نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد پنجم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۶
شماره صفحه: ۷۷-۶۴

رابطه بین تغییرات ترکیبات فنولی و نیتروژن در گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) در شرایط زراعی

محمد حسینی [1*] و عبداله ملافیلابی [2]
۱- مربی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد
۲- استادیار پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد
* نویسنده مسئول: E-mail: m.hosseini@rifst.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۲/۱۰

چکیده

این مطالعه با هدف ارزیابی روند تغییرات ترکیبات فنولی و نیتروژن در ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی این گیاه در طول فصل رشد، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار طی دو سال ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ انجام شد. چهار نوبت نمونه‌برداری از ریزوسفر، بنه و برگ زعفران طی مهر و بهمن ماه ۱۳۸۷ و اردیبهشت و تیر ماه ۱۳۸۸ از مزارع چهار ساله زعفران در بخش مرکزی روستای آبرود در شهرستان تربت حیدریه انجام شد. به منظور اندازه‌گیری محتوی کل ترکیبات فنولی و نیتروژن به ترتیب از روش‌های فولین-سیوکالتو و هضم کجلدال استفاده شد. نتایج نشان داد که محتوی نیتروژن و فنول اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر طی مراحل مختلف نمونه‌برداری به طور معنی‌داری متفاوت بود (P<۰/۰۵). محتوی ترکیبات نیتروژن و فنول برگ به مراتب بالاتر از بنه و ریزوسفر بدست آمد. به طوری‌که بیشترین میزان فنول، در مرحله اول، دوم، سوم و چهارم نمونه‌برداری به ترتیب برای بنه، برگ، برگ و ریزوسفر با ۱۳/۳، ۴۷/۷، ۴۸/۱۱ و ۰/۲۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد. بالاترین میزان نیتروژن در مرحله اول، دوم، سوم و چهارم نمونه‌برداری به ترتیب برای بنه، برگ، برگ و ریزوسفر با ۱/۶۰، ۲/۲۹، ۱/۱۴ و ۰/۹۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. با افزایش غلظت نیتروژن، محتوی فنول به طور خطی افزایش یافت؛ به طوری‌که ضریب همبستگی محتوی نیتروژن و فنول برابر با r^2=۰/۹۲ تعیین گردید. افزایش مصرف نیتروژن تحت تأثیر افزایش تخصیص کربن با افزایش تولید مواد فتوسنتزی موجب افزایش غلظت ترکیبات فنولی به عنوان یکی از مهمترین متابولیت‌های ثانویه گردید.**

واژه‌های کلیدی: بنه، ترکیبات زیست فعال، ریزوسفر، متابولیت ثانویه، ویژگیهای کیفی.

مقدمه

ترکیبات زیستی فعال شامل متابولیت‌هایی همچون آنتی‌بیوتیک‌ها، مایکوتوکسین‌ها، آلکالوئیدها، رنگدانه‌های غذایی، فاکتورهای رشد گیاهی، اسیدهای فنولیک و تانن‌ها هستند (Bravo, 1998). اسیدهای فنولیک یکی از رده بندی‌های مهم ترکیبات فنولی با کارکرد زیستی فعال و گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند (Bravo, 1998) که نقش مهمی در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان دارند و علاوه بر نقش تنظیم‌کنندگی در فرآیند طویل شدن سلول‌ها، در زمان ترشح از سیستم‌های ریشه‌ای گیاهان به عنوان بازدارنده نیز عمل می‌نمایند (Kefeli et al., 2003). ترکیبات فنولی (PCs)[1] گروه متنوعی از مواد شیمیایی هستند که در ویژگی حضور حداقل یک حلقه آریل[2] در اتصال با یک حلقه هیدروکسیل[3] مشترک هستند (Bravo, 1998). این ترکیبات دارای وزن مولکولی کم بوده و با حضور در بافت‌های گیاهان عالی، برای رشد و نمو گیاهان اهمیت بسیار زیادی دارند (Makoi & Ndakidemi, 2007). ترکیبات فنولی سنتز شده در گیاهان و خاک بصورت پلیمرها و مونومرها وجود دارند (Asami et al., 2003). این ترکیبات همچنین به عنوان بازدارنده طبیعی در مقابل علفخواران یا مهارکننده جوانه‌زنی قبل از برداشت عمل می‌نمایند (Haslam & Lilley, 1988; Bravo, 1998). ترکیبات فنولی گیاهی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانت بالا باعث پاکسازی از گونه‌های شیمیایی فعال و به حداقل رسانیدن خسارت اکسید شدن در شرایط افزایش شدت نور می‌شوند (Gulçin et al.,2010).

کورونگو و همکاران (Chrungoo et al., 1986) خاطر نشان ساختند که تغییر در محتوی ترکیبات فنولی بافت طی مرحله رشد جوانه زعفران نشان دهنده خاصیت بازدارندگی این ترکیبات است. قمصری و همکاران (Ghamsari et al., 2007) با شناسایی پراکسیدازهای فعال در بنه زعفران طی مرحله ریشه‌دهی گزارش نمودند که این ترکیبات در فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر سم‌زدایی H_2O_2، طویل شدن سلول‌ها، ساخت و تمایز دیواره سلولی و واکنش گیاه به تنش گلیکوکونژوگیت[4] دخالت می‌نمایند (Fernandez et al., 2000). ویلیامز و همکاران (Williams et al., 1986) با بررسی ۲۵۵ گونه از ۵۷ جنس مربوط به تمام قبیله‌های گیاهی خانواده Iridaceae غیریکنواختی قابل توجهی را در پراکنش فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات فنولی در برگ‌ها مشخص کرده و اظهار داشتند که ترکیبات فنولی این خانواده غیریکنواخت می‌باشد. ژنگ و همکاران (Zhang et al., 2009) همبستگی منفی معنی‌داری را بین کل ترکیبات فنولی و محتوای نیتروژن در گیاه *Casuarina equsetfolia* مشاهده کردند. سایر بررسی‌ها نشان داده است که میزان کل فنول‌ها می‌تواند به عنوان شاخصی سودمند برای فعالیت آنتی اکسیدانی در نظر گرفته شود (Teow et al., 2007). جوانمردی و همکاران (Javanmardi et al., 2003) همبستگی بین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و کل اسیدهای فنولیک در ریحان را مثبت گزارش نمودند. تعدادی از محققان نیز بر این باورند که ارزیابی محتوی ترکیبات فنولی در گیاهان علفی محدود می‌باشد (Yi & Wetzstein, 2010; Yi & Wetzstein, 2011; Freire et al., 2006; Nell et al., 2009). اگر چه امروزه مطالعات نسبتاً جامعی در خصوص شناسایی این ترکیبات انجام شده است، ولی اهمیت بیولوژیکی، اکولوژیکی و زراعی این ترکیبات در ریزوسفر کمتر شناسایی شده است.

