

تأثیر کودهای بیولوژیک تثبیت‌کننده نیتروژن و اوره بر صفات کمی و کیفی زعفران (*Crocus sativus L.*)

هاجر پارسا^۱، عزیزاله خیری^{۲*}، محسن ثانی خانی^۳، فرهنگ رضوی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲*- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

* نویسنده مسئول: [Email: Kheiry@znu.ac.ir](mailto:Kheiry@znu.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۰۶

چکیده

به منظور بررسی خصوصیات کمی و کیفی گیاه زعفران تحت تأثیر منابع مختلف نیتروژن، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل، کود ازتوبارور-۱ (حاوی *Azotobacter vinelandii*) در دو سطح (۰/۱ و ۰/۲ درصد)، کود نیتروکارا (حاوی باکتری *Azorhizobium caulinodan*) در دو سطح (۱ و ۲ درصد)، ترکیب هر دو کود زیستی (۱) درصد نیتروکارا + ۰/۱ درصد ازتوبارور-۱، (۱) درصد نیتروکارا + ۰/۲ درصد ازتوبارور-۱، (۲) درصد نیتروکارا + ۰/۱ درصد ازتوبارور-۱، (۲) درصد نیتروکارا + ۰/۲ درصد ازتوبارور-۱، یک سطح نیتروژن (۴۰ کیلوگرم در هکتار) و شاهد بود. بررسی صفات نشان داد بالاترین تعداد گل، عملکرد کلاله و بیشترین طول کلاله، در کاربرد ۰/۲ درصد ازتوباکتر به دست آمد. هم‌چنین تیمارهای ۰/۱ درصد ازتوباکتر و ۲ درصد آزورایزوبیوم بیشترین وزن خشک کلاله را داشتند. بیشترین میزان نیتروژن برگ و کلروفیل *a* در تیمارهای ۰/۲ درصد ازتوباکتر و ۴۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن حاصل شد. در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشخص شد که بیشترین درصد آنتی‌اکسیدان کلاله و فنل کل کلاله در تیمار آزورایزوبیوم ۱ درصد و بالاترین میزان فلاونوئید در تیمار ۰/۱ درصد ازتوباکتر بود. بالاترین میزان کروسین و سافرانال به ترتیب در تیمارهای ