



اثر دمای محیط ریشه بر فعالیت آنتی اکسیدانت‌های بنه زعفران

فاطمه نصیریان¹، علی سروش زاده^{2*}، فائزه قناتی³ و حسین اورکی⁴

تاریخ پذیرش: 1393/4/30

تاریخ دریافت: 1392/9/16

چکیده

به منظور ارزیابی اثر دمای محیط ریشه بر رشد و فعالیت آنتی اکسیدانت‌های موجود در بنه زعفران، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط اتاق رشد اجرا گردید. در این آزمایش اثر دو دمای 23 ± 1 و 33 ± 1 درجه سانتی‌گراد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و اکسین اکسیداز در جوانه انتهایی و بنه زعفران از تیمار (دوره خواب بنه) تا مهرماه (شروع رشد بنه) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر دو دما، فعالیت آنزیم‌ها در تیمار حد اقل بود. در مهرماه فعالیت آنزیم‌های مذکور در دمای 23 درجه سانتی‌گراد هم‌زمان با شروع رشد ریشه، جوانه انتهایی و برگ در بنه‌های زعفران افزایش یافت، اما در دمای 33 درجه سانتی‌گراد، هیچ‌گونه تغییری در فعالیت‌های آنزیمی مشاهده نشد. همچنین بیشترین میزان قندهای محلول (گلوکز، مانوز و آرابینوز) در جوانه و بنه زعفران در دمای 23 درجه سانتی‌گراد به دست آمد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد دمای 33 درجه سانتی‌گراد در محیط کشت با ایجاد اختلال در فعالیت آن‌ها موجب ادامه خواب در بنه‌های زعفران می‌شود و در مقابل در دمای 23 درجه سانتی‌گراد، افزایش فعالیت آنزیمی موجب تحریک رشد زعفران می‌شود.

کلمات کلیدی: آکسین اکسیداز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، زعفران، سوپر اکسیداز، دسموتاز، کاتالاز.

مقدمه

زمستان است که باعث می‌شود این گیاه آفت و بیماری مهمی نداشته و نیازی به سم‌پاشی‌های مکرر نداشته باشد (Behnia, 1992). علاوه بر این نیاز برای آبیاری در زعفران هنگامی است که سایر گیاهان زراعی به آب نیازی نداشته و در مقابل در دوران خواب تابستانی نیاز به آبیاری ندارد، بنابراین رقابتی با سایر گیاهان برای آب ندارد (Behnia, 1992). از طرف دیگر، زعفران گیاهی چندساله است و فقط در یک سال هزینه کشت دارد و در مقابل چندین سال قابل بهره‌برداری است (Ebrahimpor & Ramezani, 1989). به این دلیل در شرایط اقلیمی کشور ما که آب یکی از عوامل اصلی محدودکننده توسعه کشاورزی است، گسترش کشت زعفران از بازده اقتصادی خوبی برخوردار است. به طور متوسط از هر هکتار زمین زیر کشت حدود 5 کیلوگرم محصول خشک‌شده زعفران به دست می‌آید که با توجه به قیمت کنونی آن، درآمد نسبتاً مناسبی است و در صورت رعایت اصول صحیح کاشت و داشت میانگین تولید تا 12 کیلوگرم در هکتار هم قابل افزایش است. خوش‌خو (Khoshkho, 1988) اظهار داشت که تمایل به گلدهی در بنه‌ها با انبار کردن آن‌ها در درجه

زعفران یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و صادراتی ایران و گران‌بهارترین ادویه جهان است. مبدأ اصلی زعفران را آسیا به‌ویژه کشورهای ایران و چین می‌دانند و پراکندگی آن از پرتقال و مراکش در غرب اسپانیا گرفته تا قرقیزستان و ایالت سین کیانگ چین ادامه می‌یابد (Hill, 2004). طبق آمارنامه کشاورزی، میزان تولید زعفران در سال 1389 به مقدار 239245 کیلوگرم بوده که در سال 1390 به حدود 254060 کیلوگرم رسیده و 6/2 درصد رشد داشت که عمدتاً در شهرهای جنوبی و مرکزی خراسان رواج دارد (Amarnamh, Keshavarzi, 2011). رویش این گیاه در فصل‌های سرد پاییز و

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

2- دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

3- دانشجوی دکتری گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

4- دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس.

*- نویسنده مسئول: (Email: soroosh@modares.ac.ir)

فنل اکسیداز < لیگنین پراکسیداز

و آنزیم‌ها برحسب میزان فعالیت به صورت زیر طبقه‌بندی شدند:

