

تأثیر کود بیولوژیک نیتروکسین بر صفات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه زعفران (*Crocus sativus* L.)

علی افتاده فدافن^۱، محمد حسین امینی فرد^۲، فرید مرادی نژاد^۳، محمد علی بهدانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهان دارویی، گروه باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران

۲- استادیار گروه باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- استادیار گروه باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۴- دانشیار گروه پژوهشی زعفران و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه دانشگاه بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۲

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر مقادیر مختلف نیتروکسین بر خصوصیات کمی و کیفی زعفران، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، با سه مقدار نیتروکسین (۰، ۵، ۱۰ لیتر در هکتار) در سه تکرار، در سال زراعی ۱۳۹۴ در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد و عملکرد گل از تیمار ۵ لیتر نیتروکسین در هکتار به ترتیب به میزان ۶/۶۶ عدد در متر مربع و ۵/۷۸ کیلوگرم در هکتار و کمترین آنها از تیمار شاهد به ترتیب ۵ عدد در متر مربع و ۴/۱۰ کیلوگرم در هکتار به دست آمد. همچنین، بیشترین میزان سافرانال و کروسین کلاله از تیمار ۵ لیتر نیتروکسین در هکتار به ترتیب با ۱۷ و ۴۶/۵۷ درصد و کمترین آن از تیمار شاهد به ترتیب با ۱۱ و ۲۷/۱۳ درصد به دست آمد. تیمار ۱۰ لیتر نیتروکسین در هکتار، باعث افزایش ۴۵ درصدی میزان پیکروکروسین کلاله در مقایسه با شاهد شد. نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان، فنول و آنتوسیانین گلبرگ، در تیمار ۱۰ لیتر نیتروکسین در هکتار به ترتیب ۳۵/۶۶ درصد، ۸۳/۲۶ و ۲۳/۷۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم مشاهده شد. بطور کلی نتایج بیانگر اثر مثبت کاربرد نیتروکسین بر صفات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه زعفران بود.

کلید واژه‌ها: آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، فنول، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

تثبیت نیتروژن و رهاسازی یون‌های فسفات، پتاسیم و آهن از ترکیبات نامحلول) تولید می‌شوند. این باکتری‌ها معمولاً در اطراف ریشه مستقر شده و گیاه را در جذب عناصر همیاری می‌کنند. این کودها، آلودگی زیست محیطی همچون کودهای شیمیایی نداشته و موجب احیاء و حفظ محیط زیست می‌شوند (Dakorai et al., 2000).

در تحقیقی به منظور بررسی اثر کود زیستی بر زعفران انجام دادند و مشخص شد که طول کلاله و خامه زعفران با مصرف این کودها به طور معنی‌دار افزایش یافت (نقدی‌بادی و همکاران، ۱۳۹۰). در مطالعات Sharaf- (Eldin et al., 2008) در زعفران افزایش طول و سطح برگ در اثر کودهای زیستی نشان داده شد. Azzaz et al. (2009) امکان استفاده از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی را در گیاه رازیانه بررسی کرده و نتیجه گرفتند که رشد رویشی، عملکرد و میزان اسانس گیاه رازیانه در تیمارهای کود زیستی افزایش یافت. یکی از کودهای زیستی، نیتروکسین می‌باشد که حاوی مؤثرترین باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن از جنس ازتوباکتر و آزوسپریلیوم است که علاوه بر تثبیت نیتروژن هوا و متعادل کردن جذب عناصر غذایی پرمصرف و کم مصرف مورد نیاز گیاه، با سنتز و ترشح مواد محرک رشد گیاه مانند اکسین همچنین، ترشح اسیدهای آمینه مختلف سبب رشد و توسعه ریشه و اندام‌های هوایی گیاه می‌گردد (پوراکبر و همکاران، ۱۳۸۷). پاسخ گیاهان به تلقیح با آزوسپریلیوم و ازتوباکتر به صورت افزایش وزن خشک گیاه، ازدیاد میزان نیتروژن، افزایش گل آذین‌ها، افزایش ارتفاع گیاه و طول برگ، تسریع در مراحل جوانه‌زنی و گلدهی گزارش شده است (Patriquin et al., 1983). لیچی و همکاران (2006) اثر مثبت ازتوباکتر بر افزایش میزان اسانس گیاه دارویی رزماری را گزارش نمودند. در تحقیقی دیگر که در گیاه رازیانه انجام شد، مشاهده گردید که کاربرد کودهای زیستی حاوی ازتوباکتر و آزوسپریلیوم مقدار اسانس را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش داده است

