

Investigating the effect of corm weight, mycorrhiza fungi and Azotobacter bio fertilizer on qualitative characteristic and secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.)

Zohre Dehghani¹, Mohammad Hossein AminiFard^{2*}, Mohammad Ali Behdani³, Mehdi Jahani⁴

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

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

3- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran

4- Associate Professor, Department of plant protection Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

*Corresponding Author Email: mh.aminifard@birjand.ac.ir

Abstract

Introduction: Saffron (*Crocus sativus* L.) is a valuable medicinal plant and a fragrant and expensive export spice from the lily family. Today, the positive results of using biofertilizers have led farmers to use more biological and organic fertilizers in saffron cultivation. In the meantime, the use of biofertilizers is considered due to the increased water retention capacity and nutrient absorption. Also, the combination of low-input ecological systems such as co-inoculation of crops with mycorrhiza fungi and nitrogen-fixing bacteria can be a suitable and environmentally friendly alternative to chemical fertilizers and today's high-input systems. Therefore, the present study was conducted to investigate the effect of corm weight, mycorrhizal fungi, and Azotobacter biofertilizer on qualitative characteristic and secondary metabolites of saffron, so that by selecting the best amount of biofertilizers and the appropriate corm weight of the saffron, and as a result, reducing the use of chemical fertilizers, steps can be taken to develop the cultivation and improve the yield of this important medicinal plant.

Materials and Methods: In order to investigate the effect of corm weight, mycorrhizal fungi and Azotobacter biofertilizer on qualitative characteristic and secondary metabolites of saffron, an experiment was conducted in the 2023-2024 crop year as a factorial design in a randomized complete block design at the Birjand Agricultural Faculty Research Farm. The experimental factors included three levels of corm weight (0.1 to 4, 4.1 to 8 and 8.1 to 12 grams), two levels of bacterial biofertilizer (application and non-application of Azotobacter-1 fertilizer containing Pantoea agglomerans strain O4 bacteria) and two levels of mycorrhizal biofertilizer (containing arbuscular mycorrhizal fungi strains

Glomus mosseae, *Glomus intraradices* and *Glomus etunicatum* and a control without mycorrhiza). Bacterial treatments were applied in the first year of planting by inoculating saffron corms by preparing a suspension of the above bacteria mixed with distilled water in two times. The first time was done before planting by dipping the corms and the second time was done with irrigation 40 days after planting and also in the first irrigation of the second year according to the instructions of Zistfanavar Sabz Company. Mycorrhiza treatments were done at a rate of 10 grams for each seedling by adding it to the planting hole at the time of planting according to the instructions of Daneshbonyan Zist Sepidan Hayat Paya Company.

Results and Discussion: The results of the interaction effects of the weight of the corm, mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria on the photosynthetic pigments of saffron leaves showed that The treatment of the corms of the weight group of 8.1-12 grams and the use of mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria increased chlorophyll a and total chlorophyll by 225.92 and 148.57 percent, respectively, compared to the treatment of the corms of the weight group of 4.1-8 grams and no use of fungi and bacteria. The treatment of 8.1-12 grams of corm and the use of mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria increased carbohydrate by 51.08 percent compared to the treatment of the corms of the weight group of 0.1-4 grams and the use of Azotobacter bacteria, and total phenol by 127.07 percent compared to the control treatment. The combined treatment of mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria had the highest amount of flavonoids. The highest content of crocin, safranal and picrocrocin was obtained from the treatment of the corms of the weight group of 8.1 to 12 g and the lack of use of mycorrhizal fungi and the use of Azotobacter bacteria.

Conclusion: Simultaneous application of Azotobacter bacteria and inoculation of 8.1-12 g corms with mycorrhizal fungi improved photosynthetic pigments and biochemical properties, and planting 8.1-12 g corms and using Azotobacter bacteria increased the active ingredients of saffron. Therefore, the use of biofertilizers and the development of mycorrhizal hyphae in agricultural soil, including in the planting site of saffron corms, can improve saffron cultivation in sustainable agriculture and reduce losses caused by excessive use of chemical fertilizers.

Keywords: Azeto BARVAR. 1, Crocin, Photosynthetic Pigments, Bio-fertilizer, Medicinal plant

ارزیابی تأثیر وزن بنه، قارچ میکوریزا و کود زیستی ازتوباکتر بر خصوصیات بیوشیمیایی و مواد

مؤثره زعفران (*Crocus sativus* L.)

زهره دهقانی^۱، محمد حسین امینی فرد^{۲*}، محمدعلی بهدانی^۳، مهدی جهانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- استاد گروه به نژادی و ژنتیک و گروه پژوهشی زعفران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

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

چکیده

به منظور بررسی تأثیر وزن پدازه، قارچ میکوریزا و کود زیستی ازتوباکتر بر خصوصیات بیوشیمیایی و مواد مؤثره زعفران آزمایشی در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی بیرجند اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ۳ سطح وزن پدازه (۰/۱ تا ۴/۱، ۸ تا ۸/۱ و ۱۲ گرم)، دو سطح کود زیستی باکتریایی (کاربرد و عدم کاربرد کود ازتوبارور-۱ حاوی باکتری‌های *Pantoea agglomerans* سویه O4) و دو سطح کود زیستی میکوریزا (حاوی قارچ میکوریزا آرباسکولار سویه‌های *Glomus intraradices*، *Glomus mosseae*، *Glomus etunicatum* و شاهد بدون میکوریزا) بود. نتایج اثرات متقابل وزن پدازه، قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بر رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ زعفران نشان داد که بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۳/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۵/۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) برگ از پدازه‌های ۸/۱ تا ۱۲ گرم و مصرف قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر حاصل شد. بیش‌ترین میزان قند (۲۷/۶۴ میلی‌گرم بر گرم) و فنول کل (۲۷/۶۸ میلی‌گرم بر گرم) کلاله از تیمار پدازه‌های ۸/۱ تا ۱۲ گرم و مصرف قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر به‌دست آمد. همچنین بالاترین میزان محتوای کروسین، سافرانال و پیکروکروسین از تیمار پدازه‌های گروه وزنی ۸/۱ تا ۱۲ گرم و عدم مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر به‌دست آمد. در مجموع نتایج این تحقیق، بیانگر بهبود کیفیت زعفران با کاربرد همزمان پدازه‌هایی با وزن بالاتر (۸/۱ تا ۱۲ گرم) و مصرف قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بود.

واژه‌های کلیدی: ازتوبارور-۱، کروسین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کود بیولوژیک، گیاه دارویی

زعفران (*Crocus sativus* L.) یک گیاه دارویی ارزشمند و یک ادویه صادراتی خوشبو و گران قیمت از خانواده زنبق است (Soltani et al., 2023). تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی زعفران وجود چندین ترکیب فرار و غیرفرار در کلاله‌های این گیاه دارویی را تأیید کرده است. زعفران دارای چهار ماده فعال زیستی اصلی شامل کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال می‌باشد و علاوه بر این دارای یکسری مواد معدنی، پروتئین، قند و ویتامین‌هایی مانند B1 و B2 نیز می‌باشد (Anaeigoudari et al., 2023). مزاج زعفران گرم و خشک است و به‌نظر می‌رسد نشاط‌آور بودن از مهم‌ترین خواص ذکر شده برای زعفران باشد، یعنی زعفران می‌تواند خلق و خو را بهبود بخشد و احساسات مثبتی هم‌چون شادی، سرگرمی، لذت و سرزندگی را در فرد مصرف کننده ایجاد کند (Soltani et al., 2023). خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی زعفران عمدتاً مربوط به کروسین موجود در کلاله زعفران می‌باشد و می‌تواند در کاهش علائم بیماری آلزایمر نیز مؤثر باشد (Anaeigoudari et al., 2023). سافرانال به‌عنوان یک مونوترپن آلدئید استخراج شده از اسانس زعفران، دارای چندین فعالیت بیولوژیکی از جمله کاهش قند خون، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد تشنج و ضد اضطراب می‌باشد (El-Midaoui et al., 2022). زعفران در مناطق محدودی از جهان کشت می‌شود. ایران، کشمیر، مراکش، یونان، اسپانیا و ایتالیا کشورهای اصلی خرید و فروش گیاه دارویی زعفران هستند. در این میان ایران بیش از ۹۰ درصد از تولید کل زعفران دنیا و بیش از ۸۴ درصد سطح زیر کشت آن را در اختیار دارد (Hosseini-Evari et al., 2020).

