Journal of Saffron Research

Vol. 13, No. 1, p. 141-155, 2025

10.22077/jsr.2025.9210.1271

University of Birjand

Original Article

The Effect of Different Levels of Sheep Manure and Sulfur on Biochemical Traits and Active Ingredients of Saffron (*Crocus sativus* L.)

Mohammad Hossein Aminifard[1*], Ali Khaksari Moghadam[2], Hassan Bayat[3], Hamid-Reza Fallahi[4]

1- Associate Professor, Department of Horticultural Science and the Research Center for Special Plants of the Region, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

2- MSc Student in Medicinal Plants, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

3- Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

4- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

*Corresponding author: *mh.aminifard@birjand.ac.ir*

Received: 14 April 2025, **Revised:** 21 May 2025, **Accepted:** 03 July 2025

Extended Abstract

Introduction: Saffron (*Crocus sativus* L.) is the most precious agricultural product and one of the most valuable spices and medicinal plants with many applications in the food and pharmaceutical industries. Iran is the largest producer and exporter of saffron in the world, and more than 90 percent of the world's annual saffron production is produced in Iran. Recently, concerns about the ability to maintain soil fertility and ecological stability have been raised as an important issue regarding chemical fertilizers. Animal fertilizers do not have unilateral effects, but on the one hand, they help provide nutrients, and on the other hand, they improve soil structure. Also, providing plants with the elements they need plays an important role in increasing the quality of food produced and improving the health of society. Sulfur also has the potential to reduce soil pH, at least on a small scale around soil particles, due to its capacity to oxidize and produce sulfuric acid. Therefore, it can be effective, especially in the rhizosphere region, in dissolving insoluble nutrient compounds and releasing essential elements. Therefore, using elemental sulfur as an acidifying agent is useful in increasing the ability to absorb nutrients in calcareous soils. Therefore, considering the importance of saffron as a vital economic and medicinal product of the country, the objective of this project was to simultaneously study the effect of sheep manure and sulfur on the active ingredients and biochemical traits of saffron, so that steps could be taken towards sustainable production and increasing the quality of this important medicinal plant.

Materials and Methods: This study was conducted to investigate the effect of sheep manure and sulfur on biochemical traits and active ingredients of saffron during 2018-2019 and 2019-2020 in the Sarayan region in a factorial manner and a randomized complete block design with three replications. Experimental treatments included sheep manure at four levels (0, 20, 40, and 60 t. ha^{-1}) and sulfur at three levels (0, 200, and 400

Copyright © 2025 by the authors
Published by University of Birjand. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

kg. ha^{-1}). The planting operation began in September 2018. Each plot consisted of four lines, with a distance of 25 cm between two planting lines and a distance of 5 cm between the corms on each line, and 40 corms were planted on each line. Simultaneously with the start of flowering in the second year (late November 2019), saffron flowers were harvested from the entire surface of the plots in the early morning hours, taking into account the marginal effect (half a meter away from each side of the plot). The different parts of the flower were dried naturally in the shade. After drying, the saffron stigmas harvested each day were mixed and used for testing and were prepared for measuring biochemical traits. To determine the free radical scavenging rate of saffron stigma, the radical scavenging capacity was measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging method, to measure the total phenol content of saffron stigma, the gallic acid method and Folin-Ciocalchio reagent were used, the anthocyanin of stigma was measured using the differential pH method, to measure the qualitative compounds present in flower stigma, the Iranian national standard method was used, and the chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid amounts were measured using the Arnon method. Statistical analysis of the data was performed using SAS 9.4 software. Data comparison was also performed using the protected Duncan's multiple range test at a probability of 5%.

Results and Discussion: The results demonstrated that sheep manure and sulfur had a significant impact on the biochemical characteristics of stigma (antioxidant, phenol, and anthocyanin), effective substances of stigma (picrocrocin, crocin, and safranal), and biochemical characteristics of leaves (chlorophyll a, b, total, and carotenoid) of saffron. The treatment of 60 t. ha^{-1} of sheep manure has the highest amounts of antioxidants (30.46%), phenol (62.52 mg. 100 g dry $weight^{-1}$), anthocyanin (33.41 mg. 100 g dry $weight^{-1}$), picrocrocin (33.00 absorption of 1% aqueous solution at 257 nm), crocin (285.667 absorption of 1% aqueous solution at 440 nm), safranal (34.56 absorption of 1% aqueous solution at 330 nm) and chlorophyll b (0.048 mg. g fresh $weight^{-1}$). With a consumption of 400 kg. ha^{-1} of sulfur, antioxidant 12.31%, phenol 0.35%, anthocyanin 31.56%, picrocrocin 30.95%, crocin 48.48%, safranal 11.23%, chlorophyll a 16.80%, Chlorophyll b 8.33%, and carotenoid 16.14% increase compared to the control. Also, the highest amount of phenol (62.73 mg. 100 g dry $weight^{-1}$), anthocyanin (29.63 mg. 100 g dry $weight^{-1}$), crocin (287.33 absorption of one percent aqueous solution at 440 nm), safranal (38.81 absorption of one percent aqueous solution at 330 nm), total chlorophyll (1.026 mg. g fresh $weight^{-1}$) and carotenoid (1.026 mg. g fresh $weight^{-1}$) at the level of 60 t. ha^{-1} of sheep manure and 400 kg. ha^{-1} sulfur was obtained.

Conclusion: The findings of this experiment indicated that sheep manure and sulfur positively influenced the biochemical traits and active components of saffron.

Conflict of Interest: The authors declare no potential conflict of interest related to the work.

Keywords: Chlorophyll, Crocin, Organic fertilizer, Picrocrocin, Saffron, Safranal.

نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد سیزدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۴
شماره صفحه: ۱۵۵-۱۴۱
doi 10.22077/jsr.2025.9210.1271

مقاله پژوهشی

تأثیر سطوح مختلف کود دامی و گوگرد بر صفات بیوشیمیایی و مواد مؤثره زعفران (*Crocus sativus* L.)