زعفران با نام علمی *Crocus sativus L.* از خانواده زنبق (Iridaceae) گیاهی تک لپه، چندساله و نیمه گرمسیری است که در آب و هوایی مدیترانه، غرب آسیا همچنین، در مناطق کم باران ایران با زمستان سرد و تابستانی گرم رویش دارد (Sepaskhah and Kamgar- Haghghi, 2009). این گیاه به دلیل تریپلوئید بودن عقیم است و به صورت رویشی و توسط بینه تکثیر می‌گردد (Gresta et al., 2008). قسمت خوراکی مورد استفاده زعفران کلاله می‌باشد. تکثیر زعفران زراعی منحصراً از طریق پیازهای توپر صورت می‌گیرد (Vurdu et al., 2004). این گیاه به دلیل ترکیبات فعال موجود در کلاله از زمان‌های باستان به عنوان یکی از گونه‌های گیاهی معروف و گران قیمت دارویی و ادویه‌ای مطرح بوده و علاوه بر این دارای کاربردهای دیگری در صنایع آرایشی و غذایی می‌باشد (Juana et al., 2009). عوامل زیادی مانند اقلیم، بیماری‌ها، تاریخ کاشت و انواع کودها در تعیین کیفیت و کمیت زعفران تولیدی نقش بسزایی دارند (همتی کاخکی و حسینی، ۱۳۸۲). مصرف کودهای شیمیایی به منظور افزایش تولید محصولات کشاورزی در واحد سطح، سبب ایجاد مشکلات زیادی می‌شود. از مشکلات کودهای شیمیایی این که کودها در دراز مدت خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک را تخریب کرده و با کاهش نفوذپذیری در خاک، نفوذ ریشه گیاهان را دچار مشکل می‌سازد و در نهایت کاهش عملکرد را به دنبال خواهند داشت. همچنین، استفاده زیاد از کودهای شیمیایی باعث کاهش کیفیت تولیدات کشاورزی، ایجاد مشکلات زیست محیطی و آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شود (Wu et al., 2004). امروزه به دلیل افزایش اهمیت مسائل زیست محیطی توجه بیشتری به کودهای زیستی و آلی برای جایگزینی کودهای شیمیایی شده است (پیرانوشه و همکاران، ۱۳۸۹). کودهای زیستی از باکتری‌ها و قارچ‌های مفیدی تشکیل شده‌اند که هر یک به منظور خاصی (مانند

بنه‌های مرغوب و یکنواخت (وزن بین ۷ تا ۹ گرم و به طور متوسط ۸ گرم، سالم، بدون زخم و خراشیدگی و عاری از هر نوع بیماری) از اکوتیپ شهرستان کاشمر تهیه شد. کود بیولوژیک نیتروکسین مورد استفاده در این تحقیق، دارای مجموعه‌ای از مؤثرترین باکتری‌های تثبیت کننده از جنس‌های *Azospirillum sp* و *Azotobacter sp* بود. سهم هر یک از جنس‌های باکتری در هر میلی لیتر نیتروکسین به تعداد 10^8 سلول زنده (CFU) بود. بنه‌های استفاده شده در این آزمایش قبل از کشت با محلول کودی نیتروکسین به مدت ۱۰ دقیقه آغشته شده و سپس کشت شدند (کوچکی و همکاران، ۱۳۹۰). فواصل کاشت بنه‌ها 10×20 سانتی‌متر (50 بنه در مترمربع) و عمق کاشت حدود ۱۵ سانتی‌متر و به صورت خشکه‌کاری کاشته شدند. زمان کاشت اواخر شهریور ۹۴ بود. آبیاری اول بلافاصله بعد از کاشت و آبیاری دوم ۱۰ روز بعد از آبیاری اول به منظور تسهیل در سبز شدن بنه‌ها انجام شد. عملیات سله شکنی جهت سهولت بیشتر خروج جوانه‌های گل از خاک و رشد مطلوب آنها انجام شد. در طول مراحل اجرای آزمایش هیچگونه آفت‌کش یا علف‌کش شیمیایی مورد استفاده قرار نگرفت و کنترل علف‌های هرز از طریق وجین دستی انجام شد. نمونه برداری در اواسط آبان همزمان با شروع گل‌دهی زعفران آغاز شد. گل‌ها پس از حذف اثر حاشیه‌ای شمارش، و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت 0.01 گرم توزین شدند. سپس کلاره و گلبرگ‌ها در آون با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند.

(Mahfouz and Sharaf-Eldin, 2007). امیدی و همکاران (۱۳۸۸) تاثیر نیتروکسین را بر کیفیت کلاره زعفران بسیار بیشتر از کودهای شیمیایی و در مورد سایر صفات رویشی و زایشی، مساوی با کود شیمیایی برآورد کردند. با توجه به موارد یاد شده، این آزمایش به منظور پیدا کردن جایگزینی مناسب برای کودهای شیمیایی و اهمیت افزایش خواص کمی و کیفی زعفران و بالا بردن عملکرد گل زعفران صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۴ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تیمار و سه تکرار در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند (با طول جغرافیایی ۵۹ درجه و ۱۳ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۵۶ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۴۸۰ متری از سطح دریا) انجام شد. برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه (عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر) نمونه برداری قبل از شروع آزمایش انجام شد که نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول ۱ آمده است. جهت اجرای آزمایش، ابتدا پس از شخم، دیسک و مسطح کردن خاک اقدام به کرت‌بندی زمین نموده و کرت‌هایی به ابعاد 2×2 متر (چهار متر مربع) ایجاد شد. بین هر کرت فاصله ۵۰ سانتی‌متری و بین بلوک‌ها فاصله‌ای با عرض یک متر (با احتساب جوی‌های آبیاری) ایجاد شد. به منظور اجتناب از مخلوط شدن آب بلوک‌ها با یکدیگر برای هر تکرار، جوی آبیاری جداگانه‌ای در نظر گرفته شد و آبیاری به صورت سیفونی انجام شد.