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله و علفی بوده (Mollafilabi, 2004) که در اغلب کشورهای دارای اقلیم گرم و خشک کاشته می‌شود (Abdullaev, 2006). این گیاه علاوه بر مصرف ادویه‌ای، یک گیاه دارویی بسیار مطلوب در طب سنتی است که برای درمان بیماری‌هایی همچون گرفتگی عضلات، آسم، بیماری‌های کبد، تسکین درد و تقویت سیستم دفاعی و سیستم گوارشی کاربرد دارد (Wintherhalter & Straubinger, 2000). مصرف عصاره زعفران همچنین برای درمان بیماری‌های عصبی، تقویت حافظه (Abe & Saito, 2000)، بهبود جریان خون به چشم (Xuan, 1999) نیز توسط برخی محققان تأیید شده است. خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی[5] و ضدمیکروبی[1] زعفران در طی

1- Phenolic compounds
2- Aryl
3- Hydroxyl
4- Glycoconjugate
5- Antioxidant

سال‌های اخیر به طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گرفته است (Esmaeili et al., 2011)، عمدتاً به وجود ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شوند (Heim et al., 2002, Hosseini et al., 2015). ترکیبات فنولی که عمدتاً فلاونوئیدها[2] و آنتوسیانین‌ها[3] هستند، اجزای فعال بیولوژیکی اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران بوده که نقش مهمی در سلامت انسان و حیوانات به عهده دارند (Parr & Bolwell, 2000). مواد غنی از فنول‌ها می‌توانند در تجزیه اکسیداتیو[4] چربی‌ها مؤثر بوده و کیفیت و ارزش تغذیه‌ای[5] غذا را بهبود بخشند (Omidi et al., 2014). امیدی و همکاران (Omidi et al., 2014) اظهار داشتند که گلبرگ‌های زغفران دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند. برخی محققان دلیل این امر را به وجود ترکیبات فنولی نسبت دادند (Goli et al.,2012; Omidi et al., 2014). کامفرول[6] حاصل[7] از گلبرگ‌های تازه زعفران نیز جزء بسیار مهم دیگر می‌باشد (Hosseinzadeh et al., 2007; Hadizadeh et al., 2003) که بر پاکسازی[8] رادیکال‌های آزاد[9] به طور ویژه‌ای مؤثر می‌باشد (Chia-Ying et al., 2004).

بنابراین، از آنجا که مطالعه تغییرات ترکیبات فنولی شاخصی سودمند برای ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Teow et al., 2007) و تاکنون نتایج مستند زیادی در خصوص تغییرات ترکیبات فنولی زعفران در طی فصل رشد و مقایسه محتوی این ترکیبات بین اندام‌های مختلف این گیاه وجود ندارد، هدف از اجرای این مطالعه ارزیابی روند تغییرات محتوی ترکیبات فنولی و نیتروژن در اندام‌های هوایی و زیرزمینی و ریزوسفر زعفران در طی فصل رشد و تعیین ضرایب همبستگی این ترکیبات است.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این آزمایش، چهار نوبت نمونه‌برداری از خاک، بنه و برگ زعفران در دوره زمانی مهر و بهمن ماه ۱۳۸۷ و اردیبهشت ماه و تیر ماه ۱۳۸۸ از مزارع چهار ساله در بخش مرکزی، روستای آبرود (واقع در ۱۰ کیلومتری از شهرستان تربت حیدریه (شمال غربی) با طول جغرافیایی °۵۸ و ´۱۲ و عرض جغرافیایی °۳۵ و ´۲۶ و متوسط بارندگی ۲۲۵ میلی‌متر) در شهرستان تربت حیدریه انجام شد.

نمونه‌های خاک، بنه و برگ‌ها به طور کامل از یکدیگر تفکیک شدند. پس از آن، نمونه‌های گیاهی در آون با دمای ۸۰°C±۲ به مدت ۷۲ ساعت قرار داده و پس از خشک و آسیاب شدن، از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. نمونه‌های خاک به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد خشک و پس از کوبیده شدن، از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند.

به منظور اندازه گیری محتوی کل ترکیبات فنولی از روش فولین- سیوکالتو (Marino et al., 2004) استفاده شد. مقدار ترکیبات فنولی در نمونه‌های بنه، برگ و خاک گیاه به روش اسپکتروفتومتری مطابق دستور کار سینگلتون و همکاران (Singleton et al., 1999) تعیین گردید. لازم به ذکر است اگرچه حلال‌های مختلفی (همچون آب، مخلوط اتانول، استون یا استونیتریل) برای استخراج فلاونوئیدها از مواد گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Nørbæk et al., 2002; Xu & Chang, 2007; Sultana et al.,2009)، ولی بسیاری از مطالعات مؤید آن است که استخراج ترکیبات فنولی به میزان زیادی وابسته به نوع حلال مورد استفاده می‌باشد (Barnes et al., 2009; Sultana et al., 2002). مارتینو و همکاران (Martino et al., 2006) بهترین حالت استخراج اجزای گیاهی گل‌های فوقانی شبدر شیرین گل زرد (*Melilotus officinalis* L.) را استفاده از ۵۰٪ اتانول آبی گزارش نمودند.

