



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY

E-ISSN: 2322-2204

Vol. 14, Issue, No. 2, Summer 2022

Document Type: Research Paper

Received: 28/07/2023

Accepted: 10/10/2023

Morphophysiological and Biochemical Responses of *Crocus sativus* During the Interaction of Melatonin and Drought Stress

Parvaneh Hemmati Hassan Gavyar¹, Hamzeh Amiri^{1*}, Marino B. Arnao², Seifollah Bahramikia¹

¹ Department of Biology, Faculty of Basic Science, Lorestan University, Khorramabad, Lorestan, Iran

² Department of Plant Biology, Faculty of Biology, University of Murcia, Murcia, Spain

Abstract

Melatonin increases stress tolerance in plants. Saffron's red stigmas are the main Iran's industrial and export products. The aim of this study was to investigate the effect of melatonin on some morphophysiological and biochemical characteristics of saffron under drought-stress conditions. Drought stress was applied by polyethylene glycol 6000 at 10% and 20% levels. Root treatment of melatonin was applied at a concentration of 100 μ M. Drought stress, particularly 20% stress, led to a decrease in growth parameters. Under 20% stress, the amount of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, and photosynthesis rate decreased by 22.32%, 35.84%, 51.35%, and 10.05%, respectively, while the ion leakage (2.70%), proline content (15.00%), and flavonoid (1.94%) increased. Exogenous application of melatonin has a positive effect on increasing plant resistance to drought stress by affecting physiological indicators such as photosynthetic parameters and the antioxidant system.

Introduction

Drought is one of the limiting and effective abiotic factors in agricultural productivity in the world. Under drought stress conditions, plant growth factors decrease (Zhang et al., 2014; Brunner et al., 2015). Drought stress leads to the accumulation of reactive oxygen species in cells. Excessive accumulation of ROS causes lipid peroxidation and ion leakage. By inactivating enzymes, proteins, and nucleic acids, ROS reduces photosynthesis and the yield of crops (Altaf et al., 2022). Plants use different strategies to respond to stress. An increase in abscisic acid levels, compatible osmolyte content, protective enzyme activities, and antioxidant levels with inhibiting energy consumption pathways are among these strategies (Li et al., 2018). Natural or synthetic growth regulators such as melatonin can affect plant physiological processes at low concentrations. Melatonin regulates the biological responses of plants by modulating

* Corresponding Author: amiri_h_lu@yahoo.com



various physiological, biochemical, and molecular processes and finally increases the resistance of plants against drought conditions. Saffron with the common name Saffron and the scientific name *Crocus sativus* is from the Iridaceae family. As the most expensive agricultural and medicinal product in the world, saffron has a special place among Iran's industrial and export products (Farooq et al., 2009). Since most of the regions of Iran are facing the problem of water shortage, studying the responses of plants to water stress is of particular importance. The aim of this study was to investigate the potential improving effects of melatonin on the antioxidant and photosynthetic responses of *Crocus sativus* L. under drought-stress conditions.

Materials and Methods

After disinfection, the corms were washed and transferred to pots containing perlite. Irrigation and addition of Hoagland's nutrient solution were done at one-week intervals. In order to apply drought stress, polyethylene glycol 6000 was used at two levels of 10% and 20%. Root treatment of melatonin with a concentration of 100 μ M was done after applying drought stress. The fresh and dry weight of the samples, the relative water content, and the amount of photosynthetic pigments were measured according to the methods of Moradi Rikabad et al. (2019), Martínez et al. (2004), and Arnon (1949), respectively. The maximum photosystem quantum efficiency (Fv/Fm) II was measured using a fluorometer apparatus (Pocket PEA) and the amount of net photosynthesis (Pn) was measured using a portable gas exchange device model CI-340. In order to measure proline content, ninhydrin was used as a reagent, and proline was used as a standard. The sugar in the samples was measured by the phenol-sulfuric acid method. The leakage of electrolytes was measured by the method of Lutts et al. (1996). The amount of H₂O₂ was calculated using the extinction coefficient of 0.28 mmol/cm. The measurement of phenolic and flavonoid compounds was done by colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent and aluminum chloride, respectively. The free radicals inhibition was measured by the DPPH method. This research was conducted as a factorial study in the form of a completely randomized design in three replications. To analyze the data, Minitab 16.0 was used, and the significance levels of differences between samples were determined using Tukey's test at the $P \leq 0.05$ statistical level. Microsoft Office Excel 2013 was used to draw the graphs.

Results and Discussion

The results of the study showed that drought stress decreases the height, fresh and dry weight, and relative water content of the plant. Exogenous melatonin improves plant growth factors in these conditions. Melatonin probably stimulates plant growth factors by affecting plant metabolites and increasing the biosynthesis of phytohormones and facilitating the absorption of nutrients (Arnao, 2014; Naghizadeh et al., 2019). According to the results, drought stress causes a decrease in the content of photosynthetic pigments, Pn, and Fv/Fm. In fact, drought stress disrupts the balance between the absorption capacity and the use of light energy, causing disruption in photosynthesis, and damage to the photosynthetic apparatus (Pineiro & Chaves, 2011). Exogenous melatonin treatment protects chlorophyll against abiotic stress by reducing lipid peroxidation and regulating the downstream genes of chlorophyll degradation (Yu et al., 2018). Exogenous treatment of melatonin by modulating the stomatal pore can

also improve plant growth and increase Pn under drought stress (Liu et al., 2020). In this study, drought stress led to an increase in proline and soluble sugars, although these changes were not significant.

The Exogenous application of melatonin in these conditions decreased the content of these osmolytes. Under stressful conditions, the accumulation of compatible osmolytes improves turgor pressure, thereby preventing cell dehydration (Liang et al., 2018). The Exogenous application of melatonin may maintain the water balance in the plant through other ways and thus regulate the cell turgor pressure and reduce the content of compatible osmolytes (Ibrahim et al., 2020, Altaf et al., 2022). The results showed that drought stress leads to an increase in hydrogen peroxide content and ion leakage, although these changes were not significant, exogenous application of melatonin caused a decrease in hydrogen peroxide content and ion leakage while the content of phenol and flavonoid were increased. Drought stress often causes the accumulation of reactive oxygen species, which results in cell membrane damage. Under stressful conditions, melatonin can increase the activity of the H⁺-ATPase pump and contribute to the stability of the plasma membrane (Wang et al., 2019).

Conclusion

The results of this study showed that melatonin increases the resistance of *Crocus sativus* L. against drought stress by regulating the physiological and biochemical responses. In today's conditions, where water scarcity is one of the most important challenges in world agriculture, the use of new growth regulators, including melatonin, can be effective in increasing the tolerance of plants to drought stress and improving the growth and quality of agricultural products.

Keywords: Fv/Fm, Compatible Osmolytes, Saffron, Melatonin

پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه زعفران طی برهم‌کنش ملاتونین و تنش خشکی

پروانه همتی حسن گاویار^۱، حمزه امیری^{۱*}، مارینوبی. آرنائو^۲، سیف‌الله بهرامی^۱
^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
^۲گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه مورسیا، مورسیا، اسپانیا

چکیده

ملاتونین سبب افزایش تحمل به تنش در گیاهان می‌شود. کلاله‌های قرمزرنگ زعفران جایگاه ویژه‌ای بین محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر ملاتونین بر برخی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی زعفران در شرایط تنش خشکی بود. تنش با پلی‌اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ در سطوح ۱۰ و ۲۰ درصد اعمال شد. تیمار ریشه‌ای ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اعمال شد. نتایج نشان دادند تنش خشکی به‌ویژه تنش ۲۰ درصد اثر کاهشی بر شاخص‌های رشدی دارد. تنش ۲۰ درصد، میزان کلروفیل a را ۲۲/۳۲ درصد، کلروفیل b را ۳۵/۸۴ درصد، کاروتنوئیدها را ۱۰/۰۵ درصد و سرعت فتوسنتز را ۵۱/۳۵ درصد در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد؛ درحالی‌که نشت یونی را ۲/۷۰ درصد، محتوای پرولین را ۱۵/۰۰ درصد و فلاونوئید را ۱/۹۴ درصد افزایش داد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند کاربرد خارجی ملاتونین با تأثیر بر شاخص‌های فیزیولوژیکی از جمله شاخص‌های فتوسنتزی و سیستم آنتی‌اکسیدانی، در افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی اثر مثبت دارد.