جدول ۱. نتایج تجزیه خاک محل آزمایش

Table 1. Results of soil analysis

بافت خاک	مواد آلی	شاخص واکنش	فسفر	پتاسیم	سدیم	هدایت الکتریکی
Soil Texture	Organic matter (%)	pH	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Na (mg/kg)	EC (dS/m)
لومی	0.68	7.76	60.00	42.35	98.00	3.10

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان گلبرگ

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ از روش DPPH استفاده شد (Brand-Williams et al., 1995). پس از تهیه عصاره گلبرگ زعفران، دو میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۰/۱۵ میلی‌مولار DPPH به لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر عصاره اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ ثانیه جهت میکس شدن با دستگاه ورتکس، مخلوط سپس به مدت ۲۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق تثبیت گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (UNICO) خوانده شد. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید.

= فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

۱۰۰ × (عدد قرائت شده / جذب نمونه شاهد) - ۱

از آماده‌سازی عصاره گیاهی در دو بافر پتاسیم کلرید و کلریدریک اسید، با اسیدیته ۱ و سدیم استات و کلریدریک اسید با اسیدیته ۴/۵، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۱۰ و ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. میزان آنتوسیانین از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$A = (A_{MAX} - A_{700nm}) pH_1 - (A_{MAX} - A_{700nm}) pH_{4.5}$$

$$\text{کل آنتوسیانین (mg/L)} = A \times MW \times DF \times 1000 / \epsilon \times d$$

$$A_{max} = \text{جذب در طول موج } 510 \text{ DF} = \text{درجه رقت (10)}$$

$$\epsilon = 15600$$

$$MW = \text{وزن مولکولی پلارگونیدین 3- گلیکوزاید:}$$

$$433/39 \text{ گرم بر مول.}$$

اندازه‌گیری پیکروسین، کروسین و سافرانال کلاله زعفران

متابولیت‌های ثانویه اصلی کلاله زعفران شامل کروسین (عامل رنگ)، پیکروکروسین (عامل طعم) و سافرانال (عامل عطر) به روش اسپکتروفوتومتری طبق استاندارد ملی ایران (INS, 2006) اندازه‌گیری شدند. بر اساس این روش، ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه کلاله پودر شده با استفاده از آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد، سپس این ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی با کمک دور متوسط همزن مغناطیسی حل شد و میزان جذب در طیف‌های ۲۵۷ (پیکروکروسین)، ۳۳۰ (سافرانال) و ۴۴۰ (کروسین) نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شدند. سپس اعداد بدست آمده در فرمول $X = A/M \times 100$ قرار داده شد.

$$X = \text{میزان ترکیب کیفی مشخص بر حسب درصد، } A =$$

عدد قرائت شده توسط دستگاه، $M =$ وزن خشک کلاله بر حسب میلی‌گرم. در پایان تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار آماری SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر انجام شد.

اندازه‌گیری فنول گلبرگ

محتوی فنول کل با استفاده از روش گالیک اسید و معرف فولین سیکالتو محاسبه شد (Chuah et al., 2008). نیم میلی‌لیتر از نمونه گلبرگ زعفران را به لوله آزمایش منتقل و بعد از ۵ دقیقه ۰/۵ میلی‌لیتر فولین سیکالتو به آن اضافه شد، سپس ۲ میلی‌لیتر بی‌کربنات سدیم (۲۰۰ گرم در لیتر) به آن اضافه شد. محلول را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته و ۱۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه (آب مقطر) به آن اضافه شد. محلول به مدت ۵ دقیقه در سانتیفریوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و در نهایت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و طول موج ۷۲۵ نانومتر، میزان جذب نمونه قرائت شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن خشک محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین گلبرگ

میزان آنتوسیانین گلبرگ زعفران با استفاده از روش اختلاف pH بین دو سیستم بافری بر اساس روش (Giusti and Wrolstad, 2003) اندازه‌گیری شد. در این روش پس

نتایج و بحث

تعداد و عملکرد گل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، که اثر سطوح مختلف نیتروکسین بر تعداد و عملکرد گل زعفران در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، هر دو سطح نیتروکسین مورد مطالعه منجر به افزایش تعداد گل و عملکرد گل در هکتار شدند، بطوری که بیشترین تعداد گل و عملکرد گل در هکتار به ترتیب ۶/۶۶ عدد و ۵۷۸۴ گرم از تیمار ۵ لیتر نیتروکسین در هکتار به دست آمد اما اختلاف معنی‌داری بین سطح ۵ لیتر و ۱۰ لیتر نیتروکسین مشاهده نشد. کمترین تعداد گل و عملکرد گل نیز از تیمار شاهد و به ترتیب به میزان ۵ عدد و ۴۱۰۰ گرم به دست آمد (جدول ۳).