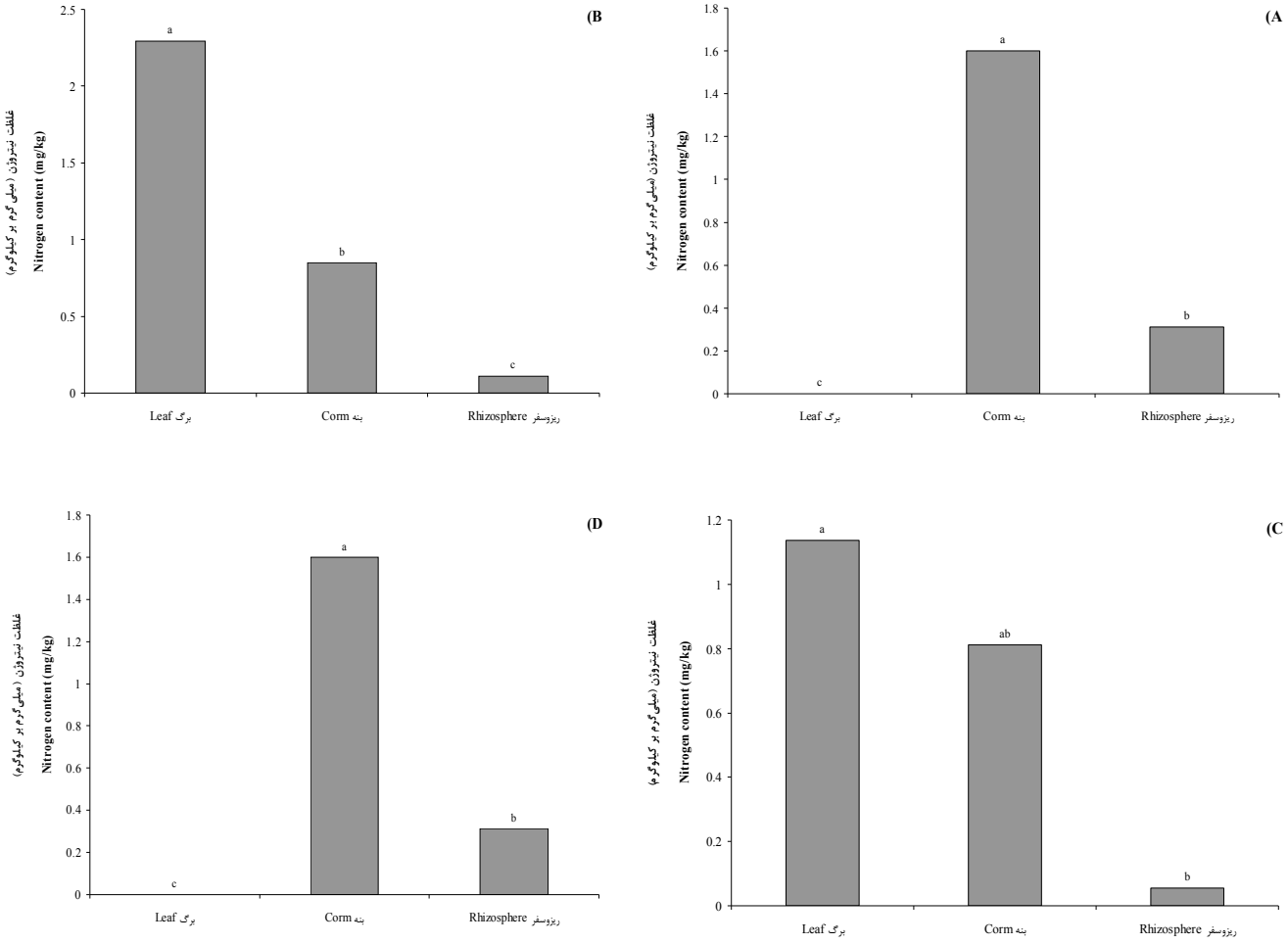
برای تعیین مقدار نیتروژن در نمونه‌های خاک اطراف ریشه و بنه و برگ گیاه زعفران از روش هضم کجلدال استفاده شد (Bremner, 1970).

پس از بررسی نرمالیتی، داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار آنالیز شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. جهت رسم شکل‌ها و تعیین ضریب همبستگی از نرم‌افزار Sigma plot استفاده گردید.

1- Antimicrobial
2- Flavonoids
3- Anthocyanin
4- Oxidative degradation
5- Nutritional value
6- Kaempferol
7- Isolated form
8- Scavenging
9- Free radicals

نتایج و بحث

محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر طی مراحل مختلف نمونه‌برداری در شکل ۱ نشان داده شده است.

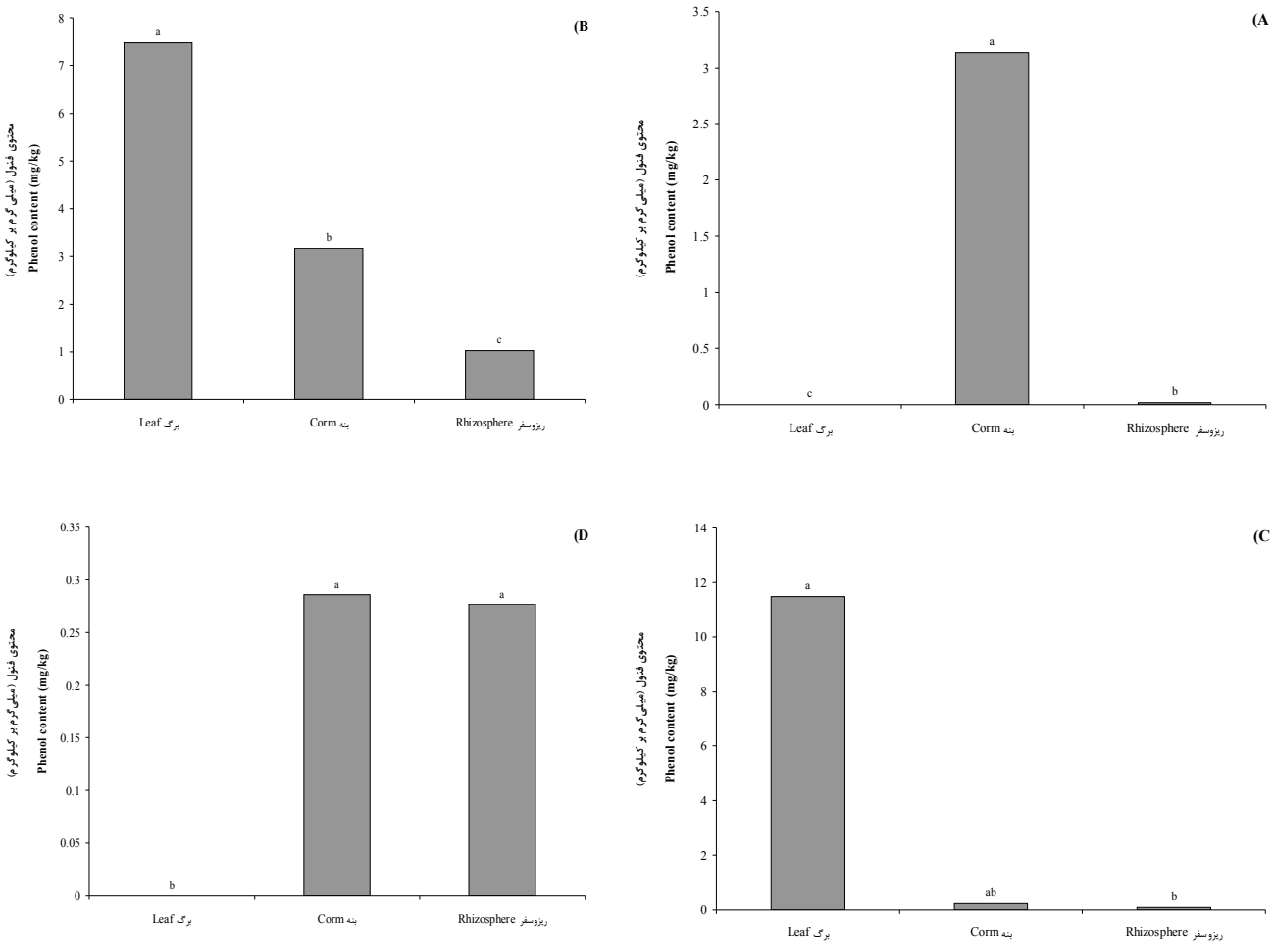


شکل ۱. مقایسه میانگین محتوی نیتروژن ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران در مراحل مختلف نمونه‌برداری (الف) مهر ۱۳۸۷، (ب) بهمن ۱۳۸۷، (ج) اردیبهشت ۱۳۸۸ و (د) تیر ۱۳۸۸