یکی از موارد مهم در جهت بهبود کیفیت و افزایش عملکرد محصول زعفران، اندازه پدازه‌های کشت شده زعفران در مزرعه می‌باشد، که می‌تواند بر نحوه تخصیص مواد غذایی در گیاه مؤثر بوده و از طریق افزایش رشد رویشی، بر میزان تولید و عملکرد مؤثر باشد (Nassiri Mahallati et al., 2015). لذا اندازه پدازه مادری، یکی از فاکتورهای مهم در انتخاب پدازه‌های با کیفیت جهت کاشت زعفران می‌باشد (Koocheki et al., 2018). در مطالعه خاوری و همکاران (Khavari et al., 2016)، دریافتند که وزن پدازه زعفران می‌تواند تأثیر زیادی بر عملکرد آن داشته باشد. استفاده از پدازه‌هایی با وزن ۹ تا ۱۱ گرم نسبت به ۶ تا ۸ گرم، سبب افزایش عملکرد گل، کلاله و خامه زعفران می‌شود. کاشت پدازه‌هایی با متوسط وزن کمتر از ۴ گرم در سال اول منجر به عدم تولید گل‌های زعفران شد که می‌توان نتیجه گرفت پدازه‌های درشت‌تر توان گلدهی بالاتری دارند (Koocheki et al., 2018). افزایش وزن پدازه‌های مادری می‌تواند از طریق بهبود ذخایر غذایی، سبب افزایش رشد رویشی، تحریک در گل‌آوری و توسعه پدازه‌های دختری و در نتیجه افزایش عملکرد کمی و کیفی زعفران شود (Golzar Jahan Abadi et al., 2017).

کودهای شیمیایی از زمان انقلاب سبز به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند و سبب کاهش سلامت خاک (با غیرقابل سکونت کردن اکولوژی خاک برای جانوران خاکزی که تا حد زیادی مسئول حفظ حاصلخیزی خاک و تأمین برخی مواد مغذی

برای گیاهان هستند) می‌شوند (Kumar et al., 2017). امروزه نتایج مثبت استفاده از کودهای زیستی باعث روی آوردن کشاورزان به مصرف بیشتر از کودهای بیولوژیک و زیستی در کشت و کار زعفران شده است (Koocheki, 2013). در این میان، استفاده از کودهای زیستی، به دلیل افزایش ظرفیت نگهداری آب و جذب عناصر غذایی مدنظر می‌باشد (Caser et al., 2019). همچنین ترکیب نظام‌های کم نهاده اکولوژیک، همچون تلقیح توأم گیاهان با قارچ میکوریزا و باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن می‌تواند جایگزین مناسب و زیست محیطی برای کودهای شیمیایی و نظام‌های پرنهاده امروزی باشد (Aminifard et al., 2025).

کاربرد سه گانه کودهای زیستی ازتوباکتر و باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس باعث افزایش ۹۲ درصدی تعداد گل‌های زعفران نسبت به تیمار شاهد شد (Aalizadeh et al., 2021). در پژوهشی میزان رشد رویشی گیاه زعفران تحت تیمار با قارچ میکوریزا و شاهد بررسی گردید. طی کشت گلدانی زعفران همراه با تیمار مصرف قارچ میکوریزا و شاهد مشخص شد، که میزان صفات وزن تر اندام هوایی و ارتفاع گیاه نسبت به شاهد افزایش چشمگیری یافت. همچنین نتایج مقایسه میانگین کلروفیل برگ نمونه‌ها، نشانگر اختلاف معنی‌دار گیاهان تیمار شده با قارچ نسبت به شاهد بود (Zand et al., 2014). همچنین گزارش گردید که بالاترین محتوای پیکروکروسین کلاله‌های زعفران از تیمار مصرف ۰/۱ و ۰/۲ درصد ازتوباکتر به دست آمد (Kheiry et al., 2018). مصرف کود زیستی نیتروکسین نیز توانست تأثیرات مثبتی بر میزان طعم کلاله‌های زعفران داشته باشد. بیش‌ترین محتوای پیکروکروسین از تیمار ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین و حداقل میزان این صفت از مصرف ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی اوره گزارش شد (Golzad et al., 2010). همچنین در بررسی تأثیر مصرف قارچ میکوریزا به همراه گروه‌های وزنی مختلف از پدازه‌های زعفران مشخص گردید، که استفاده از پدازه‌هایی با وزن بالاتر، سبب افزایش عملکرد پدازه‌های متصل به پدازه مادری گردید و مصرف قارچ میکوریزا نیز توانست سبب بهبود عملکرد پدازه‌ها و گل زعفران شود (Noori et al., 2023). همچنین گزارش گردید که تلقیح پدازه‌های زعفران به قارچ میکوریزا آرباسکولار سبب افزایش قابل توجهی محتوای کروسین کلاله‌های زعفران شد (Caser et al., 2019).

لذا تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیر وزن پدازه، قارچ میکوریزا و کود زیستی ازتوباکتر بر خصوصیات بیوشیمیایی و مواد مؤثره زعفران (*Crocus sativus* L.) اجرا شد، تا با انتخاب بهترین وزن مناسب پدازه زعفران و بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌های مفید و در نتیجه کاهش مصرف کودهای شیمیایی، بتوان در جهت توسعه کشت و بهبود عملکرد و کیفیت این گیاه دارویی مهم گام برداشت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۱۲ تیمار در دو سال زراعی ۱۴۰۲ - ۱۴۰۱ در مزرعه آموزشی و تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل فاکتور اول وزن پدازه در ۳ سطح (متوسط وزن ۰/۱ تا ۰/۴، ۴/۱ تا ۸ و ۸/۱ تا ۱۲ گرم)، فاکتور دوم کود زیستی باکتریایی در دو سطح (کاربرد و

عدم کاربرد کود ازتوبارور-۱ حاوی باکتری‌های سودوموناس *Pantoea agglomerans* سویه O4 و فاکتور سوم کود زیستی مایکوریزا (حاوی قارچ مایکوریزا آرباسکولار سویه‌های *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum* و شاهد بدون مایکوریزا) بود. اعمال تیمارهای باکتریایی در سال اول کاشت به صورت تلقیح کردن پدازه‌های زعفران با تهیه سوسپانسیونی از باکتری‌های فوق در ترکیب با آب مقطر در دو نوبت صورت گرفت. نوبت اول قبل از کاشت به صورت غوطه‌وری پدازه و نوبت دوم به همراه آبیاری ۴۰ روز پس از کاشت و همچنین در اولین آبیاری سال دوم، طبق دستورالعمل شرکت زیست فناوری سبز انجام شد. تیمارهای مایکوریزا به میزان ۱۰ گرم برای هر پدازه با افزودن به چاله کشت (زیر پدازه) در زمان کاشت طبق دستورالعمل شرکت دانش بنیان زیست سپیدان حیات پایا انجام گردید. قبل از انجام آزمایش، نمونه‌برداری از خاک به طور تصادفی از عمق ۰ الی ۳۰ سانتی‌متری برای آزمایش آنالیز خاک انجام گردید (جدول ۱).

پتاسیم	فسفر	نیتروژن	کربن آلی	شن	رس	سیلت	بافت خاک	PH
K	P	N	OC	Sand	Clay	Silt	Soil Texture	
(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		
300	63.7	0.013	0.15	30	24	46	لومی Loam	7.9

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه مورد مطالعه
Table 1. Physical and chemical properties of soil in the study area

عملیات آماده‌سازی زمین، شامل شخم اولیه، دیسک و تسطیح زمین توسط لولر در شهریورماه ۱۴۰۱ انجام شد. سپس کرت‌هایی به ابعاد ۱×۲ متر ایجاد گردید، که فاصله بین کرت‌های آزمایشی ۵۰ سانتی‌متر و فاصله بین بلوک‌ها ۲ متر، در نظر گرفته شد. به منظور اجتناب از مخلوط شدن آب کرت‌ها با یکدیگر، آبیاری توسط لوله انجام شد. همچنین پدازه‌های مناسب و یکنواخت (در ۳ گروه با متوسط وزن ۰/۱ تا ۴ گرم، ۴/۱ تا ۸ گرم و ۸/۱ تا ۱۲ گرم، سالم و بدون بریدگی) از شهرستان قاینات برای کشت تهیه و استفاده گردید. پدازه‌های زعفران پس از جداسازی پوشش سطحی و فلس‌های زیرین در مهرماه ۱۴۰۱ بر اساس نقشه طرح آزمایشی در شیارهایی با عمق ۱۵ سانتی‌متر و با فاصله کاشت بین ردیف ۲۰ سانتی‌متر و فاصله کاشت روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر از یکدیگر با تراکم ۵۰ پدازه در متر مربع توسط بیلچه کاشته شدند. بعد از اتمام کاشت پدازه‌های زعفران، اولین آبیاری به صورت سنگین توسط لوله در اوایل آبان ماه صورت گرفت. پس از گاورو شدن زمین، با فاصله یک هفته از آبیاری اول، سطح زمین با چهار شاخ فلزی تا عمق ۵ سانتی‌متر سله شکنی شد. سله شکنی سبب می‌شود تا گل‌ها به راحتی از خاک خارج شوند، همچنین رطوبت زمین حفظ و تهویه خاک به راحتی انجام شود. آبیاری‌های بعدی، بعد از اتمام دوره گلدهی و سپس در