محمدحسین امینی‌فرد[۱*]، علی خاکساری‌مقدم[۲]، حسن بیات[۳]، حمیدرضا فلاحی[۴]

۱- دانشیار، گروه علوم باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گرایش فیزیولوژی گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۴- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، گروه پژوهشی گیاه و تنش‌های محیطی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

*نویسنده مسئول: *mh.aminifard@birjand.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۵؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۲

چکیده

این تحقیق، به‌منظور بررسی تأثیر کود گوسفندی و گوگرد بر صفات بیوشیمیایی و مواد مؤثره زعفران طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ و ۱۳۹۹-۱۳۹۸ در منطقه سرایان به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل کود گوسفندی در چهار سطح (۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ تن در هکتار) و گوگرد در سه سطح (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار) بودند. نتایج نشان داد که کود گوسفندی و گوگرد بر صفات بیوشیمیایی کلاله (آنتی‌اکسیدان، فنول و آنتوسیانین)، مواد مؤثره کلاله (پیکروکروسین، کروسین و سافرانال) و صفات بیوشیمیایی برگ (کلروفیل *a*، *b*، کل و کاروتنوئید) زعفران معنی‌دار شد. تیمار ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان (۳۰/۴۶ درصد)، فنول (۶۲/۵۲ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک)، آنتوسیانین (۳۳/۴۱ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک)، پیکروکروسین (۳۳/۰۰ جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۲۵۷ نانومتر)، کروسین (۲۸۵/۶۶۷ جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۴۴۰ نانومتر) و سافرانال (۳۴/۵۶ جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۳۳۰ نانومتر) را به خود اختصاص داد. با مصرف ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد نیز آنتی‌اکسیدان ۱۲/۳۱ درصد، فنول ۰/۳۵ درصد، آنتوسیانین ۳۱/۵۶ درصد، پیکروکروسین ۳۰/۹۵ درصد، کروسین ۴۸/۴۸ درصد وسافرانال ۱۱/۲۳ درصد، نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین بیشترین مقدار فنول (۶۲/۷۳ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک)، آنتوسیانین (۲۹/۶۳ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) و کروسین (۲۸۷/۳۳ جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۴۴۰ نانومتر) در سطح ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پیکروکروسین، زعفران، سافرانال، کروسین، کلروفیل، کود آلی.

Copyright © 2025 by the authors
Published by University of Birjand. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گرانبهاترین محصول کشاورزی و از با ارزش‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی است که کاربردهای بسیاری در صنعت غذا و دارو دارد. ایران بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده زعفران در جهان است و بیش از ۹۰ درصد تولید سالانه زعفران دنیا در ایران تولید می‌شود. حدود ۹۰ درصد از تولید این محصول در کشور مربوط به استان‌های خراسان‌رضوی، جنوبی و شمالی می‌باشد (Koocheki & Khajeh-Hosseini, 2020). بر اساس گزارش‌های منتشرشده میزان تولید سالیانه زعفران در جهان بیش از ۴۷۲ تن است. با توجه به اینکه کشور ایران منشأ اصلی کشت این گیاه است، سهم قابل توجهی در تولید زعفران در جهان نیز دارد (بیش از ۸۸ درصد). پس از ایران کشورهای هند، یونان، افغانستان، مراکش و اسپانیا از مهمترین کشورهای تولیدکننده زعفران در دنیا به شمار می‌روند (Statistics, 2023). عمده ترکیبات دارویی این گیاه شامل کروسین‌ها، پیکروکروسین‌ها و سافرانال می‌باشند (Hosseinpour azad et al., 2016).

در سال‌های اخیر نگرانی در رابطه با قابلیت حفظ حاصلخیزی خاک و ثبات اکولوژیکی در خصوص کودهای شیمیایی به عنوان یک موضوع مهم مطرح شده است. کاربرد کودهای آلی به‌عنوان منبع غذایی گیاه تصعید آمونیاک از خاک را کنترل نموده و می‌تواند همراه با مقادیر کمتر کودهای شیمیایی استفاده گردد (Rezvani Moghaddam et al., 2013). کودهای حیوانی دارای اثرات یک‌جانبه نبوده، بلکه از یک طرف کمک به تأمین مواد غذایی می‌کند و از طرف دیگر، موجب اصلاح ساختمان خاک می‌گردند بنابراین، استفاده از کودهای آلی جهت افزایش و یا حداقل حفظ حاصلخیزی خاک و افزایش عملکرد اجتناب‌ناپذیر است (Pasban et al., 2015). همچنین کود دامی در خاک ضمن تأمین رطوبت، امکان آماده‌سازی بستر زمین را برای رشد بهتر ریشه فراهم کرده و به‌دلیل تأمین عناصر غذایی از جمله نیتروژن باعث افزایش رشد رویشی گیاه و در نهایت باعث افزایش عملکرد کمی و کیفی می‌گردد (Hammad et al., 2019). تحقیقات بسیاری به نقش کودهای آلی در افزایش متابولیت‌های ثانویه زعفران اشاره دارد. محققین نشان دادند، که بیشترین میزان هر یک از مواد مؤثره پیکروکروسین، سافرانال و کروسین در سال اول کاشت در زعفران‌های تیمار شده با کودهای آلی نظیر ورمی‌کمپوست و کمترین آنها در شاهد به‌دست آمد (Ismaeili et al., 2015). نتایج دوساله امینی‌فرد و احمدی (Aminifard & Ahmadi, 2018) نشان داد که در سال اول اجرای آزمایش کود گاوی بر مواد مؤثره کلاله (پیکروکروسین، کروسین و سافرانال) و در سال دوم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ (آنتوسیانین و فنول) و مواد مؤثره کلاله معنی‌دار شد.

همچنین فراهمی عناصر مورد نیاز گیاهان نقش مهمی در افزایش کیفیت مواد غذایی تولیدی و بهبود سلامتی جامعه دارد (Ahmadi et al., 2012). گوگرد یکی از عناصر ضروری مورد نیاز گیاهان است که در سال‌های اخیر کمتر مورد توجه قرار گرفته است. کاهش مصرف گوگرد و از سوی دیگر افزایش روزافزون استفاده از کودهای NPK باعث برهم خوردن تعادل عناصر غذایی از جمله گوگرد در خاک‌های کشاورزی شده است، به‌طوری‌که به‌دلیل کمبود گوگرد، تولید برخی پروتئین‌ها و ویتامین‌های ضروری گیاهان با مشکل مواجه شده است (Rezvani Moghaddam et al., 2015). گوگرد همچنین به‌دلیل ظرفیت اکسیده شدن و تولید اسیدسولفوریک، پتانسیل لازم برای کاهش pH خاک حداقل در مقیاس کوچک اطراف ذرات خاک را دارد. بنابراین، این عنصر می‌تواند به‌خصوص در منطقه ریزوسفر در انحلال ترکیبات غذایی نامحلول و آزاد شدن عناصر ضروری مؤثر واقع شود. بنابراین استفاده از گوگرد عنصری به‌عنوان یک ماده اسیدزا به‌منظور افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی در خاک‌های آهکی کاربرد دارد (Karimi et al., 2012).