Fig. 1. Mean comparisons of nitrogen contents in rhizosphere, aerial and underground organs of saffron during different sampling times: a) early Oct. 2009, b) early Feb. 2009, c) early May and d) early July

محتوی نیتروژن اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر طی مراحل مختلف نمونه‌برداری به طور معنی‌داری متفاوت بود (P<۰/۰۵). به طوری‌که در مرحله اول، بیشترین میزان نیتروژن برای بنه با ۱/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد که ۴۱۲ درصد بالاتر از محتوی آن در ریزوسفر بود (شکل ۱- الف). در مرحله دوم، بیشترین محتوی نیتروژن مربوط به برگ با ۲/۲۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که نسبت به محتوی نیتروژن بنه و ریزوسفر به ترتیب با ۱۷۰ و بیش از ۱۰۰ درصد بالاتر محاسبه شد (شکل ۲-ب). در مرحله سوم، بالاترین میزان نیتروژن برای برگ با ۱/۱۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد که نسبت به محتوی نیتروژن بنه و ریزوسفر به ترتیب برابر با ۴۰ و بیش از ۱۰۰ درصد بالاتر حاصل گردید (شکل ۱-ج). در مرحله چهارم، بیشترین محتوی نیتروژن مربوط به ریزوسفر با ۰/۹۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که ۹۳ درصد کمتر از مقدار آن در بنه بود (شکل ۱-د).

میزان فنول اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر طی زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. مقایسه میانگین محتوی فنولی ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران در مراحل مختلف نمونه‌برداری (الف) مهر ۱۳۸۷، (ب) بهمن ۱۳۸۷، (ج) اردیبهشت ۱۳۸۸ و (د) تیر ۱۳۸۸

Fig. 2. Mean comparisons of phenolic contents in rhizosphere, aerial and underground organs of saffron during different sampling times :a) early Oct. 2009, b) early Feb. 2009, c) early May and d) early July

میزان فنول اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر طی مراحل مختلف نمونه‌برداری به طور معنی‌داری متفاوت می‌باشد ($P\leq ۰/۰۵$)؛ به طوری‌که در مرحله اول، بیشترین میزان فنول برای بنه با ۳/۱۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد که بیش از ۱۰۰ درصد بالاتر از مقدار آن در ریزوسفر تعیین گردید (شکل ۲-الف). در مرحله دوم، بالاترین محتوی فنول مربوط به برگ با ۷/۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که میزان آن نسبت به محتوی این ترکیب در بنه و ریزوسفر به ترتیب بیش از ۱۳۵ و ۶۲۵ درصد بالاتر بود (شکل ۲-ب). در مرحله سوم، بیشترین محتوی فنول برای برگ با ۱۱/۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم حاصل گردید که نسبت به مقدار آن در بنه و ریزوسفر بیش از ۱۰۰ درصد بیشتر تعیین گردید (شکل ۲-ج). در مرحله چهارم، بالاترین میزان فنول برای ریزوسفر با ۰/۲۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم بدست آمد که سه درصد بیشتر از محتوی آن در برگ بدست آمد (شکل ۲-د و جدول ۱).

از آنجا که در تیر و مهر ماه، زعفران به ترتیب مراحل رکود و رشد زایشی(گلدهی) خود را سپری می‌کند، بنابراین به دلیل عدم وجود برگ در این مراحل ، پایین‌ترین مقادیر ترکیبات فنولی و نیتروژن (صفر میلی‌گرم بر کیلوگرم) در این اندام مشاهده شد. همچنین به نظر می‌رسد که به دلیل عدم وجود هر گونه رشد فعال (اعم از رویشی یا زایشی) برای بنه‌های زعفران طی دوره رکود این گیاه در تیر ماه، تجمع ترکیبات فنولی و نیتروژن به دلیل عدم جذب از خاک، موجب افزایش محتوی این ترکیبات در ریزوسفر در مقایسه با سایر اندام‌های هوایی و زیرزمینی شد. بررسی‌ها نشان داده که افزایش رشد و بهبود تولید مواد فتوسنتزی تحت تأثیر افزایش غلظت ترکیبات فنولی مربوط به افزایش تخصیص کربن تثبیت شده اضافی به مسیر اسید شیکیمیک می‌باشد (Haukioja et al., 1998). افزایش رشد با بالا بردن تخصیص کربن، علاوه بر افزایش تولید ماده خشک و سنتز متابولیت‌های اولیه، باعث بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شده است (Haukioja et al., 1998). سنه و همکاران (Sene et al., 2001) با بررسی مقدار ترکیبات فنولی اندام‌های هوایی و زیرزمینی و روابط آن با تولید ماده خشک سورگوم اظهار داشتند که مقدار فنول همبستگی قوی با ماده خشک اندام‌های هوایی دارد. از این‌رو، به نظر می‌رسد فاکتورهای مؤثر بر افزایش تولید ماده خشک، تولید متابولیت‌های ثانویه و اولیه را نیز تحت تأثیر قرار داده و از این طریق، باعث افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Shukla et al., 1992).

به طور کلی، همانگونه که در شکل‌های ۱ و ۲ ملاحظه می‌گردد، محتوی ترکیبات نیتروژن و فنول برگ به مراتب بالاتر از بنه و ریزوسفر بدست آمد. برخی تحقیقات (Lee & Scagel, 2010; Kwee & Niemeyer, 2011) مؤید غلظت بالاتر ترکیبات ثانویه در اندام‌های هوایی (به ویژه برگ‌ها) در مقایسه با اندام‌های زیرزمینی تعدادی از گونه¬های گیاهی می‌باشد. هنریکوئز و همکاران (Henríquez et al., 2009) گزارش نمودند که اندام‌های مختلف گیاه پتانسیل زیستی مختلفی از نظر تولید ترکیبات فنولی دارند. بانرجی و همکاران (Banerjee et al., 2008) اظهار داشتند که محتوی ترکیبات فنولی ارقام و اندام‌های مختلف گیاهان متفاوت است. این محققان همچنین اعلام نمودند که بیشترین مقادیر ترکیبات فنولی در بین اندام‌های مختلف هوایی (برگ و ساقه) و زیرزمینی (ریشه) مربوط به برگ بود.

