Saffron Agronomy & Technology
Vol. 8, No. 2, Summer 2020, P.231-242

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹ ص. ۲۴۲-۲۳۱

ارزیابی متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ در جمعیت‌های زعفران تحت شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری

پریسا شیخ‌الاسلامی[۱]، جلال صبا[۲]*، فرید شکاری[۳]، محمدرضا عظیمی‌مقدم[۳] و اعظم ملکی[۴]

تاریخ دریافت: ۱ خرداد ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۲۱ مهر ۱۳۹۸

شیخ‌الاسلامی، پ.، صبا، ج.، شکاری، ف.، عظیمی‌مقدم، م.ر.، و ملکی، ا. ۱۳۹۹. ارزیابی متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ در جمعیت‌های زعفران تحت شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری. زراعت و فناوری زعفران، ۸(۲): ۲۴۲-۲۳۱.

چکیده

گلبرگ زعفران که از لحاظ وزنی بخش قابل توجهی از گل زعفران را تشکیل می‌دهد سالانه در مقادیر زیاد به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود. در حالی‌که این قسمت گل دارای ترکیباتی از جمله فنل، آنتوسیانین و فلاونوئید با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. به منظور ارزیابی متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ در ۸ جمعیت زعفران، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در دو شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان بر روی بوته‌های سال سوم زعفران به اجرا درآمد. جهت اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل گلبرگ و تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره گلبرگ زعفران به ترتیب از روش‌های طیف نورسنجی فرابنفش- مرئی، فولین سیوکالتیو و DPPH استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس مرکب در دو شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری نشان داد که متابولیت‌های ثانویه و خواص آنتی‌اکسیدانی در دو شرایط آبیاری تفاوت معنی‌داری نداشت. در حالی‌که از نظر محتوای فنل کل در شرایط یکبار آبیاری افزایش معنی‌دار مشاهده شد. جمعیت تربت‌جام بیشترین مقدار فنل کل (۸۶/۵۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره متانولی) را در شرایط یکبار آبیاری داشت. در هر دو شرایط آبیاری، جمعیت‌های مورد ارزیابی مقادیر مناسبی از متابولیت‌های ثانویه، فنل و آنتی‌اکسیدان را داشتند، که می‌تواند برای استفاده در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پیکروکروسین، رادیکال آزاد، سافرانال، فولین_سیوکالتیو،کروسین و کم‌آبیاری.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۲- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۳- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۴- پژوهشگر پسا دکترای گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: saba@znu.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2019.187000.1352

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. متعلق به خانواده *Iridaceae* است که کلاله‌های خشک آن گران‌قیمت‌ترین ادویه در جهان بوده و کاربرد فراوانی در صنایع غذایی و دارویی دارد (Ahmadian-Kouchaksaraie et al., 2016). پیکروکروسین، سافرانال و کروسین سه ترکیب اصلی زعفران هستند که به‌ترتیب طعم، عطر و رنگ زعفران را ایجاد می‌کنند. کروسین علاوه بر رنگ، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی با رفع رادیکال‌های آزاد و محافظت سلول‌ها و بافت‌ها از اکسیداسیو نمی‌باشد (Melnyk et al., 2010). فرآورده تجاری زعفران، کلاله قرمز و بخش زرد رنگ متصل به آن است (Aghaei & Rezagholizadeh, 2011). با این‌حال، گلبرگ زعفران نیز که به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود، دارای خواص متعددی از جمله ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضددرد، درمان اختلالات نورولوژیک همراه با اختلال حافظه، ضدانعقاد و ضدفشارخون می‌باشد (Bagherzade & Manzaritavakoli, 2015). گلبرگ زعفران شامل ترکیباتی مانند، پروتئین، چربی، فیبر، سدیم، پتاسیم، کلسیم، آهن، منیزیم و فسفر و همچنین ترکیبات فلانوئیدی، کارتنوئیدی (کروسین و کروستین)، آنتی‌اکسیدانی، فنلی، ترپن‌ها و آلکالوئیدها است (Hosseini et al., 2018; Chichiriccò et al., 2019). از این‌رو، دارای پتانسیل تجاری بوده و می‌تواند برای کشاورزان محلی ارزش افزوده داشته باشد (Zeka et al., 2015). حضور ترکیبات زیست‌فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه ترکیبات پلی‌فنلی در مواد غذایی با منشأ گیاهی، که دارای اثرات زیستی متفاوت از جمله ضد فساد و آنتی‌باکتریال و از بین برنده رادیکال‌های آزاد می‌باشند، عامل مؤثر در حفظ سلامت انسان است (Temerdashev et al., 2011; Salmanian et al., 2013). مطالعه‌ای به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران با استفاده از روش DPPH مشخص نمود که عصاره گلبرگ زعفران کاشته شده در مناطق مختلف لرستان دارای ۱/۶۶ تا ۱۵۶/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Mohammadian et al., 2017) همچنین ترمنتزی و همکاران (Termentzi et al., 2008) با تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش LC-DAD-MS اظهار داشتند که می‌توان از گلبرگ زعفران جهت استخراج ترکیبات فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی در صنایع غذایی و دارویی بهره برد.