با توجه به بالا بودن pH خاک در مناطق خشک و نیمه-خشک استفاده از گوگرد برای تنظیم این شاخص و در نتیجه افزایش حلالیت بسیاری از عناصر غذایی سودمند است. ضمن اینکه گوگرد جزو عناصر غذایی پرمصرف است و کمبود آن در خاک می‌تواند بازدارندهٔ رشد مطلوب گیاه باشد. با این وجود، برای اینکه حداکثر اثرگذاری از مصرف گوگرد حاصل شود، بایستی این عنصر ابتدا در خاک اکسید شود. جهت تحریک عوامل بیولوژیک موثر در اکسیداسیون گوگرد، فراهمی مادهٔ آلی در خاک مهم می‌باشد. بر این اساس، در آزمایش کنونی مصرف همزمان گوگرد و مادهٔ آلی مورد توجه قرار گرفت، تا با افزایش

محتوای ماده آلی خاک از طریق کاربرد کود دامی، اکسیداسیون گوگرد تسهیل شود. از این‌رو، هدف از اجرای این تحقیق، مطالعه تأثیر کاربرد همزمان کود گوسفندی و گوگرد بر مواد مؤثره و صفات بیوشیمیایی زعفران بود، تا بتوان در جهت تولید پایدار و افزایش کیفیت این گیاه دارویی مهم، گام برداشت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در شرایط مزرعه در سال‌های زراعی ۹۹-۹۸ و ۹۸-۹۷ به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح پایهٔ بلوک-های کامل تصادفی در شهرستان سرایان، در شمال غربی استان خراسان جنوبی انجام شد. در این آزمایش اثر استفاده از کود گوسفندی در چهار سطح (۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ تن در هکتار) و گوگرد در سه سطح (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار) به صورت مخلوط با خاک قبل از کاشت بررسی شد. گوگرد کلوخه تولید پالایشگاه خانگیران در کیسه‌های ۲۵ کیلوگرمی با درجه خلوص ۹۰ درصد و کود گوسفندی خریداری شده از دامپروری های محلی به صورت پوسیده مورد استفاده قرار گرفته است (جدول ۱). قبل از انجام آزمایش و اقدام به عملیات آماده‌سازی، نمونه‌برداری از زمین به طور تصادفی از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری برای آزمایش آنالیز خاک انجام گردید (جدول ۲).

با توجه به نتایج جدول ۲، محتوای ماده آلی خاک محل اجرای تحقیق حدود ۰/۶ درصد بود. در منابع علمی میزان مناسب ماده آلی خاک برای زعفران نزدیک به ۲ درصد پیشنهاد شده است (Fallahi & Salariyan. 2023). بنابراین، برای رسیدن به این سطح از ماده آلی، لازم بود تا عمق حدود ۲۵ سانتی‌متری خاک حدود ۴۰ تن در هکتار کود آلی استفاده شود (Fallahi & Salariyan. 2023). بر این اساس در آزمایش کنونی، کاربرد ۴۰ تن در هکتار کود دامی به عنوان سطح مورد نیاز انتخاب گردید و جهت درک کامل پاسخ زعفران به این فاکتور آزمایشی، یک سطح کودی کمتر (۲۰ تن) و یک سطح بالاتر (۶۰ تن در هکتار) از مقدار مورد نیاز نیز منظور گردید. انتخاب سطوح مصرف کود گوگرد نیز بر اساس نتایج آزمایش بساط‌پور و همکاران (Basatpour et al., 2021) صورت گرفت. با توجه به اینکه در آزمایش مذکور رشد و عملکرد زعفران با افزایش مصرف این عنصر به ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار افزایش پیدا کرد، در آزمایش کنونی علاوه بر سطح مورد اشاره یک سطح کودی بالاتر نیز منظور گردید.

جدول ۱. ویژگی‌های کود گوسفندی

Table 1. Properties of sheep manure

هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) EC ($dS.m^{-1}$)	اسیدیته Ph	نیتروژن (درصد) N (%)	پتاسیم (درصد) K_2O (%)	فسفر (درصد) P_2O_5 (%)	ماده آلی (٪) Organic matter (%)
14.580	7.74	2.00	2.70	1.50	58.00

جدول ۲. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه مورد مطالعه

Table 2. Physical and chemical properties of soil in the study area

هدایت الکتریکی (میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر) EC ($mS.cm^{-1}$)	pH	نیتروژن کل (درصد) Total nitrogen (%)	پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) K ($mg.kg^{-1}$)	فسفر (میلی‌گرم بر کیلوگرم) P ($mg.kg^{-1}$)	ماده آلی (٪) Organic matter (%)	بافت Texture	شن Sand	رس clay	سیلت Silt
8.31	7.7	0.032	270	4.5	0.64	لومی Loamy	48	18	34

عملیات آبیاری با آب چاه موتور شهرستان سرایان با EC=۱/۲ ds/m انجام پذیرفت. اولین آبیاری در ۱۵ مهر سال‌های ۹۷ و ۹۸ انجام شد و آبیاری‌های بعدی پس از پایان دوره گلدهی، و سپس در ماه‌های دی، بهمن، اسفند، فروردین و اردیبهشت هر دو سال انجام گرفت (Behdani et al., 2022). در طول مراحل اجرای آزمایش هیچ‌گونه کود شیمیایی (به جز تیمار گوگرد مورد آزمایش)، آفت‌کش و علف‌کش شیمیایی مورد استفاده قرار نگرفت و کنترل علف‌های هرز در طی دوره‌ی رشد گیاه از طریق وجین دستی انجام شد. در انتهای فصل (اواخر اردیبهشت ماه ۹۸) برگ‌های زرد شده برداشت و سپس مزرعه وارد دوره خواب تابستانی شده و در ابتدای فصل رشد بعدی و با شروع سرما (۱۵ مهر ماه ۹۸) اولین آبیاری انجام و سله‌شکنی نیز انجام گردید. همزمان با شروع گلدهی سال دوم (اواخر آبان ماه ۹۸)، گلهای زعفران دراولین ساعات صبح با در نظر گرفتن اثر حاشیه‌ای (نیم متر فاصله با هر ضلع کرت)، از کل سطح کرت‌ها برداشت شد و قسمت‌های مختلف گل بصورت طبیعی در سایه خشک شدند. بعد از خشک شدن، کلاله های زعفران برداشت شده در هر روز با هم مخلوط و برای آزمایش، مورد استفاده قرار گرفت و جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمایی آماده گردیدند.

اندازه گیری صفات بیوشیمیایی و مواد مؤثره زعفران

آماده‌سازی عصاره

به منظور آماده‌سازی عصاره جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، یک گرم کلاله خشک شده زعفران در ۱۰۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد حل شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و از قسمت روشناور محلول به عنوان عصاره زعفران استفاده گردید (Gholizade et al., 2017).

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH) کلاله زعفران: جهت تعیین میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH) کلاله زعفران از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی و با کمک ۲،۲-دی‌فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید (Turkmen et al., 2005). لذا برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۰/۱۵ میلی‌مولار DPPH به لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر عصاره کلاله زعفران اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه ورتکس مخلوط شد. بعد محلول به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق تثبیت گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (UNICO,2000,Germany) خوانده شد.