مشابه نتایج به دست آمده (Sharaf-Eldin et al., 2008) طی تحقیقی در زعفران اعلام کردند بیشترین تعداد گل مربوط به مصرف کود نیتروکسین و کمترین آن مربوط به عدم مصرف کود زیستی بود. گلزاری (۱۳۹۵) نیز بیان کردند کاربرد کودهای زیستی باعث افزایش تعداد و عملکرد گل زعفران شد. باکتری‌های موجود در نیتروکسین نقش‌های متفاوتی دارند، یعنی علاوه بر کمک به جذب

عنصری خاص باعث جذب سایر عناصر، کاهش بیماری‌ها، بهبود ساختمان خاک، تحریک بیشتر رشد گیاه و افزایش کمی و کیفی محصول می‌شوند (امیدی و همکاران، ۱۳۸۸). از طرفی کود زیستی از طریق ترشحات حل‌کننده باکتری‌ها و کاهش pH توانسته است عناصر مختلف غذایی بیشتری را به صورت محلول در اختیار گیاه قرار داده (Han et al., 2006) و در افزایش تولید مؤثر واقع شود (Kucey, 1998). همچنین، نیتروکسین موجب تثبیت نیتروژن هوا، متعادل‌تر کردن جذب عناصر اصلی پرمصرف و ریزمغذی مورد نیاز گیاه، سنتز و ترشح هورمون‌های رشد گیاه (شبه اکسین)، اسیدهای آمینه مختلف و آنتی بیوتیک‌ها شده و از این طریق نیز توانسته موجب رشد و توسعه ریشه و اندام هوایی و زایشی زعفران شده (Gutierrez- Manero et al., 2001) که در نتیجه، می‌تواند باعث افزایش تعداد و عملکرد زعفران گردد (Alipur et al., 2013).

پیکروکروسین، کروسین، سافرانا

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غوطه‌ور کردن پدازه‌ها در نیتروکسین باعث افزایش معنی‌دار پیکروکروسین در سطح احتمال ۵ درصد، و کروسین و سافرانا در سطح احتمال ۱ درصد شد (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف نیتروکسین بر خصوصیات کمی و کیفی زعفران

Table 2. Analysis of variance of the effect of nitroxin on quantitative and qualitative characteristics of saffron.

تعداد گل	عملکرد گل	پیکروکروسین	کروسین	سافرانا	درجه آزادی	منابع تغییرات
Number of flower	Yield of flower	Picrocrocin	crocrocin	Safranal	df	Source of variance
0.33 ^{ns}	217202.70 ^{ns}	2.01 ^{ns}	24.58 ^{ns}	0.44 ^{ns}	2	بلوک
2.33*	2365375.6*	94.10*	337.46**	52.41**	2	تیمار
0.16	317827.70	6.60	6.66	2.79	4	خطای آزمایشی
						Test error

ns, *, ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

ns, ** and * are non-significant and significant at the 0.01 and 0.05, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف نیتروکسین بر خصوصیات کمی و کیفی زعفران

Table 3. Comparison of mean of quantitative and qualitative characteristics of saffron affected by nitroxin.

تعداد گل	عملکرد گل	پیکروکروسین	کروسین	سافراناال	تیمار
Number of Flower	Yield of flower (g/ha)	Picrocrocin (%)	crocoicin (%)	Safranal (%)	Treatment
5.00 ^b	4100.00 ^b	24.78 ^b	27.13 ^b	11.00 ^b	شاهد Control
6.66 ^a	5784.00 ^a	29.46 ^b	46.57 ^a	17.00 ^a	۵ لیتر نیتروکسین در هکتار 5 liters per hectare nitroxin
6.33 ^a	5430.00 ^a	35.93 ^a	29.49 ^b	19.00 ^a	۱۰ لیتر نیتروکسین در هکتار 10 liters per hectare nitroxin

میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Means in each column, followed by similar letter (s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan multiple range test.

حاوی ازتوباکتر و آزوسپریلیوم، مقدار اسانس را در مقایسه با تیمار شاهد بطور معنی‌داری افزایش داده است (Mahfouz and Sharaf-Eldin, 2007).

Fatma et al., (2006) در آزمایشی روی گیاه مرزنجوش نشان دادند که کودهای بیولوژیک شامل ازتوباکتر، آزوسپریلیوم روی شاخص‌های رشدی و میزان اسانس آن اثرات قابل توجهی دارد. نتایج تحقیقات نشان داد که به دلیل اثرات کود زیستی نیتروژن بر فراهمی ترکیبات، مواد هورمونی و ویتامین‌های محلول در آب، ایجاد حالت همکاری متقابل با سایر میکروارگانیسم‌ها و تولید ترکیبات اولیه مؤثر در بیوسنتز گلوکوزئیدها و تجزیه آنها به ترکیبات ثانویه زعفران میزان این مواد در زعفران افزایش می‌یابد (Patten and Glick, 1996). از طرفی دیگر اسانس‌های تریپنئیدی نظیر فیتوالکسین‌ها و سافراناال، نیاز مبرم به ترکیبات فسفردار دارد. لیکن جهت تأمین انرژی لازم (ATP و NADPH) برای چرخه‌های آن به نیتروژن وابسته است (Loomis and Corteau., 1972). بنابراین، نیتروکسین به عنوان یک کود بیولوژیک می‌تواند باعث افزایش جذب نیتروژن شود (Rojas et al., 2001). و در نتیجه آن انرژی لازم برای ساخت ترکیبات ثانویه گیاه تأمین شده و تولید این ترکیبات بالا می‌رود.