واژه‌های کلیدی: Fv/Fm، اسمولیت‌های سازگار، زعفران، ملاتونین



مقدمه

خشکی یکی از عوامل غیرزیستی محدودکننده و اثرگذار بر بهره‌وری کشاورزی در جهان است (Shohani et al., 2022). کمبود آب در جهان به‌ویژه در ایران رو به افزایش است. هنگامی که گیاهان تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند، فرایندهای رشدی آنها متوقف می‌شوند و طول ساقه و ریشه و وزن اندام‌ها کاهش می‌یابد. (Zhang et al., 2014; Brunner et al., 2015). تنش خشکی با کاهش سرعت فتوسنتز، رشد گیاه را به‌طور مستقیم کاهش می‌دهد (Liang et al., 2018). اصلی‌ترین عامل محدودکننده سرعت فتوسنتز طی تنش خشکی، بسته‌شدن روزنه‌ها است که سبب کاهش دسترسی به CO_2 می‌شود (Ghotbi-Ravandi et al., 2014). تنش خشکی، تجمع گونه‌های فعال اکسیژن از جمله O_2^- و H_2O_2 را در سلول افزایش می‌دهد و از آنجایی که این ترکیبات با غشای اندامک‌های سلولی مهم مانند میتوکندری و کلروپلاست در ارتباط هستند، تجمع بیش از حد آنها سبب پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی می‌شود؛ علاوه‌براین، گونه‌های فعال اکسیژن با غیرفعال کردن آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و نوکلئیک‌اسیدها، فتوسنتز و بازده محصولات زراعی را کاهش می‌دهند (Altah et al., 2022).

گیاهان راهبردهای مختلفی از جمله افزایش موقتی سطوح آبسزیک‌اسید، افزایش اسمولیت‌های سازگار، افزایش آنزیم‌های حفاظتی، افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و مهار مسیرهای مصرف انرژی را برای پاسخ به تنش به کار می‌برند (Li et al., 2018) که در بین آنها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تنظیم

اسمزی در افزایش تحمل به تنش خشکی اهمیت ویژه‌ای دارند (Hatzig et al., 2014; Blum, 2017).

Noori et al. (2022) اثر روش‌های مختلف آبیاری در شرایط تنش آبی را بر ویژگی‌های بنه دختری و سطح فتوسنتزی گیاه زعفران بررسی کردند. نتایج پژوهش آنها نشان دادند کاهش مقدار آبیاری به‌منظور ایجاد تنش خشکی سبب کاهش معنادار تعداد برگ، طول برگ، وزن تر و خشک برگ، قطر بنه دختری، تعداد، وزن تر و وزن خشک بنه دختری می‌شود. بر اساس نتایج یادشده، دسترسی به آب کافی اهمیت ویژه‌ای دارد. Tavakoli et al. (2020) نشان دادند استفاده از پلی‌اتیلن گلايکول ۱۲ درصد، تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه زعفران را افزایش می‌دهد و در این شرایط، درصد مهار رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد.

تنظیم‌کننده‌های رشد طبیعی یا مصنوعی مانند ملاتونین یکی از مهم‌ترین گروه‌های ترکیبات آلی هستند که در غلظت‌های کم نیز فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ این مولکول‌های علامت‌رسان از مهم‌ترین عوامل پاسخ‌دهنده به تنش هستند. غلظت استفاده‌شده، شرایط فیزیولوژیکی گیاه و عوامل محیطی مؤثر بر جذب، سه عامل مهم و اثرگذار بر توانایی تنظیم‌کننده رشد در مقاومت گیاهان به شرایط تنشی هستند (Quamruzzaman et al., 2021).

ملاتونین (N-acetyl-5-methoxytryptamine) از مشتقات تریپتوفان است که در موجودات زنده وجود دارد و برای نخستین بار در سال ۱۹۹۵،

حذف گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش عملکرد الیاف پنبه منجر می‌شود (Hu et al., 2021).

زعفران با نام عمومی Saffron و نام علمی *Crocus sativus* از خانواده زنبق (Iridaceae)، گیاهی است ژئوفیت و چندساله که در پاییز گل می‌دهد (Molina et al., 2005). کلاله قرمزرنگ این گیاه که حاوی سه متابولیت ثانویه اصلی به نام‌های کروسین (رنگیزه‌های کاروتنوئیدی محلول در آب و مسئول رنگ)، پیکروکروسین (کلیکوزید تلخ مزه و مسئول طعم زعفران) و سافراناال (جزء اصلی مواد فرار و مسئول طعم و مزه) است، به شکل ادویه غذا استفاده می‌شود (Vahedi et al., 2018). زعفران گران‌ترین محصول کشاورزی و دارویی جهان است و جایگاه ویژه‌ای بین محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد (Farooq et al., 2009).

از آنجایی که ایران کشوری کم‌آب است، مطالعه در زمینه پاسخ‌های گیاهان به تنش کم‌آبی اهمیت ویژه‌ای دارد تا زمینه کشت وسیع‌تر محصولات مهمی مانند زعفران فراهم شود. هدف مطالعه حاضر، بررسی آثار احتمالی بهبوددهنده ملاتونین بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتزی گیاه *Crocus sativus* L. در شرایط تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کاشت

بنه‌های جمعیت سرایان گیاه زعفران از شرکت مهتو خریداری و با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و سپس آب مقطر شستشو و به گلدان‌های حاوی پرلیت منتقل شدند. گلدان‌ها به اتاقک رشد (با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی) منتقل شدند.

هاتوری آن را در گیاهان شناسایی کرد. این تنظیم‌کننده رشد، نقش شبه‌هورمونی در گیاهان دارد (Zhang et al., 2019). ملاتونین، پاسخ‌های زیستی گیاهان را با تعدیل فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی تنظیم می‌کند و در نهایت، مقاومت گیاهان را برای تحمل شرایط خشکسالی افزایش می‌دهد (Cui et al., 2017; Campos et al., 2019; Sharma & Zheng, 2019). دستگاه فتوسنتزی و سیستم دفاع ضداکسیداتیو، فرایندهای فیزیولوژیکی اصلی هستند که ملاتونین آنها را در شرایط کمبود آب کنترل می‌کند (Wang et al., 2013; Liang et al., 2019; Sharma & Zheng 2019). به‌تازگی، پژوهش‌های بسیاری به‌منظور کشف آثار این مولکول چندمنظوره در گیاهان در معرض تنش‌های غیرزیستی انجام شده‌اند؛ باوجوداین، تنش خشکی در مقایسه با تنش‌های دیگر کمتر مطالعه شده و به دانش جامعی در زمینه سازوکارهای دقیق تنظیم‌کننده تحمل به خشکی با واسطه ملاتونین نیاز است (Sharma & Zheng, 2019). Imran et al. (2021) نشان دادند کاربرد خارجی ملاتونین به‌ویژه تیمار ریشه‌ای در غلظت ۱۰۰ میکرومولار با ممانعت از تجمع پراکسیدهایروژن و آسیب به غشا سبب محافظت از ویژگی‌های رشدی و رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاه سویا می‌شود. آنها بیان کردند این آثار احتمالاً با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون پراکسیداز ارتباط دارند. گزارش‌ها نشان می‌دهند اسپری کردن آبسیزیک‌اسید و ملاتونین، وضعیت آب و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های در معرض تنش خشکی را در گیاه پنبه ارتقا می‌دهد و به

گرفتند؛ در ادامه، آب سطحی آنها با دستمال کاغذی گرفته و وزن آنها (وزن آماس) دوباره یادداشت شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد. محتوای آب نسبی از رابطه ۱ محاسبه شد (Martinez et al., 2004).