تقاضا برای آب در مناطق خشک و نیمه‌خشک، که حدود دو سوم سطح زمین را تشکیل می‌دهند، تا سال ۲۰۵۰ به میزان ۵۵٪ افزایش می‌یابد. بنابراین، یافتن گیاهانی با نیاز آبی کم به یک مسئله جدی تبدیل شده است (Mzabri et al., 2017). کم‌آبی یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که بر روی رشد و توسعه گیاهان تأثیر می‌گذارد (Nouraei et al., 2018). کشور ایران نیز همواره با این مشکل مواجه بوده است. در این شرایط، تولید عملکرد مطلوب با تعداد کم آبیاری، سازگاری با نظام‌های کم نهاده و امکان بهره‌برداری چندین ساله با یکبار کاشت، از مزایای گیاه زعفران محسوب می‌شود.

مقدار متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، تحت تأثیر عوامل مختلف بیولوژیکی، بیوشیمیایی، اکولوژیکی، فرآیندهای تکاملی و محیطی می‌باشد. تنش خشکی مهم‌ترین عامل تأثیرگذار است که از طریق تولید بیش از حد گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) موجب تولید تنش اکسیداتیو شده و منجر به صدمات جدی به ساختارهای سلولی می‌گردد. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با روش‌های مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند (Vakili Ghartavol & Alizadeh Salteh, 2016). ترکیبات فنلی هم با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی یکی از مکانیسم‌های غیرآنزیمی برای مقابله با تنش اکسیداتیو

القاء شده توسط خشکی بوده و به عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. به همین علت مقدار متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف گیاهان در اثر تنش خشکی افزایش می‌یابد. گزارش‌های متعددی در ارتباط با تأثیر تنش خشکی بر متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی وجود دارد (Gharibi et al., 2019). با این حال، در رابطه با مقدار متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران تحت تنش خشکی، بررسی صورت نگرفته است. نوگاس و همکاران (Nogués et al., 1998) افزایش قابل توجه ترکیبات فنلی را در گیاه نخود فرنگی تحت شرایط تنش گزارش کردند. زهیر و همکاران (Zahir et al., 2014) تغییرات متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش خشکی را در گیاه مارتیغال گزارش کردند. طبق نتایج بدست آمده توسط باریلس و همکاران (Barreales et al., 2019) آبیاری به طور واضح محتوای فنل کل موجود در برگ‌های انگور را در کلیه مراحل فنولوژی کاهش داد. از این‌رو، تحقیق حاضر، با هدف بررسی تأثیر کاهش تعداد دفعات آبیاری بر متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

دو آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۶- ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در دو شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۸ جمعیت و ۳ تکرار بر روی بوته‌های سال سوم زعفران انجام گرفت. ابعاد کرت‌ها ۲×۱/۵متر و هر کرت شامل شش ردیف با تراکم ۴۰ بوته در مترمربع بود. مشابه سال‌های اول و دوم، آبیاری مرسوم در آذر و اسفند ۹۵ و اردیبهشت و مهر ۹۶ انجام شد ولی در شرایط یکبار آبیاری، آبیاری تنها در مهرماه انجام گردید. ۸ جمعیت زعفران (جمع‌آوری‌شده از نطنز، زاوه، تربت‌جام، تربت‌حیدریه، زرند، گرگان، قاین و فیض‌آباد) که در آزمایشات قبلی (Alavi, 2015) سازگاری مناسبی در شرایط اقلیمی زنجان داشتند، تیمارهای آزمایش را تشکیل دادند.

در زمان برداشت، گلبرگ‌های زعفران پس از خشک شدن درآون (به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد)، تا زمان انجام آزمایشات در محیط خشک با دمای پایین نگهداری شدند.

اندازه‌گیری متابولیت‌های گلبرگ

برای اندازه‌گیری متابولیت‌های گلبرگ (پیکروکروسین، سافرانال و کروسین)، از روش استاندارد ۲-۲۵۹ سازمان ملی استاندارد ایران (Anonymous, 2012) استفاده گردید. بدین منظورمقدار ۲۵۰ میلی‌گرم از نمونه خشک گلبرگ، پودر شده و به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و مقدار ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. محتویات بالن ژوژه به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس بالن ژوژه تا خط نشانه با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک میلی‌لیتر از محلول برداشته و به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شده و بعد از انجام سانتریفیوژ، از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر جهت اندازه‌گیری پیکروکروسین، سافرانال و کروسین به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر استفاده شد. آب مقطر نیز به‌عنوان بلانک (شاهد) در نظر گرفته شد. درصد ترکیبات شیمیایی گلبرگ زعفران (%E) براساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\%E = {A \times 100}/{M(100 - H)} \quad (۱)$$

A= میزان ترکیبات شیمیایی زعفران در طول موج‌های زیر:

پیکروکروسین: جذب در طول موج ۲۵۷ نانومتر

سافرانال: جذب در طول موج ۳۳۰ نانومتر

کروسین: جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر

M= جرم نمونه زعفران (گرم)