بطوری که بیشترین میزان پیکروکروسین ۳۵/۹۳ درصد از تیمار پدازه‌ها در ۱۰ لیتر در هکتار نیتروکسین حاصل شد و کمترین آن از تیمار شاهد و به میزان ۲۴/۷۸ درصد به دست آمد. در این آزمایش تیمار ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین توانست بیشترین مقدار کروسین را به میزان ۴۶/۵۷ تولید نماید و در مقابل تیمار شاهد با تولید ۲۷/۱۳ درصد کمترین مقدار کروسین را تولید نمود. از طرفی افزایش میزان نیتروکسین مصرفی به ۱۰ لیتر نتوانست اثرات مثبتی روی افزایش میزان سافراناال داشته باشد، زیرا با وجود اینکه بیشترین میزان سافراناال از تیمار غوطه‌وری پدازه‌ها با ۱۰ لیتر در هکتار نیتروکسین به میزان ۱۹ درصد افزایش نسبت به شاهد به دست آمد، اما بین دو تیمار ۵ و ۱۰ لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). مشابه این آزمایش مصرف نیتروکسین سبب افزایش میزان پیکروکسین و سافراناال در کلاله زعفران شد همچنین، تأثیر نیتروکسین بر کیفیت کلاله بسیار بیشتر از کودهای شیمیایی برآورد شد. مصرف نیتروکسین روی بهبود خصوصیات کیفی دیگر گیاهان دارویی نیز به اثبات رسیده است (امیدی و همکاران، ۱۳۸۸). بطوریکه Leithy et al (2006) اثر مثبت ازتوباکتر بر افزایش میزان اسانس گیاه دارویی رزماری را گزارش نمودند. در تحقیقی دیگر که در گیاه رازیانه انجام شد، مشاهده گردید که کاربرد کودهای زیستی

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف نیتروکسین بر خصوصیات کمی و کیفی زعفران

Table 2. Analysis of variance of the effect of nitroxin on quantitative and qualitative characteristics of saffron.

منابع تغییرات	درجه آزادی	آنتوسیانین	فنول	آنتی اکسیدان
Source of variance	df	Anthocyanins	Phenols	Antioxidants
بلوک	2	4.12 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.50 ^{ns}
Blok				
تیمار	2	54.53*	7.10*	66.52*
Treatment				
خطای آزمایش	4	4.95	0.98	5.53
Test error				

ns, *, ** : به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, ** and * are non-significant and significant at the 0.01 and 0.05, respectively.

آنتی اکسیدان

عناصر غذایی خاک، بهبود ظرفیت نگهداری آب، بهبود دانه‌بندی خاک و افزایش ظرفیت تامپونی خاک در برابر تغییر اسیدیته، شوری، حشره‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و عناصر سنگین می‌شود. با توجه به تحقیقات Rimmer (2006) که گزارش کرد حاصلخیزی خاک می‌تواند باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان گیاه شود افزایش میزان آنتی‌اکسیدان زعفران منطقی به نظر می‌رسد.

فنول

میزان فنول با کاربرد کود نیتروکسین در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین مقدار فنول از تیمار ۱۰ لیتر در هکتار نیتروکسین و به میزان ۸۳/۲۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم و کمترین آن از تیمار شاهد و به میزان ۷۷/۲۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم به دست آمد. در این آزمایش بین تیمار شاهد و ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵). مشابه این آزمایش نوربخش و همکاران (۱۳۹۲) بیان کردند نیتروکسین علاوه بر قرار دادن ازت بیشتر در اختیار گیاه با تولید و ترشح هورمون‌های محرک رشد و ویتامین‌ها در اطراف ریشه منجر به افزایش میزان فنول گیاه رزماری شد.

نتایج تجزیه واریانس حاکی از اثر معنی‌دار اعمال کود نیتروکسین بر افزایش میزان آنتی‌اکسیدان در سطح ۵ درصد بود (جدول ۴). در این آزمایش بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان از تیمار ۱۰ لیتر در هکتار نیتروکسین و به میزان ۳۵/۶۶ درصد و کمترین آن از تیمار شاهد و به میزان ۲۴/۲۶ درصد به دست آمد و بین تیمار شاهد و ۵ لیتر نیتروکسین در هکتار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵). این نتایج با مطالعات قربان‌پور و همکاران (۱۳۹۴) که نشان دادند باکترهای محرک رشد باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه مریم‌گلی شد و نتایج Reganold et al (2010) که گزارش کردند گوجه‌فرنگی‌های حاصل از مزارع ارگانیک در مقایسه با تیمارهای کودی معمول ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند مطابقت داشت. مواد مؤثره در گیاهان اساساً با هدایت فرآیندهای ژنتیکی و تحت تأثیر آنزیم‌ها و کوآنزیم‌ها ساخته می‌شوند ولی ساخت آنها بطور بارزی تحت تأثیر عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرد، به طوری که این عوامل سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و کیفیت مواد مؤثره آنها می‌گردد (امیدبگی، ۱۳۷۹). یکی از این عوامل حاصلخیزی خاک می‌باشد. نورقلی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند که ورود باکتری‌های موجود این کود به خاک، باعث افزایش بهبود ظرفیت تبادل

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف نیتروکسین بر خصوصیات کمی و کیفی زعفران

Table 3. Comparisons of means of the effect of different levels of nitroxin on quantitative and qualitative characteristics of saffron.