ماه‌های دی، اسفند و فروردین ماه انجام شد. در طول مراحل اجرای آزمایش، هیچ‌گونه کود شیمیایی، آفت‌کش و علف‌کش شیمیایی مورد استفاده قرار نگرفت و کنترل علف‌های هرز موجود در طی دوره رشد گیاه از طریق وجین دستی انجام شد. اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a, b و کلروفیل کل) نیز در طی فصل رشد (در دی ماه ۱۴۰۲) و از برگ‌های جوان توسعه یافته در مرحله رشد رویشی زعفران با استفاده از روش آرنون (Arnon, 1967) انجام شد. گل‌های زعفران در سال دوم زراعی (۱۴۰۲) در اولین ساعات صبح با در نظر گرفتن اثر حاشیه‌ای (نیم متر فاصله با هر ضلع کرت)، از کل سطح کرت‌ها برداشت شد و قسمت‌های مختلف گل بصورت طبیعی در سایه خشک شدند. بعد از خشک شدن، کلاله‌های زعفران برداشت شده در هر روز با هم مخلوط و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی آماده گردیدند.

روش تهیه عصاره کلاله زعفران

به منظور آماده‌سازی عصاره جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، یک گرم کلاله خشک شده زعفران در ۱۰۰ سی‌سی اتانول ۸۰ درصد حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و از قسمت روشن‌آور به عنوان عصاره زعفران استفاده گردید.

مقدار قند (کربوهیدرات) کل

جهت ارزیابی میزان قند کل در کلاله زعفران، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط گردید و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبجوش گذاشته و پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب آن‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و در نهایت میزان قند کل از روی منحنی استاندارد گلوکز تعیین و بر حسب میلی‌گرم بر گرم بیان شد (Chang et al., 2002).

مقدار کل ترکیبات فنولی کلاله زعفران

برای اندازه‌گیری محتوی فنول کل کلاله زعفران از روش گالیک اسید و معرف فولین سیوکالچو استفاده شد. جهت ارزیابی میزان فنول کل کلاله، ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۰/۴ میلی‌لیتر فولین سیکالتو ۵۰ درصد ترکیب گردید و بعد از ۳ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد به ترکیب اضافه شد. سپس نمونه‌ها ۴۵ دقیقه در اتاق تاریک گذاشته و بعد میزان جذب نمونه‌ها در طیف ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در نهایت میزان فنول نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین و بر حسب میلی‌گرم بر گرم بیان شد (Turkmen et al., 2005).

مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی کلاله زعفران

جهت ارزیابی میزان فلاونوئید کل کلاله زعفران، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید

آلومینیوم ۲ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. در نهایت میزان فلاونوئید نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد کوثرستین تعیین و بر حسب میلی‌گرم بر گرم بیان شد (Chang et al., 2002).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل کلالة زعفران

جهت تعیین میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH) کلالة زعفران از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی و با کمک ۲،۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH حل و در متانول ترکیب گردید. پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Turkmen et al., 2005). در نهایت با استفاده از فرمول ذیل درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها محاسبه شد:

(رابطه ۱) $100 \times (\text{عدد قرائت شده} / \text{جذب نمونه شاهد}) - 1 = \text{فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل}$

اندازه‌گیری مواد مؤثره زعفران

جهت اندازه‌گیری ترکیبات کیفی موجود در کلالة گل از روش استاندارد ملی ایران (INS, 2006) استفاده گردید (Parsa et al., 2018). میزان مواد مؤثره زعفران (پیکروکروسین، سافرانال و کروسین) بر مبنای ثبت تغییرات حاصل از چگالی نوری به ترتیب در طول موج‌های ۲۵۷ (پیکروکروسین)، ۳۳۰ (سافرانال) و ۴۴۰ (کروسین) نانومتر در دمای متوسط تعیین می‌گردد. براساس این روش ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه کلالة پودر شده با استفاده از آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. سپس این ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی به کمک دور متوسط همزن مغناطیسی حل شد و میزان جذب محلول آبی یک درصد در طیف‌های ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (UNICO, 2000, Germany) قرائت شدند. عدد به دست آمده در رابطه ۲ قرار داده شد و به ترتیب مقدار پیکروکروسین، سافرانال و کروسین اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است در این روش نیازی به استفاده از استاندارد نمی‌باشد (INS, 2006).

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A \times 100}{M(100-H)} \quad (\text{رابطه ۲})$$

$E_{1cm}^{1\%}$ = میزان جذب عصاره آبی زعفران، 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 کلالة که معمولاً بین ۱۰-۸ درصد می‌باشد.

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

نتایج و بحث

رنگیزه های فتوسنتزی (کلروفیل a)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل وزن پدازه و قارچ میکوریزا و وزن پدازه و باکتری ازتوباکتر و اثرات سه گانه در سطح احتمال یک درصد بر کلروفیل a معنی دار بود (جدول ۲). تیمار وزن پدازه ۸/۱ تا ۱۲ گرم، مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر، سبب افزایش ۲۲۵/۹۲ کلروفیل a نسبت به تیمار پدازه گروه وزنی ۴/۱ تا ۸ گرم و عدم مصرف قارچ و باکتری شد (جدول ۳). مصرف قارچ میکوریزا آرباسکولار سبب افزایش دسترسی گیاه به عنصر پرمصرف فسفر شده که در تأمین انرژی مراحل فتوسنتزی نقش دارد و از همین رو در جهت تأمین نیاز غذایی این قارچ همزیست و افزایش فتوسنتز در گیاه، میزان غلظت رنگدانه کلروفیل a در برگ های گیاه دارویی زعفران افزایش قابل توجهی می یابد. هم چنین در نتایج کار سایر محققین گزارش شد که مصرف ۷/۵ گرم قارچ میکوریزا به ازای هر جایگاه کشت به همراه کاربرد ۲۴ تن در هکتار ورمی کمپوست، سبب بیشترین میزان کلروفیل a (۱۶/۰۳ میلی گرم بر گرم) در گیاه زعفران شد (Jami et al., 2020).

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای آزمایشی بر رنگیزه های فتوسنتزی برگ زعفران
Table 2. The ANOVA (mean squares) of the effect of experimental treatments on photosynthetic pigments leaf of saffron

کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variance
0.003 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.09 ^{ns}	2	تکرار Replication
5.98 ^{**}	0.76 ^{**}	2.94 ^{**}	2	وزن پدازه Corm weight
1.53 ^{**}	0.01 ^{ns}	1.26 ^{**}	1	قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi
1.34 ^{**}	0.001 ^{ns}	1.42 ^{**}	1	باکتری ازتوباکتر Azotobacter
1.73 ^{**}	0.03 ^{ns}	2.28 ^{**}	2	وزن پدازه × قارچ میکوریزا CM×MF
2.46 ^{**}	0.29 ^{**}	2.11 ^{**}	2	وزن پدازه × باکتری ازتوباکتر CM×AB
1.33 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.84 ^{ns}	1	قارچ میکوریزا × باکتری ازتوباکتر MF×AB
1.32 ^{**}	0.09 ^{ns}	1.67 ^{**}	2	وزن پدازه × قارچ میکوریزا × باکتری ازتوباکتر CM×MF×AB
0.11	0.01	0.08	22	خطا Error
8.59	8.86	10.77	-	ضریب تغییرات C.V (%)

^{ns}, *, **: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد
^{ns}, **, *: non-significant and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively

جدول ۳. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل وزن پدازه، قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بر رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ زعفران

