فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۳ ص. ۷۱-۶۱

مقاله پژوهشی

اثر سیستم آبیاری و دو سویه باکتری محرک رشد گیاه بر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کلاله زعفران

رضا دهقانی بیدگلی[۱*]

۱ گروه مهندسی طبیعت، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین،دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): dehghanir@kashanu.ac.ir

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۳

چکیده

ترکیبات فنلی (فلاونوئید، تانن و آنتوسیانین) مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند و عوامل متعددی مانند عوامل محیطی و تغذیه گیاه بر کمیت و کیفیت آنها تاثیرگذارمی‌باشند. یکی از گیاهان دارویی بومی ایران، زعفران با نام علمی *Crocus sativus* Var. officinalis است که سابقه استفاده از ترکیبات آن به زمان‌های کهن بر می‌گردد و در مناطق مختلف کشور به صورت طبیعی و کشت شده وجود دارد. تحقیق حاضر به منظور بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره زعفران تحت تاثیر دو سویه باکتری محرک رشد (ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵) و (سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹) و همچنین دو روش آبیاری غرقابی و قطره‌ای انجام شده است. در این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا بررسی فیتوشیمی گیاه انجام شد، سپس سنجش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام به روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت و در نهایت فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه در غلظت‌های مختلف با استفاده از روش مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و روش آنالیز واریانس انجام شد. نتایج آزمون فیتوشیمیایی وجود ترکیبات ثانویه‌ای مانند تانن، آنتوسیانین و فلاونوئید و عدم وجود آلکالوئید را تایید کرد. همچنین میزان ترکیبات فلاونوئیدی موجود در نمونه‌ای که ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ به کار برده شده بود کمی بیش‌تر از سایر نمونه‌ها بود. تیمار سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ و تیمار آبیاری غرقابی به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ترکیبات فنلی و تیمار آبیاری قطره‌ای بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. کاربرد باکتری‌های محرک رشد و جایگزینی سیستم آبیاری قطره‌ای در کشت زعفران می تواند منجر به افزایش کارایی عصاره این گیاه به عنوان منبع ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی و دارویی باشد.

کلیدواژه‌ها: فلاونوئید، باکتری محرک رشد، عصاره، آبیاری قطره‌ای، زعفران.

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به منظور استخراج عصاره و برای تولید دارو و نیز جایگزین کردن آنها به جای داروهای شیمیایی برای حفظ سلامتی انسان‌ها از مهم‌ترین نیازهای تمدن امروزی می‌باشد [۲۱]. ترکیبات فنلی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتوسیانین و غیره می‌باشند که معمولا

در میوه‌ها، سبزیجات، برگ‌ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه و در سایر قسمت های گیاه دیده می‌شوند، این مواد منافع قابل توجهی در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خواص آنتی اکسیدان دارند[۳۰]. در سال‌های اخیر ثابت شده است که رادیکال‌های آزاد مهم‌ترین عوامل اکسیدکننده مواد غذایی هستند که با یك روند تخریبی باعث از بین رفتن ارزش غذایی و تغییر در ترکیبات شیمیایی آنها می‌گردند [۱۸و۲۰]. فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیك متنوع این ترکیبات از جمله آنتی‌اکسیدانی، آنتی میکروبی و ضد التهاب آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است. ترکیبات فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند. زعفران نیز در این گروه قرار دارد و دارای انواع زیادی از ترکیبات فلاوونوئیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. این ترکیبات خود دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند [۱۷و۱۳].

زعفران گیاهی چندساله و ژئوفیت-تریپلوئید[1] است که می‌تواند بسته به شرایط آب‌وهوای منطقه کشت شده و ۸ الی ۱۴ سال به روند تولیدی خود ادامه دهد [۱۴]. تحقیقات مختلف از برتری کارایی اقتصادی مصرف آب زعفران نسبت به سایر محصولات در مناطق خشک و نیمه خشک حکایت دارد [۲۷]. مطالعات نشان داده است که پارامترهای درجه حرارت، میزان آب آبیاری، کود [۱و۸]. و ارتفاع ار سطح دریا [۱۲]. بر میزان عملکرد محصول نقش به‌سزایی دارد. همچنین عوامل محیطی مانند تغذیه گیاه و رطوبت دردسترس، برخصوصیات کمی و کیفی گیاه زعفران تاثیرگذار است [۳۵و۱۹]. دوره شکوفایی گل‌ها از اواخر مهر تا اواخر آبان می‌باشد. روند رشد رویشی گیاه تا اواخر اردیبهشت‌ماه ادامه دارد. از اواخر اردیبهشت‌ماه تا اواسط مهرماه گیاه زعفران به خواب‌رفته و برگ‌ها خشک می‌شود [۶و۹]. از آنجا که گونه‌های مختلف گیاهان در قبال عملیات آبیاری، عکس‌العمل‌های متفاوتی از خود بروز می‌دهند، لذا در این تحقیق با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد گونه دارویی زعفران، تاثیر روش‌های آبیاری بر متغیرهای کمی گونه مذکور مورد بررسی قرار گرفت. همچنین این مطالعه می تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره‌های این گیاه به عنوان منبع ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان جهت استفاده در صنایع غذایی و دارویی باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بررسی تاثیر دو سویه باکتری محرک رشد گیاه[2] (PGPR) شامل ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ و سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ و همچنین دو روش‌های آبیاری (غرقابی و قطره‌ای) بر عصاره‌ی کلاله زعفران در ۴ کرت آزمایشی واقع در پژوهشکده اسانس‌های طبیعی دانشگاه کاشان در شهر قمصر کاشان و در سال ۱۴۰۰ انجام گرفت.

- روش نمونه برداری

پیازهای زعفران در آذرماه سال ۱۳۹۹ رقم سوپر نگین از شهرستان قاینات تهیه و به کرت‌های مورد نظر انتقال یافتند و به مدت یکسال تحت تیمارهای مورد نظر قرار گرفتند. در کرت اول و دوم پیازهای زعفران به صورت ردیف‌های منظم قرار داشتند و به ترتیب به مدت یکسال باکتری‌های محرک رشد با آب مورد نیاز در پای هر بوته قرار داده شد. در کرت سوم و چهارم بوته‌های زعفران به‌صورت ردیف‌های منظم قرار داشتند و به ترتیب به مدت یکسال با سیستم غرقابی و قطره‌ای آبیاری شدند. نمونه‌برداری از گل‌های زعفران کرت‌های آزمایشی در شهریور سال ۱۴۰۰ همزمان با فصل گلدهی از گل های ۱۰۰ پیاز به صورت تصادفی انجام گردید.