(رابطه ۱) $RWC (\%) = (FW - DW / TW - DW) \times 100$
 در این رابطه، FW: وزن تر، DW: وزن خشک و TW: وزن تورژسانس است.

اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید)

محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی مطابق روش Arnon (1949) اندازه‌گیری شد. به این منظور، ۰/۰۶ گرم از بافت تازه برگ با ۱ میلی‌لیتر استون (V/V) ۸۰ درصد ساییده شد. عصاره استخراج شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. حجم نهایی عصاره با استون به ۱ میلی‌لیتر رسانده و جذب محلول رویی در سه طول موج ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده و میزان رنگدانه‌ها از رابطه‌های ۲، ۳ و ۴ محاسبه شد (Arnon, 1949).

$Chlorophyll\ a = ((19.3 * A663) - (0.86 * A645) * V) / 100W$ (رابطه ۲)

$Chlorophyll\ b = ((19.3 * A645) - (3.6 * A663) * V) / 100W$ (رابطه ۳)

$Carotenoids = ((1000 * A470) - (3.27 * mg\ chl\ a) - (104 * mg\ chl\ (b))) / 227$ (رابطه ۴)

آبیاری و اضافه کردن محلول غذایی هوگلند با فواصل یک‌هفته‌ای انجام شد؛ گفتنی است تا زمان بیرون آمدن جوانه‌ها از سطح پرلیت، گلدان‌ها تنها آب مقطر دریافت کردند. در هفته ششم، به منظور اعمال تنش خشکی از پلی‌اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ در دو سطح ۱۰ درصد و ۲۰ درصد که به ترتیب معادل منفی ۱/۴۸ و منفی ۴/۹۱ بار است، استفاده شد. تیمار ریشه‌ای ملاتونین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۶ هفته پس از اعمال تنش خشکی انجام شد. گلدان‌ها به شش گروه تقسیم شدند؛ به این ترتیب که گروه اول هیچ‌گونه تنش یا تیمار ملاتونین دریافت نکردند، گروه دوم تنها در معرض تنش ۱۰ درصد خشکی قرار گرفتند، گروه سوم تنها در معرض تنش ۲۰ درصد خشکی قرار گرفتند، گروه چهارم تنها تیمار ریشه‌ای ملاتونین را دریافت کردند، گروه پنجم تنش خشکی ۱۰ درصد و تیمار ریشه‌ای ملاتونین را دریافت کردند و گروه ششم تنش خشکی ۲۰ درصد و تیمار ریشه‌ای ملاتونین را دریافت کردند. برداشت نمونه‌ها در هفته دوازدهم انجام و از نمونه‌های فریزر شده برای انجام سنجش‌های مدنظر استفاده شد.

اندازه‌گیری وزن تر، وزن خشک، ارتفاع گیاه و محتوای آب نسبی (RWC)

وزن تر نمونه‌ها هنگام برداشت اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد (Moradi Rikabad et al., 2019). به منظور اندازه‌گیری محتوای آب نسبی، وزن تر برگ بی‌درنگ پس از برداشت اندازه‌گیری شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار

استیک‌اسید گلاسیال به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از خنک‌شدن، ۲۰۰ میکرولیتر تولوئن اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس شدند و در نهایت، جذب آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. میزان پرولین نمونه‌ها از رابطه حاصل از نمودار استاندارد و برحسب میلی‌گرم پرولین بر میلی‌گرم وزن تر گیاه گزارش شد (Bates et al., 1973).

قند کل

مقدار ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ با نیتروژن مایع پودر و در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار ساییده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس محلول رویی جدا شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به ۳۰۰ میکرولیتر سولفوریک‌اسید اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد؛ در ادامه، نمونه‌ها در حمام یخ قرار گرفتند و سپس جذب آنها در طول موج ۳۱۵ نانومتر خوانده شد. میزان قند نمونه‌ها از نمودار استاندارد گلوکز و با واحد میلی‌گرم گلوکز بر گرم وزن تر گیاه محاسبه شد (Albalasmeh et al., 2013).

نشت یونی

به منظور تعیین میزان نشت الکترولیت‌های سلول‌های برگ، مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ جدا و با آب مقطر شستشو شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در لوله‌های شیشه‌ای حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند و پس از آن،

که در آن، A663، A645 و A470 به ترتیب مقادیر جذب رنگدانه‌ها در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر را نشان می‌دهند. V و W به ترتیب حجم عصاره پس از فیلتراسیون و وزن تر نمونه برگ را نشان می‌دهند.

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (FV/Fm)

میزان فلورسانس کلروفیل برگ‌ها با دستگاه فلورومتر (مدل Pocket PEA، ساخت کشور انگلیس) اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که پس از اعمال تنش و تیمار ملاتونین، برگ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با گیره‌های مخصوص در تاریکی قرار گرفتند و میزان فلورسانس آنها ثبت شد.

میزان فتوسنتز خالص (Pn)

میزان فتوسنتز خالص با دستگاه تبادلات گازی قابل حمل (مدل CI-340، ساخت CID آمریکا) اندازه‌گیری شد. اساس کار این دستگاه بر میزان کربن‌دی‌اکسید مصرفی است. میزان فتوسنتز بر اساس میکرومول (کربن‌دی‌اکسید) بر مترمربع در ثانیه اندازه‌گیری شد.

سنجش پرولین

به منظور سنجش محتوای پرولین از نین‌هیدرین به عنوان معرف و از پرولین به عنوان استاندارد استفاده شد. مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ با ۱ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک‌اسید ۳ درصد ساییده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر نین‌هیدرین و ۲۰۰ میکرولیتر

از گذشت ۶۰ ثانیه، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت به مکانی تاریک با دمای اتاق منتقل شدند و سپس جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فنل عصاره‌ها از رابطه حاصل از نمودار استاندارد (رابطه ۶) و برحسب میکروگرم گالیک‌اسید در میلی‌گرم وزن تر گیاه گزارش شد (Hemmati Hassan Gavyar & Amiri, 2018).

Absorbance: 0.0016 Gallic acid (μg)
+0.0488 ($r^2 = 0.9802$) (رابطه ۶)

به منظور سنجش محتوای فلاونوئید، ۳۰۰ میکرولیتر متانول، ۲۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۲۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۵۶۰ میکرولیتر آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی اضافه و پس از گذشت ۴۰ دقیقه، جذب آنها در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، میزان فلاونوئید عصاره‌ها از رابطه حاصل از نمودار استاندارد (رابطه ۷) و برحسب میکروگرم کوئرستین در میلی‌گرم وزن تر گیاه گزارش شد (Hemmati Hassan Gavyar & Amiri, 2018).