لیگنین پراکسیداز < دیانیزین پراکسیداز < کاتالاز < پلی فنل اکسیداز

اگرچه فعالیت‌های آنزیمی در طول دوره خواب محدود می‌شوند، ولی برخی از آن‌ها برای ادامه بقا ضروری است (Rietveld et al., 2000). برای مثال یک غده زیرزمینی مربوط به هر گیاهی در معرض انواع گوناگون تنش‌ها مانند گرما، سرما و خشکی قرار می‌گیرد که همه آن‌ها می‌توانند منجر به تنش‌های اکسیداتیو شوند، از این‌رو آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی احتمالاً حتی در زمان خواب نیز فعال‌اند (Keyhani et al., 2003). آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله آنزیم‌هایی هستند که گیاهان برای دفاع علیه صدمات اکسیداتیو به کار می‌برند (Keyhani et al., 2003). فعالیت این آنزیم‌ها در پیازهای در حال خواب زعفران گزارش شده است (Keyhani et al., 2003). با وجود تحقیقات انجام‌شده در مورد فعالیت آنزیم‌ها در زعفران تاکنون در مورد تأثیر تغییرات دما بر فعالیت‌های آنزیم‌ها در جوانه و بنه زعفران و ارتباط این فعالیت‌ها با رشد زعفران تحقیقی صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در اتاقک رشد مجهز به دستگاه تنظیم دمای محیط ریشه در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس در سال 1392 اجرا گردید. در این دستگاه همانند گزارش امیر شکاری و همکاران (Amirshकारी et al., 2007)، برای تنظیم دمای محیط ریشه 12 گلدان در داخل مخزن محتوی آب تعبیه شدند. دمای آب داخل مخزن به وسیله دستگاه‌های سردکننده و گرم‌کننده کنترل شد. دمای آب داخل مخزن از طریق فرایند جابجایی در اطراف ظروفی که گلدان‌ها در داخل آن قرار داشتند به محیط ریشه‌ها انتقال می‌یافت. با استفاده از این دستگاه دمای محیط ریشه برای 6 گلدان در حدود 23 ± 1 و برای 6 گلدان دیگر در حدود 33 ± 1 درجه سانتی‌گراد در دوره خواب بنه‌های زعفران تنظیم شد. به این منظور بنه‌های زعفران در خردادماه (از مزرعه 3 ساله در استان تهران، مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) تهیه شده و پس از جدا کردن پوسته رویی و بنه‌های تحلیل رفته مادری، در محلول بنومیل 2 درصد به منظور جلوگیری از فعالیت قارچی ضد عفونی شدند.

حرارت 25-30 درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد و به نظر می‌رسد که قرار گرفتن بنه‌ها در معرض درجه حرارت‌های بالا در طولانی مدت باعث عدم تشکیل جوانه‌های اولیه گل در آن‌ها می‌گردد. این محقق اظهار داشت که درجه حرارت‌های متوسط (8-12 درجه سانتی‌گراد) مناسب‌ترین درجه حرارت برای تشکیل جوانه گل می‌باشد و زمانی که بنه‌ها در صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند فقط تعداد کمی از آن‌ها به گل می‌رود. در آزمایشی که توسط مولینا و همکاران (Molina et al., 2003) بر روی تأثیر دما بر گلدهی گیاه زعفران صورت گرفت مشاهده شد که دما فاکتور اصلی در سرعت رشد اندام‌های هوایی زعفران است. دمای لازم برای تشکیل جوانه اولیه گل (20 درجه سانتی‌گراد) در زعفران بیش از دمای لازم برای ظهور گل (17 درجه سانتی‌گراد) بود. از این‌رو در مناطق گرمسیر جوانه گل زودتر تشکیل شده و ظهور گل دیرتر صورت می‌گیرد. در آزمایشی به بررسی تأثیر دماهای مختلف (9-30 درجه سانتی‌گراد) در دوره خواب زعفران بر گلدهی آن پرداخته شد (Molina et al., 2005). نتایج نشان داد حداکثر تعداد گل در دمای 25 درجه با یک دوره نگهداری 90-150 روزه مشاهده شد (Molina et al., 2005). دوره نگهداری 180 روزه باعث عدم تکامل گل‌ها شد و نگهداری بنه‌ها در 30 درجه سانتی‌گراد تنها در مدت 90-120 روز تولید گل کرد و در یک دوره طولانی‌تر توقف گلدهی را در پی داشت (Molina et al., 2005). در دمای 30 درجه تعداد کمتری جوانه گل تشکیل شد و این دما عدم تکامل برخی گل‌ها را به همراه داشت (Molina et al., 2005). دوره خواب و رشد بعدی گیاهان تحت تأثیر فعالیت‌های هورمونی و آنزیمی است که این فعالیت‌ها تحت تأثیر محیط قرار دارند (Rietveld et al., 2000). علی‌رغم مطالعات زیادی که در مورد فعالیت‌های آنزیمی در گیاهان صورت گرفته، اطلاعات کمی در مورد فعالیت‌های آنزیمی در زعفران وجود دارد (Keyhani et al., 2006). تنش‌های محیطی تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌کنند و فعالیت این رادیکال‌های آزاد باعث مسمومیت و به هم خوردن نظم واکنش‌ها و مرگ سلول می‌شود. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با خاصیت نابودکنندگی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن مانع این اختلال می‌شوند (Adams et al., 1999). در آزمایشی کیهانی و همکاران (Keyhani et al., 2006) به شناسایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موجود در بنه زعفران پرداختند. طبق نتایج این محققین، ترتیب آنزیم‌ها بر اساس مقدار در هر میلی‌گرم پروتئین عصاره به صورت زیر قابل طبقه‌بندی شدند:

کاتالاز < سوپر اکسیداز < دیانیزین پراکسیداز < پلی

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر دما بر آنزیم‌ها و قندهای محلول در تیرماه در بنه و جوانه.
 Table 1-Analysis of variance of the effect of temperature on enzymes and soluble sugars in July in saffron corm and buds.