H= میزان رطوبت و مواد فرار موجود در نمونه

تعیین محتوای فنل

مقادیر فنل کل با روش معرف فولین-سیوکالتیو و با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد تعیین گردید (Nazari et al., 2013). مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره گلبرگ را با ۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه هم‌زده، سپس ۴ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم یک مولار اضافه گردید. جذب نمونه‌ها پس از قرار دادن آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی، در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۷۶۵ نانومتر در مقابل بلانک (متانول خالص) قرائت شد. برای تهیه استوک گالیک‌اسید، مقدار یک میلی‌گرم گالیک‌اسید را در یک میلی‌لیتر آب مقطر به‌خوبی حل نموده تا محلول استوک گالیک‌اسید با غلظت $1 mg.ml^{-1}$ یا $1000 \mu g.ml^{-1}$ به‌دست آید. سپس از این محلول، محلول‌هایی با غلظت ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. مقدار جذب محلول‌های استاندارد در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و با استفاده از داده‌های مربوط به غلظت محلول‌های گالیک‌اسید و مقادیر جذب قرائت‌شده، معادله خط رگرسیون محاسبه شد. در نهایت، مقدار گالیک‌اسید نمونه‌های آزمایشی با استفاده از معادله خط رگرسیون به‌دست آمده، محاسبه گردید.

$$Y = 0.033 + 0.003X \quad (۲)$$

X= عددقرائت شده در اسپکتروفتومتر

Y= گالیک اسید

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی

برای تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی از روش فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد یا روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) استفاده شد (Brand-Williams et al., 1995). در این روش ۳۰۰ میلی‌گرم از گلبرگ خشک شده پودر گردید و به همراه ۹ میلی‌لیتر متانول خالص به داخل فالکون منتقل گردید. فالکون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک نگهداری شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی به ۳/۹ میلی‌لیتر DPPH استوک ساخته شده (۰/۰۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) اضافه شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرارگرفت و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷nm با اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در نهایت، نتایج به‌صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%IC50 = \left[\left(A_{blank} - A_{sample} \right) / A_{blank} \right] \times 100 \quad (۳)$$

در این فرمول به ترتیب A_{blank} و A_{sample} میزان جذب شاهد و نمونه را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس ساده مرکب ۸ جمعیت زعفران در دو شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری انجام شد و مقایسات میانگین جمعیت‌ها (دانکن) با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و برآورد ضرایب همبستگی و تجزیه کلاستر با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی متابولیت‌های ثانویه گلبرگ

نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس مرکب آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری (جدول ۱) نشان داد که بین دو شرایط آبیاری (آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری) از لحاظ متابولیت‌های ثانویه گلبرگ (پیکروکروسین، سافرانال و کروسین) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میانگین متابولیت‌های ثانویه گلبرگ در دو شرایط آبیاری در جدول ۲ آمده است. چنانچه مشاهده می‌شود کاهش تعداد دفعات آبیاری در مناطق کم آب تأثیر

چندانی روی متابولیت‌های ثانویه گلبرگ نخواهد داشت. از این‌رو، با توجه به ضایعات بسیار بالای گلبرگ می‌توان تحقیقات لازم فنی و اقتصادی برای استخراج پیکروکروسین و سافرانال از این اندام را برای استفاده از طعم و عطر و همچنین خواص دارویی آن توصیه نمود.

با توجه به معنی‌دار نبودن اثر متقابل جمعیت در آبیاری، جهت تجزیه و تحلیل بهتر اختلاف جمعیت‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها در دو شرایط آبیاری به‌طور جداگانه انجام شد (جدول ۳ و ۴). نتایج نشان داد که در هر دو شرایط آبیاری بین جمعیت‌های مورد مطالعه از لحاظ صفات پیکروکروسین، سافرانال و کروسین گلبرگ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. با این‌حال، در شرایط آبیاری مرسوم جمعیت قائن دارای بیشترین درصد کروسین گلبرگ بود (جدول ۴). همچنین، در شرایط یکبار آبیاری جمعیت فیض‌آباد بیشترین مقدار سافرانال را دارا بود و از این لحاظ به‌غیر از جمعیت گرگان با سایر جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۴). کابالرو اورتگا و همکاران (Caballero-Ortega et al., 2007) اختلاف بین جمعیت‌ها از لحاظ متابولیت‌های ثانویه را ناشی از تفاوت محیط، ژنتیک (واریته) و فعالیت‌های کشاورزی دانسته‌اند، لذا از آنجایی که آزمایش حاضر بر روی بوته‌های سال سوم و با عملیات کشاورزی یکسان انجام گردیده است، می‌توان اختلافات بین جمعیت‌ها را به تفاوت‌های ژنتیکی آن‌ها منتسب نمود.