Absorbance: 0.0091 quercetin (μg) +0.0206
($r^2 = 0.995$) (رابطه ۷)

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۴ درصد وزنی - حجمی DPPH حل شده در متانول اضافه شد. پس از نیم ساعت که

هدایت الکتریکی محلول با دستگاه سنجش هدایت الکتریکی تعیین شد (EC_1). در ادامه، ظروف حاوی نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از کاهش دما، هدایت الکتریکی آنها دوباره اندازه‌گیری شد (EC_2). درصد نشت الکترولیت از رابطه ۵ محاسبه شد (Lutts et al., 1996):

$$EC (\%) = (EC_1 / EC_2) \times 100 \quad (\text{رابطه ۵})$$

سنجش H_2O_2

مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۰/۱ درصد ساییده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی جدا شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره با ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار مخلوط و سپس ۲۰۰ میکرولیتر پتاسیم‌یدید ۱ مولار به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در تاریکی قرار گرفت و در نهایت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. میزان H_2O_2 با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه شد (Imran et al., 2021).

سنجش محتوای فنل و فلاونوئید

مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ پودر و در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به منظور سنجش ترکیبات فنلی، ۳۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیو کالچو ۰/۱ رقیق شده در آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی اضافه شد و پس

نمونه‌ها در تاریکی و دمای اتاق قرار داشتند، جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد از رابطه ۸ محاسبه شد (Hemmati Hassan Gavyar & Amiri, 2018).

$$\text{I\%} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \quad (\text{رابطه ۸})$$

در این رابطه، A_{blank} : جذب واکنش شاهد منفی و A_{sample} : جذب نمونه مدنظر در مخلوط واکنشی است.

مطالعه‌های آماری

مطالعه حاضر به شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تمام داده‌ها به‌طور میانگین و مقادیر انحراف از استاندارد آنها در سه تکرار گزارش شدند. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار مینی‌تب ۱۶ استفاده و سطوح معناداری تفاوت بین نمونه‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد. نرم‌افزار Excel 2013 برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند تنش خشکی به کاهش وزن تر، وزن خشک، ارتفاع و محتوای آب نسبی گیاه در مقایسه با گروه شاهد منجر می‌شود؛ به‌طوری که تغییرات کاهشی نسبت به گروه شاهد در تنش‌های ۱۰ و ۲۰ درصد خشکی برای وزن تر به ترتیب ۹/۳۴ و ۲۳/۴۸ درصد، وزن خشک به ترتیب ۱۴/۱۸ و ۳۹/۴۰ درصد، ارتفاع به ترتیب ۱۰/۱۶ و ۱۹/۰۶ درصد و محتوای آب نسبی به ترتیب ۱۳/۱۹۳ و ۲۵/۹۸ درصد بود؛ از سوی دیگر تیمار ملاتونین، شاخص‌های یادشده را در شرایط تنش افزایش داد و این افزایش در سطح ۲۰ درصد چشمگیرتر از ۱۰ درصد بود. در شرایط تنش ۲۰ درصد، ملاتونین ۱۷/۰۹ درصد وزن تر، ۱۵/۱۲ درصد وزن خشک، ۲۱/۵۷ درصد ارتفاع و ۸/۶۱ درصد محتوای آب نسبی را در مقایسه با گروه‌های شاهد مربوطه افزایش داد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین صفت‌های وزن تر (FW)، وزن خشک (DW)، ارتفاع (SH) و محتوای آب نسبی (RWC) گیاه زعفران در شرایط تنش خشکی (۱۰ و ۲۰ درصد) و ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار). مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف یکسان، وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P < 0.05$ با آزمون توکی را نشان می‌دهند. گروه کنترل (C)، ملاتونین (Mel)

Table 1- Effect of drought stress (10% and 20%) and melatonin (100 μ M) on FW, DW, SH, and RWC. The values presented are mean \pm SE (n=3). The same letters indicate no significant difference at the $p < 0.05$. C: Control; Mel: Melatonin. FW: Fresh weight; DW: Dry weight; SH: Shoot height; RWC: Relative water content.

Treatment	FW (g)	DW (g)	SH (cm)	RWC%
None Drought				
C	4.634 \pm 0.04 ^a	0.7833 \pm 0.01 ^a	20.67 \pm 0.33 ^a	81.18 \pm 2.47 ^a
Mel 100 μ M	4.297 \pm 0.04 ^{ab}	0.675 \pm 0.00 ^{ab}	23.57 \pm 0.47 ^a	78.6 \pm 3.23 ^{bab}
PEG10%				
C	3.977 \pm 0.06 ^b	0.666 \pm 0.01 ^b	18.57 \pm 0.35 ^{cd}	70.47 \pm 2.37 ^{bc}
Mel 100	4.193 \pm 0.04 ^b	0.6704 \pm 0.03 ^{ab}	21.93 \pm 1.03 ^{ab}	72.88 \pm 0.080 ^{abc}
PEG20%				
C	2.808 \pm 0.10 ^d	0.525 \pm 0.05 ^c	16.73 \pm 0.27 ^d	60.09 \pm 3.84 ^d
Mel 100	3.387 \pm 0.09 ^c	0.6185 \pm 0.03 ^{bc}	21.33 \pm 0.44 ^{abc}	65.75 \pm 1.19 ^{cd}

می‌رفت کارایی فتوسیستم II (Fv/Fm) در شرایط تنش کاهش یافت و بیشترین مقدار این مؤلفه (۰/۸۳۹۳) در غیاب تنش و در گروه دریافت‌کننده ملاتونین و کمترین مقدار آن (۰/۸۲۶) در گروهی که تنها تنش ۲۰ درصد را دریافت کرده بود، مشاهده شد (شکل ۱E). به‌طور کلی تنش خشکی سبب کاهش شاخص‌های فتوستتزی شد و در این شرایط، ملاتونین اثر مثبت و بهبوددهنده داشت (شکل ۱).

اسمولیت‌های سازگار

تنش خشکی، میزان اسمولیت‌های سازگار (پرولین و قند) را به‌طور غیرمعناداری افزایش داد؛ درحالی‌که ملاتونین اثر کاهشی بر آنها داشت (شکل 2A, B). گروه‌های شاهد دریافت‌کننده تنش ۲۰ درصد، بیشترین میزان پرولین (۰/۱۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و قند (۰/۱۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را داشتند. کمترین میزان پرولین (۰/۰۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و قند (۰/۰۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گروه پنجم، یعنی گروه در معرض تنش ۱۰ درصد و دریافت‌کننده ملاتونین، مشاهده شد. میزان پرولین قند در تنش ۲۰ درصد و در حضور ملاتونین به ترتیب ۱۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و ۹۹/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود.