ارتباط بین محتوی نیتروژن و فنول در ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر در شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول۱. مقایسه میانگین‌های صفات اندازه‌گیری شده در پیاز، برگ‌ها و ریزوسفر گیاه زعفران

Table 1. Mean comparisons of saffron corms, leaves and rhizosphere

ریزوسفر Rhizosphere		برگها Leaves					پیاز Corms					صفات Character	
نیتروژن کجلدال Kjeldahl N mg/kg	فنول Phenols mg/kg	وزن خشک Dry weight Kg/ha	وزن تر Fresh weight Kg/ha	عملکرد Yield Kg/ha	نیتروژن کجلدال Kjeldahl N mg/kg	فنول Phenols mg/kg	وزن خشک Dry weight Kg/ha	وزن تر Fresh weight Kg/ha	عملکرد yield Kg/ha	نیتروژن کجلدال Kjeldahl N mg/kg	فنول Phenols mg/kg	نوع اثر Effect type	
0.3124^{b}	0^{d}						15307^{a}	24978^{a}	–	1.599^{a}	3.132^{a}	T_1	زمان Time
0.1085^{b}	1.0299^{a}	7036.3^{a}	31131^{a}	–	2.291^{a}	7.47^{a}	11944^{a}	29629^{a}	–	0.848^{b}	3.166^{a}	T_2	
0.0560^{c}	0.0860^{c}	2187.1^{b}	7418^{b}	–	1.136^{b}	11.48^{a}	13632^{a}	32274^{a}	–	0.811^{b}	0.238^{b}	T_3	
0.9093^{a}	0.277^{b}						10019^{a}	21084^{a}	–	0.061^{c}	0.286^{b}	T_4	
0.4334^{a}	0.4133^{a}	4093.1^{b}	16936^{b}	13.18^{a}	1.709^{ab}	8.968^{a}	10752^{a}	24801^{a}	1.18^{a}	0.858^{ab}	1.361^{a}	Y_1	سن مزارع Farm ages
0.38150^{a}	0.3543^{a}	6452.5^{a}	27824^{a}	4.42^{b}	1.610^{b}	9.003^{a}	14772^{a}	32957^{a}	4.42^{a}	0.881^{a}	1.783^{a}	Y_2	
0.22470^{a}	0.2772^{a}	3289.4^{b}	13064^{b}	1.77^{c}	1.831^{a}	10.455^{a}	12653^{a}	23215^{a}	1.77^{a}	0.751^{b}	1.703^{a}	Y_3	

زمان های نمونه برداری : مهر T_1 ، بهمن T_2 ، فروردین T_3 ، تیر T_4

سنین مزارع : ۳ ساله Y_1 ، ۵ ساله Y_2 ، ۷ ساله Y_3

Sampling times:October T1,Feb.T2,April T3,July T4.
Farm ages:three years Y1,five years Y2,seven years Y3

ارتباط خطی بین محتوی ترکیبات فنولی و نیتروژن در ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران مشاهده شد. البته این ارتباط برای ریزوسفر منفی و برای اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران مثبت تعیین گردید. ضرایب همبستگی بین محتوی ترکیبات فنولی و نیتروژن در ریزوسفر، بنه و برگ زعفران به ترتیب $r^2_{=۰/۰۴}{}^{ns}$، $r^2_{=۰/۵۱}{}^{*}$ و $r^2_{=۰/۵۵}{}^{*}$ بدست آمد (شکل ۳).

ارتباط بین میانگین محتوی نیتروژن و فنول در ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران در شکل ۴ نشان داده شده است.

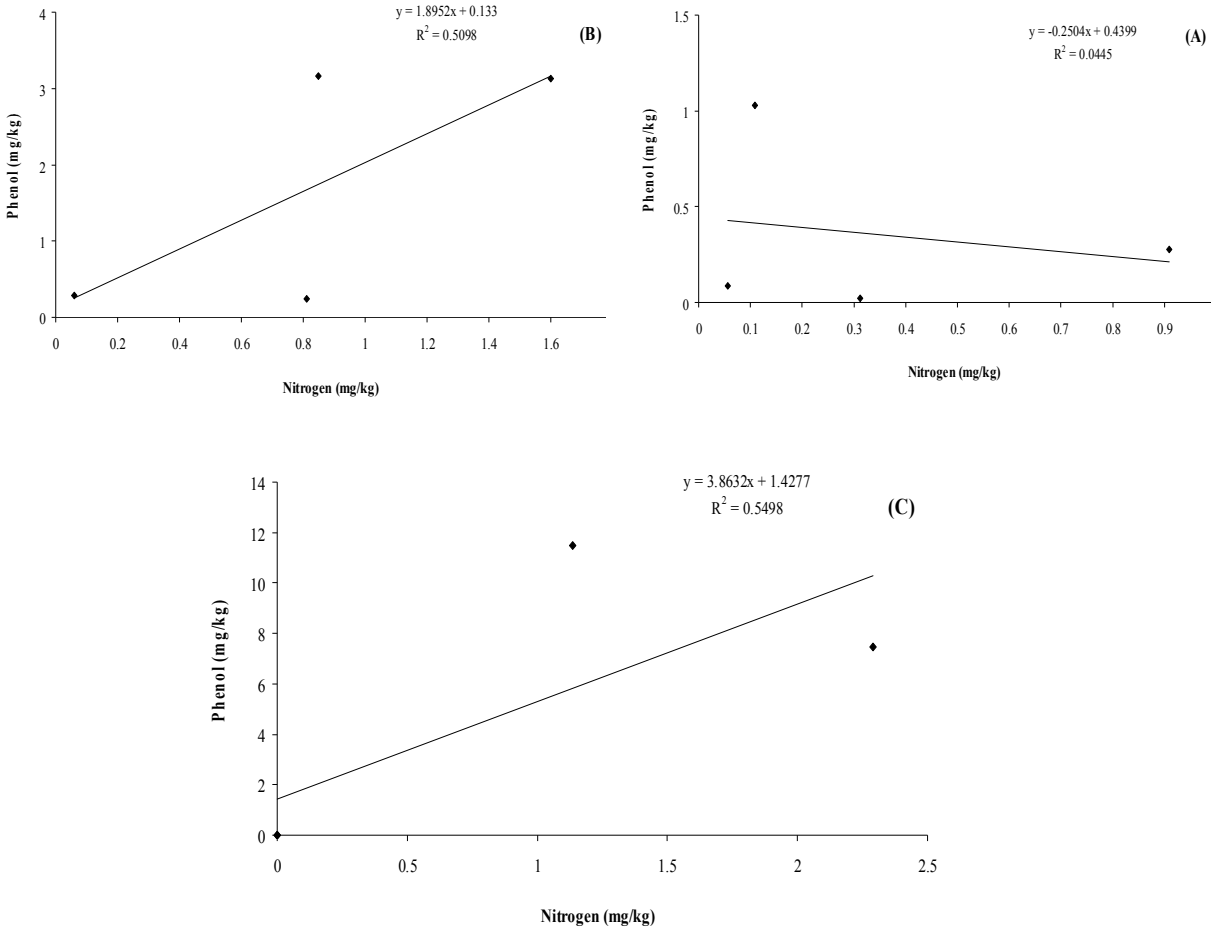
با افزایش غلظت نیتروژن محتوی فنول نیز به طور خطی افزایش یافت؛ به طوری‌که میانگین ضریب همبستگی محتوی نیتروژن و فنول در اندام‌های هوایی و زیرزمینی و ریزوسفر زعفران برابر با $r^2_{=۰/۹۲}{}^{**}$ تعیین گردید (شکل ۴). بر این اساس، به نظر می‌رسد که افزایش مصرف نیتروژن علاوه بر افزایش رشد تحت تأثیر افزایش تخصیص کربن با افزایش تولید مواد فتوسنتزی (Haukioja et al., 1998) موجب افزایش غلظت ترکیبات فنولی گردید. همبستگی مثبت بین عناصر غذایی و تولید ترکیبات فنولی باعث اثر این عناصر بر متابولیسم ترکیبات فنولی می‌گردد (Scagel & Lee, 2012). نتایج مطالعه شوکلا و همکاران (Shukla et al., 1992) نشان داد فاکتورهایی که باعث افزایش تولید ماده خشک می‌شوند، افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را نیز به دنبال دارند. نیتروژن در فرآیند بیوسنتز ترکیبات فنلی و اسید های آمینه نظیر ، فنیل آلانین[1] و تیروزین[2] دخالت دارد (Vogt, 2010; Petersen et al., 2009; Boudet, 2007). بدین‌ترتیب، با توجه به وجود رابطه مثبت و خطی بین میزان نیتروژن و فنول، پیش‌بینی می‌شود که با افزایش مصرف نیتروژن محتوی فنول نیز به میزان زیادی افزایش می‌یابد.