در شرایط آبیاری مرسوم بین پیکروکروسین، سافرانال و کروسین گلبرگ همبستگی مثبت وجود داشت (جدول ۵) که فرضیه مربوط به یکسان بودن پیش‌ماده اولیه این متابولیت‌ها را قوت می‌بخشد (Gresta et al., 2008; Siracusa et al., 2010) در شرایط یکبار آبیاری نیز میان پیکروکروسین و سافرانال همبستگی مثبت مشاهده شد (جدول ۵) که می‌تواند به دلیل تولید سافرانال در اثر جدا شدن یک قند از پیکروکروسین باشد (Hoshyar et al., 2011).

بررسی محتوای فنلی

نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس مرکب آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری (جدول ۱) نشان داد که بین دو شرایط آبیاری از لحاظ محتوای فنل کل موجود در گلبرگ جمعیت‌های مختلف زعفران اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ وجود دارد. به‌عبارت دیگر، محتوای فنل کل در شرایط یکبار آبیاری به‌طور معنی‌داری بیشتر از شرایط آبیاری مرسوم بود (جدول ۲). مزابری و همکاران (Mzabri et al., 2017) اظهار نمودند که می‌توان علت افزایش فنل در تنش را به عکس‌العمل گیاه برای افزایش مقاومت به تنش نسبت داد. تحقیقات انجام شده به منظور بررسی تأثیر تنش خشکی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی گیاه زیره سیاه نیز افزایش متابولیت‌های ثانویه برای مقابله با تنش خشکی را نشان داده است (Saeidnejad et al., 2013). در تجزیه وایانس جداگانه (جدول ۳) در هر دو شرایط آبیاری اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌ها مشاهده نشد، که بیانگر یکسان بودن پتانسیل تولید ترکیبات فنلی جمعیت‌های مورد بررسی در هر دو شرایط آبیاری است. مقایسه میانگین‌ها در شرایط آبیاری مرسوم نیز هیچ اختلافی بین جمعیت‌ها از لحاظ محتوای فنل کل نشان نداد. با این حال، در شرایط یکبار آبیاری جمعیت تربت‌جام با بیشترین مقدار فنل کل، اختلاف معنی‌داری با جمعیت گرگان داشت. این موضوع می‌تواند مقاومت بیشتر جمعیت تربت‌جام را به کم‌آبی موجب شود.

در بررسی روابط بین صفات مشاهده شد در شرایط یکبار آبیاری که مقدار محتوای فنلی افزایش می‌یابد همبستگی مثبت و معنی‌داری بین این صفت با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (جدول۵). تحقیقات افرازه و همکاران (Afrazeh et al., 2014)، استاکوویچ و همکاران (Stankovic et al., 2011) و چیمی و همکاران (Chimi et al., 1991) نیز ارتباط معنی‌دار بین خواص آنتی‌اکسیدانی با محتویات ترکیبات فنولیک را نشان داده است.

البته وجود همبستگی مثبت بین آنتی‌اکسیدان و فنل همیشه صادق نیست و تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و آب و هوایی از جمله میزان تابش خورشید، شرایط خاک و شرایط نگهداری پس از برداشت می‌باشد (Mohammadian et al., 2017).

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصله از تجزیه واریانس مرکب (جدول ۱) نشان داد بین دو شرایط آبیاری از لحاظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین، به نظر می‌رسد که این صفت نیز مستقل از شرایط محیطی باشد. به عبارت دیگر، در هر دو شرایط آبیاری امکان استفاده از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حجم زیاد گلبرگ زعفران، که سالانه به صورت ضایعات دور ریخته می‌شود، جهت مصارف غذایی و دارویی قابل بررسی است. نتایج تجزیه واریانس جداگانه برای هر دو شرایط آبیاری (جدول ۳) نیز اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌ها نشان نداد.

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و آنتی‌اکسیدان (IC50) جمعیت‌های زعفران تحت دو شرایط آبیاری

Table 1- Combined analysis of variance forsecondary metabolites, total phenolic content and antioxidant (IC50) of saffron population sunder two irrigation conditions

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS				
		پیکروکروسین Picrocrocin	سافرانال Safranal	کروسین Crocin	محتوای فنل کل Total phenol	آنتی‌اکسیدان Antioxidant
آبیاری Irrigation	1	0.29	0.13	0.01	12971.02*	286.8
اشتباهa Error a	4	2.45	1.8	0.009	103.42	110.8
جمعیت Population	7	1.13	0.53	0.004	213.26	81.8
جمعیت× آبیاری Population× Irrigation	7	1.36	0.78	0.004	110.30	59.6
اشتباه b Error b	28	0.95	0.43	0.005	185.26	61.6

*معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵.

* Significant at 0.05 probability level۰

جدول ۲- مقایسه میانگین سطوح آبیاری بر متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و آنتی‌اکسیدان جمعیت‌های زعفران تحت دو شرایط آبیاری

Table 2- Mean comparison of irrigation levels on secondary metabolites, total phenolic content and antioxidant (IC50) of saffron populations

سطوح آبیاری Irrigation levels	پیکروکروسین Picrocrocin (%)	سافرانال Safranal (%)	کروسین Crocin (%)	محتوای فنل کل Total phenol (mg Gae.grexc^{-1})	آنتی‌اکسیدان Antioxidant (µgr.ml^{-1})
آبیاری مرسوم Conventional irrigation	92.10^{a}	41.08^{b}	0.38^{a}	6.55^{a}	8.99^{a}
یکبار آبیاری Once irrigation	87.21^{a}	73.96^{a}	0.41^{a}	6.45^{a}	9.15^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column, the Mean followed by similar letter do not have a significant difference at 0.05 probability level using Duncan's Test.