نشت یونی و پراکسید هیدروژن

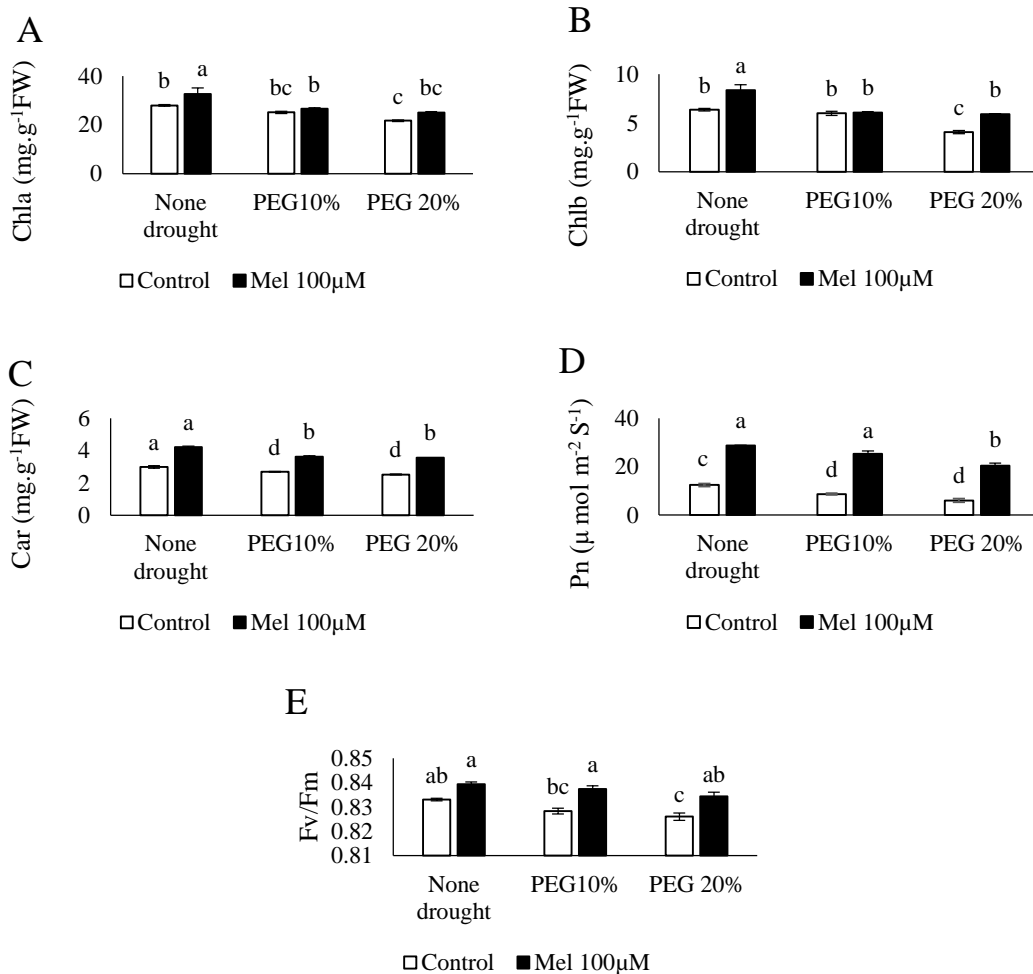
افزایش نشت یونی و تولید H_2O_2 در سلول‌های در معرض تنش خشکی اعمال‌شده معنادار نبود. گروه دریافت‌کننده تنش ۲۰ درصد، بیشترین میزان نشت یونی (۴۶/۲۲ درصد) را نشان داد (شکل 3A,

شاخص‌های فتوستتزی گیاه

تنش خشکی به کاهش میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید در مقایسه با گروه شاهد منجر شد. در شرایط تنش ۱۰ و ۲۰ درصد، میزان کلروفیل a به ترتیب ۱۰/۰۱ و ۲۲/۳۲ درصد، کلروفیل b به ترتیب ۵/۸۱ و ۳۵/۸۴ درصد و کاروتنوئیدها به ترتیب ۱۰/۰۵ و ۱۵/۶۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد کاهش نشان دادند (شکل‌های 1A, B, C)؛ این کاهش در کلروفیل a و کلروفیل b طی تنش ۱۰ درصد معنادار نبود. اثر کاهشی یادشده در حضور ملاتونین به افزایشی تبدیل شد؛ به‌طوری‌که در مقایسه با گروه‌های مربوطه در معرض تنش، کلروفیل a ۵/۶۲ و ۱۳/۳۶ درصد، کلروفیل b ۱/۱۱ و ۳۱/۱۰ درصد و کاروتنوئیدها ۲۵/۸۵ و ۲۹/۲۸ درصد به ترتیب برای تنش‌های ۱۰ و ۲۰ درصد افزایش نشان دادند. میزان فتوستتز (Pn) در شرایط تنش و به‌ویژه تنش ۲۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معناداری کاهش یافت (شکل 1D)؛ این کاهش در تنش ۱۰ و ۲۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد به ترتیب ۳۰/۱۰ و ۵۱/۳۵ درصد بود. بیشترین میزان فتوستتز (۲۸/۷ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در گروه چهارم، یعنی گروهی که تنها ملاتونین دریافت کرده بودند، مشاهده شد. گروه‌های دریافت‌کننده ملاتونین در شرایط تنش ۱۰ و ۲۰ درصد به ترتیب ۷۰/۳۳ و ۶۵/۷۴ درصد در مقایسه با گروه‌های شاهد در معرض تنش، افزایش میزان فتوستتز نشان دادند. همان‌طور که انتظار

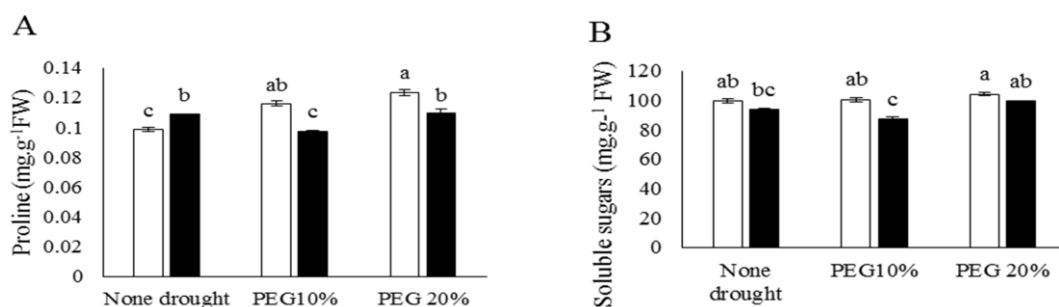
کاهش داد. میزان کاهش نشت یونی در گروه‌های در معرض تنش ۱۰ و ۲۰ درصد و دریافت‌کننده ملاتونین در مقایسه با گروه شاهد (گروه اول) به ترتیب ۱۰/۳۸ و ۵/۵۷ درصد بود؛ میزان کاهش در این گروه‌ها به ترتیب ۲۲/۵۱ و ۱۰/۵۶ درصد بود (شکل ۳).

(B)؛ بیشترین میزان H_2O_2 (۹/۲۳ میکرومول بر گرم وزن تر) نیز در این گروه مشاهده شد. حضور ملاتونین سبب ثبات و پایداری غشای سلولی گیاه می‌شود؛ به طوری که گروه شاهد دریافت‌کننده ملاتونین، میزان نشت یونی و H_2O_2 را به ترتیب ۳/۶۹ و ۴۷/۳۷ درصد در مقایسه با گروه شاهد



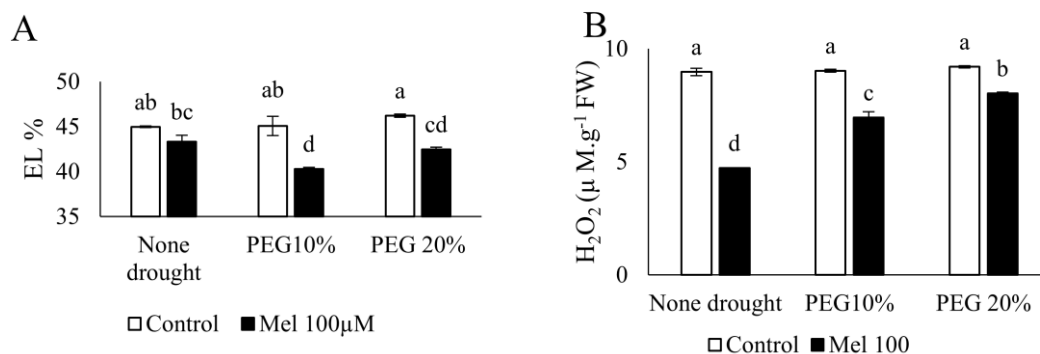
شکل ۱- مقایسه میانگین کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کاروتنوئیدها (C)، میزان فتوسنتز (D) (Pn) و کارایی فتوسیستم II (Fv/Fm) (E) گیاه زعفران در شرایط تنش خشکی (۱۰ و ۲۰ درصد) و ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار). مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف یکسان، وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P < 0.05$ با آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 1- The effect of drought stress (10% and 20%) and melatonin (100 μM) on Chl a (A), Chl b (B), Car (C), Pn (D), Fv/Fm (E). The values presented are mean ±SE (n=3). The same letters indicate no significant difference at the $p < 0.05$. Mel: Melatonin, Pn: Net photosynthesis; Fv/Fm: Maximum quantum efficiency of photosystem II; Car: Carotenoid; Ch a: Chlorophyll a; Chl b: Chlorophyll b.