منابع تغییر	درجه آزادی df	آرابینوز Arabinose		مانوز Mannose		گلوکز Glucose		اکسین اکسیداز Auxin oxidase		سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase		پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase		پراکسیداز Peroxidase		کاتالاز Catalase	
		corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude
دما Temperature	1	0	0.0004 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.0006 ^{ns}	1.9*	0.00004 ^{ns}	51.76*	56.43*	0.6535**	0.0572**	0.00007 ^{ns}	0.0264*	0.0004 ^{ns}	0.0005 ^{ns}		
خطا Error	4	0.015	0.014	0.0001	0.0004	0.41	0.0073	3.049	4.836	0.0004	0.002	0.0232	0.0025	0.0198	0.0019		
ضرب تغییرات C.V	-	12	24	16	6	6	23	2	8	9	3	7	3	22	12		

ns = غیر معنی دار * = تفاوت معنی دار در سطح 5٪ ** = تفاوت معنی دار در سطح 1٪
 * = p < 0.05, ** = p < 0.01, NS = non-significant

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر دما بر آنزیم‌ها و قندهای محلول در مردادماه در بنه و جوانه
 Table 2-Analysis of variance of the effect of temperature on enzymes and soluble sugars in August in saffron corm and buds.

منابع تغییر	درجه آزادی df	آرابینوز Arabinose		مانوز Mannose		گلوکز Glucose		اکسین اکسیداز Auxin oxidase		سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase		پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase		پراکسیداز Peroxidase		کاتالاز Catalase	
		corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude
دما Temperature	1	0.008**	0.003**	0.007**	0.030**	0.164**	0.026**	6.02*	1.25**	110*	480**	0.6**	0.1**	0.0056 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.0005 ^{ns}	0.13**
خطا Error	4	0.0005	0.0001	0.0002	0.001	0.0009	0.0009	0.19	0.03	7.5	8.3	0.008	0.004	0.0056	0.009	0.0026	0.0006
ضرب تغییرات C.V	-	21	14	9	13	9	7	18	4	11	10	8	12	7	6	15	6

ns = غیر معنی دار * = تفاوت معنی دار در سطح 5٪ ** = تفاوت معنی دار در سطح 1٪
 * = p < 0.05, ** = p < 0.01, NS = non-significant

سنجش فعالیت کاتالاز با روش (Cakmak & Horst, 1991) و با عصاره‌های به‌دست‌آمده از مرحله اول تعیین شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت سوپر اکسید دسموتاز از روش فوتوشیمیایی (Constantine et al., 1977) استفاده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز برحسب تغییرات جذب به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره و بر اساس روش پاندولفینی سنجش شد (Pandolfini et al., 1992). همچنین بر اساس روش کان میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز اندازه‌گیری شد (Kan, 1975). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر و بر اساس روش پرسوی صورت گرفت (Pressy, 1990). میزان قندهای محلول نیز با استفاده از روش دوبیوس اندازه‌گیری شد (Dubois et al., 1956). در این آزمایش برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه آماری SAS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس اثر دو دمای 23 و 33 درجه بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، پلی فنل اکسیداز (PPO)، اکسین اکسیداز (IAAO) و سوپر اکسیددیسموتاز (SOD) در بافت جوانه و قسمت انتهایی بنه زعفران در طول 4 ماه (تیر، مرداد، شهریور و مهر) بررسی شد. نتایج نشان داد که در تیرماه دما اثر معنی‌داری بر مقدار ترکیبات قندی در جوانه و بنه زعفران نداشت. در مقابل فعالیت برخی از آنزیم‌ها در این ماه در جوانه و بنه به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر دما قرار گرفت (جدول 1).

در جوانه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و اکسین اکسیداز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار نگرفت، اما فعالیت بقیه آنزیم‌ها (پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما در این ماه قرار گرفت. در تیرماه در بنه‌های زعفران فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار نگرفت، اما فعالیت بقیه آنزیم‌ها (پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و اکسین اکسیداز) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مردادماه دما اثر معنی‌داری بر مقدار ترکیبات قندی و فعالیت اکثر آنزیم‌ها در جوانه و بنه زعفران نداشت. تنها فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در بنه تحت تأثیر قرار نداشت (جدول 2).