امروزه نتایج اکثر تحقیقات مؤید تأثیر سطوح کودهای مختلف به ویژه کودهای نیتروژنه بر افزایش تجمع ترکیبات فنولی به ویژه در برگ‌ها (Geneva et al., 2010; Nguyen et al., 2010) در مقایسه با سایر اندام‌های گیاه (Nell et al., 2009) می‌باشد. پرنر و همکاران (Perner et al., 2008) اعلام نمودند که نوع کود نیتروژن بر تولید کورستین- گلیکوسید[3] به عنوان یکی از متابولیت‌های ثانویه در غده‌های پیاز تأثیر دارد. با این‌وجود، از آنجا که بسیاری از ترکیبات ثانویه نظیر فنول‌ها در واکنش گیاهان نسبت به تنش‌ها و محرک‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارند (Vogt, 2010)، لذا پیشنهاد می‌شود مطالعه محتوی این ترکیبات در اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران به دقت بررسی شود که این امر علاوه بر تعیین الگوی رشد گیاهان، می‌تواند نقش مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه و مدیریت پایدار آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز این گیاه نیز ایفاء نماید.

دیکسون و همکاران (Dixon et al., 1994) اظهار داشتند که متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در اثرات متقابل بین گیاهان و محیط زیست طبیعی ایفاء می‌نمایند. آنها همچنین اظهار داشتند که افزایش ترکیبات فنولی در محیط ریزوسفر می‌تواند به عنوان عامل مهمی در تحریک قدرت دفاعی و اثرات متقابل پاتوژنی این گیاه در نظر گرفته شود. همچنین از آنجا که محتوی ترکیبات فنولی تأثیر بسزایی بر کیفیت زعفران دارد (Ferrara et al., 2014; Heim et al., 2000; Omidi et al., 2014)، پیشنهاد می‌شود ارتباط بین محتوی این ترکیبات با تولید ماده خشک اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران به منظور بهبود کیفیت این گیاه ارزشمند به دقت مورد بررسی قرار گیرد. طی مطالعه‌ای سرانو-دیاز و همکاران (Serrano-Díaa et al., 2014) ۱۵ ترکیب فنولی را در زعفران شناسایی کردند که عمده‌ترین آنها شامل کامفرول، ۳-O-سوفوروزید[4] و دلفینیدین ۳، ۵-دی-O-گلوکوزید[5] بود. نتایج برخی دیگر از مطالعات مؤید تأثیر معنی‌دار وضعیت تغذیه‌ای گیاه بر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌باشد (Areias et al., 2000; Fanasca et al., 2006; Mogren et al., 2006; Nell et al., 2009). همچنین از آنجا که در شرایط نیتروژن کافی، تجمع نیتروژن همبستگی زیادی با سرعت رشد گیاه و تجمع زیست توده گیاهی دارد (Jeuffroy et al., 2002) و با در نظر گرفتن این مطلب که امروزه کشاورزان در مدیریت گیاهان زراعی موارد مهمی از جمله کاربرد کود

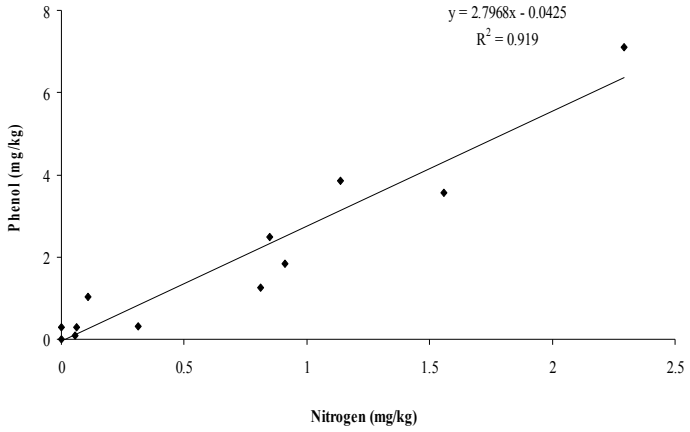
1- Phenylalanine
2- Tyrosine
3- Quercetin-glycosides
4- 3-O-sophoroside
5- Delphinidin 3,5-di-O-glucoside

نیتروژن را در نظر می‌گیرند، لذا پیشنهاد می‌شود علاوه بر تعیین نیاز گیاه به این عنصر پرمصرف، میزان آن در خاک نیز تعیین شود تا با کاهش مصرف این عنصر پرمتحرک و ضروری، علاوه بر بهبود کارایی و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی، از طریق کاهش مصرف آن، هزینه‌های تولید را کاهش داد.