تیمار	آنتوسیانین	فنول	آنتی اکسیدان
Treatment	Anthocyanin (mg/100g)	Phenols (mg/100g)	Antioxidants (%)
شاهد Control	15/44b	77.23 ^b	24.26 ^b
۵ لیتر نیتروکسین در هکتار 5 liters per hectare nitroxin	21.26 ^a	79.20 ^b	26.46 ^b
۱۰ لیتر نیتروکسین در هکتار 10 liters per hectare nitroxin	23.74 ^a	83.26 ^a	35.66 ^a

میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means in each column, followed by similar letter (s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan multiple range test.

نیتروکسین توانست بیشترین مقدار آنتوسیانین را به میزان ۲۳/۷۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم تولید کند، با این وجود بین تیمار ۱۰ و ۵ لیتر نیتروکسین در هکتار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین میزان آنتوسیانین نیز در تیمار شاهد و به میزان ۱۵/۴۴ میلی‌گرم در صد گرم مشاهده شد (جدول ۵). این نتایج با نتایج تحقیقات به دست آمده که نشان داد، افزایش ۲ کیلوگرم نیتروکسین در هکتار باعث افزایش میزان آنتوسیانین در گیاه تاج خروس شد (Rahi, 2013) و نتایج محققین که بیان کردند کودهای زیستی باعث افزایش میزان آنتوسیانین در توت‌فرنگی شد مطابقت داشت (Pesakovic et al., 2013).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده و شرایط محیطی و خاک این آزمایش، می‌توان از کود زیستی نیتروکسین به عنوان کودی مناسب برای افزایش عملکرد کمی (عملکرد گل) و خواص آنتی‌اکسیدانی و مواد مؤثره زعفران استفاده کرد. ضمناً با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد استفاده از ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین برای این آزمایش به

در تحقیقی دیگر افزایش در میزان نیتروژن (نیتروکسین) سبب افزایش ترکیبات فنولی در گیاه *Athrixia phylicoides* L. شد (Fhatuwani, 2007). چنانچه رشد در شرایط بهینه قرار داشته باشد میزان سنتز ترکیب‌های ثانویه‌ای مانند ترکیب‌های فنلی در گیاه پایین آمده و گیاه در شرایط مقابله با تنش‌ها و بیماری‌ها قرار می‌گیرد و زمانی که منابع محیطی مانند عناصر غذایی دستخوش تغییرات شدید قرار گیرد تولید ترکیب‌های ثانویه مانند ترکیب‌های فنلی افزایش می‌یابد (Taiz and Zeiger., 2006). بنابراین، با توجه به اینکه بین سطح ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین و عدم کاربرد نیتروکسین (شاهد) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین، اثرات مفیدتری که تیمار ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین روی دیگر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در این آزمایش داشته، کاربرد این سطح کودی را می‌توان توصیه کرد.

آنتوسیانین

تیمار کود نیتروکسین بر میزان آنتوسیانین گلبرگ زعفران در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تیمار ۱۰ لیتر در هکتار

صرفه‌تر و کارآمدتر می‌باشد.

منابع

- امید بیگی، ر. ۱۳۷۹. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد ۱. انتشارات فکر روز.
- امیدی، ح.، ح. نقدی بادی، ع. گلزاد، ح. ترابی، و فتوکیان م. ح. ۱۳۸۸. تأثیر کود شیمیایی و زیستی نیتروژن بر عملکرد کمی و کیفی زعفران (*Crocus sativus L.*). فصلنامه گیاهان دارویی شماره ۸ صص ۹۸-۱۰۹.
- پوراکبر، ل.، خیامی، م.، و جلیل، خ. ۱۳۸۷. بررسی اثرات متقابل مس و EDTA بر نشت یون پتاسیم و میزان برخی عناصر در ریشه و اندام هوایی دانه رست‌های ذرت. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم. صص ۱۲۱-۱۳۲.
- پیرانوشه، ا.، امام، ی.، و جمالی، ر. ۱۳۸۹. مقایسه تأثیر کود زیستی با کود شیمیایی بر رشد، عملکرد و مقدار روغن آفتابگردان (*Helianthus annuus L.*) در سطوح مختلف تنش شوری. مجله اکولوژی کشاورزی. شماره ۲ صص ۴۹۲-۵۰۱.
- قربان‌پور، م.، حاتمی، م.، و عبایی، ف. ۱۳۹۴. فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی عصاره متانولی از مریم گلی تلقیح گیاه با انواع باکتری‌های محرک رشد. چهارمین کنگره بین‌المللی گیاهان دارویی. تهران-ایران.
- کوچکی، ع.، جهانی، م.، تبریزی، ل.، و محمدآبادی، ا. ۱۳۹۰. بررسی اثر کود زیستی، کود شیمیایی و تراکم بوته بر عملکرد و بیه زعفران. مجله آب و خاک. شماره ۲۵ صص ۱۹۶-۲۰۶.
- گلزاری، م. ۱۳۹۵. تأثیر کود زیستی و وزن پدازه مادری بر رشد، گلدهی و عملکرد کلاله و معیارهای کیفی زعفران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.
- نقدی بادی، ع.، امیدی، ح.، ح. گلزاد، ح. ترابی، و فتوکیان م. ح. ۱۳۹۰. تغییرات کروسین، سافرانال و محتوای پیکروکروسین بر صفات زراعی زعفران (*Crocus sativus L.*) تحت شرایط بیولوژیک و شیمیایی کود فسفر. فصلنامه گیاهان دارویی. شماره ۴ صص ۵۸-۶۸.
- نوربخش، ف.، چالوی، و.، و اکبرپور، و. ۱۳۹۲. تأثیر کودهای بیولوژیک بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی گیاه دارویی زرماری. اولین همایش گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار. ۱۸ مهر.
- نورقلی‌پور، ف.، سماوات، س. و تهرانی، م. ۱۳۸۹. کاربرد ترکیب کود آلی و سیستم‌های کشاورزی پایدار. اولین کنگره چالش کود. نیم قرن مصرف کود. هتل المپیک، تهران. ایران.
- همتی کاخکی، ا.، حسینی، م. ۱۳۸۲. مروری بر زعفران. موسسه تحقیقات و فناوری توسعه. صص ۲۷-۲۹.
- Azzaz, N.A, Hassan, E.A and Hamad, E.H. 2009. The Chemical Constituent and Vegetative and Yielding Characteristics of Fennel Plants Treated with Organic and Bio-fertilizer Instead of Mineral Fertilizer. Australian. Journal of Basic and Applied Science. 3 (2): 579 – 87.
- Brand-Williams, W. Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate to antioxidant activity. Food Science Technology. 28: 25-30.
- Chuah, A. M., Lee, Y. C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L. J., and Matoba, T. 2008. Effect of cooking on the anthioxidant properties of colored peppers. Food chemistry. 111: 20-28.
- Dakoral, F.D., Matirul, V., Kingal, M., Phillipsz D.A., 2002. Plant Growth Promotion in Legumens and Cereals by Lumichrome a Rizobial Single Metabolite. Canadian Association of Business Incubation Publishing 321 pp.
- Eldin, M.S., Elkholy, S., Fernandez, J.A., Junge, H., Cheetham, R., Guardiola, J., Weathers, P., 2008. Bacillus subtilis FZB24 affects flower quantity and quality of saffron (*Crocus sativus L.*). Planta Medica. 13(74): 16-

20.

- Fatma, E.M, El-Zamik, I, Tomader, T, El- Hadidy, H.I, Abd El-Fattah, L, and Seham Salem, H. 2006. Efficiency of bio fertilizers, organic and inorganic amendments application on growth and essential oil of marjoram (*Majorana hortensis L.*) plants grown in sandy and calcareous. Agric. Microbiology Dept., Faculty of Agric., Zagazig University and Soil Fertility and Microbiology Dept., Desert Research Center, Cairo, Egypt.
- Fhatuwani, N. Mudau. 2007. Effects of Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Nutrition on Total Polyphenol Content of Bush Tea (*Athrixia phylicoides L.*) Leaves in Shaded Nursery Environment. Hortscience. 42 (2): 334 – 8.
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their application in food systems. Biochemical Engineering Journal. 14: 217-225.
- Gresta, F., Lombardo, G.M., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2008. Effect of mother corm dimension and sowing time on stigma yield, daughter corms and qualitative aspects of saffron (*Crocus sativus L.*) in a Mediterranean environment. Journal of Science Food and Agriculture 88: 1144–1150.
- Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., T adeo, F.R., T alon, M., 2001. The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiology Plantarum. 111: 206 – 211.
- Han, H., Supanjani, S., Lee, K.D., 2006. Effect of coin copulation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Journal Plant Soil and Environment. 52(3): 130-136.
- INS (Iran National Standard). 2006. Research Institute of Standard and Iran. Saffron Bulletin, No. 259.
- Juana, J.A.D., Córcolesb, H.L., Muñozb, R.M., and Picornella, M.R. 2009. Yield and yield components of saffron under different cropping systems. Industrial Crop Production. 30(2): 212-219
- Kucey, R.M.N., 1998. Effect of Penicillium bilajion the soil and uptake of P and, micronutrients from soil by wheat. Canadian Journal of Soil Science. 68, 261-70.
- Leithy, S., El-Meseiry, T.A. and Abdellah, E.F. 2006. Effect of bio fertilizers, cell stabilizer and irrigation regime on Rosemary herbage oil yield and quality. Journal of Applied Sciences Research. 2(10): 773-779.
- Loomis, W.D., and Croteau, 1972. Essential oil biosynthesis. Journal of Recent Advance in Phytochemistry. 6: 147-185.
- Mahfouz, S.A. and Sharaf-Eldin, M.A., 2007. Effect of mineral and bio fertilizer on growth, yield and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). International Agrophysics, 21(4): 361-366.
- Patriquin DG, Dobereiner J and Jain DK, 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Canadian Journal of Microbiology. 29: 900-915.
- Patten, C.L., and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology. 42: 207-20.
- Pesakovic, M, Karaklajic Stajic, Z, Milenkovic, S, Mitrovic, O. 2013. Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria × ananassa Duch.*) and soil micro-organisms. Science Hort. 150: 238–243.
- Rahi, A. R. 2013. Effect of nitroxin biofertilizer on morphological and physiological traits of *Amaranthus retroflexus*. Iranian Journal of Plant Physiology. 4 (1), 899-905.
- Reganold, J.P., Andrews, P.K., Reeve, J.R., Carpenter-Boggs, L., Schadt C.W., Alldredge, J.R., Ross, C.F., Davies, N.M., Zhou, J. 2010. Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry agroecosystems. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824185>.
- Rimmer, D.L., 2006. Free radicals' antioxidants and soil organic matter recalcitrance. European Journal of Soil Science. 57: 91- 94.
- Rojas A, Holguin G, Glick B and Bashan Y. 2001. Synergism between *Phyllo bacterium sp.* (N₂ – Fixer), and *Bacillus licheniformis* (P-Solubilizer), both from a Semiarid mangrove rhizosphere. FEMS Microbiology