Table 3. Comparison of the mean interaction effect corm weight, mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria on photosynthetic pigments leaf of saffron

کلروفیل کل Total chlorophyll (mg.g fw ⁻¹)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg.g fw ⁻¹)	باکتری ازتوباکتر Azotobacter	قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi	وزن پدازه Corm weight (gr)
4.72 ^{bc}	3.37 ^b			
4.38 ^d	3.03 ^{cd}	Fertilizer application	Fertilizer application	0.1-4
3.62 ^e	2.68 ^e	No fertilizer application	Fertilizer application	0.1-4
4.98 ^{ab}	3.45 ^{ab}	Fertilizer application	No fertilizer application	0.1-4
		No fertilizer application	No fertilizer application	0.1-4
2.20 ^g	1.20 ^h			
4.45 ^{cd}	3.08 ^c	Fertilizer application	Fertilizer application	4.1-8
3.45 ^f	2.45 ^f	No fertilizer application	Fertilizer application	4.1-8
2.10 ^g	1.08 ⁱ	Fertilizer application	No fertilizer application	4.1-8
		No fertilizer application	No fertilizer application	4.1-8
5.22 ^a	3.52 ^a			
4.94 ^{ab}	3.43 ^b	Fertilizer application	Fertilizer application	8.1-12
3.65 ^f	1.77 ^g	No fertilizer application	Fertilizer application	8.1-12
4.30 ^d	2.97 ^d	Fertilizer application	No fertilizer application	8.1-12
		No fertilizer application	No fertilizer application	8.1-12

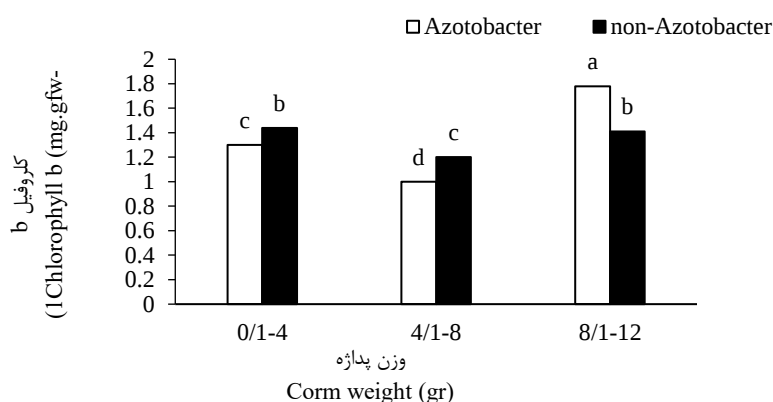
در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.
In each column, means with the same letter are not different significantly at 5% probability level.

کلروفیل b

نتایج ارائه شده حاکی از تأثیر معنی‌دار اثر ساده وزن پدازه و همچنین اثر متقابل وزن پدازه و باکتری ازتوباکتر بر کلروفیل b در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۲). نتایج اثر متقابل وزن پدازه و باکتری ازتوباکتر نشان داد که تیمار گروه وزنی پدازه‌های ۸/۱ تا ۱۲ گرم و مصرف باکتری ازتوباکتر سبب افزایش ۷۸ درصدی کلروفیل b نسبت به تیمار گروه وزنی پدازه‌های ۴/۱ تا ۸ گرم و عدم مصرف باکتری ازتوباکتر شد (شکل ۱). مشابه این آزمایش، گیاه زعفران در آزمایشی گلدانی در شرایط گلخانه و تحت تیمار با قارچ میکوریزا و تیمار شاهد قرار گرفت و نتایج مقایسه میانگین اختلاف معنی‌داری در صفت کلروفیل b برگ‌های زعفران تحت تیمار قارچی نسبت به شاهد را نشان داد (Zand et al., 2014). در پژوهشی عنوان شد که مصرف همزمان کود شیمیایی نیتروژن به همراه مصرف کود ازتوبارور ۱ توانست سبب افزایش بیشتر کلروفیل b در برگ‌های زعفران شود. مصرف نیمی از کود شیمیایی و کود زیستی نسبت به کاربرد کود شیمیایی به تنهایی، شدت این صفت را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Bayat, 2014).

کاربرد کودهای زیستی سبب افزایش قابلیت جذب و نگهداری مواد غذایی شده و منجر به رشد کمی و کیفی گیاه از جمله رنگدانه‌های برگ گیاه زعفران می‌شود. افزایش رنگدانه‌های برگ، همچون کلروفیل a و b سبب بهبود در جذب نور خورشید و

افزایش فتوسنتز گیاه شده و عملکرد گیاه را افزایش می‌دهد. هم‌چنین با افزایش جذب فسفر توسط گیاه با مصرف کودهای زیستی (قارچ میکوریزا) به‌عنوان عنصر پر مصرف در طی چرخه فتوسنتز، افزایش غلظت کلروفیل برگ قابل توجه می‌باشد.



شکل ۱. اثر متقابل وزن پدازه و باکتری ازتوباکتر بر کلروفیل b
Figure 1. Interaction effect of corm weight and Azotobacter on chlorophyll b

کلروفیل کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ترکیبی قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر تأثیر معنی‌داری بر کلروفیل کل برگ نداشت، اما سایر اثرات ساده و متقابل بر این صفت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲). تیمار گروه وزنی ۸/۱ تا ۱۲ گرم، مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر سبب افزایش ۱۴۸/۵۷ درصدی، نسبت به تیمار گروه وزنی ۴/۱ تا ۸ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و عدم مصرف باکتری ازتوباکتر شد (جدول ۳).

در تحقیق (Jami et al., 2020) مشخص شد که تیمار ترکیبی ۷/۵ گرم قارچ میکوریزا به ازای هر جایگاه کاشت و ۲۴ تن در هکتار کود ورمی کمپوست توانست مؤثرترین تیمار در افزایش کلروفیل کل در برگ‌های زعفران شود و غلظت این صفت ۳۷/۳۰ درصد نسبت به شاهد در برگ‌های گیاه افزایش یابد. مطابق تحقیقات موزنه و همکارانش، مصرف کود زیستی سوپر نیتروپلاس، می‌تواند با فراهم کردن نیتروژن مورد نیاز گیاه، سبب افزایش وزن تر بخش هوایی و کلروفیل گیاه شود (Monje et al., 1992). در تحقیقی دیگر، بالاترین میزان کلروفیل a (۲/۰۹۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در برگ‌های زعفران از تیمار مصرف بالاترین سطح از باکتری‌های ازتوباکتر به‌دست آمد. کم‌ترین مقدار صفت مذکور (۱/۰۹۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر) نیز از تیمار شاهد گزارش شد (Kheiry et al., 2018). براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، کاربرد همزمان پدازه‌های ۸/۱ تا ۱۲ گرم، قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر، کارآمدترین تیمار در افزایش خصوصیات کیفی گیاه زعفران نظیر افزایش کلروفیل برگ بود. در این پژوهش، میزان کلروفیل کل برگ‌های زعفران در نتیجه مجموع غلظت کلروفیل a و b با مصرف کودهای زیستی افزایش یافت. هم‌چنین با مطالعه غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس بر روی پدازه‌های ۸ تا ۱۰ گرم مشاهده شد که بیش‌ترین و

کم‌ترین میزان کلروفیل برگ زعفران به‌ترتیب از تیمار مصرف باکتری و عدم مصرف باکتری گزارش شد (Salehi et al., 2022). عنصر نیتروژن یکی از عناصر مهم در ساختار مولکول‌های پروتئینی، کوآنزیم‌ها و اسیدنوکلئیک بوده و از اجزای لازم در مولکول کلروفیل می‌باشد و اثرات مهمی در رشد و توسعه گیاهی دارد. لذا مصرف باکتری ازتوباکتر می‌تواند بر ظرفیت فتوسنتزی برگ مؤثر باشد.

کروسین

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از آن بود که تنها اثر ساده قارچ میکوریزا نتوانست تأثیر معنی‌داری بر محتوای کروسین کلاله‌های زعفران داشته باشد، اما سایر اثرات ساده و متقابل بر رنگ زعفران در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که حداکثر محتوای کروسین، از تیمار وزن پدازه ۸/۱ تا ۱۲ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر حاصل شد و کم‌ترین میزان آن، به تیمار پدازه‌هایی به وزن ۰/۱ تا ۴ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و عدم مصرف باکتری ازتوباکتر اختصاص داشت (جدول ۵).