- عملیات آزمایشگاهی

گل‌های برداشت شده به آزمایشگاه منتقل گردید و پس از جدا کردن گلبرگ‌ها عصاره‌گیری از کلاله آنها شروع شد، روش عصاره‌گیری از نوع ماسراسیون بود. در این روش کلاله‌ها بعد از برداشت از سایر اجزای گل جدا شدند و در سه تکرار به میزان ۵۰ گرم از هر نمونه وزن شد و در ارلن ریخته شد و مقدار ۷۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰% به گلبرگ‌ها اضافه شد. بعد از مدت ۴۸ ساعت عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و در نهایت عصاره‌های اتانولی به رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای با حجمی از اتانول به‌دست آمدند. سپس در بالن مخصوص دستگاه روتاری

[1] Triploid geophyte

[2] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

ریخته شد تا تغلیظ شوند. بعد از تغلیظ، نمونه‌ها در پتری دیش ریخته شده و در آون فن‌دار به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و بعد از آن به مدت ۴۸ ساعت در آون خلا با دمای ۵۰ درجه قرار داده شدند. بعد از خشک شدن عصاره‌ها توسط اسپاتول تراشیده شد و در ظرف درب‌دار و غیرقابل نفوذ ریخته شدند و به منظور جلوگیری از تجزیه و یا از بین رفتن مواد موثره در عصاره‌ها تا مراحل آزمایش در یخچال نگه‌داری شدند.

- تشخیص آلکالوئید

به منظور شناسایی آلکالوئیدهای موجود در عصاره از آزمون واگنر- مایر استفاده شد. در این روش ابتدا ۰/۵ گرم عصاره‌ی خشک در یک بشر ریخته شد و ۱۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال به آن اضافه شد، مخلوط به مدت پنج دقیقه درون بن ماری با دمای ۴۵ درجه قرار داده و با یک همزن مخلوط هم زده شد. سپس محلول از کاغذ صافی عبور داده شد و محلول به دو لوله‌ی آزمایش منتقل گردید. به لوله‌ی آزمایش اول چند قطره معرف مایر اضافه شد که تشکیل رسوب سفید به این معناست که عصاره دارای آلکالوئید است. به لوله‌ی آزمایش دوم چند قطره معرف واگنر اضافه شد که رسوب قرمز نشان‌دهنده‌ی وجود آلکالوئید است[۳و۴]..

- تشخیص تانن

به منظور شناسایی آلکالوئیدهای موجود در عصاره از دو آزمون استفاده شد. اول آزمون رنگی با محلول کلرید آهن استفاده و به این صورت که ۱۰میلی‌لیتر اتانول بر روی ۰/۲ گرم پودر گیاه ریخته و خوب تکان داده شد سپس محلول مورد نظر از صافی رد شد و به محلول صاف شده پنج قطره محلول کلریدآهن اضافه شد، تغییر رنگ محلول به آبی یا سبز نشان‌دهنده‌ی وجود تانن است. دوم آزمون ژلاتین که در آن ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به جوش آورده شد و ۰/۵ گرم عصاره در آن حل شده و محلول در محیط قرار گرفت تا به دمای آزمایشگاه برسد. سپس پنج قطره محلول سدیم کلرید ۱۰% به محلول اضافه شد تا ترکیبات غیر تاننی رسوب کند، در مرحله‌ی بعد محلول صاف شد و در سه لوله آزمایش ریخته شد، به لوله‌ی آزمایش اول پنج قطره ژلاتین ۱% و به لوله‌ی آزمایش دوم یک قطره کلریدآهن ۱% اضافه شد و لوله‌ی آزمایش سوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ایجاد رسوب در محلول ژلاتین و تولید رنگ سبز یا آبی در محلول کلرید آهن نشان دهنده‌ی وجود تانن در عصاره است[۱۵و۳۳].

- تشخیص سیانیدین برای تعیین آنتوسیانین و فلاونوئید

طبق آزمون منیزیم ابتدا یک گرم عصاره‌ی گیاه سه بار با پترولیوم اتر شسته شد تا چربی و رنگ آن از بین برود. به عصاره‌ی بدون چربی دو میلی‌لیتر مخلوط آب و اتانول (۱:۱) اضافه شد سپس دو میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک غلیظ به محلول اضافه شد، ظهور رنگ قرمز نشانه‌ای بر وجود آنتوسیانین در نمونه‌ی گیاهی است. در مرحله‌ی بعد یک سر اسپاتول پودر منیزیم به محلول و بعد سه میلی‌لیتر الکل آمیلیک اضافه شد. محلول دو فازی تشکیل خواهد شد، ایجاد رنگ قرمز در فاز بالایی نشان دهنده‌ی این است که نمونه‌ی گیاهی دارای فلاونوئید است و تشکیل رنگ قرمز در فاز زیرین نشان می‌دهد که نمونه گیاهی حاوی آنتوسیانین است، ظهور رنگ قرمز در هر دو فاز این را بیان می‌کند که نمونه‌ی گیاهی هم دارای آنتوسیانین و هم دارای فلاونوئید است.

- تشخیص فلاونوئید تام

محتوی تام فلاونوئیدی با استفاده از معرف کلرید آلومینیم اندازه گیری شد. به این صورت که به نیم میلی لیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی از محلول آلومینیم کلراید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱میلی لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیترآب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعداز نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانك قرائت شد. کوئرستین (ساخت مرك) به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد[۳۲و۲۸]

- تشخیص کل ترکیبات فنلی

محتوی تام فنولیك با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. در این روش به نیم میلی‌لیتر از هر عصاره ۲/۵

میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین سیوکالتیو اضافه شده، پس از پنج دقیقه، دو میلی لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. جذب مخلوط دو ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در مقابل بلانك قرائت شد. اسید گالیك به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت .میزان تام فنولیك بر اساس میزان معادل میلی‌گرم اسید گالیك درگرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد [۵و۱۰].

- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

بررسی خاصیت توانایی دادن اتم هیدروژن یا DPPH آنتی‌رادیکالی به روش الکترون در ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی رنگ کردن محلول بنفش ۲ و ۲ – دی فنیل – ۱ -پیکریل هیدرازیل یا DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این روش به عنوان ترکیب رادیکالی پایدار از ماده عنوان معرف(Sigma-Aldrich) DPPH سیگما - الدریچ استفاده شد. به این ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و عصارهای آبی، اتانولی، متانولی در متانول به ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در متانول اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPH علیه بلانك قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید[۱۶و۲۰].

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$ رابطه ۱

در این رابطه، A_{blank} میزان جذب نوری کنترل منفی که تمامی مواد به استثنای عصاره‌ها را دارد، نشان می دهد. A_{sampl} بیان‌گر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه می‌باشد. پس از آن غلظتی از عصاره‌های گیاه که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ درصد بود یا (IC_{50}) توسط نمودار محاسبه گردید. بدیهی است که هر چه این عدد کوچکتر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می باشد. در این تست به عنوان کنترل مثبت از BHT استفاده گردید و کلیه آنتی‌اکسیدان سنتزی آزمایشات سه بارتکرار شدند.

- تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار(Mean ±SD) بیان شده و به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و روش آزمون آنالیز واریانس استفاده شد و سطح معنی‌داری آزمون ها پنج درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

- نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی

ترکیبات طبیعی یا متابولیت‌های ثانویه که غربالگری آن‌ها در عصاره‌ی گیاه صورت گرفته است شامل سه دسته از ترکیبات طبیعی معروف تانن، سیانیدین و آلکالوئید می‌باشند که در جدول ۱، ذکر شده است. همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، عصاره نمونه‌های مختلف نسبت‌های متفاوتی از فاکتورهای مورد بررسی داشتند. آزمون‌های انجام شده آزمون‌های کیفی به شمار می‌روند که نشان دهنده‌ی وجود یا عدم وجود و میزان نسبی ترکیبات مهم فعال در عصاره‌ی گیاه هستند. علامت‌های مثبت نشان‌دهنده‌ی وجود آن ترکیب و علامت‌های منفی نشان‌دهنده‌ی عدم وجود آن ترکیب در عصاره می‌باشد. در این تحقیق آزمایش های فیتوشیمی وجود (+)سیانیدین، تانن و فلاونوئید را در عصاره، و وجود (-) آلکالوئید را در نمونه عصاره تایید نمود. همان طور که اشاره شد آزمون استفاده شده برای تشخیص سیانیدین به آزمون شینودا معروف است، این آزمون حضور آنتوسیانین را با رنگ قرمز اثبات می‌کند. در این تحقیق نمونه‌ی آبیاری غرقابی رنگی روشن‌تر نسبت به سه نمونه‌ی تحت تیمار سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹، ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ و آبیاری قطره‌ای داشت. برای ردیابی تانن‌ها از دو معرف کلریدآهن و ژلاتین استفاده شد. در روش کلریدآهن در هر چهار نمونه با ایجاد رنگ سبز لجنی، به آزمون جواب مثبت نشان دادند. در روش ژلاتین رسوب خاصی مشاهده نشد و بسیار ناچیز بود.

ردیابی آلکالوئیدها در نمونه‌ها با کمک دو معرف واگنر و مایر صورت گرفته است. در آزمون واگنر هیچ یک از چهار نمونه به رنگ قرمز درنیامدند و به آزمون جواب منفی دادند. همچنین در

آزمون مایر رسوب سفید رنگی حاصل نشد که این نشان دهنده‌ی عدم حضور آلکالوئید است.

- نتیجه میزان فلاونوئید تام

سنجش این آزمون با توجه به نمودار خطی جذب بر حسب غلظت برای استاندار کوئرستین در طول موج ۴۱۵ نانومتر انجام شد که در شکل ۱ آمده است. کوئرستین یک فلاونوئید طبیعی است که به منظور مهار نیتریک‌اسید استفاده می‌گردد که اثر سرطان‌زایی آن هم گزارش شده است (Dunnik & Hailey, 1992). نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فلاونوئیدی در تیمارهای مختلف نشان داد که مقدار فلاونوئید در نمونه‌ی تحت تیمار سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ کم‌تر از نمونه‌ای است که با ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ تغذیه شده است. همچنین در بین دو روش آبیاری مقدار فلاونوئید در تیمار غرقابی بیش‌تر از تیمار قطره‌ای بوده است. البته در این دو تیمار مقدار فلاونوئید آن‌ها تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند. در بین عصاره‌ها، نمونه‌ی تیمار سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ کم‌ترین مقدار فلاونوئید و نمونه‌ی ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ بیش‌ترین مقدار فلاونوئید را به خود اختصاص داد (شکل ۲).

جدول۱- آزمون‌های فیتوشیمیایی تیمارهای مختلف عصاره زعفران کلاله زعفران

Table1- Phytochemical tests for different treatments of saffron stigma extract

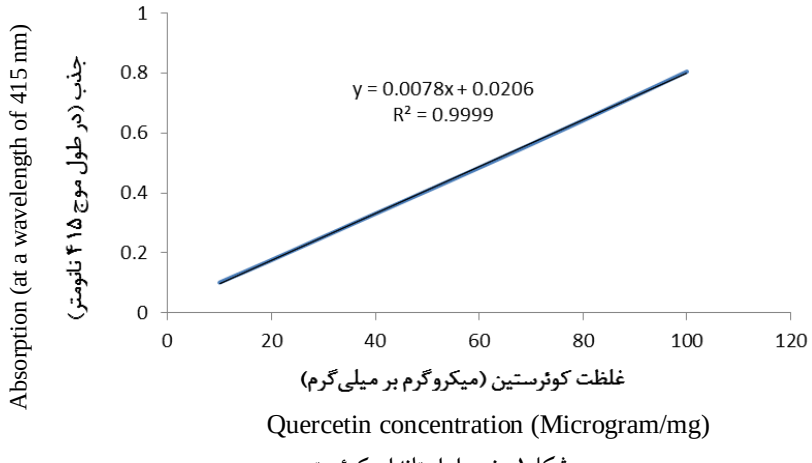
نمونه‌ها	آزمون تانن Tannin test		آزمون سیانیدین	آزمون آلکالوئید	آزمون فلاونوئید
Samples	کلریدآهن Iron chloride	ژلاتین Gelatin	Cyanidin test	Alkaloid test	Flavonoid test
سودوموناس Pseudomonas	+++	+	+++	_	+
آبیاری غرقابی Flooding irrigation	+++	+	++	_	+++
آبیاری قطره‌ای Drip irrigation	+++	+	+++	_	++
ازتوباکتر Azotobacter	+++	+	+++	_	+++

[+] نشان دهنده‌ی وجود ترکیب ثانویه موجود است. هرچه تعداد مثبت‌ها بیش‌تر باشد رنگ مورد نظر پررنگ‌تر است.

