hussain, I., Iqbal, M., Haider, M. Z., Parveen, S. and Sajid, M. A. (2014) Hydrogen peroxide modulates antioxidant system and nutrient relation in maize (*Zea mays* L.) under water-deficit conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science* 61: 507-523.
- 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.
- Bayraktar, M., Naziri, E. and Akgun, I. H. (2016) Elicitor-induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127: 289-300.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L. and Panda, S. K. (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 8: e23681.
- Chun, S. C., Paramasivan, M. and Chandrasekaran, M. (2018) Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Frontiers in Microbiology* 9: 2525-2537.
- Das, K. and Roychoudhury, A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers of Environmental Science* 2: 53-69.
- De Carvalho, M. H. C. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling and Behavior* 3: 156-165.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. L. and Reid D. M. (1982) Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Plant Physiology* 56: 453-547.
- Elavarthi, S. and Martin, B. (2010) Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Methods in Molecular Biology* 639: 273-281.
- Goli, S. A. H., Mokhtari, F. and Rahimmalek, M. (2012) Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal. *Journal of Agricultural Science* 4: 175-181.
- Havir, E. A. and McHale, N. A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450-55.
- Hellal, F. A., El-Shabrawi, M., Abd El-Hady, M., Khatab, I. A., El-Sayed, S. A. A. and Abdelly, C. (2018) Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16: 203-212.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D., Yi, M. and Zhao, Y. (2019) Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science* 10: 800-810.
- Impa, S. M. S., Nadaradjan, S. and Jagadish, S. V. K. (2012) Drought stress induced reactive oxygen species and antioxidants in plants. In: *Abiotic stress responses in plants* (Eds. Ahmad, P. and Prasad, M. N. V.) 131-147. Springer, New York.
- Isah, T. (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research* 52: 39-58.
- Jangpromma, N., Kitthaisong, S., Lomthaisong, K., Daduang, S., Jaisil, P. and Thammasirirak, S. (2010) A proteomics analysis of drought stress-responsive proteins as biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6: 89-102.
- Kabiri, M., Rezaadoost, H. and Ghassempour, A. (2017) A comparative quality study of saffron constituents through HPLC and HPTLC methods followed by isolation of crocins and Picrocrocins. *LWT- Food Science and Technology*, 84: 1-9.

- Kafi, M. and Rahimi, Z. (2011) Effect of salinity and silicon on root characteristics, growth, water status, proline content and ion accumulation of purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 57: 341-347.
- Kawarazaki, T., Kimura, S., Iizuka, A., Hanamata, S., Nibori, H. and Michikawa, M. (2013) A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. *Biochimica and Biophysica Acta* 1833: 2775-2780.
- Kheirandish, M. and Sriramapa, K. (2010) Production and export potential of saffron in Iran. *Asian Journal of Development Matters*, 4: 10-25.
- Labudda, M. (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding 3342-3354
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. and Dietz, K. J. (2019) The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants* 8: 1-31.
- Liu, B., Zhao, S., Tan, F., Zhao, H., Wang, D. and Si, H. (2017) Changes in ROS production and antioxidant capacity during tuber sprouting in potato. *Food Chemistry* 237: 205-213.
- Loreto, F. and Velikova, V. (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Journal of Plant Physiology* 127: 1781-1787.
- Lozano, P., Castellar, M., Simancas, M. and Iborra, L. (1999) Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *Journal of Chromatography* 830: 477-483.
- Luciano, J., Irineo, T. P. and Virginia, O. V. R. (2017) Integrating plant nutrients and elicitors for production of secondary metabolites, sustainable crop production and human health: a review. *International Journal of Agriculture and Biology* 19: 391-402.
- Madhumitha, G. and Saral, A. (2009) Free radical scavenging assay of *Thevetia nerifolia* leaf extracts. *Asian Journal of Chemistry* 21: 2468-2470.
- Mangano, S., Denita-Juarez, S. P., Choi, H. S., Marzol, E., Hwang, Y. and Ranocha, P. (2017) Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 5289-5294.