شکل ۳. ارتباط بین محتوی نیتروژن و ترکیبات فنولی در (الف) ریزوسفر، (ب) بنه و (ج) برگ زعفران

Fig. 3. Relation between nitrogen and phenolic contents in (A) rhizosphere, (B) corm and (C) leaf of saffron



شکل ۴. ارتباط بین میانگین محتوی نیتروژن و ترکیبات فنولی ریزوسفر و اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران

Fig. 4. Relation between average nitrogen and phenolic contents in rhizosphere, aerial and underground organs of saffron

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه به طور کلی نشان داد که تفاوت مقدار ترکیبات فنولی و نیتروژن در بین اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران و ریزوسفر طی مراحل مختلف نمونه-برداری معنی‌دار بود. بیشترین مقادیر ترکیبات فنولی و نیتروژن در مراحل اول، دوم و سوم نمونه‌برداری به ترتیب برای بنه و برگ زعفران بدست آمد. در مرحله چهارم بیشترین میزان نیتروژن مربوط به ریزوسفر بود، در حالی‌که بالاترین مقادیر ترکیبات فنولی در مقایسه اندام‌های هوایی و زیرزمینی به بنه اختصاص داشت. افزایش رشد با افزایش فتوسنتز و در نتیجه تخصیص کربن بیشتر، علاوه بر افزایش تولید ماده خشک و سنتز متابولیت‌های اولیه، باعث بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شد. بدین ترتیب، از آنجا که بسیاری از ترکیبات ثانویه نظیر فنول‌ها در واکنش گیاهان نسبت به تنش‌ها و محرک‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارند، پیشنهاد می‌شود مطالعه محتوی این ترکیبات در اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران بررسی شود که این امر علاوه بر تعیین الگوی رشد گیاهان، می‌تواند نقش مهمی در مدیریت پایدار آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز این گیاه مهم اقتصادی ایفاء نماید. علاوه بر این، با توجه به تأثیر بسزای ترکیبات فنولی بر کیفیت زعفران، پیشنهاد می‌شود ارتباط بین محتوی این ترکیبات با تولید ماده خشک اندام‌های هوایی و زیرزمینی زعفران مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Abdullaev, F., 2006. Biological properties and medicinal use of saffron (*Crocus sativus* L.). Proceedings of the 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology. Mashhad, Iran, 28-30 October, p. 339-345.

Abe, K., Saito, H., 2000. Effects of saffron and its constituent crocin on learning behavior and long term potentiation. Phytotherapy Research 14: 149-152.

Areias, F., Vanentao, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M., 2000. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 6081–6084.

Asami, D.K., Hong, Y.J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E., 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51: 1237-1241.

Banerjee, D., Chakrabarti, S., Hazra, A.K., Banerjee, S., Ray, J., Mukherjee, B., 2008. Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. African Journal of Biotechnology 7(6): 805-810.

Barnes, J.S., Nguyen, H.P., Shen, S., Schug, K.A., 2009. General method for extraction of

blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography−electrospray ionization−ion trap−time of flight−mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216: 4728−4735.

Boudet, A.M., 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry 68: 2722–2735.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews 56: 317–333.

Bremner, J.M., 1970. Nitrogen total, regular Kjeldahl method, In: Methods of Soil Analysis, Part II: Chemical and Microbiological Properties. 2nd Ed. Agronomy 9(1). A.S.A. Inc., S.S.S.A. Inc., Madison publisher, Wisconsin., USA, pp. 610-616.

Chia-Ying, L., E-Jian, L., andTian-Shung, W., 2004. Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*. Journal of Natural Products 67: 437-440.

Chrungoo, N.K., Koul, K.K., Farooq, S., 1986. Phenolic compounds in corms of saffron Crocus (*Crocus sativus* L.) during bud development. Plant Physiology and Biochemistry 13(2): 78-81.

Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J., 1994. Early events in the activation of plant defense responses. Annual Review of Phytopathology 32: 479-501.

Esmaeili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., Safarian, S., 2011. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. Pharmacognosy Magazine 7: 74-80.

Fanasca, S., Colla, G., Maiani, G., Venneria, E., Rouphael, Y., Azzini, E., Saccardo, F., 2006. Changes in antioxidant content of tomato fruits in response to cultivar and nutrient solution composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 4319–4325.

Fernandez, J.A., Escribano, J., Piqueras, A., Medina, J., 2000. A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell viability. Journal of Experimental Botany 51 (345): 731-737.

Ferrara, L., Naviglio, D., Gallo, M., 2014. Extraction of bioactive compounds of saffron (*Crocus sativus* L.) by ultrasound assisted extraction (UAE) and by rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE). European Scientific Journal 10(3): 1857–7881.

Freire, C.M.M., Marques, M.O.M., Costa, M., 2006. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology 105: 161–166.

Geneva, M.P., Stancheva, I.V., Boychinova, M.M., Mincheva, M.H., Yonova, P.A., 2010. Effects of foliar fertilization and arbuscular mycorrhizal colonization on *Salvia officinalis* L. growth, antioxidant capacity, and essential oil composition. Journal of the Science of Food and Agriculture 99: 686–702.

Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo, S., 2007. Kinetics properties of Guaiacol Peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. The Iranian Biomedical Journal 11(3): 137-146. (In Persian with English Summary)

Goli, S.A.H., Mokhtari F., Rahimmalek, M., 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (*Crocus sativus* L.) petal. Journal of Agricultural Science 4: 175-181.

Gulçin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arabian Journal of Chemistry 3: 43–53.

Hadizadeh, F., Khalilia, N., Hosseinzadeh, H., Khair-Aldine, R., 2003. Kaempferol from saffron petals. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2: 251-262. (In Persian with English Summary)

Haslam, E., Lilley, T.H., 1988. Natural astringency in foodstuffs-a molecular interpretation. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition 27: 1-40.

Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Honkanen, T., Larsson, S., Lempa, K., 1998. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: Cause of variable responses of woody plants to fertilization? Chemoecology 8: 133–139.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13(10): 572-584.

Henríquez, C., Almonacid, S., Escobar, B., Chiffelle, I., Gómez, M., Speisky, H., 2009. Antioxidant content and activity in different structures of five apple cultivars grown in Chile. Acta Horticulturae 841: 275-280.

Hosseini,M.,Sadeghian,A.R., Barakati,F.,2015.Study on trends in phenolic compounds during saffron plant growth by Folin Cio-Calteau micro method.Journal of Saffron Research.3(2):155-162.

Hosseinzadeh, H., Motamedshariaty, V., Hadizadeh, F., 2007. Antidepressant effect of kaempferol, a constituent of saffron (Crocus sativus) petal, in mice and rats. Pharmacology 2: 367-70.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chemistry 83: 547-550.