جدول ۳- تجزیه واریانس متابولیت‌های ثانویه، محتوای فنل کل و آنتی‌اکسیدان (IC50) در جمعیت‌های زعفران

Tabel 3- Analysis of variance for secondary metabolites, Total phenolic content and antioxidant (IC50) between of saffron populations

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	MSمیانگین مربعات									
		آبیاری مرسوم Conventional irrigation					یکبار آبیاری Once irrigation				
		پیکروکروسین Picrocrocin (٪)	سافرانال Safranal (٪)	کروسین Crocin (٪)	فنل کل Total phenol (mgGae.grexc^{-1})	آنتی‌اکسیدان Antioxidant IC50 (µgr.ml^{-1})	پیکروکروسین Picrocrocin (٪)	سافرانال Safranal (٪)	کروسین Crocin (٪)	فنل کل Total phenol (mgGae.grexc^{-1})	آنتی‌اکسیدان Antioxidant IC50 (µgr.ml^{-1})
تکرار Replication	2	4.54*	3.19**	0.003	604.4	135.8*	0.356	0.413	0.015	1467.4**	85.85
جمعیت Population	7	0.87	0.46	0.007	115.7	39.1	1.61	0.86	0.001	207.8	102.4
خطا Error	14	1.12	0.51	0.004	247.9	37.6	0.78	0.35	0.006	124.6	85.5

*معنی‌دار در سطح احتمال ۰۵/.

* Significant at 0.05 probability level.

جدول ۴- مقایسات میانگین جمعیت‌های زعفران از لحاظ مقادیرمتابولیت‌های ثانویه،محتوای فنل کل و آنتی‌اکسیدان (IC50) تحت شرایط آبیاری مرسوم و یکبار آبیاری

Table 4- Mean comparisons of saffron populations in terms of secondary metabolites, total phenolic content and antioxidant (IC50) under conventional irrigation conditions and once irrigation

اکوتیپ Ecotyp	آبیاری مرسوم Conventional irrigation	یکبار آبیاری Once irrigation	
	کروسین Crocin (٪)	سافرانال Safranal (٪)	فنل کل Total Phenol (Mg Gae.gr exc^{-1})
زرند Zarand	0.41^{ab}	6.1^{b}	73.54^{ab}
تربت‌جام Torbat-jam	0.32^{b}	6.0^{b}	86.56^{a}
قائن Ghain	0.45^{a}	6.0^{b}	83.89^{ab}
زاوه Zaveh	0.43^{ab}	6.2^{b}	74.10^{ab}
فیض‌آباد Faizabad	0.41^{ab}	7.4^{a}	65.31^{ab}
تربت‌حیدریه Torbat-heidarieh	0.35^{ab}	6.3^{b}	76.88^{ab}
نطنز Natanz	0.42^{ab}	6.2^{b}	67.65^{ab}
گرگان Gorgan	0.34^{ab}	7.1^{ab}	63.75^{b}

در هرردیف میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each row, the Mean followed by similar letter do not have a significant difference at 0.05 probability level using Duncan's Test.

جدول ۵- ماتریس ضرایب همبستگی صفات مورد ارزیابی در گلبرگ‌های زعفران

Table 5- Matrix of correlation coefficients of evaluated traits in petals of saffron

صفت Trait		پیکروکروسین Picrocrocin	سافرانال Safranal	کروسین Crocin	آنتی‌اکسیدان Antioxidant
سافرانال Safranal	آبیاری مرسوم Conventional irrigation	0.98**			
	یکبار آبیاری Once irrigation	0.98**			
کروسین Crocin	آبیاری مرسوم Conventional irrigation	0.47**	0.44*		
	یکبار آبیاری Once irrigation	0.29	0.29		
آنتی‌اکسیدان Antioxidant	آبیاری مرسوم Conventional irrigation	–0.11	–0.13	0.24	
	یکبار آبیاری Once irrigation	–0.44*	–0/44*	0.19	
فنل کل Total phenol	آبیاری مرسوم Conventional irrigation	0.25	0.21	0.32	0.17
	یکبار آبیاری Once irrigation	–0.09	–0.07	0.12	0.52**