در هر گلدان 5 بنه زعفران در عمق 15 سانتی‌متری در پرلیت درشت کشت و در اتاق رشد قرار داده شد. در این آزمایش برای تنظیم دمای منطقه ریشه از دستگاه‌های مخصوص تنظیم دما استفاده شد. هر دستگاه میرد به ترتیب دارای طول، عرض و ارتفاع 120، 60 و 32 سانتی‌متر بود. سیستم تهویه موجود در اتاقک رشد قابلیت تنظیم درجه حرارت داخل اتاق رادار است و همچنین اتاقک رشد قابلیت تنظیم نور و رطوبت موردنیاز را دارد. آزمایش در اتاقک رشد با دمای هوای ثابت 21 درجه سانتی‌گراد و با دوره 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی انجام گرفت. دمای 12 گلدان گروه اول در حدود 23 ± 1 و دمای 12 گلدان گروه دوم 33 ± 1 تنظیم شد. دمای گلدان‌ها به‌منظور اطمینان از صحت کار دستگاه یک روز در میان به‌وسیله دماسنج جیوه ای اندازه‌گیری شد. نمونه‌برداری به‌صورت کاملاً تصادفی از بین گلدان‌ها در هر مخزن صورت گرفت. در هر نمونه‌برداری 3 بنه از هر درجه حرارت به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس 2 گرم از قسمت جوانه انتهایی و 2 گرم از بافت انتهایی بنه از هر نمونه به‌صورت جداگانه برداشت و پس از انجماد با نیتروژن مایع علامت‌گذاری شده و به فریزر 80- درجه منتقل گردید. نمونه‌برداری یک‌بار در ماه و به مدت 4 ماه ادامه یافت. پس از مشاهده ظهور ریشه‌ها اولین آبیاری بنه‌ها در اتاق کشت صورت گرفت. میزان آب مصرف‌شده در تمام گلدان‌ها برابر بود، به‌گونه‌ای که پس از مشاهده ریشه‌های اولیه دانه‌های پرلیت کاملاً خیس شدند و درعین حال آب اضافی نیز به‌منظور جلوگیری از غرقابی بنه‌ها از گلدان‌ها خارج شد. فاصله آبیاری‌ها با سنجش میزان رطوبت گلدان‌ها به‌صورت چشمی تنظیم می‌شد و پس از مشاهده ظهور برگ‌ها از محلول غذایی کامل به همراه آب استفاده شد. سنجش آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه‌ها در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. ابتدا 0/2 گرم از هر نمونه وزن شد و در هاون همراه با 3 میلی مول بافر فسفات پتاسیم (pH=8/6) ساییده شد. هم‌گنای حاصل در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و با سرعت 12000 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره‌های سانتریفیوژ شده پس از عبور از کاغذ صافی به اپندورف منتقل شدند و پس از ثبت نام تیمار بر روی آن‌ها به فریزر 27- درجه جهت استفاده بعدی منتقل شدند. عصاره‌های به‌دست‌آمده در این روش برای سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و کربوهیدرات‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر دما بر آنزیمها و قندهای محلول در شهپرورماه در بنه و جوانه
 Table 3-Analysis of variance of the effect of temperature on enzymes and soluble sugars in saffron corm and buds.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	آرابینوز Arabinose		مانوز Mannose		گلوکز Glucose		اکسین اکسیداز Auxin oxidase		سوپراکسید دیسموئاز Superoxide dismutase		پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase		پراکسیداز Peroxidase		کاتالاز Catalase	
		corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude
دما Temperature	1	0.011**	0.013**	0.0211**	0.1326**	0.77**	0.83**	7.7**	5.7**	649**	882**	0.08**	1.12**	0.29**	0.69**	0.12**	0.2**
خطا Error	4	0.00008	0.0002	0.0002	0.0005	0.0007	0.0006	0.08	0.18	6.7	15.3	0.0006	0.004	0.01	0.004	0.003	0.005
ضریب تغییرات C.V	-	15	15	6	7	5	4	10	9	9	12	7	9	8	3	14	15

(ns) = غیر معنی دار * = تفاوت معنی دار در سطح 5٪ ** = تفاوت معنی دار در سطح 1٪
 * = p < 0.05, ** = p < 0.01, NS = non-significant

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر دما بر آنزیمها و قندهای محلول در مهرماه در بنه و جوانه
 Table 4-Analysis of variance of the effect of temperature on enzymes and soluble sugars in saffron corm and buds.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	آرابینوز Arabinose		مانوز Mannose		گلوکز Glucose		اکسین اکسیداز Auxin oxidase		سوپراکسید دیسموئاز Superoxide dismutase		پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase		پراکسیداز Peroxidase		کاتالاز Catalase	
		corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude	corm	bude
دما Temperature	1	0.024**	0.002*	0.042**	0.014*	1.81**	0.27**	12/96**	3.76**	1179**	747**	0.34**	1.078**	1.24**	0.48**	1.03**	0.33**
خطا Error	4	0.0002	0.0001	0.0003	0.001	0.0008	0.004	0.005	0.05	11.3	17.1	0.0006	1.01	0.013	0.017	0.01	0.005
ضریب تغییرات C.V	-	18	11	6	16	4	18	2	5	10	13	5	13	6	5	19	15

(ns) = غیر معنی دار * = تفاوت معنی دار در سطح 5٪ ** = تفاوت معنی دار در سطح 1٪
 * = p < 0.05, ** = p < 0.01, NS = non-significant

در جوانه انتهایی زعفران زراعی بنیان‌گذاری و تمایز اندام‌های گل با افزایش در فعالیت پراکسیدازی و اکسین اکسیدازی همراه است (Gasper et al., 1982). با بررسی فعالیت پراکسیدازی و اکسین اکسیدازی در ارتباط با ریخت‌زایی گل در توتون (در گیاه کامل و در کشت بافت) محققان نشان دادند که مرحله آغاز ریخت‌زایی گل یا مرحله تشکیل ساختمان‌های گل با افزایش فعالیت پراکسیداز ارتباط دارد (Sergeeva et al., 1985; Sergeeva et al., 198). در کنوپودیوم (*Chenopodium species*) مشخص شده است که فعالیت ایزوپراکسیدازهای بازی با وضعیت و حالت رشد و نمو گیاه ارتباط دارد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان نشانگر انتقال از رشد رویشی به زایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Krekule et al., 1985). به گزارش ابراهیم‌زاده و ابریشم‌چی (Ebrahimzadeh & Abrishamchi, 2001)، افزایش پراکسیداز یکی از شاخص‌های تغییر حالت مرفوزن گیاه است. نقش پراکسیدازها و ارتباط آن با ترازاکسین، در تنظیم ریخت‌زایی گیاهی مورد توجه بسیار قرار گرفته است.

پراکسیداز ممکن است به خاطر مشارکت در حفظ ثبات درونی اکسین، از طریق کاتابولیسم آن در فرآیند تشکیل گل نقش داشته باشد (Gifford, 1964).

به عقیده برخی محققان افزایش فعالیت پراکسیدازهای بازی ناشی از برداشته شدن اثر مواد خاصی است که به مواد پوشاننده معروف هستند و کاهش سریع آنان باعث افزایش فعالیت پراکسیدازهای بازی می‌شود. از جمله این مواد می‌توان ترکیبات فنلی را نام برد (Gasper et al., 1982). پلی فنل اکسیداز به‌طور غیرمستقیم قادر به تنظیم ساخت ترکیبات فنلی است که در اندام‌زایی و به‌ویژه ریشه‌زایی نقش دارند. نقش پلی فنل اکسیداز در ریشه‌زایی همراه و همگام با پراکسیداز عمل می‌کند (Sangari, 1994). بنابراین می‌توان گفت که افزایش سطح پلی فنل اکسیداز سبب کاهش ترکیبات فنلی شده و کاهش این ترکیبات از طریق کاهش غلظت اکسین سبب افزایش فعالیت پراکسیدازها و القای رشد می‌شود.

ویگل و نیلسون (Weigel & Nilson, 1995) نشان دادند که میزان اکسین در بنه زعفران زراعی که ضمن دوره خواب تغییر چندانی نکرد و در فاصله بین پایان دوره خواب تا زمان تشکیل اندام‌های گل افزایش می‌یافت و این افزایش به‌صورت ملایم و تدریجی تا آغاز دوره شکوفایی برگ‌ها و گل ادامه پیدا می‌کرد.

تجزیه واریانس اثر دما بر فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات قندی در جوانه و بنه زعفران در شهر یور و مهرماه نشان‌دهنده آن است که در این دو ماه فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات قندی در جوانه و بنه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر متغیر دما قرار گرفت (جدول 3 و 4).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در تیرماه فعالیت آنزیم کاتالاز و مقدار قندهای گلوکوز و مانوز در جوانه و بنه در دو دمای 23 و 33 درجه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار قند محلول آرابینوز در بنه و اکسین اکسیداز در جوانه در دمای 23 و 33 درجه تفاوت معنی‌داری نداشت. در مقابل در این ماه فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در جوانه در دمای 23 درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای 33 درجه سانتی‌گراد بود. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار قند آرابینوز در جوانه و فعالیت اکسین اکسیداز در بنه در دمای 23 درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای 33 درجه بود (جدول 5). مقایسه میانگین‌های فعالیت آنزیم‌ها و مقدار قندهای محلول در جوانه و بنه زعفران در دمای 23 و 33 درجه در مردادماه نشان‌دهنده آن است که تنها فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در بنه در دمای 23 و 33 درجه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت.

اما فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در جوانه و فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و اکسین اکسیداز و قندهای محلول گلوکوز، مانوز و آرابینوز در جوانه و بنه در دمای 23 درجه بیش از دمای 33 درجه بود (جدول 6).

جدول‌های 7 و 8 نشان‌دهنده مقایسه میانگین‌های فعالیت آنزیم‌ها و مقدار قندهای محلول در جوانه و بنه زعفران در دمای 23 و 33 درجه در شهر یور و مهرماه است. با توجه به این جدول می‌توان نتیجه گرفت که در این دو ماه فعالیت همه آنزیم‌ها و مقدار همه قندهای محلول مورد بررسی در دمای 23 درجه بیشتر از دمای 33 درجه بود. کاتالاز از جمله آنزیم‌هایی است که نسبت به تغییرات دمایی بسیار حساس است و در دمای 30 درجه به بالا غیرفعال خواهد شد. پس می‌توان نتیجه گرفت که تیمار دمایی 33 درجه سانتی‌گراد، فعالیت کاتالاز در بنه زعفران را دچار اختلال می‌نماید (Keyhani et al., 2004). البته میزان بیشتر کاتالاز در جوانه در طی ماه‌های مرداد تا شهریور نیز از این طریق قابل توجیه است به‌طوری‌که غلظت زیاد کاتالاز در طی این ماه‌ها گلدهی را تحریک خواهد کرد و در نهایت تثبیت فعالیت کاتالاز در ماه‌های شهریور تا مهر نیز می‌تواند به علت حساسیت دوره گلدهی به غلظت‌های زیاد اکسین باشد.

جدول ۵- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها و مقدار قندهای محلول در جوانه و بنه زعفران در دو دمای ۲۳ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد در تیرماه

Table 5-Mean comparison of enzyme activity and soluble sugar content of buds and corm of saffron at two temperatures, 23 and 33 ° C in July

منابع تغییرات S.O.V	آرابینوز خشک (میلی گرم/وزن خشک)	مانوز خشک (میلی گرم/وزن خشک)	گلوکز (میلی گرم/وزن خشک)	اکسین اکسیداز (میلی گرم/تغییرات ۵۲۵ جذب)	سوپراکسیددیسوتاز (میلی گرم/تغییرات ۵۶۰ جذب)	پلی فنل اکسیداز (میلی گرم/تغییرات ۴۱۰ جذب)	پروکسیداز (میلی گرم/تغییرات ۴۷۰ جذب)	کاتالاز (میلی گرم/تغییرات ۲۴۰ جذب)	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)
	Arabinose (mg.g dry weight)	Mannose (mg.g dry weight)	Glucose (mg.g dry weight)	Auxin oxidase (mg pro. absorb in 525 ⁻¹)	Superoxide dismutase (mg pro.absorb in 560 ⁻¹)	Polyphenol oxidase (mg pro.absorb in 410 ⁻¹)	Peroxidase (mg pro. absorb in 470 ⁻¹)	Catalase (mg pro.absorb in 240 ⁻¹)	
جوانه buds	0.06 ^a 0.05 ^b	0.17 ^a 0.16 ^b	0.37 ^a 0.29 ^a	3.55 ^a 3.54 ^a	25.7 ^a 19.57 ^b	0.61 ^a 0.41 ^b	1.63 ^a 1.5 ^b	0.38 ^a 0.32 ^a	23 33
بنه corm	0.015 ^a 0.014 ^a	0.15 ^a 0.13 ^a	0.19 ^a 0.18 ^a	3.94 ^a 1.47 ^b	33.22 ^a 17.34 ^b	0.91 ^a 0.25 ^b	1.06 ^a 1.05 ^a	0.31 ^a 0.30 ^a	23 33

حروف نامشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد.
a, b Within columns, means followed by the same letters are not significantly different.