شکل ۲- مقایسه میانگین پرولین (A) و قندهای محلول (B) گیاه زعفران در شرایط تنش خشکی (۱۰ و ۲۰ درصد) و ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار). مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار در سطح $P < 0.05$ با آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 2- The effect of drought stress (10% and 20%) and melatonin (100 μ M) on proline content (A) and soluble sugars (B). The values presented are mean \pm SE (n=3). The same letters indicate no significant difference at the $p < 0.05$. Mel: Melatonin.



شکل ۳- مقایسه میانگین نشت یونی (A) و پراکسید هیدروژن (B) گیاه زعفران در شرایط تنش خشکی (۱۰ و ۲۰٪) و ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار). مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار در سطح $P < 0.05$ با آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 3- The effect of drought stress (10% and 20%) and melatonin (100 μ M) on the EL% (A) and H₂O₂ content (B). The values presented are mean \pm SE (n=3). The same letters indicate no significant difference at the $p < 0.05$. Mel: Melatonin, EL: Electrolyte leakage.

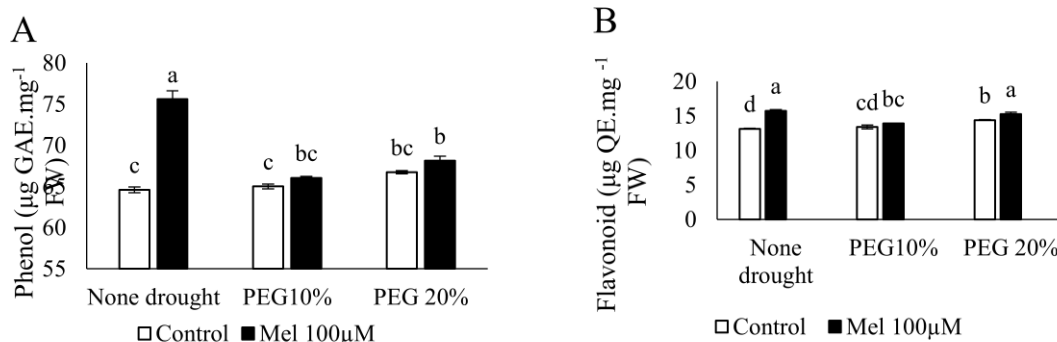
گروهی که تنها ملاتونین را دریافت کرده بودند، بیشترین میزان فنل و فلاونوئید (افزایش ۱۴/۵۵ و ۱۶/۵۹ درصدی در مقایسه با گروه شاهد به ترتیب برای فنل و فلاونوئید) را داشتند؛ افزایش یادشده در گروه‌های پنجم و ششم طی تنش‌های ۱۰ و ۲۰ درصد (۲/۲۰ و ۵/۱۸ درصد) و (۵/۷۷ و ۳/۶۰ درصد) به ترتیب برای فنل و فلاونوئید بود. کمترین مقدار فنل (۶۴/۵۸ میکروگرم گالیک اسید بر

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

تنش خشکی محتوای فنل و فلاونوئید را در گیاه زعفران افزایش داد. تفاوت افزایش محتوای فنل بین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ درصد معنادار نبود؛ درحالی‌که افزایش محتوای فلاونوئید طی اعمال تنش‌های یادشده تفاوت معناداری را نشان داد (شکل 4A, B). ملاتونین سبب افزایش محتوای فنل و فلاونوئید شد؛ به طوری که گروه چهارم، یعنی

افزایش می‌یابد. افزایش یادشده در تنش‌های ۱۰ و ۲۰ درصد به ترتیب ۱۲/۸۶ و ۱۸/۵۷ در مقایسه با گروه شاهد بود. حضور ملاتونین سبب افزایش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH شد و گروه چهارم، یعنی گروهی که تنها ملاتونین دریافت کرده بود، بیشترین درصد مهار (۱۸/۶۹ درصد) را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (شکل 4C).

میلی گرم وزن تر) و فلاونوئید (۱۳/۱۲ میکروگرم کوئرستین بر میلی گرم وزن تر) نیز در گروه شاهد مشاهده شد (شکل 4A, B). درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در عصاره‌های گیاهی با محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی ارتباط مستقیم دارد. نتایج حاضر نشان دادند با افزایش شدت تنش (میزان فنل و فلاونوئید در این شرایط افزایش یافت)، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH



شکل ۴- مقایسه میانگین محتوای فنل (A)، محتوای فلاونوئید (B) و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (C) گیاه زعفران در شرایط تنش خشکی (۱۰ و ۲۰ درصد) و ملاتونین (۱۰۰ میکرومولار). مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف یکسان، وجودنداشتن اختلاف معنادار در سطح $P < 0.05$ با آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 4- The effect of drought stress and melatonin on the content of Phenol (A), Flavonoid (B) and Antioxidant activity% (C). The values presented are mean \pm SE (n=3). The same letters indicate no significant difference at the $p < 0.05$. Mel: Melatonin.

زراعی (دیپوک، نظنز و آریانشهر) منجر می‌شود. نتایج پژوهش (Noori et al., 2022) نشان دادند کاهش مقدار آب آبیاری از ۱۰۰ درصد به ۷۰ و ۴۰ درصد به‌علت ایجاد تنش خشکی سبب کاهش معنادار وزن تر و وزن خشک برگ زعفران می‌شود. اثر بهبوددهنده ملاتونین بر شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی و کلزا در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Li et al., 2018; Altaf et al., 2022). احتمالاً ملاتونین با تأثیر بر متابولیت‌های گیاهی و افزایش میزان بیوستر فیتوهورمون‌ها

بحث

تنش خشکی با تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیکی به کاهش رشد در گیاهان منجر می‌شود. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند تنش خشکی سبب کاهش ارتفاع، وزن تر، وزن خشک و محتوای آب نسبی گیاه می‌شود و کاربرد بیرونی ملاتونین در این شرایط سبب بهبود رشد گیاه می‌شود. همسو با نتایج حاضر، Aslezaem et al. (2018) بیان کردند تنش خشکی به کاهش وزن تر و وزن خشک برگ جمعیت‌های مختلف زعفران

می‌کند (Liang et al., 2018). انرژی نورانی اضافی سبب تحریک واکنش مهلر می‌شود که نتیجه آن، تولید آنیون سوپراکسید (Driever & Baker, 2011) و رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن است که لیپیدهای غشایی را اکسید می‌کنند. تخریب غشاهای لیپیدی از جمله ساختارهای لیپیدی کلروپلاست به آسیب رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل منجر می‌شود و از این طریق بر کاهش میزان فتوسنتز تأثیر می‌گذارد. تیمار خارجی ملاتونین از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و حفاظت از غشاهای سلولی از یک سو و تنظیم ژن‌های پایین دست تجزیه‌کننده کلروفیل (فتوفیتیناز و کلروفیلاز) از سوی دیگر سبب محافظت از کلروفیل در برابر تنش می‌شود (Yu et al., 2018). تیمار خارجی ملاتونین با تنظیم اندازه روزنه‌ها می‌تواند سبب بهبود رشد گیاه و افزایش Pn در شرایط تنش خشکی شود (Liu et al., 2020). کاربرد خارجی ملاتونین به افزایش تجمع ملاتونین در کلروپلاست‌ها منجر می‌شود و از آنجایی که خود ملاتونین دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی است، سبب بهبود نسبت Fv/Fm می‌شود و به این ترتیب از ایجاد آسیب به کلروپلاست‌ها و خسارت به دستگاه فتوسنتزی جلوگیری می‌کند (Fleta-Soriano et al., 2017; Imran et al., 2021) یکی از سازوکارهایی که گیاهان برای رویارویی با تنش خشکی به کار می‌برند، افزایش محتوای اسمولیت‌های سازگار است. در مطالعه حاضر، تنش خشکی به افزایش پرولین و قندهای محلول منجر شد؛ هرچند این تغییرات معنادار نبود. کاربرد بیرونی ملاتونین در شرایط تنش یادشده سبب کاهش محتوای اسمولیت‌های سازگار