(رابطه ۱)

$$\text{آنتی‌اکسیدان} = 1 - \frac{\text{جذب نمونه شاهد}}{\text{عدد قرائت شده}} \times 100$$

اندازه‌گیری کل ترکیبات فنولی کلاله: برای اندازه‌گیری محتوی فنول کل کلاله زعفران از روش گالیک اسید و معرف فولین سیوکالچو استفاده شد. (Chuah et al., 2008). بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالچو به ۰/۵ میلی لیتر عصاره کلاله زعفران و استانداردهای گالیگ اسید اضافه و سپس به محلول حاصل ۴ میلی لیتر سدیم کربنات یک مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. سپس مقدار کل ترکیبات فنولی نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین کلاله: اندازه‌گیری آنتوسیانین کلاله به روش pH افتراقی انجام گرفت. آنتوسیانین غالب زعفران سیانیدین -۳ گلیکوزید می‌باشد و طول موج حداکثر آن ۵۲۰ می‌باشد. برای این منظور از دو بافر شامل پتاسیم کلرید و کلریدریک اسید با pH =۱ و سدیم استات و کلریدریک اسید با pH = ۴/۵ استفاده شد. نمونه‌ها با بافر به حجم رسانده شدند و سپس در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر میزان جذب برای هر دو بافر قرائت شد. میزان آنتوسیانین از رابطه زیر محاسبه گردید (Wrosotad, 1976).

(رابطه ۲)

$$A = (Amax - A700nm)pH1 - (Amax - A700)\ pH4.5$$

(رابطه ۳)

$$\text{آنتوسیانین کل}\ \frac{mg}{L} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times d}$$

A: جذب، Amax: جذب در طول موج ۵۱۰، A700: جذب در طول موج ۷۰۰، DF: درجه رقت (۱۰)، £: ۱۵۶۰۰ و MW: وزن مولکولی پلارگونیدین ۳-گلیکوزاید (۴۳۳/۳۹ گرم بر مول)، d: ۱.

اندازه‌گیری پیکرو کروسین، سافرانال و کروسین کلاله زعفران

جهت اندازه‌گیری ترکیبات کیفی موجود در کلاله گل از روش استاندارد ملی ایران (INSO 259-2, 2013) استفاده گردید. میزان مواد مؤثره زعفران (پیکروکروسین، سافرانال و کروسین) برمبنای ثبت تغییرات حاصل از چگالی نوری به ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷ (پیکروکروسین)، ۳۳۰ (سافرانال) و ۴۴۰ (کروسین) نانومتر در دمای متوسط (۲۵ درجه سانتیگراد) تعیین می‌گردد. براساس 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 به کمک دور متوسط همزن مغناطیسی حل شد و میزان جذب محلول آبی یک درصد در طیف‌های ۲۵۷، ۳۳۰ و۴۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (UNICO,2000,Germany) قرائت شدند. عدد به دست آمده در رابطه ۱ قرار داده شد و به ترتیب مقدار پیکروکروسین، سافرانال و کروسین اندازه‌گیری شد (INS, 2006).

(رابطه ۴)

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A \times 100}{M(100-H)}$$

$E_{1cm}^{1\%}$: مقدار جذب محاسبه شده بر اساس ماده خشک، A: مقدار جذب خوانده شده پس از رقیق سازی در طول موج‌های زیر:

پیکروکروسین: جذب در طول موج ۲۵۷ نانومتر، سافرانال: جذب در طول موج ۳۳۰ نانومتر، کروسین: جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر، M: جرم نمونه زعفران (گرم)، H: میزان رطوبت کلاله که معمولا بین ۱۰-۸ درصد می‌باشد.

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی برگ

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ زعفران

رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) نیز در طی فصل رشد سال دوم (اسفند ۱۳۹۸) و از برگ‌های جوان توسعه‌یافته در مرحله رشد رویشی زعفران انجام شد. اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با استفاده از روش آرنون (Arnon 1967) تعیین شد. برای این منظور ۰/۱ گرم از بافت تَر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده، سپس حجم محلول با استون به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. محلول حاضر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس میزان کلروفیل a در طول موج ۶۶۳ نانومتر، کلروفیل b در طیف جذبی ۶۴۵ نانومتر و کاروتنوئید در طیف ۴۷۰ نانومتر قرائت و اندازه‌گیری شد.

(رابطه ۵)

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645)\ V/100W$$

(رابطه ۶)

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663)\ V/100W$$

(رابطه ۷)

$$\text{Carotenoides} = 100(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/227$$

(رابطه ۸)

$$\text{Total Chlorophyll} = (20.2 \times A645 + 8.02 \times A663) \times V \times 1000/W$$

V: حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، A: جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر، W: وزن تَر نمونه بر حسب گرم

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها نیز از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلاله

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر ساده گوگرد و کود گوسفندی بر روی مقدار آنتی‌اکسیدان موجود در کلاله زعفران معنی‌دار بود (جدول ۳). کم‌ترین مقدار آنتی اکسیدان کلاله زعفران (۲۷/۲۴ درصد) در تیمار شاهد و بیش‌ترین آن (۳۰/۴۶ درصد) در تیمار ۶۰ تن در هکتار گوسفندی مشاهده شد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین اثر ساده گوگرد نیز نشان داد که بیشترین مقدار برای آنتی‌اکسیدان (۳۰/۴۷ درصد) در سطح ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار و کمترین مقدار (۲۷/۱۳ درصد) در سطح شاهد بود (جدول ۵). کود گوسفندی حاوی مواد آلی است که می‌تواند باعث افزایش مواد مغذی خاک و در نتیجه افزایش جذب عناصر توسط گیاهان شود. این مواد مغذی می‌توانند در تولید آنتی‌اکسیدان‌ها نقش داشته باشند. به عنوان مثال، مواد آلی در خاک می‌توانند باعث افزایش جذب نیتروژن و فسفر شوند که هر دو برای تولید آنتی‌اکسیدان‌ها ضروری هستند. گوگرد نیز یک عنصر غذایی مهم برای گیاهان است و در سنتز بسیاری از ترکیبات آلی، از جمله پروتئین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، نقش دارد. کمبود گوگرد می‌تواند باعث کاهش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و آسیب اکسیداتیو در گیاهان شود.

نتایج مشابهی با پژوهش ما نیز، توسط محققین گزارش شده است. مثلاً ریگانولد و همکاران (Reganold et al., 2010) گزارش کردند که، کاربرد کودهایی با پایه جانوری و گیاهی (آلی) بر مقدار آنتی‌اکسیدانی گیاه اثر معنی‌داری 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، به‌طوری‌که این عوامل سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و کیفیت مواد مؤثره آنها می‌گردد (Omid Beygi et al., 2000). ریمیر (Rimmer, 2006) گزارش کرد که حاصلخیزی و وجود مواد آلی در خاک می‌تواند باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان گیاه شود و با توجه به این‌که کود دامی هم می‌تواند این نقش را ایفا نماید لذا افزایش میزان آنتی‌اکسیدان زعفران منطقی به نظر می‌رسد.

میزان فنول کلاله

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل کودهای گوسفندی و گوگرد بر محتوای فنول کلاله معنی‌دار بود (جدول ۳). در مورد اثرات متقابل کمترین سطح فنول (۶۲/۳۸ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) مربوط به تیمار شاهد و بیشترین سطح (۶۲/۷۳ میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) با مصرف ۶۰ تن کود گوسفندی با ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار کود گوگرد حاصل شد (جدول ۶).