[+] Indicates the presence of a secondary compound. The higher the number of positive ones, the desired color is more.

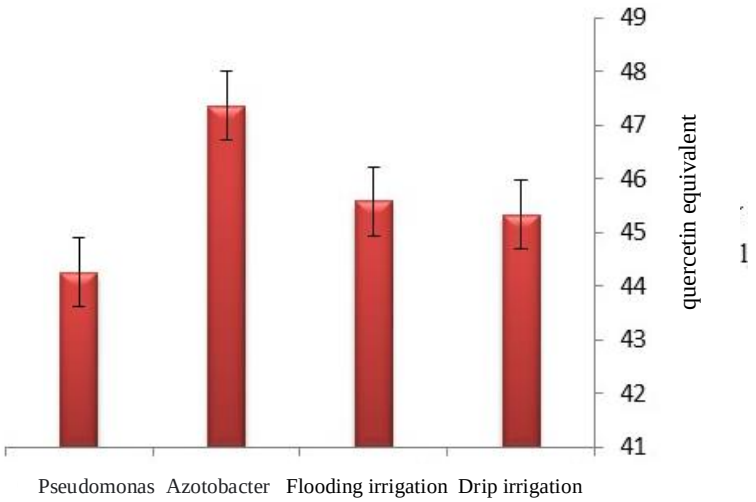
[-] نشان‌دهنده‌ی عدم وجود ترکیب گفته شده می‌باشد.

[-] Indicating the absence of the mentioned compound



شکل ۱ - نمودار استاندارد کوئرستین

Figure 1- Quercetin calibration curve



شکل ۲- میزان فلاونوئید تام بر حسب معادل کوئرستین در تیمارهای مختلف عصاره کلاله زعفران

Figure 2- Total flavonoid content in terms of quercetin equivalent in different treatments of saffron stigma extract

- نتیجه بررسی میزان کل ترکیبات فنلی

همان طور که اشاره شد برای به‌دست آوردن مقدار ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها از آزمون فولین سیکالتو استفاده شد که تعیین‌کننده میزان کل ترکیبات فنلی گیاه است. جذب محلول شامل عصاره با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حضور معرف فولین، در طول موج مذکور پس از دو ساعت خوانده و میزان کل ترکیبات فنلی بر حسب میکروگرم گالیک‌اسید معادل با یک میلی‌گرم عصاره با توجه به نمودار استاندارد محاسبه شد. میزان ترکیبات فنلی خود معیاری از آنتی‌اکسیدانی بودن عصاره‌ها نیز می‌باشد و هر چه این ترکیبات در عصاره‌ها بیش‌تر باشند، عصاره خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری دارند. نتایج این آزمون با توجه به نمودار خطی جذب بر حسب غلظت برای استاندارد گالیک‌اسید در طول موج ۷۶۰ نانومتر در حضور معرف فولین در نمودار ۳ آمده است. با توجه به نمودار مقدار ترکیبات فنلی در نمونه‌ای که آبیاری آن به صورت قطره‌ای بوده از نمونه‌ای که آبیاری آن غرقابی بود بیش‌تر است، همچنین مقدار این ترکیبات در تیمار تحت تیمار سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹بیشتر از ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ است. نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فنلی معادل گالیک‌اسید موجود در عصاره‌ها نشان داد، مقدار ترکیبات فنلی در نمونه‌ی تحت تیمار سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ بیش‌ترین و درنمونه‌ی آبیاری غرقابی کم‌ترین است. نتایج مربوط به این آزمون در شکل ۴ نشان داده شده است.

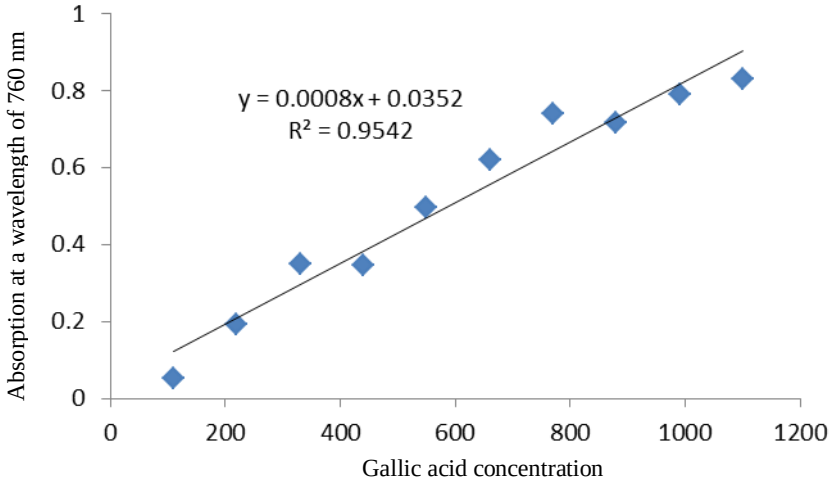
- نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی

به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی از آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. بعد از خواندن جذب محلول هر یک از نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با غلظت ثابت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای هر کدام از نمونه‌ها محاسبه شد (جدول ۲). سپس با توجه به نمودار استاندارد BHT میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره بررسی شد و درصد مهار بر حسب منفی لگاریتم غلظت برای تیمارهای مختلف بر روی نمودار استاندارد رسم شد. هرچه جواب نمونه‌ها به عدد صد در نمودار نزدیک‌تر باشد درصد مهار رادیکال‌های آزاد در آن بیش‌تر و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بیش‌تر است. (شکل‌های ۵ تا ۸). با توجه به جدول ۲ مشاهده می‌شود در نمونه‌ای که به‌صورت قطره‌ای آبیاری شده است، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH آن بیش‌تر است، در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد و به همین ترتیب تیمار ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ مهار کم‌تری در رادیکال‌های DPPH دارد. تمام نمونه‌ها با غلظت ثابت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بررسی شدند.