جدول ۶- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها و قندهای محلول در جوانه و بنه زعفران در دو دمای ۲۳ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد در مردادماه

Table 6-Mean comparison of enzyme activity and soluble sugar content of buds and corm of saffron at two temperatures, 23 and 33 °C in August

منابع تغییرات S.O.V	آرابینوز خشک (میلی گرم/وزن خشک)	مانوز خشک (میلی گرم/وزن خشک)	گلوکز (میلی گرم/وزن خشک)	اکسین اکسیداز (میلی گرم/تغییرات ۵۲۵ جذب)	سوپراکسیددیسوتاز (میلی گرم/تغییرات ۵۶۰ جذب)	پلی فنل اکسیداز (میلی گرم/تغییرات ۴۱۰ جذب)	پروکسیداز (میلی گرم/تغییرات ۴۷۰ جذب)	کاتالاز (میلی گرم/تغییرات ۲۴۰ جذب)	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)
	Arabinose (mg.g dry weight)	Mannose (mg.g dry weight)	Glucose (mg.g dry weight)	Auxin oxidase (mg pro.absorb in 525 ⁻¹)	Superoxide dismutase (mg pro.absorb in 560 ⁻¹)	Polyphenol oxidase (mg pro.absorb in 410 ⁻¹)	Peroxidase (mg pro.absorb in 470 ⁻¹)	Catalase (mg pro.absorb in 240 ⁻¹)	
جوانه buds	0.096 ^a 0.051 ^b	0.31 ^a 0.17 ^b	0.5 ^a 0.37 ^b	4.71 ^a 3.8 ^b	35.78 ^a 17.87 ^b	0.66 ^a 0.38 ^b	1.7 ^a 1.5 ^b	0.42 ^a 0.32 ^b	23 33
بنه corm	0.08 ^a 0.01 ^b	0.19 ^a 0.11 ^b	0.48 ^a 0.15 ^b	3.39 ^a 1.39 ^b	27.42 ^a 18.84 ^b	0.95 ^a 0.27 ^b	1.01 ^a 0.9 ^a	0.34 ^a 0.32 ^a	23 33

حروف نامشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد.
a, b Within columns, means followed by the same letters are not significantly different.

در بررسی کیهانی و همکاران (Keyhani et al., 2006)، فعالیت انواع آنزیم‌های جاروب کننده پراکسید هیدروژن از جمله کاتالاز، سوپراکسیداز، دسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در بنه‌های زعفران در دو محیط با اکسیژن طبیعی و در شرایط کمبود اکسیژن در طول دوره رشد بررسی شد. در بنه‌های تحت شرایط کمبود اکسیژن بیشترین تحریک به ترتیب در آنزیم‌های کاتالیز، پراکسیداز و سوپراکسیداز دسموتاز مشاهده شد.

کربوهیدرات اصلی ذخیره‌ای در بنه زعفران نشاسته است که 20 درصد وزن خشک بنه در حال خواب (اردیبهشت-تیر) را تشکیل می‌دهد (Wattiez, 1928). زعفران در دوره پس از خواب (مرداد تا فروردین) کربوهیدرات مورد نیاز خود را از تجزیه نشاسته موجود در بنه مادری و فتوسنتز برگ‌ها به دست می‌آورد. در ماه‌های مرداد تا شهریور که فعالیت‌های حیاتی در بنه زعفران آغاز می‌شود ولی هنوز گیاه به مرحله تولید ریشه و برگ در نتیجه انجام فتوسنتز و جذب مواد غذایی از خاک نرسیده، بنه‌ها تنها منبع غذایی مریستم‌های در حال رشد زعفران به حساب می‌آیند.

در ماه‌های بعد که ریشه و برگ‌ها ظاهر شده و فتوسنتز نیز آغاز می‌شود، سهم بنه در تولید انرژی جهت فرآیندهای حیاتی زعفران (در قسمت‌های هوایی گیاه) کاهش می‌یابد. ولی تا زمان تحلیل کامل بنه‌های مادری (فروردین) انتقال مواد غذایی و قندها از بنه مادری به اندام‌های در حال رشد ادامه می‌یابد. (Milyaeva & Azizbekova, 1978).