مطالعه بر روی گروه‌های وزنی مختلف از پدازه مادری زعفران نشان داد، که وزن پدازه مادری بالاتر، توانست شاخص رنگ زعفران (صفت کروسین) را افزایش دهد. بیش‌ترین محتوای کروسین کلاله از گروه وزنی بالاتر (۸/۱ تا ۱۵ گرم) به‌دست آمد (Sahabi et al., 2017). تأثیر تلقیح پدازه‌های زعفران به قارچ میکوریزا آرباسکولار نشان داد، به‌طور قابل توجهی محتوای کروسین کلاله‌های زعفران افزایش یافت (Caser et al., 2019). در پژوهشی دیگر نیز مصرف ۱۰ گرم قارچ میکوریزا به ازای هر جایگاه کاشت پدازه، توانست سبب افزایش معنی‌دار (۷/۶۷ درصد) محتوای کروسین کلاله‌های زعفران نسبت به گیاهان شاهد گردد (Jami et al., 2020). هم‌چنین مشخص شد که کاربرد کودهای زیستی، می‌تواند اثرات مثبت و معنی‌داری بر میزان کروسین (عامل رنگ) کلاله گیاه زعفران داشته باشد (Golzari, 2014). مطابق با این پژوهش نیز در مطالعه‌ای نشان داده شد که، مصرف کود زیستی بیوآمینوپالیس توانست سبب افزایش معنی‌داری در میزان کروسین کلاله‌های زعفران گردد. در این مطالعه، بالاترین و پایین‌ترین میزان کروسین به ترتیب ۲۵۰ و ۲۲۴/۶ گزارش شد (Golzari Jahan Abadi et al., 2017). مصرف ۲/۵ لیتر در هکتار کود زیستی نیتروکیسن به همراه ۷۵ کیلوگرم در هکتار کود اوره توانست سبب تولید بیش‌ترین محتوای گلوکوزید کروسین (۱۹۹/۵۳) کلاله‌های زعفران شود. کم‌ترین میزان رنگ کلاله‌ها (۱۷۴/۰۶) نیز از تیمار عدم مصرف نیتروژن گزارش شد (Golzad et al., 2010). در مطالعه دیگری، بالاترین محتوای کروسین کلاله‌های زعفران از تیمار مصرف ۰/۱ درصد ازتوباکتر به‌دست آمد (Kheiry et al., 2018). با مصرف قارچ‌های میکوریزا آرباسکولار، میزان تراکم سیستم ریشه‌ای گیاهان افزایش یافته و با بالا رفتن میزان هدایت هیدرولیکی از سمت ریشه و کشش تعرقی از سمت اندام هوایی گیاه، فتوسنتز گیاهی بهبود می‌یابد. افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه نیز سبب بهبود عملکرد کمی و کیفی زعفران از جمله محتوای کروسین کلاله‌ها می‌گردد.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای آزمایشی بر مواد مؤثره زعفران
 Table 4. The ANOVA (mean squares) of the effect of experimental treatments on secondary metabolites of saffron

پیکروکروسین Picrocrocin	سافرانال Safranal	کروسین Crocine	درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variance
2.57 ^{ns}	0.53 ^{ns}	1.33 ^{ns}	2	تکرار Replication
226.89 ^{**}	97.18 ^{**}	314.59 ^{**}	2	وزن پدازه Corm weight
1.22 ^{ns}	1.40 ^{ns}	8.67 ^{ns}	1	قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi
3.16 ^{ns}	71.31 ^{**}	453.97 ^{**}	1	باکتری ازتوباکتر Azotobacter
48.16 ^{ns}	5.72 [*]	2119.51 ^{**}	2	وزن پدازه × قارچ میکوریزا CM×MF
104.16 ^{**}	6.52 ^{**}	1630.36 ^{**}	2	وزن پدازه × باکتری ازتوباکتر CM×AB
106.09 ^{**}	21.79 ^{**}	1348.59 ^{**}	1	قارچ میکوریزا × باکتری ازتوباکتر MF×AB
5.33 [*]	18.89 ^{**}	867.40 ^{**}	2	وزن پدازه × قارچ میکوریزا × باکتری ازتوباکتر CM×MF×AB
1.04	1.05	4.68	22	خطا Error
5.09	5.86	1.75	--	ضریب تغییرات C.V (%)

ns, *, **: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد
 ns, **, *: non-significant and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively

سافرانال

مطابق جدول تجزیه واریانس داده‌ها در سال دوم، تنها اثر ساده قارچ میکوریزا تأثیر معنی داری بر محتوای سافرانال کلانله‌های زعفران نداشت، اما سایر اثرات ساده و متقابل تیمارها توانست تأثیرات معنی داری بر صفت فوق داشته باشد (جدول ۴). نتایج مشخص کرد، که اثر متقابل وزن پدازه ۸/۱ تا ۱۲ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر، سبب افزایش ۱۰۷/۵۷ درصدی نسبت به تیمار پدازه‌های گروه وزنی ۱/۱ تا ۴ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و عدم مصرف باکتری ازتوباکتر شد (جدول ۵).

در تحقیق حاضر مصرف قارچ به تنهایی اثر معنی داری بر سافرانال (عامل ایجاد عطر و بوی کلانله) نداشت، اما اثرات دوجانبه مصرف قارچ میکوریزا و وزن پدازه بالاتر توانست میزان این صفت را بالا ببرد. مطابق با پژوهش حاضر نیز، گزارش شد که وزن پدازه مادری توانست تأثیر معنی داری بر صفت کیفی پیکروکروسین کلانله داشته باشد. به طوری که بیشترین میزان این صفت از پدازه‌های گروه وزنی ۸/۱ تا ۱۲ گرم به دست آمد (Shakeri et al., 2021). در پژوهش اثر وزن پدازه مادری و هورمون اسید

سالیسیک بر صفات کیفی کلاله‌های زعفران نیز گزارش شد، که میزان سافرانال دریافتی، از پدازه‌های درشت نسبت به پدازه‌های کوچکتر ۴۴/۵۷ درصد افزایش یافت (Ansaryan Mahabadi et al., 2019). در پژوهشی کاربرد تیمار ۷/۵ گرم و تیمار ۱۰ گرم قارچ میکوریزا به ازای هر جایگاه کاشت، تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نداشت و هر دو تیمار سبب افزایش محتوای سافرانال کلاله زعفران گردید در صورتی که نتایج از لحاظ آماری با شاهد تفاوت معنی‌داری را ایجاد نکرد (Jami et al., 2020). در گزارشی دیگر نیز بیان شد که بیش‌ترین میزان سافرانال کلاله‌های زعفران از تیمار مصرف کود زیستی و کم‌ترین محتوای سافرانال از تیمار شاهد به‌دست آمد (Golzar Jahan Abadi et al., 2017). مصرف ۵ لیتر در هکتار کود زیستی نیتروکسین به همراه ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کود اوره توانست سبب تولید بیش‌ترین محتوای سافرانال کلاله‌های زعفران شود. کم‌ترین میزان این صفت نیز از تیمار عدم مصرف نیتروژن گزارش شد (Golzar et al., 2010). مصرف کودهای زیستی توانست با تأثیر بر خصوصیات عملکردی از جمله افزایش وزن و قطر پدازه‌های زعفران تأثیرات مثبتی بر خصوصیات کیفی کلاله از جمله محتوای سافرانال کلاله‌ها داشته باشد. همچنین می‌توان گفت مصرف کودهای زیستی تثبیت‌کننده نیتروژن، سبب فراهمی بیشتر ترکیبات متعدد غذایی برای ریشه‌ها و همکاری با سایر میکروارگانیسم‌ها شده و با تولید ترکیبات مؤثر بر سنتز گلوکوزیدها و تجزیه به ترکیبات ثانویه، در مؤلفه‌های کیفی زعفران مؤثر باشد.

پیکروکروسین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دهنده تأثیر معنی‌دار اثر ساده وزن پدازه بر محتوای پیکروکروسین کلاله‌های زعفران بود و تنها اثر متقابل وزن پدازه و قارچ میکوریزا نتوانست اثر معنی‌داری را داشته باشد (جدول ۴). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها، حداکثر محتوای پیکروکروسین در سال دوم از تیمار وزن پدازه ۸/۱ تا ۱۲ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر به‌دست آمد و کم‌ترین میزان آن، به تیمار پدازه‌هایی به وزن ۰/۱ تا ۴ گرم، عدم مصرف قارچ میکوریزا و عدم مصرف باکتری ازتوباکتر اختصاص داشت (جدول ۵).