- Matsuo, M., Johnson, J. M., Hieno, A., Tokizawa, M., Nomoto, M. and Tada, Y. (2015) High redox responsive transcription factor1 levels result in accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* shoots and roots. *Molecular Plant* 8: 1253-1273.
- Mhamdi, A. and Van Breusegem, F. (2018) Reactive oxygen species in plant development. *Development* 145: 1-12.
- Mir, J. I., Ahmed, N. Wafai, A. H. and Qadri, R. A. (2012) Relative expression of CsZCD gene and apocarotenoid biosynthesis during stigma development in *Crocus sativus* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18: 371-375.
- Mohsenzadeh, S., Malboobi, M. A., Razavi, K. and Farrahi-Aschtiani, S. (2006) Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae) to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 56: 314-322.
- Moratalla-López, N., José Bagur, M., Lorenzo, C., Martínez-Navarro, M. E., Rosario Salinas, M. and Alonso, G. L. (2019) Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. Flower. *Molecules* 24: 2827-2851.
- Mousa, N. A., Siaguru, P., Wiryowidagdo, S. and Wagih, M. E. (2007) Evaluation and selection of elite clonal genotypes of the sweet crop licorice (*Glycyrrhiza glabra*) in a new environment. *Sugar Technology* 9: 83-94.
- Patel, H. and Krishnamurthy, R. (2013) Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2:

- 60-65.
- Purbajanti, E. D., Kusmiyati, F., Fuskhah, E., Rosyida, R., Adinurani, P. G. and Vincevica-Gaile, Z. (2019) Selection for drought-resistant rice (*Oryza sativa* L.) using polyethylene glycol. *Earth and Environmental Science* 293: 012-014.
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S. and Rajabzadeh, G. (2015) Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids* 51: 327-337.
- Rebey, I. B., Bourgou, S., Debez, I. B. S., Karoui, I. J., Sellami, I. H., Msaada, K., Limam, F. and Marzouk, B. (2011) Effects of extraction solvents and provenances on phenolic contents and antioxidant activities of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Food and Bioprocess Technology* 5: 2827-2836.
- Robin, A. H. K., Jasim Uddin, Md. and Nafiz Bayazid, K. (2015) Polyethylene Glycol (PEG)-Treated Hydroponic Culture Reduces Length and Diameter of Root Hairs of Wheat Varieties. *Agronomy* 5: 506-518.
- Sanchez-Vioquea, R., Rodreguez-Conde M., Reina-Ureana J., Escolano-Terceroa M., Herraiz-Penalvera, D. and Santana-Méridasa, B. (2012) *In vitro* antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products* 39: 149-153.
- Sarker, U. and Oba, S. (2018). Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports* 8: 16496-16508.
- Sekmen, A. H., Ozgur, R., Uzilday, B. and Turkan, I. (2014) Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 99: 141-149.
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Martínez-Tomé, 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.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A. (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 13561-13578.
- Tajik, S., Zarinkamar, F. and Bathaie, Z. (2013) Quantification of crocin, picrocrocin and safranal components of saffron (*Crocus sativus* L.) in Ghaen and Tabas regions. *Iranian Journal of Plant Biology* 4: 423-429.
- Vahedi, M., Kabiri, M., Salami, S. A., Rezadoost, H., Mirzaie, M. and Kanani, M. R. (2018) Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Industrial Crops and Products* 118: 26-9.
- Wang, H., Tang, X. and Shao, H. B. (2015) Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. *Frontiers in Plant Science* 6: 792-806.
- Wu, H. H., Zou, Y. N., Rahman, M. M., Ni, Q. D. and Wu, Q. S. (2017) Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliate orange exposed to drought stress. *Scientific Reports* 7: 1-10.
- Yooyongwech, S., Phaukinsang, N., Cha-Um, S. and Supaibulwatana, K. (2013) Arbuscular mycorrhiza improved growth performance in *Macadamia tetraphylla* L. grown under water deficit stress involves soluble sugar and proline accumulation. *Plant Growth Regulation* 69: 285-293.