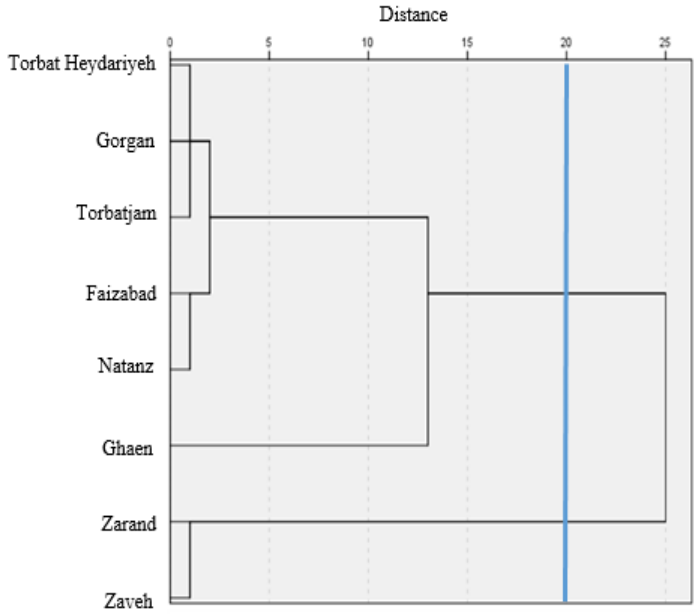
*و **به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال۰/۰۵ و ۰/۰۱.

* and ** Significant at 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

از آنجایی که این جمعیت‌ها حاصل گزینش در آزمایشات قبلی علوی (Alavi, 2015) از بین ۱۸ جمعیت زعفران می‌باشند، معنی‌دار نشدن اختلاف بین آن‌ها را می‌توان ناشی از کاهش تنوع در اثر گزینش جمعیت‌های برتر دانست. در این پژوهش مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۸ جمعیت مورد بررسی در هر دو شرایط آبیاری بین ۷۶/۵ تا ۹۴/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که با توجه به نتایج حسینقلی و همکاران (Hossein Goli et al., 2012) در مقایسه با خواص آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از قبیل TBHQ (۷۷/۹ تا ۹۳/۱ درصد) درصد قابل قبولی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی را به‌خود اختصاص داده است. در بررسی روابط بین آنتی‌اکسیدان و دیگر صفات (جدول۵)، ملاحظه گردید که در شرایط یکبار آبیاری بین آنتی‌اکسیدان و پیکروکروسین و سافرانال همبستگی منفی و با فنل همبستگی مثبت وجود دارد. وجود همبستگی مثبت فنل با آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش، به علت خواص آنتی‌اکسیدانی فنل طبیعی است.

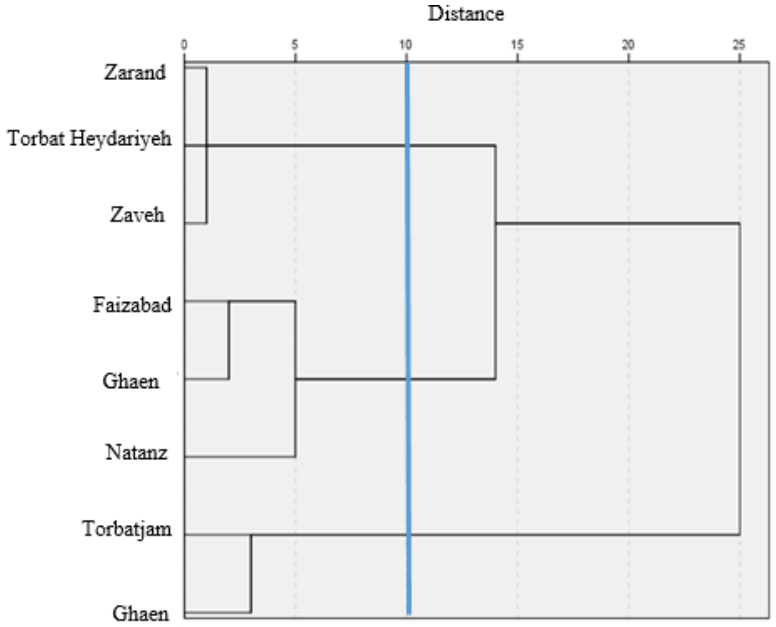
تجزیه کلاستر

به منظور گروه‌بندی جمعیت‌های زعفران مورد ارزیابی از لحاظ صفات مورد بررسی تجزیه کلاستر به روش حداقل واریانس وارد با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی به طور جداگانه برای هر دو شرایط آبیاری انجام شد. در شرایط آبیاری مرسوم جمعیت‌های تربت‌حیدریه، گرگان، تربت‌جام، فیض‌آباد، نطنز و قاین در گروه اول و جمعیت‌های زرند و زاوه در گروه دوم قرار گرفتند. گروه دوم از لحاظ مقدار فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از گروه اول برتر بوده‌اند. در شرایط یکبار آبیاری جمعیت‌های زرند، تربت‌حیدریه و زاوه در گروه اول، جمعیت‌های فیض‌آباد، نطنز و گرگان در گروه دوم و جمعیت‌های تربت‌جام و قاین در گروه سوم قرار گرفتند. از لحاظ متابولیت‌های ثانویه گلبرگ، کلاستر دوم، از لحاظ محتوای فنل کلاستر سوم و در نهایت از لحاظ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلاستر اول بیشترین مقدار را نشان دادند.



شکل ۱- دندروگرام جمعیت‌های زعفران از لحاظ صفات گلبرگ در شرایط آبیاری مرسوم با استفاده از روش وارد

Figure1- Dendrogram of saffron populations in terms of petal traits under conventional irrigation conditions using Ward's method.