در راستای تحقیق حاضر امینی فرد و همکاران (Aminifard et al., 2022) و کاسر و همکاران (Caser et al., 2019) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. در پژوهشی گزارش شد، که مصرف کودهای زیستی توانست تأثیرات مثبتی بر میزان پیکروکروسین کلاله‌ها داشته باشد. نتایج نشان داد که بالاترین محتوای پیکروکروسین از مصرف کود زیستی بیوآمینو پالیس و کم‌ترین میزان این صفت از تیمار شاهد به‌دست آمد (Golzar Jahan Abadi et al., 2017). در مطالعه دیگری، بالاترین محتوای پیکروکروسین کلاله‌های زعفران از تیمار مصرف ۰/۱ و ۰/۲ درصد ازتوباکتر به‌دست آمد (Kheiry et al., 2018). همچنین مصرف کود زیستی نیتروکسین نیز توانست تأثیرات مثبتی بر میزان طعم کلاله‌های زعفران داشته باشد. بیش‌ترین محتوای پیکروکروسین از تیمار ۵ لیتر در هکتار نیتروکسین و حداقل میزان این صفت از مصرف ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی اوره گزارش شد (Golzar et al., 2010).

(et al., 2010). بررسی‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که میزان دسترسی گیاه به عناصر غذایی می‌تواند نقش تعیین‌کننده‌ای در تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشد، به‌ویژه نیتروژن به‌عنوان یکی از عناصر کلیدی، علاوه بر تأثیر بر رشد و عملکرد، در تنظیم مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات ثانویه نیز دخالت دارد (Aires et al., 2006). سنتز ترکیبات ترپنوئیدی مانند فیتوالکسین‌ها و سافرانال نیازمند حضور ترکیبات فسفردار است و برای تأمین انرژی مورد نیاز (ATP و NADPH) چرخه‌های متابولیکی وابستگی زیادی به نیتروژن وجود دارد (Loomis & Corteau, 1972). بنابراین، حضور باکتری‌های محرک رشد نظیر ازتوباکتر با افزایش دسترسی گیاه به منابع نیتروژن، شرایط مطلوبی برای تولید این ترکیبات فراهم می‌کند. در مجموع، افزایش نیتروژن قابل جذب از طریق بهبود سطح برگ، ارتقای فتوسنتز و افزایش زیست‌توده، می‌تواند درصد اسانس و عملکرد گیاهان دارویی و معطر را ارتقا دهد (Singh et al., 2011).

جدول ۵. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل وزن پدازه، قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بر مواد مؤثره زعفران
Table 5. Comparison of the mean interaction effect corm weight, mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria on secondary metabolites of saffron

وزن پدازه Corm weight (gr)	قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi	باکتری ازتوباکتر Azotobacter	کروسین Crocine ($E_{1cm}^{1\%}$)	سافرانا Safranal ($E_{1cm}^{1\%}$)	پیکروکروسین Picrocrocin ($E_{1cm}^{1\%}$)
0.1-4	Fertilizer application	Fertilizer application	126.81 ^c	13.55 ^d	14.59 ^{fg}
0.1-4	Fertilizer application	No fertilizer application	145.48 ^b	15.84 ^d	22.99 ^c
0.1-4	No fertilizer application	Fertilizer application	113.55 ^{gf}	17.18 ^{cd}	16.88 ^e
0.1-4	No fertilizer application	No fertilizer application	106.59 ^h	10.95 ^e	12.32 ^g
4.1-8	Fertilizer application	Fertilizer application	125.84 ^c	18.36 ^{bc}	18.96 ^d
4.1-8	Fertilizer application	No fertilizer application	121.48 ^{de}	15.70 ^d	15.59 ^{ef}
4.1-8	No fertilizer application	Fertilizer application	124.81 ^{cd}	19.62 ^b	25.81 ^b
4.1-8	No fertilizer application	No fertilizer application	115.70 ^{gf}	18.36 ^{bc}	16.14 ^{de}
8.1-12	Fertilizer application	Fertilizer application	117.92 ^{gf}	21.77 ^{ab}	23.21 ^{bc}
8.1-12	Fertilizer application	No fertilizer application	118.36 ^{ef}	18.36 ^{bc}	25.70 ^b
8.1-12	No fertilizer application	Fertilizer application	175.99 ^a	22.73 ^a	28.47 ^a
8.1-12	No fertilizer application	No fertilizer application	113.03 ^g	17.10 ^{cd}	21.95 ^c

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

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

میزان قند

با توجه به نتایج آنالیز واریانس، اثر ساده وزن پدازه توانست تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر محتوای قند کلاله‌های زعفران داشته باشد، به‌طوری‌که برهمکنش وزن پدازه و قارچ میکوریزا و هم‌چنین تیمار وزن پدازه و باکتری ازتوباکتر نیز تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر میزان قند کلاله داشت (جدول ۶). بررسی اثرات متقابل سه گانه نشان داد که وزن پدازه بالاتر به‌همراه مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر، توانست میزان قند در کلاله‌های زعفران را بالا ببرد (جدول ۷). افزایش میزان قند در کلاله‌های زعفران در تیمارهای دارای پدازه‌های سنگین همراه با کاربرد قارچ میکوریزا و باکتری

ازتوباکتر را می‌توان ناشی از اثرات هم‌افزایی این عوامل دانست. پدازه‌های بزرگ‌تر به دلیل ذخایر غذایی بیشتر، توانایی بالاتری در تأمین انرژی و پیش‌سازهای متابولیکی دارند. قارچ‌های میکوریزا با افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر و نیتروژن، مسیرهای بیوشیمیایی سنتز کربوهیدرات‌ها را تقویت می‌کنند. از سوی دیگر، باکتری‌های ازتوباکتر علاوه بر تثبیت نیتروژن، با تولید هورمون‌های محرک رشد مانند اکسین و سیتوکینین، موجب افزایش فعالیت فتوسنتزی و تجمع کربوهیدرات‌ها می‌شوند. ترکیب این سه عامل در نهایت منجر به افزایش محتوای قند در کلاله‌ها گردید. در مطالعه تأثیر کاربرد کود زیستی و وزن پدازه زعفران مشخص گردید که استفاده همزمان از کودهای زیستی به‌همراه وزن پدازه بالاتر، سبب افزایش میزان کربوهیدرات کل برگ‌های زعفران شد. به‌طور کلی استفاده از پدازه‌هایی با وزن بالاتر سبب افزایش صفت قند گیاه شد (Mohammad Ghasemi et al., 2022) که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

جدول ۶. نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات کیفی زعفران
Table 6. The ANOVA (mean squares) of the effect of experimental treatments on qualitative characteristic of saffron

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	قند Suger	فنول Phenol	فلاونوئید Flavonoid	آنتی اکسیدان Antioxidant
تکرار Replication	2	0.02 ^{ns}	4.26 ^{ns}	101.15 ^{**}	15.0008 ^{ns}
وزن پدازه Corm weight	2	55.98 ^{**}	19.74 ^{ns}	22.88 [*]	14.31 ^{ns}
قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi	1	3.24 ^{ns}	126.26 ^{**}	3.50 ^{ns}	419.29 ^{**}
باکتری ازتوباکتر Azotobacter	1	1.00 ^{ns}	238.08 ^{**}	0.98 ^{ns}	1284.50 ^{**}
وزن پدازه × قارچ میکوریزا CM×MF	2	18.26 ^{**}	13.03 ^{ns}	3.13 ^{ns}	698.08 ^{**}
وزن پدازه × باکتری ازتوباکتر CM×AB	2	19.11 ^{**}	8.44 ^{ns}	3.66 ^{ns}	78.642 [*]
قارچ میکوریزا × باکتری ازتوباکتر MF×AB	1	42.09 ^{ns}	2.86 [*]	1.22 [*]	175.38 ^{ns}
وزن پدازه × قارچ میکوریزا × باکتری ازتوباکتر CM×MF×AB	2	16.34 ^{**}	55.61 ^{**}	11.68 ^{ns}	248.53 ^{**}
خطا Error	22	0.251	6.51	4.96	15.13
ضریب تغییرات C.V (%)	--	2.18	12.21	23.00	6.78

ns, *, **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد
ns, **, *: non-significant and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively

میزان فنول

نتایج جدول (۶) آنالیز واریانس داده‌ها در سال دوم نشان دهنده تأثیر معنی‌دار اثر ساده قارچ میکوریزا، باکتری ازتوباکتر و برهمکنش این دو عامل بر محتوای فنول کلاله زعفران بود. هم‌چنین اثر متقابل وزن پدازه و قارچ و باکتری نیز در سطح احتمال یک درصد، بر میزان فنول کلاله تأثیر معنی‌داری را نشان داد (جدول ۶). مطابق جدول (۷)، حداکثر و حداقل میزان فنول کلاله زعفران (به‌ترتیب ۲۷/۶۸ و ۱۲/۱۹ میلی‌گرم بر گرم) در سال دوم از تیمار وزن پدازه ۸/۱-۱۲ گرم، مصرف قارچ میکوریزا و مصرف باکتری ازتوباکتر و تیمار وزن پدازه ۰/۱-۴ گرم و عدم مصرف قارچ و باکتری حاصل شد. مطابق با پژوهش حاضر نیز گزارش شده است که اثر ساده وزن پدازه مادری بر میزان فنول کلاله‌های زعفران معنی‌دار نبود ولی اثرات متقابل وزن پدازه و تیمار اسید جیبرلیک توانست، اثر معنی‌داری بر این صفت نشان دهد. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان فنول (۶/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از پدازه‌های گروه وزنی ۸/۱ تا ۱۲ گرم حاصل شد (Shakeri et al., 2021). در پژوهشی، بالاترین میزان فنول کلاله‌های زعفران (۷/۵۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از تیمار مصرف ۰/۱ درصد باکتری ازتوباکتر و کم‌ترین مقدار این صفت (۶/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از شاهد به‌دست آمد (Kheiry et al., 2018). در مطالعه دیگری گزارش شد که بالاترین و کم‌ترین میزان فنول (۱۹/۴۱ و ۱۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) کلاله‌های زعفران، به‌ترتیب از تیمار یک درصد نیتروکارا و تیمار ۰/۲ درصد ازتوبارور و ۲ درصد نیتروکارا حاصل شد (Parsa et al., 2018).

میزان فلاونوئید

نتایج نشان دهنده تأثیر معنی‌دار اثر ساده وزن پدازه و هم‌چنین اثر متقابل قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بر محتوای فلاونوئید کلاله زعفران بود، اما سایر اثرات ساده و متقابل نتوانستند تأثیر معنی‌داری داشته باشند (جدول ۶). تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر دارای بیش‌ترین میزان فلاونوئید بود (شکل ۲). در پژوهشی گزارش شد، بالاترین میزان فلاونوئید کلاله‌های زعفران (۳/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از تیمار مصرف ۰/۱ درصد باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن (ازتوباکتر) حاصل شد (Kheiry et al., 2018). در مطالعه‌ای دیگر، بالاترین میزان فلاونوئید کلاله‌های زعفران (۳/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از تیمار مصرف ۰/۲ درصد ازتوبارور-۱ حاصل شد (Parsa et al., 2018). با توجه به نتایج فعلی و همکاران (Feli et al., 2018)، می‌توان اظهار کرد که کودهای زیستی وضعیت بهتری را برای فعالیت‌های میکروبی مفید در خاک مهیا کرده است و ضمن فراهم کردن مطلوب عناصر غذایی برای زعفران از طریق ایجاد اثرات هم‌افزایی و تشدید کننده، میزان درصد صفات کیفی را افزایش می‌دهند.

میزان آنتی اکسیدان

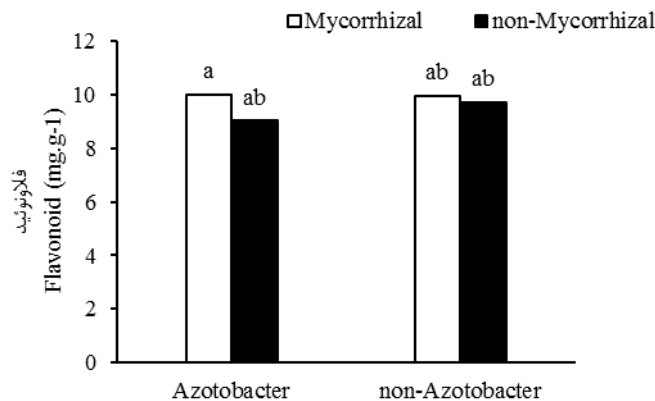
همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس ملاحظه می‌شود، اثرات ساده قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر توانستند اثر معنی‌داری بر درصد آنتی اکسیدان کلاله زعفران در سطح احتمال یک درصد نشان دهند، اما برهمکنش این دو عامل، نتوانست اثر معنی‌داری بر این صفت داشته باشد (جدول ۶). با توجه به اثرات سه گانه تیمارها، تیمارهای با وزن پدازه‌های بالاتر و عدم مصرف قارچ و باکتری نتوانست تأثیر بیشتری بر درصد آنتی اکسیدان کلاله‌های زعفران داشته باشد (جدول ۷).

مطابق با آزمایش حاضر، گزارش شد که اثر ساده وزن پدازه مادری نتوانست تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کلاله‌های زعفران داشته باشد (Shakeri et al., 2021). در تحقیقی، بالاترین میزان آنتی اکسیدان کلاله‌های زعفران (۹۵/۸۳ درصد) از تیمار مصرف ۰/۱ درصد باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن (ازتوباکتر) حاصل شد (Kheiry et al., 2018). در مطالعه دیگری بیش‌ترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کلاله‌های زعفران (۶۲/۳۹ درصد) از تیمار مصرف یک درصد نیتروکارا به‌دست آمد. پایین‌ترین میزان این صفت ۳۹/۴۲ درصد ثبت شده است (Parsa et al., 2018). طبق نتایج پژوهش حاضر، درصد فعالیت آنتی اکسیدانی کلاله‌های زعفران با مصرف باکتری ازتوباکتر افزایش یافت. با تثبیت نیتروژن، میزان دسترسی گیاه به این عنصر مهم افزایش یافته و با توجه به نقش این عنصر در بیوسنتز مسیر استات، منجر به تولید بیشتر مواد آنتی اکسیدانی نظیر فنول و فلاونوئید کلاله‌ها شده است.

جدول ۷. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل وزن پدازه، قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بر خصوصیات کیفی زعفران
Table 7. Comparison of the mean interaction effect corm weight, mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria on qualitative characteristic of saffron

وزن پدازه Corm weight (gr)	قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi	باکتری ازتوباکتر Azotobacter	قند Sugar (mg.g ⁻¹)	فنول Phenol (mg.g ⁻¹)	آنتی اکسیدان Antioxidant (%)
0.1-4	Fertilizer application	Fertilizer application	20.32 ^e	21.44 ^{bcd}	63.61 ^{ab}
0.1-4	Fertilizer application	No fertilizer application	21.56 ^d	23.17 ^{abc}	64.08 ^{ab}
0.1-4	No fertilizer application	Fertilizer application	18.30 ^f	20.87 ^{cd}	46.97 ^c
0.1-4	No fertilizer application	No fertilizer application	21.61 ^d	12.19 ^e	59.64 ^{ab}
4.1-8	Fertilizer application	Fertilizer application	24.46 ^c	26.02 ^{ab}	37.14 ^d
4.1-8	Fertilizer application	No fertilizer application	21.33 ^d	20.71 ^{cd}	63.66 ^{ab}
4.1-8	No fertilizer application	Fertilizer application	25.88 ^b	21.97 ^{bcd}	59.84 ^{ab}
4.1-8	No fertilizer application	No fertilizer application	23.97 ^c	17.08 ^d	66.85 ^a
8.1-12	Fertilizer application	Fertilizer application	27.64 ^a	27.68 ^a	36.46 ^d
8.1-12	Fertilizer application	No fertilizer application	24.04 ^c	17.53 ^d	58.55 ^b
8.1-12	No fertilizer application	Fertilizer application	19.94 ^e	22.76 ^{bc}	64.11 ^{ab}
8.1-12	No fertilizer application	No fertilizer application	26.03 ^b	19.21 ^{cd}	67.04 ^a

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.
In each column, means with the same letter are not different significantly at 5% probability level.