همان‌طور که در این آزمایش مشاهده شد، در بنه‌های تحت تیمار 33 درجه سانتی‌گراد افزایشی در غلظت قندهای قابل احیاء در واحد وزن خشک گیاه در طول ماه‌های نمونه‌برداری مشاهده نشد، که این امر می‌تواند به دلیل القای خواب در بنه‌ها تحت این تیمار دمایی باشد که این نتیجه با سنجش فعالیت آنزیم‌ها در 33 درجه مطابقت داشت. در 23 درجه سانتی‌گراد فعالیت مشابهی در تمام قندهای قابل احیاء مورد آزمایش مشاهده شد. در جوانه و بنه غلظت قندهای مورد آزمایش در فاصله ماه‌های تیر تا شهریور (قبل از ظهور برگ‌ها) روندی صعودی را نشان داد و میزان این قندها در جوانه بیش از بنه بود که این امر می‌تواند نشان‌دهنده قوی‌تر بودن جوانه (قبل از ظهور برگ‌ها) به عنوان مخزن برای جذب قندها نسبت به ریشه باشد. پس از شهریور و همزمان با ظهور برگ‌ها، میزان غلظت قندهای قابل

احیاء مورد آزمایش در بنه بیش از جوانه بود که این امر می‌تواند در نتیجه شروع فتوسنتز در برگ‌ها باشد. با شروع فتوسنتز، برگ‌ها به تدریج از مخزن به منبع تغییر رویه می‌دهند و علاوه بر تولید نیازهای خود شروع به صدور مواد فتوسنتزی به سایر منابع که در این ماه‌ها (قبل از تشکیل بنه دختری) ریشه و گل هستند، می‌کنند. از آنجا که توزیع مواد فتوسنتزی معمولاً از نزدیک‌ترین مبدأ به محل مصرف می‌باشد (Koocheki & Sarmdnya, 2004)، مواد فتوسنتزی تولید شده توسط برگ‌ها به مصرف تولید برگ‌های جدید و جوانه گل می‌رسد و ریشه نیز نیاز خود را به مواد قندی از طریق تجزیه نشاسته بنه تأمین می‌کند، احتمالاً علت بالاتر بودن غلظت قندهای قابل احیاء در بافت ریشه نسبت به بافت جوانه این مکانیزم می‌باشد. Preiss (1988). بیشترین غلظت در بین قندهای مورد آزمایش مربوط به گلوکز (هگزوز) و پس از آن مانوز (هگزوز) بود و آرابینوز (پنتوز) غلظت بسیار ناچیزی را به خود اختصاص داد.

نتیجه‌گیری

در این آزمایش بنه‌ها به مدت 130-100 روز در هر تیمار دمایی قرار گرفتند و پس از آن به دمای 17 درجه سانتی‌گراد که دمای مطلوب برای گلدهی است منتقل شدند. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش فعالیت تمام آنزیم‌های مورد مطالعه در تیرماه حداقل بود. در مهرماه نیز فعالیت آنزیم‌های مذکور در دمای 23 درجه سانتی-گراد افزایش یافت، اما در دمای 33 درجه سانتی‌گراد، هیچ‌گونه تغییری در فعالیت‌های آنزیمی مشاهده نشد. همچنین بیشترین میزان قندهای محلول (گلوکز، مانوز و آرابینوز) در جوانه و بنه زعفران در دمای 23 درجه سانتی‌گراد به دست آمد. به نظر می‌رسد دمای 33 درجه سانتی‌گراد در محیط کشت با ایجاد اختلال در فعالیت آن‌ها موجب ادامه خواب در بنه‌های زعفران می‌شود و در مقابل در دمای 23 درجه سانتی‌گراد، افزایش فعالیت آنزیمی موجب تحریک رشد زعفران می‌شود. همچنین با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش دمای مطلوب برای انبار کردن بنه‌ها 27-23 درجه سانتی‌گراد بود، به طوری که بنه‌های نگهداری شده در این دامنه به مدت 150-90 روز 2 تا 3 گل تولید کردند.

- Adams, L., Benson, E., Staines, H.J., Bremmer, D.H., Millan, S., and Dighton, N. 1999. Effect of lipid peroxidation products 4-hydroxi-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of In vitro plant cells. *Journal of Plant Physiology* 155: 376-386.
- Amarnameh Keshavarzi. 2011. Second edition, ministry of jihad-e-agriculture. Available at Web site www.agri-jahad.ir (verified 1 March 2011).
- Amirshékari, H., Sorooshzadeh, A., and Modares-sanavy, S.A.M. 2007. Effect of root temperature, the siz of corm and Gibberellin on vegetative growth of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Agricultural Science and Natural Source of Gorgan* 14 (5): 96-103. (In Persian with English summary).
- Behnia, M.R. 1992. Saffron cultivation. University of Tehran press. (In Persian).
- Cakmak, I., and Horst, W.J. 1991. Effect of Aluminum on Lipid Peroxidation, Superoxide Desmutase, Catalase, and Peroxidase Activities in Root Tipes of Soybean (*Glycine max*), *Physiology Plant* 83: 463-468.
- Constantine, N., Giannopolitis and Stanly, K. Ries. 1977. Superoxide Dismutases, Occurrence in Higher Plant. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analysis Chemistry* 28: 350-356.
- Ebrahimpor, M., and Ramezani, M. 1989. The role of foliar feeding on saffron production, third festival of Red Gold (saffron), Islamic Azad University, Ghaenat branch. (In Persian with English summary).
- Ebrahimzadeh, H., and Abrishamchi, P. 2001. Changes in IAA, Phenolic compounds, peroxidase, IAA oxidase in relation to flower formation. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 223-228.
- Gasper, T., Penel, C., tope, T., and Greppin, H. 1982. Peroxidase 1970-1080.A Survy of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. University of Geneva Prass, Geneva.
- Gifford, E. 1964. Development Studies of Vegetative and Floral Meristem, Brookhaven Symposium. *Biology* 16: 126-136.
- Hill, T. 2004. The Contemporary encyclopedia of herbs and spices: Seasoningsfor the Global Kitchen, Wiley.
- Kan, V. 1975. Polyphenol oxidase activity and browning of three avacado varieties, *Journal of Science Food Agriculture* 51:145-161.
- Keyhani, J., Keyhani, E., and Kamali, J. 2004. Termal stability of catalases active in dormant saffron (*Crocus sativus* L.). International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, 13 May 2004 Albaceto Spain.
- Keyhani, E., Ghamsari, L., Keyhani, J., and Hadizadeh, M. 2003. Antioxidant enzymes during hypoxia-anoxia signaling events in *Crocus sativus* L. Corm.Institute of Biochemistry and Biophysics (IBM), University of Tehran.
- Keyhani, E., Keyhani, J., Hadizadeh, M., Ghamsari, L., and Attar, F. 2003. Cultivation techniques morphology and enzymatic properties of *Crocus sativus*. Procidings of the First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, Albaceta, Spain, 22-25 October 2003. 227-246.
- Keyhani, E., Saeidian, S., Keyhani, J., Attar, F., and Oveissi, S. 2006. Identification of enzymatic properties in *Crocus sativus* L. roots. 2nd international Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, 28-30 October 2006, Mashhad, Iran.
- Koocheki, A., and Sarmdnya, G. 2004. Physiology of crop plants. Jahadeh Daneshgahi Mashhad. 400.
- Krekule, J., Pavlova, L., Seuckova, D., and Machackova, I. 1985. Auxin in flowering of short-day and long-day chenopodium Species. *Biology of Plant* 27: 310-317.
- Milyaeva, E.L., and Azizbekova, N.S.H. 1978a. Changes in RNA levels in the shoot apex of silen during the Transition to Flowering. *Planta* 136: 167-172.
- Molina, R.V., Garcia-Luis, A., Coll, V., Ferrer, C., Valero, M., Navarro, Y., and Guardiola, j .2003. Flower formation in the saffron *Crocus (Crocus sativus L.)* the role of temperature. Procidings of the First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, Albaceta, Spain, 22-25 October 2003. 39-47.
- Molina, R.V., Valerro, M., Navarro, Y., Guardiola, J.L., and Garcia-Luis, A. 2005. Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Scince Horticulture*, 103 (3): 361-379.
- Pandolfini, F., Gabbrielli, R., and Comparini, C. 1992. Nickel Toxicity and peroxidase activity in seedling of *Triticum aestivum* L., *Plant Cell Environment* 15: 719-725.