شکل ۲- دندروگرام جمعیت‌های زعفران از لحاظ صفات گلبرگ در شرایط یکبار آبیاری با استفاده از روش وارد

Figure 2- Dendrogram of saffron populations in terms petal traits under once irrigation conditions using Ward's method.

نتیجه‌گیری

گلبرگ‌های زعفران که از لحاظ وزنی بخش قابل توجهی از گل زعفران را تشکیل می‌دهند، سالانه در مقادیر زیاد به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شوند. درحالیکه این قسمت از گل نیز دارای ترکیباتی از جمله فنل، آنتوسیانین و فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی است. تحقیق حاضر نشان داد که مقادیر مناسبی از پیکروکروسین، سافرانال، فنل و آنتی‌اکسیدان در گلبرگ زعفران وجود دارد و کاهش تعداد دفعات آبیاری از چهار بار به یکبار تغییر چندانی در میزان این متابولیت‌های ثانویه و آنتی‌اکسیدان گلبرگ زعفران ایجاد نمی‌کند. بنابراین، در هر دو شرایط آبیاری نرمال و کم‌آبیاری بررسی فنی و اقتصادی استخراج این مواد از گلبرگ‌های زعفران پیشنهاد می‌گردد.

منابع

Afrazeh, Z., Bolandi, M., Khorshidi, M., and Mohammadi nafchi, A. 2014. Evaluation of antioxidant activity of aqueos and alcoholic extracts (methanol, ethanol) saffron petals. Saffron Agronomy and Technology 2 (3): 231-236.

Aghaei, M., and Rezagholizadeh, M. 2011. Iran's comparative advantage in production of saffron. Journal of Economics and Agriculture Development 25 (1): 121-132.

Ahmadian-Kouchaksaraie, Z., Niazmand, R., and Najaf najafi, M. 2016. Optimization of the subcritical water extraction of phenolic antioxidantsfrom *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Box-Behnkendesign and principal component analysis. Innovative

Food Science and Emerging Technologies 36: 234-244.

Alavi-Siney, M. 2015. Evaluation of saffron (*Crocus Sativus L.*) echotypes diversity in Zanjan conditions. PhD dissertation. Faculty of Agriculture. Zanjan University of Zanjan, Iran.

Anonymous. 2012. Saffron, test methods. INSO 259-2. Iranian National Standardization Organization.

Bagherzade, Gh., and Manzaritavakoli, M. 2015. Qualitative and quantitative investigation of phytochemical factors of wastage of *Crocus sativus* L. and determination of anthocyanin content using ultrasound waves. Journal of Saffron Research (semi-annual) 4 (2): 149-158.

Barreales, D., Malheiro, R., Pereira, J.A., Verdial, J., Bento, A., Casquero, P.A., and Ribeiro, A.C. 2019. Effects of irrigation and collection period on grapevine leaf (*Vitis vinifera* L. var. Touriga Nacional): Evaluation of the phytochemical composition and antioxidant properties. Scientia Horticulturae 245: 74-81.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technology 28: 25-30.

Caballero-ortega, H., Pereda-miranda, R., and Abdullaev, F.I. 2007. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Corcus sativus* L.) sources. Food Chemistry 100: 1126-1131.

Chichiriccò, G., Ferrante, G., Menghini, L., Recinella, L., Leone, SH., Chiavaroli, A., Brunetti, L., Di Simone, S., Ronci, M., Piccone, P., Lanza, B., Cesa, S., Poma, A., Vecchiotti, G., and Orlando, G. 2019. *Crocus sativus* by-products as sources of bioactive extracts: Pharmacological and toxicological focus on anthers. Food and Chemical Toxicology 126: 7-14.

Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., and Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society 68 (5): 307-312.

Gharibi, Sh., Sayed Tabatabaei, B.E., Saeidi, Gh., Talebi, M., and Matkowski, A. 2019. The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech. F. Phytochemistry 162: 90-98.

Gresta, F., Lombardo, G., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. Agronomy for Sustainable Development 28 (1): 95-112.

Hoshyar, R., Bhtohei, Z., and Etemadi-kia, B. 2011. Quantitative Comparison of Some Major Metabolites (Crocin, Picrocrosin and safranal) in Different Packages of Saffron in Iran HPLC. Office of Publications, Tarbiat Modares University Press, Central Library 13 (2): 63-71.

Hossein Goli, A., Mokhtari, F., and Rahimmalek, M. 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (*Crocus sativus* L.) petal. Journal of Agricultural Science 4 (10): 175-181.

Hosseini, A., Razavi, M., and Hosseinzadeh, H. 2018. Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: a review. Iran Journal Basic Med Science 21 (11): 1091-1099.

Melnyk, J.P., Wang, S., and Marcone, M.F. 2010. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International 43: 1981-1989.

Mohammadian, A., Ahmadvand, H., Karamian, R., Siahmansour, R., Sepahvand, A., and Omidvari, Sh. 2017. Survey and comparison of the antioxidant activity, total phenolic, and flavonoid compounds of saffron petals sowing in different regions of the Lorestan province. Saffron Agronomy and Technology 5 (1): 51-60.