مشابه نتایج این آزمایش امینی‌فرد و احمدی (Aminifard & Ahmadi, 2018) گزارش کردند که استفاده از کود دامی تأثیر معنی‌داری بر میزان فنول گلبرگ زعفران در سال دوم آزمایش داشت. پریز-لوپز و همکاران (Pérez-López et al., 2007) نیز، با کاربرد کود آلی، افزایش میزان فنول را، در مقایسه با تیمار شاهد، مثبت گزارش نمودند. در خصوص افزایش فنول، تور و همکاران (Toor et al., 2006) اظهار داشتند که به خاطر استفاده از کودهای آلی، میزان قند و کربن در گیاه افزایش می‌یابد، لذا قند اضافی که در گیاه تولید می‌شود، در ساختمان متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات فنولی استفاده می‌شود که در نهایت باعث افزایش میزان فنول در گیاه می‌گردد. لذا افزایش عناصر غذایی در خاک تیمار شده با کودهای دامی منجر به افزایش میزان فتوسنتز خالص در گیاه و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر با بیوسنتز نشاسته و پروتئین در سنتز ترکیبات ثانویه می‌گردد (Ghasemzadeh et al., 2011; Müller et al., 2013). از طرف دیگر افزایش ترکیبات فنلی با افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در گیاه ارتباط مستقیم دارد از آنجا که هیدرات‌های کربن اسکلت مورد نیاز برای ساخت ترکیبات فنلی شناخته شده‌اند لذا افزایش در مقدار آنها به عنوان افزایش سوبسترا برای ترکیبات فنلی می‌باشد که این امر ممکن است به اختصاص یافتن بیشتر کربن به مسیر شیکمیک اسید مربوط باشد (Nguyen et al., 2010).

میزان آنتوسیانین کلاله

مطابق جدول تجزیه واریانس میزان آنتوسیانین کلاله زعفران به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثرات ساده و متقابل تیمارهای مصرف کود گوسفندی و گوگرد قرار گرفت (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن

بود که بیشترین میزان آنتوسیانین در تیمار مصرف ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد و کمترین میزان آن در تیمار عدم مصرف کود گوسفندی و گوگرد (شاهد) حاصل شد (جدول ۶).

مشابه نتایج این آزمایش، گندی و همکاران (Gendy et al., 2012) در بررسی تأثیر کود آلی و کود زیستی بر خصوصیات بیوشیمیایی چای ترش اظهار داشتند که حداکثر میزان آنتوسیانین از مصرف کود آلی به دست آمد. همچنین برخی محققین نیز افزایش میزان آنتوسیانین گیاه را در نتیجه استفاده از کودهای آلی گزارش کردند (Gharib et al., 2011). تئونیسن و همکاران (Theunissen et al., 2010) بیان کردند که استفاده از کودهای آلی به واسطه مقادیر بالای ترکیبات هیومیکی، باعث سنتز ترکیبات فنولی مثل فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در گیاهان می‌شود و همچنین از آنجایی‌که مسیر سنتز آنتوسیانین، فنل و فلاونوئید مشابه بوده و توسط آنزیم PAL که به عنوان آنزیم محرک بیوسنتز طیف وسیعی از ترکیبات فنیل پروپان است، انجام می‌گیرد (Jeong et al., 2004)، لذا افزایش میزان ترکیبات فنولی تحت تأثیر کود دامی در افزایش میزان آنتوسیانین نیز مؤثر است که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. آنتوسیانین‌ها ترکیبات گلیکوزیدی هستند که وجود قند برای تشکیل آنها ضروری است استفاده از کودهای دامی سبب بهبود خصوصیات فیزیکی خاک افزایش جذب عناصر توسط ریشه‌ها، تولید پیکر رویشی بیشتر و سطح فتوسنتزی بالاتر، تولید کربوهیدرات بیشتر و در نهایت سبب افزایش تولید آنتوسیانین می‌گردد (Hapkins, 1999).

جدول۳. نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برای خصوصیات بیوشیمیایی و مواد مؤثره کلاله زعفران

Table 3. Results of analysis of variance (mean square) for biochemical properties and active ingredients of saffron stigma

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	سافرانال Safranal	کروسین Crocin	پیکروکروسین Picrocrocin	آنتوسیانین Anthocyanins	فنول Phenols	آنتی اکسیدان Antioxidants
بلوک Block	2	18.200 ns	20.801ns	8.97ns	5.200ns	0.0004 ns	0.177ns
کود گوسفندی Sheep manure	3	180.213**	270.89**	40.987**	345.138**	0.0132**	39.35**
گوگرد Sulfur	2	168.578**	479.12*	35.406**	158.408**	0.1121**	25.32**
گوسفندی × گوگرد Sheep × Sulfur	6	8.070**	251.172**	4.894ns	20.801**	0.0072**	12.93 ns
خطا Error	--	2.478	35.11	7.515	4.9073	0.00123	2.13
ضریب تغییرات C.V.	--	3.92	16.10	6.21	12.10	0.07	52.6

ns، ** و * به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد.

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

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر کود گوسفندی بر صفات بیوشیمیایی و مواد مؤثره کلاله زعفران

Table 4. Comparison of the average effect of sheep manure on biochemical traits and active ingredients of saffron stigma

کود گوسفندی (تن در هکتار) Sheep manure (t. h^{-1})	پیکروکروسین (جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۲۵۷ نانومتر) Picrocrocin (absorption of 1% aqueous solution at 257 nm)	آنتی‌اکسیدان (درصد) Antioxidants (%)
0	19.87^{d}	27.24^{d}
20	23.37^{c}	29.25^{c}
40	25.34^{b}	29.97^{b}
60	33.00^{a}	30.46^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

In each column, means with the same letter are not different significantly at 5% probability level.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر کود گوگرد بر خصوصیات بیوشیمیایی و مواد مؤثره کلاله زعفران

Table 5. Comparison of the average effect of sulfur fertilizer on biochemical properties and active ingredients of saffron stigma

گوگرد (کیلوگرم در هکتار) Sulfur (kg. h^{-1})	پیکروکروسین (جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۲۵۷ نانومتر) Picrocrocin (absorption of 1% aqueous solution at 257 nm)	آنتی اکسیدان (درصد) Antioxidants (%)
0	23.81^{c}	27.13^{c}
200	27.40^{b}	28.25^{b}
400	31.18^{a}	30.47^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

In each column, means with the same letter are not different significantly at 5% probability level.