شکل ۲. اثر متقابل قارچ میکوریزا و باکتری ازتوباکتر بر فلاونوئید

Figure 2. Interaction effect of mycorrhizal fungi and Azotobacter bacteria on flavonoid

نتیجه گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که کاربرد همزمان باکتری ازتوباکتر و تلقیح پدازه‌های با وزن ۸/۱ تا ۱۲ گرم با قارچ میکوریزا، سبب بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی و خصوصیات بیوشیمیایی و کاشت پدازه‌های با وزن ۸/۱ تا ۱۲ گرم و مصرف باکتری ازتوباکتر، باعث افزایش مواد مؤثره زعفران شد. بنابراین مصرف کودهای زیستی و توسعه هیف‌های قارچ میکوریزا در خاک، از جمله در جایگاه کاشت پدازه‌های زعفران، می‌تواند باعث بهبود کمیت و کیفیت زعفران در کشاورزی پایدار و کاهش خسارت‌های ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی گردد.

منابع

- Aalizadeh, M. B., Shafaroodi, A., & Ebadi A. (2021). Evaluation of quantitative and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) in response to organic, chemical and biological fertilizers in climatic conditions of Ardabil province. *Crop Physiology Journal*, 13(49), 129-147.
- Aires, A., Rosa, E., & Carvalho, R. (2006). Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var italica.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1512–1516.
- Aminifard, M.H., Khandan Deh-Arbab, S., Fallahi, H. R., & kaveh, H. (2022). Evaluation of the effects of amino acid and mother corm weight on antioxidant activity and stigma quality of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 10(2), 183-194.
- AminiFard, M. H., Dehghani, Z. , Behdani, M. A., & Jahani, M. (2025). Investigating the effect of corm weight, mycorrhiza fungi and Azotobacter bio fertilizer on the growth and yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, in press.
- Anaeigoudari, F., Anaeigoudari, A., & Kheirkhah-Vakilabad, A. (2023). A review of therapeutic impacts of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents. *Physiological Reports*, 11(15), e15785.
- Ansaryan Mahabadi, S., Allah dadi, I., Ghorbani Javid, M., & Soltani, E. (2019). Effect of corm priming with

- salicylic acid and mother corm weight on flowering and qualitative characteristics of saffron stigma. *Saffron Agronomy and Technology*, 7(1), 41-53.
- Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Journal of Agronomy*, 23, 112-121.
- Bayat, M. (2014). Study of genetic diversity, the effect of nano-fertilizers and maternal seed weight on agronomic and qualitative characteristics of saffron (*Crocus sativus* L.). PhD thesis, Faculty of Agriculture, Urmia University.
- Caser, M., Demasi, S., Victorino, Í. M. M., Donno, D., Faccio, A., Lumini, E., & Scariot, V. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi modulate the crop performance and metabolic profile of saffron in soilless cultivation. *Agronomy*, 9(5), 232.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- El-Midaoui, A., Ghzaïel, I., Vervandier-Fasseur, D., Ksila, M., Zarrouk, A., Nury, T., & Lizard, G. (2022). Saffron (*Crocus sativus* L.): A source of nutrients for health and for the treatment of neuropsychiatric and age-related diseases. *Nutrients*, 14(3), 597.
- Feli, A., Maleki Farahani, S., & Besharati, H. (2018). The effect of urea fertilizer and different organic and bio-fertilizers on quantitative and qualitative yield and some soil properties in Saffron cultivation. *Journal of Crops Improvement*, 20(2), 345-356.
- Golzad, A., Omid, H., Naqdi badi, H., Torabi Golsfidi, H., and Foutokian, M. H. (2010). Evaluation of quantitative and qualitative performance of saffron under the influence of biological and chemical fertilizers (nitrogen and phosphorus). Master's thesis, Faculty of Agriculture, Shahed University.
- Golzari Jahan Abadi, M., Behdani, M. A., Sayyari Zahan, M. H., & Khorramdel, S. (2017). Effect of some fertilizer sources and mother corm weight on growth criteria and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 4(2), 172-186. doi: 10.22077/jsr.2017.518
- Golzari, M. (2014). The effect of biofertilizers and maternal pedicel weight on flower and stigma growth and yield and stigma quality characteristics of saffron. Master's thesis, Faculty of Agriculture, University of Birjand.
- Hosseini-Evari, Z., Izadi-Darbandi, E., Kafi, M., & Makarian, H. (2020). Saffron (*Crocus sativus* L.) tolerance to some herbicides. *Journal of Crop Protection*, 9(4), 721-731.
- INS (Iran National Standard). (2006). Research institute of standard and iran. Number: 259-2.
- Jahan, M., Koocheki, A., & Nasiri mahalati, M. (2007). The effects of arbuscular mycorrhizal fungus and free living nitrogen fixing bacteria on growth, photosynthesis and yield of corn. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 5(1), 53-68.
- Jami, N., Rahimi, A., Sedaghati, E., & Naghizadeh, M. (2020). Effects of mycorrhiza inoculation and vermicompost levels on some nutrient concentrations and corm criteria of saffron (*Crocus sativus* L.) under Kerman climatic conditions. *Journal of Saffron Research*, 7(2), 217-234.
- Khavari, A., Behdani, M. A., Zamani, G. R., & Mahmoodi, S. (2016). Effects of planting methods and corm weight on corm and flower yield of saffron (*Crocus sativus* L.) in Qaenat Region. *Journal of Saffron Research*, 4(1), 120-133.
- Kheiry, A., Parsa, H., Sani Khani, M., & Razavi, F. (2018). Effect of bio-fertilizers and nitrogen on quantitative and qualitative characteristics of tepals in saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy and Technology*, 6(3), 309-322.
- Koocheki, A. (2013). Research on production of saffron in iran: past trend and future prospects. *Saffron Agronomy and Technology*, 1(1), 3-21.
- Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Molafilabi, A., & Noroozian, A. (2018). Effects of extensive range of corm weights on saffron (*Crocus sativus* L.) growth and flowering. *Journal of Agroecology*, 10(3), 635-646.
- Kumar, R., Kumawat, N., & Sahu, Y. K. (2017). Role of biofertilizers in agriculture. *Popular kheti*, 5(4), 63-66.
- Loomis, W.D., & Croteau, R. (1972). Essential oil biosynthesis. *Journal of Recent Advance in Phytochemistry*, 6, 147-185.
- Mohammad Ghasemi, H., Ghorbani Javid, M., Akbari, G., & Mortazavian, S. M. M. (2022). Effect of application of biological and chemical potassium fertilizer and corm weight on physiological traits and flower yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 10(2), 215-230.

- Monje, O. A., & Bugbee, B. (1992). Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *Hort Science*, 27(1), 69-71.
- Nassiri Mahallati, M., Koocheki, A., Amin Ghafouri, A., & Mahluji Rad, M. (2015). Optimizing corm size and density in saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation by central composite design. *Saffron Agronomy and Technology*, 3(3), 161-177.
- Noori, A., Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., & Khorramdel, S. (2023). Effects of mycorrhiza inoculation, mother corm weight and humic acid on daughter corm and flower yield of saffron. *Journal of Saffron Research*, 11(1), 48-65.
- Parsa, H., Kheiry, A., Sani Khani, M., & Razavi, F. (2018). The effect of nitrogen-fixing biofertilizers and urea on quantitative and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 6(1), 141-153.
- Sahabi, H., Jahan, M., Kochaki, A., & Nasiri, M. (2017). Effect of mother corm weight and foliar application of nutrients on flower and corm yield of Spanish and Iranian saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy and Technology*, 5(2), 123-131.
- Salehi, F., aelaie, M., Mortazavi, S. N., Salami, S. A., & Rezadoost Chahardeh, H. (2022). Study of morphophysiological attributes of two saffron ecotypes treated with *Bacillus subtilis* under Zanzan climatic conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 53(1), 15-30.
- Shakeri, M., Aminifard, M.H., Behdani, M.A., & Tabatabaei, S.J., (2021). Effects of different gibberellic acid levels and corm weight on antioxidant activity and secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, 9(1), 1-10.
- Singh, M., Khan, M.M.A., & Naeem, M. (2016). Effect of nitrogen on growth, nutrient assimilation, essential oil content, yield and quality attributes in *Zingiber officinale* Rosc. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 171-178.
- Soltani, M. K., Shams, J., Ghaffari, F., Alijaniha, F., & Naseri, M. (2023). Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) supplementation on happiness and quality of life in healthy adults: a randomized double blind clinical trial. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 2849-2855.
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food chemistry*, 93(4), 713-718.
- Zand, A., Riahi, H., Shariatmadari, Z., & Zangeneh, S. (2014). Effect of funneliformis mosseae mycorrhiza symbiosis on growth and yield of *Crocus sativus* L. *Journal of Saffron Research*, 2(2), 141-151.