با توجه به شکل‌های ۵ و۶ درصد مهار رادیکال آزاد نمونه‌ی سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶ برابر ۹۱/۹۶۳ شده است که نشان از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن است. اما در نمونه‌ای که با ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ تغذیه می‌شده است درصد مهار آن

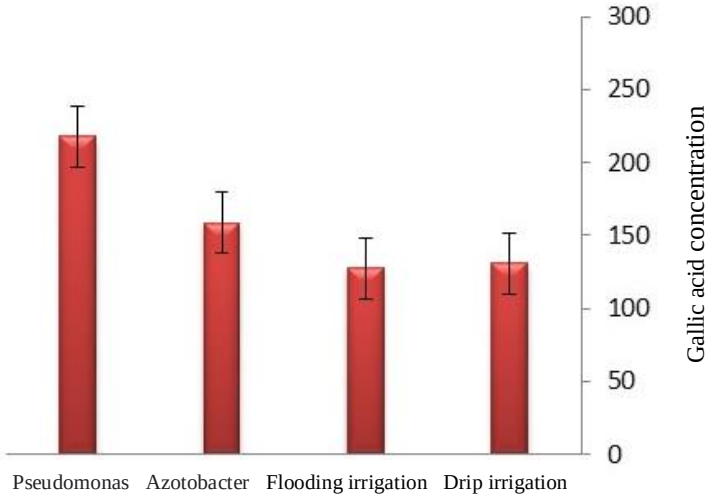
۲۹/۸۷ درصد شده است که نشان دهنده‌ی توانایی کم این نمونه در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH است.

همان‌طور که نتایج شکل‌های ۷ و ۸ نشان می‌دهد، دو نمونه‌ای که به‌صورت غرقابی و قطره‌ای آبیاری می‌شدند، نمونه‌ی آبیاری قطره‌ای با ۹۷/۰۶ درصد، مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را دارد که در تمام نمونه‌ها از درصد بالاتری برخوردار است و در نمونه‌ی آبیاری غرقابی ۸۷/۹۵ درصد مهار داشته است که تا حدی نشانگر مهارکنندگی مناسب عصاره‌ی این نمونه است.



شکل ۳- نمودار استاندارد معادل گالیک اسید

Figure 3- Gallic acid equivalent standard curve



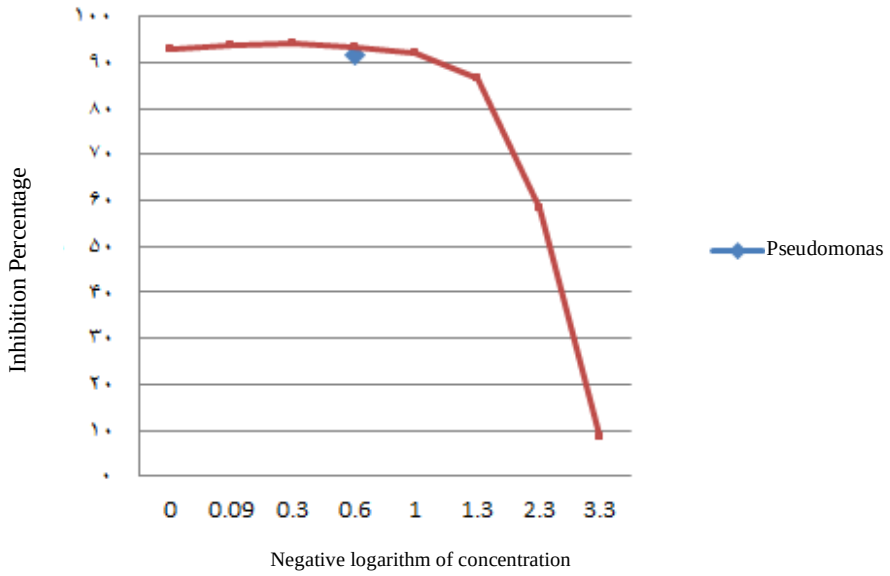
شکل ۴- میزان فنل تام عصاره تیمارهای مختلف کلاله زعفران

Figure 4- The amount of total phenol in the extract of different treatments of saffron stigma

جدول ۲- نتایج آزمون آنتی‌اکسیدانی تیمارهای مختلف عصاره کلاله زعفران

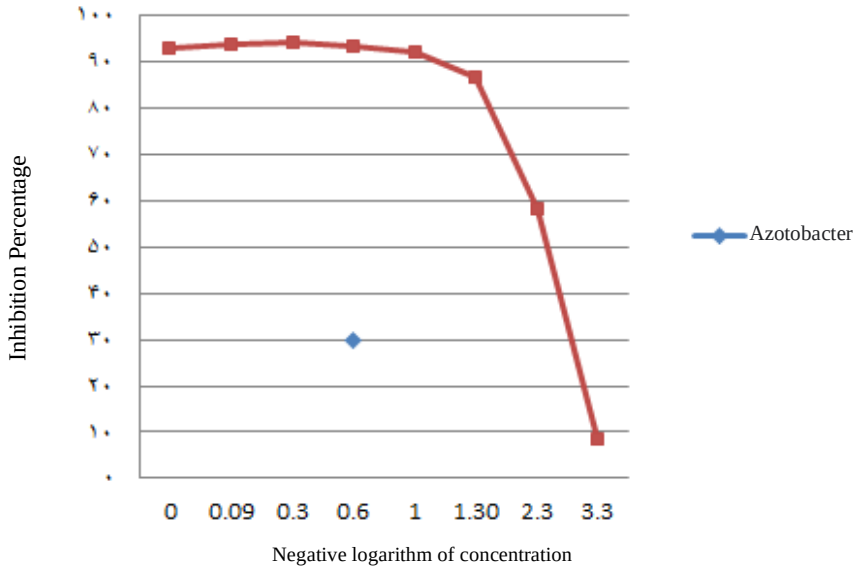
Table2- Antioxidant test results in different treatments of saffron stigma extract