جدول ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل کود گوسفندی و گوگرد بر صفات بیوشیمیایی و مواد مؤثره کلاله زعفران

Table 6. Comparison of the average interaction effect of sheep manure and sulfur on biochemical traits and active ingredients of saffron stigma

کود گوسفندی (تن در هکتار) Sheep manure (t. h^{-1})	سافرانال (جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۳۳۰ نانومتر) Safranal (absorption of 1% aqueous solution at 330 nm)	کروسین (جذب محلول آبی یک درصد در طول موج ۴۴۰ نانومتر) Crocin (absorption of 1% aqueous solution at 440 nm)	آنتوسیانین (میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) Anthocyanins (mg. 100 g dry weight^{-1})	فنول (میلی‌گرم در صد گرم وزن خشک) Phenols (mg. 100 g dry weight^{-1})
0	21.54^{h}	117.33^{i}	6.61^{h}	62.38^{i}
0	24.87^{g}	192.00^{g}	12.19^{fg}	62.46^{fg}
0	9.20^{f}	266.00^{cde}	11.96^{g}	62.57^{c}
20	22.62^{h}	137.33^{h}	11.76^{g}	62.45^{fgh}
20	31.23^{e}	242.00^{ef}	14.96^{def}	62.47^{efg}
20	32.78^{de}	258.00^{de}	15.42^{de}	62.54^{cd}
40	27.54^{f}	197.33^{g}	12.99^{efg}	62.41^{hi}
40	32.70^{de}	290.00^{c}	18.60^{bc}	62.51^{de}
40	33.64^{cd}	335.33^{b}	20.92^{b}	62.49^{ef}
60	27.75^{f}	255.33^{de}	15.99^{cd}	62.57^{c}
60	36.50^{b}	272.00^{cd}	19.52^{b}	62.64^{b}
60	38.81^{a}	287.33^{a}	29.63^{a}	62.73^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

In each column, means with the same letter are not different significantly at 5% probability level.

میزان پیکروکروسین، کروسین و سافرانال کلاله

نتایج جدول (۳) مشخص کرد که میزان پیکروکروسین زعفران تنها تحت تأثیر اثرات ساده کود گوسفندی و گوگرد قرار گرفت و اثرات متقابل این دو عامل نتوانستند بر این شاخص تأثیرگذار باشند. مقایسه میانگین صفات (جدول ۴) بیانگر این است که بیشترین سطح پیکروکروسین با کاربرد ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و کمترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین با مصرف ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد بالاترین میزان پیکروکروسین و پایین‌ترین آن در تیمار عدم مصرف کود به دست آمد (جدول ۵). همانطور که نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد اثرات ساده و متقابل کود گوسفندی و گوگرد بر میزان کروسین کلاله زعفران معنی‌دار بود. بیشترین مقدار کروسین از تیمار ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار کود گوگرد و کمترین آن در تیمار شاهد حاصل شد (جدول ۶). مطابق با نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳)، کود گوسفندی و کود گوگرد توانستند میزان سافرانال را تحت تأثیر معنی‌دار خود قرار دهند حتی این شاخص تحت تأثیر اثر متقابل این دو عامل نیز قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کمترین میزان سافرانال در تیمار شاهد و بیشترین این صفت با کاربرد همزمان ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی با ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد حاصل شد (جدول ۶).

کودهای آلی به سبب بهبود شرایط خاک و فراهمی عناصر غذایی برای میکروارگانیسم‌ها و تولید ترکیبات اولیه مؤثر در بیوسنتز گلوکوزیدها و تجزیه آن‌ها به ترکیبات ثانویه توسط باکتری‌های محرک رشد، ممکن است بر عملکرد کیفی زعفران تأثیر گذاشته باشد (Loper & Schroth, 1986). رضاییان و پاسبان (Rezaian & Paseban, 2006) با مطالعه تأثیر عناصر میکرو و کود دامی روی عملکرد و کیفیت زعفران گزارش کردند که میزان کروسین در تیمار کود دامی افزایش یافته است هم چنین آن‌ها با مقایسه سطوح مختلف سولفات آهن بیشترین میزان کروسین را در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار سولفات آهن بدست آوردند. گلذاری جهان آبادی و همکاران (Golzari Jahan Abadi et al., 2017) بیان داشت تیمارهای کودی زیستی و آلی بر خصوصیات کیفی زعفران تأثیر معنی‌داری داشت و موجب بهبود سه مؤلفه کیفیت زعفران شد.

صفات بیوشیمیایی برگ زعفران

اثر ساده کود گوسفندی و گوگرد و همچنین اثرات متقابل این دو کود برمیزان کلروفیل *a* معنی‌دار بودند (جدول ۷). اثرات متقابل دو کود مصرفی نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل *a* (۰/۱۵ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) از تیمار ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد و کمترین مقدار (۰/۰۹ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) در سطح شاهد بوده است (جدول ۸).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر هر دو عامل کود گوسفندی و گوگرد و اثر متقابل آن‌ها بر میزان کلروفیل *b* معنی‌دار گردید (جدول ۷). با مشاهده جدول مقایسه میانگین اثرات متقابل نیز بیش‌ترین میزان کلروفیل *b* از مصرف توأمان ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار کود گوگرد (۰/۰۳۵ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) و کمترین مقدار (۰/۰۳۱ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) نیز مربوط به شاهد بود (جدول ۸).

جدول ۷. نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) دو فاکتور کود گوسفندی و گوگرد بر روی صفات بیوشیمیایی برگ زعفران

Table 7. Results of analysis of variance of two factors of sheep manure and sulfur on biochemical traits of saffron leaves

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	کاروتنویید Carotenoids	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a
بلوک Block	2	0.097^{ns}	1.834^{*}	0.610^{ns}	1.504^{ns}
کود گوسفندی Sheep manure	3	6.302^{**}	1.682^{**}	14.779^{**}	4.512^{**}
گوگرد Sulfur	2	2.792^{**}	24.284^{**}	13.419^{**}	4.554^{**}
گوسفندی × گوگرد Sheep × Sulfur	6	2.483^{**}	7.501^{**}	13.465^{**}	8.958^{**}

ns، ** و * به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد.

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

جدول ۸. مقایسه میانگین اثر متقابل کود گوسفندی و گوگرد بر صفات بیوشیمیایی برگ زعفران

Table 8. Comparison of the mean interaction of sheep manure and sulfur on biochemical traits of saffron leaves

کود گوسفندی (تن در هکتار) Sheep manure (t. h^{-1})	گوگرد (کیلوگرم در هکتار) Sulfur (kg. h^{-1})	کاروتنویید(میلی-گرم در گرم وزن تر) Carotenoids (mg. g fresh weight^{-1})	کلروفیل کل(میلی‌گرم در گرم وزن تر) Total chlorophyll (mg. g fresh weight^{-1})	کلروفیل b (میلی‌گرم در گرم وزن تر) Chlorophyll b (mg. g fresh weight^{-1})	کلروفیل a (میلی‌گرم در گرم وزن تر) Chlorophyll a (mg. g fresh weight^{-1})
0	0	0.611^{e}	0.864^{cd}	0.031^{d}	0.09^{e}
0	200	0.807^{cd}	1.061^{c}	0.035^{cd}	0.13^{bc}
0	400	1.016^{ab}	1.284^{a}	0.039^{bc}	0.13^{bc}
20	0	0.912^{bc}	1.149^{abc}	0.038^{bc}	0.10^{de}
20	200	0.781^{d}	1.098^{bc}	0.034^{cd}	0.12^{c}
20	400	0.910^{bc}	1.303^{a}	0.032^{ab}	0.12^{cd}
40	0	1.006^{b}	1.254^{ab}	0.038^{bc}	0.14^{ab}
40	200	0.981^{ab}	1.260^{ab}	0.032^{ab}	0.13^{bc}
40	400	0.842^{cd}	0.842^{d}	0.035^{cd}	0/13^{bc}
60	0	1.007^{ab}	1.009^{ab}	0.032^{ab}	0.13^{bc}
60	200	1.007^{ab}	1.009^{ab}	0.035^{a}	0.15^{a}
60	400	1.026^{a}	1.026^{a}	0.035^{cd}	0.13^{bc}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

In each column, means with the same letter are not different significantly at 5% probability level.