Ecology. 35: 181 - 7.

Sepaskhah, A.R. and Kamgar-Haghighi, A.A. 2009. Saffron irrigation regime. International Journal of Plant Production. 3: 1-16.

Sharaf-Eldin, M.A., Elkholy, S., Fernández, J.A., Junge, H., Cheetham, R.D., Guardiola, J.L. and Weathers, P.J. 2008. The effect of *Bacillus subtilis* FZB24 on flowers quantity and quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Planta Medica*. 74 (10): 1316-1320.

Taiz, L. and Zeiger, E., 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Association, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, 764p.

Vurdu, H., Guney, K., and Cicek, F. 2004. Biology of *Crocus Olivier* sub sp *Olivier*. *Acta Horticultural*. 650: 71-85.

Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. and Wong, M.H., 2004. Effect of bio fertilizer containing N-fixer, P and K solubilizes and AM fungi on maize growth. *Geoderma*. 125: 155-166.

The effect of nitroxin on secondary metabolites in saffron (*Crocus sativus* L.)

Ali Oftadeh Fadafen¹, Mohammad Hosein Aminifard^{2*},
Farid Moradinezhad², Mohmmad Ali Behdani³

1- M.Sc. Student, Department of Horticulture, College of Agriculture of Medical Plants Physiology, University of Birjand, Iran.

2- Department of Horticultural Science, Special Plant Researches College of Agriculture, University of Birjand, Iran.

3- Associate Professor Department of saffron and Special Plant Researches College of Agriculture University of Birjand, Iran

*Corresponding Author: Mohammad Hossein Aminifard
Email: mh.aminifard@birjand.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: The most expensive medicinal spicy plant in the Middle East countries is saffron (*Crocus sativus* L.). Saffron is prepared from dried, bright red stigma and its value is determined by the color compounds, carotenoids, crocin, and other crocetinglocosyl ester, slightly bitter flavor, picrocrocin, and pleasant aroma, safranal. Nutritional management is one of the main factors affecting chemical properties and yield of saffron. The aim of this research was to investigate the effects of different rates of nitroxin on flower properties and second metabolites of saffron.

Materials and Methods: This experiment was carried out as randomized completely block design with three replications in research farm of Birjand University, Iran, during growing season 2015. Experimental factor was consisted of nitroxin (0, 5, 10 liters per ha). Mother corm planting was in early October, 2015 with 10×20 cm corms distances and planting depth of 15 cm. Flower of saffron was measured during autumn of 2015. Total phenolic was determined using the Folin-Ciocalteu assay. Free radical scavenging activity of the samples was determined using DPPH method. The main secondary metabolites' crocin, picrocrocin and safranal were measured by Spectrophotometric approach according to Iran's national standard. Finally, data analysis was done using SAS 9.1 and means were compared by duncan's multiple range test at 5% level of probability.

Results and Discussion: Use of Nitroxin was showed a significant effect on the number and flower yield was 5%. So that the greatest number and Yield Flower of treatment nitroxin 5 liters per hectare, respectively, at a rate of 6.66 per square meter and 5784 grams per hectare And least of all from the control by 5 per square meter and 4100 grams per hectare, respectively. Use of Nitroxin on the safranal (perfume) and crocin (color) Saffron significant effect at 1 percent And the picrocrocin (taste) at 5 percent, The highest rate of treatment safranal and Safranal nitroxin 5 liters per hectare, respectively, 17 and 46.57 percent and the lowest of control, respectively, 11 and 27.13 respectively. The treatment nitroxin 10 liters per hectare, an increase of 45 percent compared with the control Picrocrocin. The amount of antioxidants, phenols and anthocyanin petals were significant at the 5% level, the highest amount of antioxidants, phenols and anthocyanin in the treatment of 10 liters per hectare nitroxin by 35.66 percent, 83.26 and 23.74 mg per 100 g, respectively.

Conclusion: Generally, the findings of current study revealed that the use of nitroxin had strong impact on quantities and qualities properties saffron in this study.

Keywords: secondary metabolites, antioxidants, phenols, anthocyanin