آبیاری قطره‌ای	آبیاری غرقابی	ازتوباکتر	سودوموناس	تیمار
Drip irrigation	Flooding irrigation	Azotobacter	Pseudomonas	Treatment
± 97.06 0.6	0.3 ± 87.95	0.5 ± 29.88	± 91.63 0.4	درصد مهار Inhibition percent



شکل ۵- درصد مهار تیمار سودوموناس روی نمودار استاندار BHT

Figure 5- Inhibition Percentage of Pseudomonas treatment on BHT standard curve

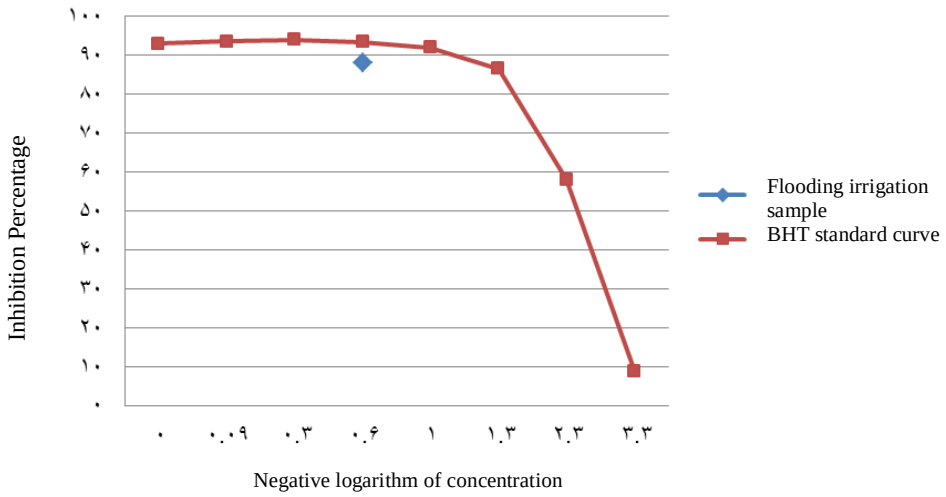


شکل ۶- درصد مهار تیمار ازتو باکتر روی نمودار استاندار BHT

Figure 6- Inhibition Percentage of Azotobacter treatment on BHT standard curve

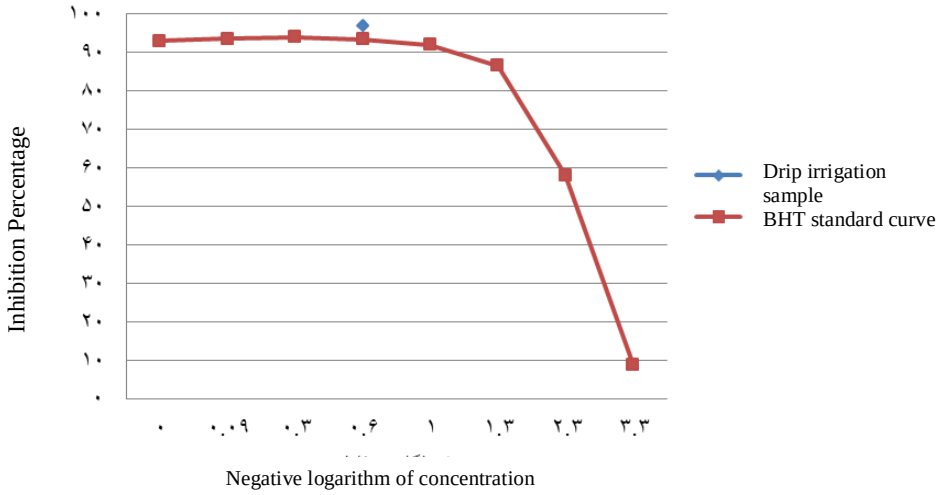
بحث

تاکنون در مورد عملکرد عصاره‌ی این گونه تحت تیمارهای اعمال شده در این تحقیق، گزارشی وجود ندارد اما این نتیجه با نتایج تحقیقات دانشخواه و همکارن [۳۰]. که در آن سطوح مختلف نیتروژن و پتاسیم را بر عملکرد گل و اسانس زعفران بررسی کردند و دریافتند که بیش‌ترین میزان گل‌دهی و وزن تر گل با آمیخته‌ی کودی به میزان ۶۰ کیلوگرم در هکتار به نسبت مساوی برای نیتروژن و پتاسیم و بیش‌ترین عملکرد اسانس با مصرف ۳۰ کیلوگرم در هکتار برای هر کدام از آن‌ها به‌دست آمد مطابقت دارد. در پژوهش‌های دیگر که باز هم در مورد اسانس گیاهان است، نتایج به‌این صورت بود که کاربرد کود شیمیایی در ریحان [۲۹و۳۴]. باعث افزایش میزان اسانس در این گیاهان شده است.



شکل ۷- درصد مهار تیمار آبیاری غرقابی روی نمودار استاندار BHT

Figure 7- Inhibition Percentage of Flooding irrigation treatment on BHT standard curve



شکل ۸- درصد مهار تیمار آبیاری قطره ای روی نمودار استاندار BHT

Figure 8- Inhibition Percentage of Drip irrigation treatment on BHT standard curve

جمشیدی و همکاران [۷و۱۱]. نیز میزان تانن را در گلاب، پساب و تفاله‌ی زعفران در ژنوتیپ‌های مختلف آن بررسی کردند و نتایج تحقیق نشان داد میزان تانن در تفاله‌ی گل قابل توجه بود. این پژوهش‌ها نشان دهنده‌ی وجود آنتوسیانین و تانن در گلبرگ زعفران است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. در این زمینه Pop et al., 2007 بیان کرده‌اند که میزان ماده‌ی موثره (فلاون‌ها) در گیاه همیشه بهار در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص، منجر به افزایش معنی‌دار این ترکیب شده است. در دو نمونه‌ای که سیستم آبیاری متفاوت است اگرچه که میزان این ترکیبات در نمونه‌ی غرقابی بیش‌تر است ولی تفاوت بسیار ناچیزی با نمونه‌ی قطره‌ای دارد [۲۲و۲۳].