اثرات ساده و متقابل کود گوسفندی و گوگرد نیز بر میزان کلروفیل کل برگ زعفران معنی‌دار بود (جدول ۷). با توجه به اثر متقابل تیمارها، بیشترین میزان کلروفیل کل در سطح ۲۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد (۱/۰۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) بدست آمد و کمترین مقدار (۰/۸۶۴ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) در سطح شاهد مشاهده شد (جدول ۸). کود گوسفندی و گوگرد به طور جداگانه و ترکیبی می‌توانند اثر مثبتی بر کلروفیل گیاهان داشته باشند. گوگرد به عنوان یک عنصر ضروری برای تولید کلروفیل نقش دارد و می‌تواند سطح کلروفیل را در گیاهان افزایش دهد. کود حیوانی (مانند کود گوسفندی) نیز می‌تواند با تأمین مواد مغذی لازم، به رشد و توسعه گیاهان کمک کرده و در نتیجه، سطح کلروفیل را افزایش دهد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده کود گوسفندی و گوگرد و اثرات متقابل بر میزان کاروتنوئید برگ زعفران معنی‌دار بود (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که، بیشترین مقدار کاروتنوئید (۱/۰۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) مربوط به مصرف ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد بود و کمترین مقدار (۰/۶۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن تازه) نیز برای شاهد بدست آمد (جدول ۸).

مشابه نتایج این پژوهش، امینی‌فرد و همکاران (Aminifard et al., 2020) تأثیر معنی‌دار کود گاوی بر میزان کلروفیل a و کل برگ زعفران را گزارش کردند. نتایج این تحقیق بیانگر نقش مؤثر کود دامی در افزایش کلروفیل a، b و کل بود، این امر نشان‌دهنده ارتباط مثبت تغذیه صحیح گیاه با رشد و ترکیبات فیتوشیمیایی آن می‌باشد (Rasouli et al., 2014). بنابراین به نظر می-رسد کود دامی با در دسترس قرار دادن نیتروژن بیشتر برای گیاه سبب افزایش کلروفیل در این گیاه شده باشد (Amiri, 2008). همچنین افزایش در میزان کلروفیل را می‌توان، به نقش کودهای آلی (کود دامی) در افزایش فعالیت آنزیم رابیسکو (Delfine et al., 2005)، افزایش سطح برگ و افزایش میزان فتوسنتز (Balakumbahan & Rajamani, 2010) نسبت داد. گوگرد سبب آزادسازی عناصر مهمی همچون فسفر، آهن، روی و منگنز می‌شود (Rahimiyan, 2012) که این عناصر نقش بارزی در افزایش فتوسنتز دارند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش و با توجه به شرایط محیطی و خاک این آزمایش مشخص شد، کود گوسفندی و گوگرد توانسته‌اند، بر شاخص‌های کیفی و مواد مؤثره گیاه

دارویی زعفران اثر مثبت بگذارند. در این تحقیق، سطوح بالای کود گوسفندی (۶۰ تن در هکتار) و گوگرد (۴۰۰ کیلوگرم در هکتار) بیشترین تأثیر را بر خصوصیات کیفی گیاه اعمال کردند. به‌طورکلی با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد، که استفاده بهینه از کود گوسفندی و گوگرد (البته با توجه به در نظر گرفتن شرایط خاک هر منطقه و قابل جذب بودن این کودها در خاک) می‌تواند برای بهبود بخشیدن به صفات کیفی و مواد مؤثره این گیاه ارزشمند مدنظر قرار گیرد. لازم به ذکر است که عملکرد کمی و کیفی زعفران بخاطر چند ساله بودن آن، کمتر تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی در سال اول قرار می گیرد و بهتر است اثر تیمارهای آزمایش برای عملکرد، از سال دوم به بعد مورد بررسی قرار گیرد. همچنین در آزمایشات آتی از سطوح بالاتر از ۶۰ تن در هکتار کود گوسفندی و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد استفاده شود.

منابع

Ahmadi, J., Seyfi, M., & Amini, M. (2012). Effect of spraying micronutrients Fe, Zn and Ca on grain and oil yield of sesame (*Sesamus indicum* L.) varieties. *Electronic Journal of Crop Production*, 5, 115-130. [in Persian]

Aminifard, M .H., & Ahmadi, f. (2018). Effects of of fulvic acid and cow manure on stigma active components and petal Antiradical Activity of saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy and Technology*, 6(4), 415-428. [in Persian]. doi:10.22048/jsat.2017.99009.1260.

Aminifard, M. H., Ahmadi, f., & Gazel, R. (2020). Effects of different fulvic acid and cow manure levels on physiological characteristics and flower yield of saffron (*Crocus sativus* L.) in the first year. *Journal of Saffron Research*, 7(2), 299-310. doi:10.22077/jsr.2018.1013.1044.

Amiri, M. E. (2008). Impact of animal manures and chemical fertilizers on yield components of saffron (*Crocus sativus* L.). *American-Eurasian Journal of Agriculture Environmental Science*, 4(3), 274-279.

Arnon, A. J. A. J. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy journal*, 23(1), 112-121.

Balakumbahan, R., & Rajamani, K. (2010). Effect of biostimulants on growth and yield of Senna (*Cassia angustifoliavar* KKM. 1). *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 2(1), 16-18.

Basatpour , G., Kheirkhah, M., & Babaeian, M. (2021). Effect of Sulfur and Potassium Fertilizers on Yield and Yield Components of Saffron (*Crocus sativus* L.) in Kermanshah. Journal of Saffron Research 9(1), 228-242 [in Persian]

Behdani, M. A., Gerami Sadeghian, M., Eslami, S. V., & Aminifard, M. H. (2022). Evaluation of acadian seaweed extract and biomex liquid poultry on the qualitative traits and secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 10(1), 14-27.

Chuah, A. M., Lee, Y.-C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.-J., & Matoba, T. J. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*, 111(1), 20-28.

Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E., & Alvino, A. (2005). Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(2), 183-191.