- Preiss, J. 1988. Biosynthesis of starch and its regulation. In: J.Preiss (Ed), Biochemistry of plant .Vol.10 Carbohydrates. NewYork: Academic press. 181-245.
- Pressy, R. 1990. Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. Plant Physiology 93: 798-804.
- Rietveld, P., Wilkinson, C., Hanneke, M., Franssen, J., Weisbeek, K., and Douwe de Boer, A .2000. Low temprature sensing in tulip (*Tulip gesneriana L.*) is Mediated throughan Increased Response to Auxin. Journal of Exprimental Botany. 51:58.
- Sangary, S. 1994. Evaluation of the activity of polyphenol oxidase and peroxidase in tea plant. M.Sc. Thesis. College of Science, University of Tehran. (In Persian with English summary).
- Sergeeva, L.I., Aksenova, N.P., and Konstantinova, T.N. 1985. In vivo and invitro studios of peroxidase and IAA oxidase activity in relation to floral morphogenesis in "Trapenzond" tobacco. Biology of Plant 27: 330-333.
- Sergeeva, L.I., Podolnyi, V.Z., Ple, P., Aksenova, N.P., and Konstantinova, T.N. 1987. Indoleacetic acid oxidase activity changes in trapenzond tobacco during transition of flowering. Fiziol. Rastanii 34: 329-334.
- Wattiez, N. 1928. Analysis of Saffron . Journal of Pharmacie Belgique. 10: 371-375.
- Weigel, D., and Nilsson, O. 1995. A development switch sufficient for flower initiation in diverse plants. Nature 377: 495-500.

The effect of root-zone temperature on antioxidant activities in saffron corm

Fatemeh Nasirian¹, Ali Sorooshzadeh^{*2}, Faezeh Ghanati³ and Hussein Oraki⁴

Received: 5 December, 2014

Accepted: 19 July, 2014

Abstract

This research was conducted in a completely randomized design with three replications, to evaluate the effect of root-zone temperature on antioxidant activity in saffron corm in 2013. In this experiment, effect of two root-zone temperatures ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $33\pm 1^{\circ}\text{C}$) in growth chamber on the activity of antioxidant enzymes: peroxidase, polyphenol oxidase, superoxide dismutase, catalase and auxin oxidase in the apical of saffron corms during corm dormancy stage (July) and at beginning corm growing stage (October) were studied. The results showed that at both root-zone temperatures the activity of all enzymes were least in July. Moreover at the 33°C root-zone temperature no differences in enzyme activities were observed between the months of July to October. In addition measured soluble sugars in buds and corms of saffron showed the highest rate of glucose, mannose, and arabinose at a temperature of 23°C , respectively. Thus, treatment of 23°C as the best temperature for storage and maintenance of saffron corms was introduced.

Keywords: Antioxidant, Catalase, Peroxidase, Polyphenol oxidase, Super oxidase dismutase, Auxin oxidase, Saffron.

1- M.Sc. Student, Agronomy Department, College of Agriculture, Tarbiat Modares University.

2- Associate professor, Agronomy Department, College of Agriculture, Tarbiat Modares University.

3- Associate Professor, Science Faculty, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

4- Ph.D. Student, Agronomy Department, College of Agriculture, Tarbiat Modares University.

(*- Corresponding author Email: soroosh@modares.ac.ir)