ولی‌اوغلو و مازا[۲۴]. برای جداسازی و اندازه‌گیری فلاونوئید در گلبرگ زعفران پژوهشی انجام دادند که بیش از ۲۵ پیک ردیابی شدند و ترکیباتی مثل کامفرول و کوئرستین شناسایی شدند که این ترکیبات جز فلاونوئیدها هستند. در این آزمون عصاره نمونه‌ی ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ بیش‌ترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و نمونه‌ی سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ کم‌ترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را به خود اختصاص داده‌اند. درباره‌ی وجود ترکیبات فنلی در زعفران پژوهش‌هایی انجام شده است و[۲۵]. در پژوهشی از تقطیر گلبرگ‌های زعفران به منبعی از ترکیبات فنلی دست یافتند. از آن‌جایی که به جز نمونه‌ی ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ درصد مهار سه نمونه‌ی دیگر با

نمودار استاندارد BHT بسیار نزدیک بوده و نشان از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن‌هاست که این نتیجه با نتایج دیگران[۲۶] نیز مطابقت دارد و نشان از اثر آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ی این گیاه است.

میزان ترکیبات فنلی و درصد مهار رادیکال‌های آزاد در آزمون آنتی‌اکسیدان رابطه‌ی مستقیم با یکدیگر دارند. به همین دلیل در هر دو آزمون مشاهده می‌شود که نمونه‌ای که سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹ در آن استفاده شده دارای درصد بالای آنتی‌اکسیدان و مقدار فنل است که می‌تواند به دلیل جذب موادی باشد که در تولید ترکیبات فنلی و همین‌طور خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نقش دارند. همان‌طور که در نتایج عنوان شده است، در نمونه‌هایی که آبیاری متفاوت بود تفاوت چندانی بین دو نمونه مشاهده نشد که قابل توجه می‌باشد و به همین دلیل بهتر است از آبیاری قطره‌ای استفاده شود که صرفه‌جویی در مصرف آب هم صورت گیرد.

نتیجه گیری

در این تحقیق نتایج آزمون فیتوشیمیایی، وجود ترکیبات ثانویه‌ای مانند تانن، آنتوسیانین و فلاونوئید و عدم وجود آلکالوئید را تایید کرد. در آزمون میزان فلاونوئید تام اگرچه میزان ترکیبات فلاونوئیدی موجود در نمونه‌های عصاره نزدیک به یکدیگر بودند اما در نمونه‌ای که ازتوباکتر کروکوکوم سویه ۵ به کار برده شده بود این مقدار، کمی بیش‌تر بود. میزان ترکیبات فنلی و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH هم نشان از خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبتا بالای این گونه است. نمونه‌ی سودوموناس فلورسنس سویه ۱۶۹و نمونه‌ی غرقابی به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ترکیبات فنلی و نمونه‌ی قطره‌ای بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داده‌اند. درنتیجه، طبق یافته‌های پژوهش حاضر و سازگاری زعفران به شرایط آب و هوایی کشورمان، وجود فرهنگ دیرینه، تولید و مصرف، رونق و تقاضای بازارهای جهانی محصولات ایران و به تبع آن اشتغال‌زایی و ارزآوری از جمله مسائلی است که توجه خاص به این گیاه را می‌طلبد.

References

[1] Amirshekari H, Sorooshzadeh A, Modarress Sanavy A, and Jalali Javaran M. Study of effects of root temperature, corm size, and gibberellin on underground organs of saffron (*Crocus sativus* L.). Iran. Journal of Biology. 2007; 19(5)18-27. (In Persian with English Summary).

[2] Anwar M, Petra, D.D, Chand S, Alpesh K, Naqvi A.A. and Khanuja S.P.S.. Effect of organic manures and inorganic fertilizer on growth herb and oil yield, nutrient accumulation and quality of French basil. Journal of Communication Soil Science and Plant Analysis. 2005; 36(13):1737-1746.

[3] Ayci F, Aydinili M, Bozdemir A. and Tatus M. Gas chromatographic investigation of Rose concrete, absolute and solid residue, Journal of Flavor and Fragrance. 2005; 20(5): 481-486.

[4] Bashiri M. and Salari A. Using geostatistics for zoning areas suitable for saffron cultivation in the Khorasan Razavi Province Based on Climatological Parameters. Saffron agronomy and technology. 2016;4 (2):155–167. (In Persian with English Summary).

[5] Bashiri M, Maroosi A, Salari A, and Ghodoosi M. Climatic zonation and land suitability determination for saffron in Khorasan-Razavi province using data mining algorithms. ***Saffron Agronomy and Technology***. 2017; ***5***(4):79-392. (In Persian with English Summary).

[6] Bidram F. Identify essential components and antioxidant, antimicrobial and anticancer effects of two plants *Rosa damascene* and Salvia limbata. M.Sc. Thesis, Natural Essential Oil Research Institute. 2016; 7(3). 230. University of Kashan. Iran.130 p. (In Persian with English Summary).

[7] Borrelli A. The influence of the water regimes and nitrogen fertilizing on the production of Roses under glass. Journal of Rivista Della Orto Florofuettioli. 2012; 65:109-117.

[8] Brain K.R, and Turner T.D. The practical evaluation of phytopharmaceuticals. Bristol: Wright-Scientechnica. 1975; 10-30.

[9] Burits M, and Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Journal of Phytotherapy Research. 2000; 14: 323-328.

[10] Chang C.C, Yang M.H, Wen H.M, and Chern, JC. Estimation of total flavonoid content in proplis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food Drug 2000;10: 178-182.

[11] Chhabra S.C, Uiso F.C, and Mshiu E.N. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 1984; 11: 157-179.