Fallahi, H.R., and Salariyan, A. 2023. Evaluation of Saffron Irrigation and Nutritional Management among Different Farmers Groups Compared to Experts Recommendations. Saffron Agronomy & Technology, 10(4): 371-390. [in Persian]

Gendy, A., Said-Al Ahl, H., & Mahmoud, A. A. (2012). Growth, productivity and chemical constituents of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) plants as influenced by cattle manure and biofertilizers treatments. *Australian Journal of Basic Applied Sciences*, 6(5), 1-12.

Gharib, S., El-Mogy, M. M., Gawad, A., & Shalaby, E. A. (2011). Influence of compost, amino and humic acids on the growth, yield and chemical parameters of strawberries. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2304-2308.

Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. Z. (2011). Effect of CO_2 enrichment on synthesis of some primary and secondary metabolites in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). International Journal of Molecular Sciences, 12(2), 1101-1114.

Gholizade, Z., Aminifard, M., & Sayyari, M. (2017). Evaluating the effects of municipal waste compost and corm weight on qualitative characteristic and secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Productions*, 40(3), 53-64.

Golzari Jahan Abadi, M., Behdani, M. A., Sayyari Zahan, M. H., & Khorramdel, S. (2017). Effect of some fertilizer sources and mother corm weight on growth criteria and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 4(2), 172-186. doi:10.22077/jsr.2017.518.

Haghirossadat, F., Bernard, F., Kalantar, M., Sheikhha, M., Hokmollahi, F., Azimzadeh,

M., & Hoori, M. (2010). Bunium persicum (Black Caraway (of Yazd province: chemical assessment and Evaluation of its antioxidant effects. *SSU_Journals*, 18(3), 284-291.

Hammad, H. S., Al-Mandalawi, A. A. M., & Hamdi, G. J. (2019). Effect of manure on growth and yield of broccoli. *International Journal of Vegetable Science*, 25(4), 400-406.

Hapkins, W. (1999). *Introductin to plant physiology*. Vol 1 and 2. In: John Wiley and Sons, New York.

Hosseinpour azad, N., Nematzadeh, G. H., Gouliano, G., Ranjbar, G. A., & Yamch, A. (2016). Identification of Apo- Carotenoids' crocin and crocetin isomers in saffron crude extracts by HPLC coupled to atmospheric pressure chemical ionization and high resolution orbitrap mass spectrometry. *Saffron Agronomy and Technology*, 4(4), 291-299. [in Persian]

Ismaeili, V., Moradi, P., & Ansari, K. (2015). Changes of crocin, picrocrocin and safranal in saffron (*Crocus sativus* L.) treated with compost and biological fertilizations. Paper presented at the The first nationalconference on the use of medicinal plants and traditional medicine in life style, University of Torbat Heidariyeh, Iran, 6 December 2015.

INSO 259-2, 5th Revision. (2013). Saffron-Test metods. *Iranian National Standardization Organization*.

Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., & Esaka, M. (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167(2), 247-252.

Karimi, F ,.Bahmanyar, M. A., & Shahabi, M. (2012). Improving the content of oil, protein and some yield components of canola in two calcareous soil, consequence the sulfur and cattle manure application. *Journal of Agricultural Science Sustainable Production*, 22(3), 71-85.

Koocheki, A., & Khajeh-Hosseini, M. (2020). *Saffron: Science, Technology and Health*. 1st Edition. Woodhead Publishing.

Loper, J., & Schroth, M. (1986). Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. *In Iron, Siderophores, and Plant Diseases* (pp. 85-98): Springer.

Müller, V., Lankes, C., Zimmermann, B. F., Noga, G., & Hunsche, M. (2013). Centelloside accumulation in leaves of *Centella asiatica* is determined by resource partitioning between primary and secondary metabolism while influenced by supply levels of either nitrogen, phosphorus or potassium. *Journal of Plant Physiology*, 170(13), 1165-1175.

Nguyen, P. M., Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2010). Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 123(4), 1235-1241.

Omid Beygi, R., Sadeghi, B., & Ramezani, A. A. (2000). Effects of cultivation site on quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science Technology*, 1(3-4), 167-178.

Pasban, F., Balouchi, H., Yadavi, A., Salehi, A., Attarzadeh, M. J. J. o. A .S., & Production, S. (2015). The role organic and biological fertilizers in qualitative and quantitative yield of soybean (*Glycine max* L.) cv Williams. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 25(3), 137-149. [in Persian with English Summary].

Pérez-López, A. J., del Amor, F. M., Serrano-Martínez, A., Fortea, M. I., & Núñez-Delicado, E. (2007). Influence of agricultural practices on the quality of sweet pepper fruits as affected by the maturity stage. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 87(11), 2075-2080.

Rahimiyan, Z. (2012). Effect of sulfcrop physiologyur and thiobacillus with organic matter on quantitative and qualitative traits of canola. *Crop Physiology*, 3(12), 19-27. [in Persian]

Rasouli, Z., Maleki farahani, S., & Besharati, H. (2014). Reaction some vegetative characteristics of saffron (*Crocus sativus* L.) to various fertilizers. *Journal of Soil and Water Science*, 27(1), 35-46. [in Persian]

Reganold, J. P., Andrews, P. K., Reeve, J. R., Carpenter-Boggs, L., Schadt, C. W., Alldredge ,J. R., Zhou, J. (2010). Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry agroecosystems. *PloS one*, 5(9), e12346.

Rezaian, S., & Paseban, M. (2006). The effect of micronutrient and manure fertilizers on the quantity and quality of Khorasan saffron. Paper presented at the Second International Symposium on Saffron Biology and Technology, Mashhad, Iran, October.

Rezvani Moghaddam, P., Amiri, M., & Ehyaee, H. (2015). Effect of simultaneous application of mycorrhiza with compost, vermicompost and sulfural geranole on some quantitative and qualitative characteristics of sesame (*Sesamum indicum* L.) in a low input cropping system. *Journal of Agroecology*, 7, 563-577. [in Persian]

Rezvani Moghaddam, p., Sabouri, A., Mohammadabadi, A., & Moradi, R. (2013). Effect of chemical fertilizer, cow manure and municipal compost on yield, yield components and oil quantity of three sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars in mashhad.

Iranian Journal of Field Crops Research, 11, 241-250. [in Persian]

Rimmer, D. (2006). Free radicals, antioxidants, and soil organic matter recalcitrance. *European Journal of Soil Science*, 57(2), 91-94.

Statista. (2023). Saffron production worldwide in 2019, by leading country. Saffron: leading producers worldwide 2019 | Statista.

Theunissen, J., Ndakidemi, P. A., & Laubscher, C. P. (2010). Potential of vermicompost produced from plant waste on the growth and nutrient status in vegetable production. *International Journal of the Physical Sciences*, 13, 1964-1973.

Toor, R. K., Savage, G. P., & Heeb, A. (2006). Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition Analysis*, 19(1), 20-27.

Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food chemistry*, 93(4), 713-718.