Jésica Serrano-Díaz, J., Sáchez, A.M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., Alonso, G.L., 2014. Flavonoid determination in the quality control of floral bioresidues from *Crocus sativus* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(14): 3125–3133.

Jeuffroy, M.H., Ney, B., Ourry, A., 2002. Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. Journal of Experimental Botany 53 (370): 809-823.

Kefeli, V.I., Kalevitch, M.V., Borsari, B., 2003. Phenolic cycle in plants and environment. Journal of Cell and Molecular Biology 2: 13-18.

Kwee, E.M., Niemeyer, E.D., 2011. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among fifteen basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. Food Chemistry 128: 1044–1050.

Lee, J., Scagel, C.F., 2010. Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. Journal of Functional Foods 2: 77–84.

Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A., 2007. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. African Journal of Biotechnology 6(12): 1358-1368.

Marino, M.A., Mazzanti, A., Assuero, S.G., Gastal, F., Echeverria, H.E., Andrade, F., 2004. Nitrogen dilution curves and nitrogen use efficiency during winter-spring growth of annual ryegrass. Agronomy Journal 96: 601-607.

Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S., 2006. Microwave assisted extraction of cumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction Journal of Agricultural and Food Chemistry 1125(2): 147-151.

Mogren, L.M., Olsson, M.E., Gertsson, U.E., 2006. Quercetin content in field-cured onions (*Allium cepa* L.): Effects of cultivar, lifting time, and nitrogen fertilizer level. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 6185–6191.

Mollafilabi, A., 2004. Experimental finding of production and echo physiological aspects of saffron (*Crocus sativus* L.). I. International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology. Albacete, Spain.

Nell, M., Vötsch, M., Vierheilig, H., Steinhellner, S., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C., Novak, J., 2009. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1090–1096.

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

Nørbæk, R., Brandt, K., Nielsen, J.K., Ørgaard, M., Jacobsen, N., 2002. Flower pigment composition of Crocus species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. Biochemical Systematics and Ecology 30: 763−791.

Omidi, A., Rahdari, S., Hassanpour Fard, M., 2014. A preliminary study on antioxidant activities of saffron petal extracts in lambs. Veterinary Science Development 4(5161): 1-4.

Parr, A.J., Bolwell, G.P., 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 985-1012.

Perner, H.S., Rohn, G., Driemel, N., Batt, D., Schwarz, L., Kroh, W., George, E., 2008. Effect of nitrogen species supply and mycorrhizal colonization on organosulfur and phenolic compounds in onion. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 3538–3545.

Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. Phytochemistry 70: 1663–1679.

Scagel, C.F., Lee, J., 2012. Phenolic composition of basil plants is differentially altered by plant nutrient status and inoculation with mycorrhizal fungi. Horticultural Science 47(5): 660–671.

Sene, M., Dove, T., Gallet, C., 2001. Relationships between biomass, and phenolic production in grain sorghum grown under different conditions. Agronomy Journal 93: 49-54.

Shukla, A., Abad Farooqi, A., Shukla, Y., Sharma, S., 1992. Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L. Plant Growth Regulation 11: 165-171.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M., 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules 14: 2167−2180.

Teow, C.C., Troung, V.D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C., 2007. Antioxidant activities, phenolic and β-

carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. Food Chemistry 103: 829-838.

Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular Plant 3: 2–20.

Williams, C.A., Harborne, J.B., Glodblatt, P., 1986. Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family Iridaceae. Phytochemistry 25 (9): 2135-2154.

Wintherhalter, P., Straubinger, M., 2000. Saffron–renewed interest in an ancient spice. Food Reviews International 16: 39-59.

Xu, B.J., Chang, S.K.C., 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. Journal of Food Science 72: 159−166.

Xuan, B., 1999. Effects of crocin analogs on ocular flow and retinal function. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 15: 143-152.

Yi, W., Wetzstein, H.Y., 2011. Effects of drying and extraction conditions on the biochemical activity of selected herbs. Horticultural Science 46:70–73.

Yi, W., Wetzstein, H.Y., 2010. Biochemical, biological and histological evaluation of some culinary and medicinal herbs grown under greenhouse and field conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 1063–1070.

Zhang, L., Ye, G., Lin, Y., Zhou, H., Zeng, Q., 2009. Seasonal changes in tannin and nitrogen contents of *Casuarina equisetifolia* branchlets. Journal of Zheijang University Science B 10(2): 103-111.

Journal of Saffron Research (semi-annual)
Vol.5, No.1, Spring & Summer, 2017
p. 64-77

University of Birjand

Relation of phenolic compounds and nitrogen content of Saffron (*Crocus sativus* L.) under field conditions

Mohammad Hosseini[*1] and Abdollah Mollafilabi[2]
1- M.Sc, Research Institute of Food Science and Technology(RIFST), Department of Food Biotechnology
2- Assistant Prof, Research Institute of Food Science and Technology(RIFST), Department of Food Biotechnology
*Corresponding Author E-mail: m.hosseini@rifst.ac.ir

Received 25 December 2016; Accepted 30 April 2017

Abstract
This study was conducted with the aim of evaluating the trend of changes in phenolics and nitrogen contents in aerial, underground and rhizosphere of saffron based on a randomized complete block design with four replications during two years of 2008 and 2009. Four samplings were performed as follows: rhizosphere, corm and leaves were sampled in early Oct., early Feb., 2009, and early May, early July, 2010 from four- year old farms in central section of Abrood village in Torbat-e-Heidarieh city. In order to measure total phenolics and nitrogen contents Folin Cio-Calteau micro method and micro-kjeldahl methods were applied, respectively. Results showed that nitrogen and phenolic contents of saffron aerial and underground organs and rhizosphere were significantly different during sampling stages ($p \leq 0.05$). Nitrogen and phenolic contents of leaves were much higher than corm and rhizosphere. So the highest phenolic contents in the first, second, third and fourth sampling stages were recorded for corm, leaf, leaf and rhizosphere with 3.13, 7.47, 11.48 and 0.28 mg.kg-1, respectively. The maximum nitrogen contents in these stages were observed for corm, leaf, leaf and rhizosphere with 1.60, 2.29, 1.14 and 0.91 mg.kg, respectively. By increasing nitrogen content, phenolic increased linearly, so that correlation coefficient of nitrogen and phenolic contents were determined equal to $r^2_{=0.92}{}^{**}$. Increase of nitrogen use affected by increase of carbon allocation due to increasing photosynthate production caused to increase phenolic concentrations as one of the most important secondary metabolites.

Keywords:Bioactive substances, Corm, Qualitative characters, Rhizosphere, Secondary metabolites