[12] Damadzadeh M. Integrated management *Rosa damascene* Mill In connection with the essential oil and rose water in Kashan. The final report of the research project, Agriculture

and Natural Resources Research Center of Isfahan, Iran. 2003; 250 p. (In Persian with English Summary).
[13] Danshkhvah M, Kafi M, Nikbakht A, and Mirjalili M.H. Effect of nitrogen and potassium on performance indices and *Rosa damascene* Mill linseed flowers Kashan. Journal of Horticultural Science and Technology. 2007; 8 (2): 90-83.
[14] Dehghani-Bidgoli R, Salary A, and Bashiri M. Effect of Irrigation Regimes on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Saffron Stigma Extract. Journal of Saffron Research. 2019; 7(1):109-122. (In Persian with English Summary).
[15] Dunnik J.K. and Hailey J. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. Journal of Toxicological Sciences. 1992; 19(3): 423-431.
[16] Emad M, Gheybi F, Rasooli M, Khanjan Zadeh R, and Mohammadi Gozani S. Industrial Herbalist *Rosa damascene* Mill. Pune Publication, Tehran. 2012; 310 p.
[17] [17] Gault M, and Synge P.M. The dictionary of roses in colour. Rainbird References Books, London, UK. 1971; 350 p.
[18] Henry C, and Heppell N. Nutritional losses and gains during processing: future problems and issues. Proceeding of Natural Sciences. 2000; 61: 145-8.
[19] Jaimand K, Rezaei M.b, Asareh MH, Tabaei Aghdaie R, and Moshky zadeh S. Evaluation of the flavonoid species of *Rosa damascene* Mill. Journal of Iran Medicinal and Aromatic Plants Research. 2010; 25 (2): 35-47. (In Persian with English Summary).
[20] Jaimand K, Rezaei M.b, Tabaei Aghdaie R, Naderi Hajibagheri Kennedy M, and Moshky zadeh S. Determination of tannin content in Rose water, wastewater and trash of rose *(Rosa damascene* Mill). Journal of Iran Medicinal and Aromatic Plants Research. 2011; 27 (2): 45-57. (In Persian with English Summary).
[21] Jalali A, Zaefarian F, Torabi B, and Abbasi R. Changes of some growth indices and yield of saffron (*Crocus sativus* L.) in different altitudes. Saffron Agronomy and Technology. 2022; *10*(3): 195-214. (In Persian with English Summary).
[22] Jamshidi M, Ahmadi HR, Rezazadeh Sh, Fathi F, and Mazanderani M. Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. Medicinal Plant. 2010; 9(34): 177-183. (In Persian with English Summary).
[23] Karimi H. Culture of Iranian plants. Volume II. Parcham Publication, Tehran.2005; 450p. (In Persian).
[24] Koocheki A, and Seyyedi S.M. Phonological stages and formation of replacement corms of saffron (*Crocus sativus* L.) during growing period. Saffron Research. 2015; 3(2): 134-154. (In Persian with English Summary).
[25] Makki zadeh Tafti M, Chaiechi M.R, Nasrollahzadeh S, and Khavazi K. Evaluate the effect of nitrogen fertilizers on growth and yield of biological and chemical dill (*Anethum graveolens* L.). Journal of Knowledge of sustainable agricultural production (agricultural knowledge). 2011; 21 (4): 62-51. (In Persian with English Summary).
[26] Ordoñez A, Gomez, J.D, Vattuone, M.A, and lsla M.I. Antioxidant activities of sechium edule (Jacq) Swartz extracts. Journal of Food Chemistry.2006; 97: 452-458.
[27] Ozkan G, Sagdic O, Baydar N.G, and Baydar H. Antioxidant and anti-bacterial activities of *Rosa damascene* flower extracts. Journal of Food Science and Technology. 2004; 10: 277 – 281.
[28] Pop G, Pirsan P, Mateoc-sirb N, and Mateoc T. Influence of technological elements on yield quantity and quality in marigold (*Calendula officinalis* L.) cultivated in cultural conditions of Timisoara. 1st international scientific on Medicinal, Aromatic and Spice plants, Nitra. 2007; December 5 – 6: 20-23.
[29] Raghavendra H, Vijayananda B, Madhumathi G, and Hiremath A. In vitro antioxidant activity of *Vitex negundo* L. Leaf extracts. Chiang Mai Journal of Science. 2010; 37(3): 489-497.
[30] Ramesh P, and Okigbo R.N. Effects of plants and medicinal plant combinations as anti-infectives. Journal of African Pharmacy and Pharmacology. 2008; 2(7): 130-135.
[31] Rezaei M, Jaimand K, Tabaei Aghdaie R, and Barazandeh, M.. Comparison of laboratory and industrial samples in terms of quantity and quality *Rosa damascene* Mill major combinations of Kashan. Journal of Medicinal and Aromatic Plants of Iran 2007; 19: 72-63. (In Persian with English Summary).
[32] Schieber A, Mihalev K, Berardini N, Mollov P, and Carle R. Flavonol Glycosides from distilled petals of Rosa *damascene Mill. Zeitschrift* fur Natuforschung. Journal of Biosciences. 2005; 60: 379- 84.
[33] Velioglu Y.S, and Mazza G. Characterization of flavonoids in petals of *Rosa damascene* By HPLC and spectral analysis. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1991; 39: 463-7.

he effect of irrigation system and two variants of PGPR on phenolic compounds and antioxidant activity of *saffron* stigma extract

Dehghani Bidgoli R.[1*]

[1] Department of Nature Engineering, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Kashan University, Kashan, Iran

* (Corresponding author): dehghanir@kashanu.ac.ir

Received: June 2024 Accepted: August 2024

Abstract

Introduction: Phenolic compounds (flavonoids, tannins, and anthocyanin) are considered as most important natural antioxidants and many factors such as environmental parameters and plant nutrition affect their quantity and quality. One of the native medicinal plants of Iran is saffron with the scientific name of *Crocus sativus Var. officinalis.* That the use of its compounds be traced to ancient times and there is natural and cultivated in the different regions of the country.

Methods: This study is done with aims to evaluate the quality and quantity of phenolic compounds and antioxidant activity Saffron species under the influence of two types of PGPR (Azotobacter chroococcum 5 and pseudomonas fluorescens 169) and two irrigation systems (flooding and drip). In this study, plant phytochemistry study was conducted initially, and then measuring a number of phenolic compounds and flavonoids were spectrophotometry method. Finally, the antioxidant activity of the extract was measured in different concentrations using free radical scavenging (DPPH). Data analysis was performed by using SPSS version 19 software and ANOVA test.

Results: The results of phytochemical tests confirmed the compounds such as tannins, anthocyanins and flavonoids and absence of alkaloids. A number of flavonoid compounds in the sample with Azotobacter chroococcum 5 was more than other samples. pseudomonas fluorescens 169 and flooding treatments had the highest and lowest number of phenolic compounds and drip irrigation showed the highest antioxidant properties.

Discussion: Therefore, the use of growth-stimulating bacteria and replacing the drip irrigation system in saffron cultivation is suggested.

Keywords: Flavonoids, PGPR, Drip irrigation, Extract, *Saffron*.