از جمله اکسین و سیتوکینین و تسهیل جذب مواد غذایی، رشد گیاه را تحریک می‌کند (Amao, 2014; Naghizadeh et al., 2019). ملاتونین با افزایش فشار تورگور و محتوای آب نسبی برگ سبب بهبود رشد در شرایط تنش می‌شود (Naghizadeh et al., 2019). با توجه به نتایج حاضر، تنش خشکی سبب کاهش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل‌ها و کاروتنوئید)، Pn و Fv/Fm می‌شود. نتایج حاضر مشابه با پژوهش‌های سایر پژوهشگران از جمله Altaf et al. (2022)، Sheikhalipour et al. (2022) و Liu et al. (2020) روی گیاهان استویا، گوجه‌فرنگی و تنباکو نشان می‌دهند تنش خشکی با ایجاد اختلال در فعالیت‌های فتوسنتزی سبب کاهش شاخص‌های فتوسنتزی از جمله محتوای کلروفیل‌ها، کاروتنوئید، Pn و Fv/Fm می‌شود. نتایج مطالعه‌های یادشده همسو با نتایج پژوهش حاضر، اثر بهبوددهنده و افزایشی ملاتونین بر شاخص‌های فتوسنتزی را تأیید می‌کنند. مطالعه‌های پیشین بیان می‌کنند ملاتونین آثار منفی ناشی از تنش خشکی بر شاخص‌های فتوسنتزی را کاهش می‌دهد. در واقع تنش خشکی با برهم‌زدن تعادل بین ظرفیت جذب و استفاده از انرژی نورانی سبب اختلال در فتوسنتز می‌شود و به دستگاه فتوسنتزی آسیب‌ها می‌زند (Pinheiro & Chaves, 2011). بسته‌شدن روزنه و کاهش غلظت CO₂ درونی در شرایط کمبود آب، تقاضا برای NADPH در چرخه کالوین را کاهش می‌دهد و این امر سبب داکسیداسیون و مسدود شدن زنجیره انتقال الکترون می‌شود؛ در نتیجه، زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی از اکسیژن به‌عنوان پذیرنده الکترون استفاده و اشکال اکسیژن یکتایی را تولید

حاضر سبب کاهش محتوای پراکسید هیدروژن، افزایش میزان فنل و افزایش درصد مهار رادیکال‌های آزاد شد. اغلب تنش خشکی سبب تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و نتیجه آن، ایجاد تنش‌های اکسیداتیو و آسیب به غشای سلولی است (Cruz de Carvalho, 2008). هنگام ایجاد آسیب اکسیداتیو، گیاهان سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی خود مانند سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی را فعال می‌کنند. در شرایط تنش، ملاتونین فعالیت پمپ H^+ -ATPase را افزایش می‌دهد و در واقع طی شرایط تنش، ملاتونین به ۵- متوکسی‌تریپتامین تبدیل می‌شود که این ترکیب تحریک‌کننده فعالیت پمپ H^+ -ATPase در گیاهان است و از این طریق می‌تواند به ثبات غشای پلاسمایی کمک کند (Wang et al., 2019). گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار فنل‌ها و فلاونوئیدها سبب مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند و به این ترتیب از آسیب به غشاهای سلولی جلوگیری می‌کنند (Naghizadeh et al., 2019; Sheikhalipour et al., 2022).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند ملاتونین با تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه زعفران سبب افزایش مقاومت این گیاه در برابر تنش خشکی می‌شود. نتایج نشان می‌دهند در شرایط امروزی که کشاورزی جهان با بحران کم‌آبی روبه‌رو است، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد نوین از جمله ملاتونین در افزایش تحمل گیاهان به خشکی و بهبود رشد و کیفیت محصولات کشاورزی مؤثر است.

می‌شود. در شرایط تنش، تجمع اسمولیت‌های سازگار سبب بهبود فشار تورگور می‌شود و از دهیدراتاسیون سلول‌ها جلوگیری می‌کند (Liang et al., 2018). از دیگر نقش‌های مهم این ترکیبات می‌توان به نقش آنها در حفاظت از ساختار آنزیم‌ها، هورمون‌های گیاهی، غشاهای سلولی و سایر اجزای سلولی اشاره کرد. حضور این اسمولیت‌ها در تعادل کربن-نیترژن، انتقال سیگنال، پتانسیل ردوکس و اسیدیته بسیار مهم است (Namvar et al., 2017). هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، نتایج سایر پژوهشگران نشان می‌دهند تنش خشکی به افزایش محتوای اسمولیت‌های سازگار منجر می‌شود؛ در حالی که در این شرایط، کاربرد خارجی ملاتونین ممکن است دیگر مسیرهای تعادل آبی در گیاه را حفظ کند و به این ترتیب سبب تنظیم فشار تورگور سلولی و کاهش محتوای اسمولیت‌های سازگار شود (Ibrahim et al., 2020, Altaf et al., 2022).

تنش خشکی سبب افزایش محتوای پراکسید هیدروژن و نشت یونی شد و اگرچه این تغییرات معنادار نبودند، کاربرد خارجی تنظیم‌کننده رشد ملاتونین سبب کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و نشت یونی شد؛ در حالی که محتوای آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی فنل و فلاونوئید افزایش یافت. مطالعه‌های Sharifi et al. (2020)، Altaf et al. (2022) و Sheikhalipour et al. (2022) همسو با نتایج حاضر نشان دادند تنش خشکی در گیاهان زعفران، گوجه‌فرنگی و استویا سبب افزایش H_2O_2 و نشت یونی می‌شود و در این شرایط، ترکیبات فنلی افزایش می‌یابند. کاربرد خارجی ملاتونین مشابه با داده‌های پژوهش

References

- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Altaf, M. A., Shahid, R., Ren, M. X., Naz, S., Altaf, M. M., Khan, L. U., ... & Ahmad, P. (2022). Melatonin improves drought stress tolerance of tomato by modulating plant growth, root architecture, photosynthesis, and antioxidant defense system. *Antioxidants*, 11(2), 309. <https://doi.org/10.3390/antiox11020309>
- Arnao, M. B., & Hernandez-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in Plant Science*, 19, 789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.006>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.
- Aslezaeem, F., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., & Sharifi, G. (2018). Comparative study of drought stress and salicylic acid effects on different accessions of saffron (*Crocus Sativus* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(3), 483-498 [In Persian].
- Bates, L. S., Waldren, R. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell & Environment*, 40(1), 4-10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., & Sperisen, C. (2015). How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*, 6, 547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>
- Campos, C. N., Ávila, R. G., de Souza, K. R. D., Azevedo, L. M., & Alves, J. D. (2019). Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. *Plants Agricultural Water Management*, 211, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.025>
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156-165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
- Cui, G., Zhao, X., Liu, S., Sun, F., Zhang, C., & Xi, Y. (2017). Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 138-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.014>
- Driever, S. M., & Baker, N. R. (2011). The water-water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO₂ assimilation is restricted. *Plant, Cell & Environment*, 34(5), 837-846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02288.x>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*, 153-188.
- Fleta-Soriano, E., Díaz, L., Bonet, E., & Munné-Bosch, S. (2017). Melatonin may exert a protective role against drought stress in maize. *Journal of Agronomy and Crop Science* 203(4), 286-294. <https://doi.org/10.1111/jac.12201>
- Ghotbi-Ravandi, A. A., Shahbazi, M., Shariati, M., & Mulo, P. (2014). Effects of mild and severe drought stress on photosynthetic efficiency in tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare* L.)

- genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6), 403-415. <https://doi.org/10.1111/jac.12062>
- Hatzig, S., Zaharia, L. I., Abrams, S., Hohmann, M., Legoahec, L., Bouchereau, A., ... & Snowden, R. J. (2014). Early osmotic adjustment responses in drought-resistant and drought-sensitive oilseed rape. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(8), 797-809. <https://doi.org/10.1111/jipb.12199>
- Hemmati Hassan Gavyar, P., & Amiri, H. (2018). Chemical composition of essential oil and antioxidant activity of leaves and stems of *Phlomis lurestanica*. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1414-1422. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1490321>
- Hu, W., Zhang, J., Yan, K., Zhou, Z., Zhao, W., Zhang, X., ... & Yu, R. (2021). Beneficial effects of abscisic acid and melatonin in overcoming drought stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Physiologia Plantarum*, 173(4), 2041-2054. <https://doi.org/10.1111/ppl.13550>
- Ibrahim, M. F., Elbar, O. H. A., Farag, R., Hikal, M., El-Kelish, A., El-Yazied, A. A., ... & El-Gawad, H. G. A. (2020). Melatonin counteracts drought induced oxidative damage and stimulates growth, productivity and fruit quality properties of tomato plants. *Plants*, 9(10), 1276. <https://doi.org/10.3390/plants9101276>
- Imran, M., Latif Khan, A., Shahzad, R., Aaqil Khan, M., Bilal, S., Khan, A., ... & Lee, I. J. (2021). Exogenous melatonin induces drought stress tolerance by promoting plant growth and antioxidant defence system of soybean plants. *AoB Plants* 13(4), 26. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plab026>
- Li, J., Zeng, L., Cheng, Y., Lu, G., Fu, G., Ma, H., ... & Li, C. (2018). Exogenous melatonin alleviates damage from drought stress in *Brassica napus* L. (rapeseed) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2601-8>
- Liang, D., Ni, Z., Xia, H., Xie, Y., Lv, X., Wang, J., ... & Luo, X. (2019). Exogenous melatonin promotes biomass accumulation and photosynthesis of kiwifruit seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 246, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.058>
- Liang, G., Bu, J., Zhang, S., Jing, G., Zhang, G., & Liu, X. (2018). Effects of drought stress on the photosynthetic physiological parameters of *Populus× euramericana* "Neva". *Journal of Forestry Research*, 30, 409-416. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0667-9>
- Liu, L., Li, D., Ma, Y., Shen, H., Zhao, S., & Wang, Y. (2020). Combined application of arbuscular mycorrhizal fungi and exogenous melatonin alleviates drought stress and improves plant growth in tobacco seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(3), 1074-1087. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10165-6>
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134>
- Martinez, J. P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M., & Kinet, J. M. (2004). Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L?. *Journal of Plant Physiology*, 161(9), 1041-1051. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.12.009>
- Molina, R. V., Valero, M., Navarro, Y., Guardiola, J. L., & García-Luis, A. J. S. H. (2005). Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 103(3), 361-379. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.06.005>

- Moradi Rikabad, M., Pourakbar, L., Moghaddam, S. S., & Popović-Djordjević J. (2019). Agrobiological, chemical and antioxidant properties of saffron (*Crocus sativus* L.) exposed to TiO₂ nanoparticles and ultraviolet-B stress. *Industrial Crops and Products*, 137, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.017>
- Naghizadeh, M., Kabiri, R., Hatami, A., Oloumi, H., Nasibi, F., & Tahmasei, Z. (2019). Exogenous application of melatonin mitigates the adverse effects of drought stress on morpho-physiological traits and secondary metabolites in Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 881-894. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00674-4>
- Namvar, A., Hadi, H., & Seyed Sharifi, R. (2017). Role of exogenous phytoprotectants in mitigation of adverse effects of abiotic stresses. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 12(48), 103-128. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.76712423.1396.12.48.9.3> [In Persian].
- Noori, A. M., Banejad, H., & Ferezh, M. K. (2022). The effect of irrigation different methods under the deficit-irrigation conditions on characteristics of replacement corm and photosynthesis level of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Water Management in Agriculture*, 8(2), 15-26. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.24764531.1400.8.2.2.8> [In Persian].
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869-882. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340/>
- Quamruzzaman, M., Manik, S. N., Shabala, S., & Zhou M. (2021). Improving performance of salt-grown crops by exogenous application of plant growth regulators. *Biomolecules*, 11(6), 788. <https://doi.org/10.3390/biom11060788>
- Sharifi, G., Niknam, V., Sedighi, F., & Seifi Kalhor, M. (2020). Investigation of GABA effect on drought stress tolerance improvement in cultivated saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Process and Function*, 9(39), 29-50. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.23222727.1399.9.39.10.9> [In Persian].
- Sharma, A., & Zheng, B. (2019). Melatonin mediated regulation of drought stress: Physiological and molecular aspects. *Plants*, 8(7), 190. <https://doi.org/10.3390/plants8070190>
- Sheikhalipour, M., Gohari G., Esmailpour B., Panahirad S., Milani M. H., Kulak M., & Janda, T. (2022). Melatonin and TiO₂ NPs application-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidant enzymes activities and secondary metabolites in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Under Drought Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(3), 2023-2040. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10679-1>
- Shohani, F., Fazeli, A., & Hosseini, S. (2022). The effects of using salicylic acid and Silicon on some physiological and anatomical indices in two ecotypes of *Scrophularia striata* L. Medicinal Plant under drought stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 14(2), 33-54. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2023.137115.1315> [In Persian].
- Tavakoli, F., Rafieiolhossaini, M., Ravash, R., & Rafieian-kopaei, M. (2020). Study of secondary metabolites and morphophysiological characters of saffron under poly ethylene glycol elicitor. *Iranian Journal of Plant Biology*, 12(3), 23-42. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2020.120576.1190> [In Persian].
- Vahedi, M., Kabiri, M., Salami, S. A., Rezadoost, H., Mirzaie, M., & Kanani, M. R. (2018). Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron

- (*Crocus sativus* L.) accessions. *Industrial Crops and Products*, 118, 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.024>
- Wang, M., Duan, S., Zhou, Z., Chen, S., & Wang, D. (2019). Foliar spraying of melatonin confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.127>
- Wang, P., Sun, X., Li, C., Wei, Z., Liang, D., & Ma, F. (2013). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 292-302. <https://doi.org/10.1111/jpi.12017>
- Yu, Y., Lv, Y., Shi, Y., Li, T., Chen, Y., Zhao, D., & Zhao, Z. (2018). The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules*, 23(8), 1887. <https://doi.org/10.3390/molecules23081887>
- Zhang, M., He, S., Zhan, Y., Qin, B., Jin, X., Wang, M. ... & Wu, Y. (2019). Exogenous melatonin reduces the inhibitory effect of osmotic stress on photosynthesis in soybean. *PLoS One* 14(12), e0226542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226542>
- Zhang, X., Lu, G., Long, W., Zou, X., Li, F., & Nishio, T. (2014). Recent progress in drought and salt tolerance studies in Brassica crops. *Breeding Science*, 64(1), 60-73. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.60>