Mzabri, I., Legsayer, M., Aliyat, F., Maldani, M., Kouddane, N. E., Boukroute, A., Bekkouch, I., and Berrichi, A. 2017. Effect of drought stress

on the growth and development of saffron (*Crocus Sativus.* L) in Eastern Morocco. Atlas Journal of Biology 364-370.

Nazari, S., Nazarnezhad, N.J., and Ebrahimzadeh, M.A. 2013. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic and flavonoids content of *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* bark. Iranian Journal of Wood and Paper Science Research 28 (3): 522-533.

Nogués, S., Allen, D.J., Morison, J.I.L., and Baker, N.R. 1998 . Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development and photosynthesis in droughted pea plants. Plant Physiology 117: 173–181.

Nouraei,S., Rahimmalek, M., and Saeidi, G. 2018. Variation in polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var.scolymus Hayek L.) as affected by drought stress. Scientia Horticulture 233: 378–385.

Saeidnejad, A.H., Kafi, M., Khazaei, H.R., and Pessarakli, M. 2013. Effects of drought stress on quantitative and qualitative yield and antioxidative activity of *Bunium persicum*. Turkish Journal of Botany 37: 930-939.

Salmanian, Sh., Sadeghi-mahoonak, A., Jamson, M., and Tabatabaee-amid, B. 2013. Identification and quantification of phenolic acids, radical scavenging activity and ferric reducing power of *Eryngium caucasicum* Trautv. ethanolic and methanolic extracts. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology 2 (2): 193-204.

Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G.M., and Ruberto, G. 2010. Influence of corm provenance and environmental condition on yield and apocarotenoid profiles in saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Food Composition and Analysis 23 (5): 394-400.

Stankovic, M.S. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. Kragujevac Journal Scindeks 33: 63-72.

Temerdashev, Z., Frolova, N., and Kolychev, I. 2011. Determination of phenolic compounds in medicinal herbs by reversed-phase HPLC. Journal of Analytical Chemistry 66 (4): 407-414.

Termentzi, A., and Kokkalou, E. 2008. LC-DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of *Crocus sativus* petal extracts. Planta Medica 74 (5): 573-581.

Vakili-ghartavol, M., and Alizadeh-salteh, S. 2016. Comparison between metabolites and antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.) from Kashmar and Marand regions. Saffron Agronomy and Technology 4 (3): 215-224.

Zahir, A., Abbasi, B. H., Adil, M., Anjum, S., Zia, M., and Ul-Haq, I. (2014). Synergistic effects of drought stress and photoperiods on phenology and secondary metabolism of *Silybum marianum*. Applied Biochemistry and Biotechnology 174 (2): 693–707.

Zeka, K.C. Ruparelia, K.A. Cantinenza, M.P., Androutsopoulos, V., Vegilo, F., and Arroo, R.J. 2015. Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. Fitoterapia 107: 128-134.

Evaluation of Secondary Metabolites, Total Phenol Content and Antioxidant Properties of Petal in Saffron Populations under Conventional and once Irrigation Conditions

Parisa Sheykholeslami[1], Jalal Saba[2*], Farid Shekari[3], Mohammadreza Azimi Moghaddam[3] and Azam Maleki[4]

Submitted: 22 May 2019 **Accepted:** 13 October 2019

Sheykholeslami, P., Jalal Saba, J., Shekari, F., Azimi Moghaddam, M., and Maleki, A. 2020. Evaluation of secondary metabolites, total phenol content and antioxidant properties of petal in saffron populations under conventional and once irrigation conditions. Saffron Agronomy & Technology, 8(1): 231-242.

Abstract

Each year a large amount of saffron petals which make up a significant proportion of saffron flowers are discarded as waste while this part of the flower also contains compounds such as phenol, anthocyanin, flavonoid and antioxidant properties. Two separate experiments were conducted using randomized complete block design with three replications in order to evaluate secondary metabolites, total phenol content and antioxidant capacity of petals in eight saffron populations under normal and once irrigation conditions at the research farm of university of Zanjan on three year old saffron plants. In order to measure and determine secondary metabolites, total phenol content and antioxidant properties of saffron petal extract, UV-Visible Metering Spectra, folin-Ciocalteu and DPPH were used, respectively. Combined analysis of variance under normal and once irrigation conditions showed that the difference between secondary metabolites and antioxidant properties was not significant in the two irrigation conditions. While, total phenol content was significantly higher under the once irrigation condition, the Torbat-e-jam population had highest total phenol content (86.66 mg gallic acid per gram of methanolic extract) under this condition. In both irrigation conditions, the evaluated populations exhibited suitable amounts of Picocrocin, Safranal, phenol and antioxidant properties which can be considered to be of use for us in the food, pharmaceutical and chemical industries.

Keywords: Crocin, Folin-ciocalteu, Free radical, Limited irrigation, Picocrocin and Safranal

1 - MSc. Student of Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2 - Professor of Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3 - Associate Professor of Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4 - Postdoc. Researcher of Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
(*- Corresponding author. Email: saba@znu.ac.ir)
DOI: 10.22048/jsat.2019.187000.1352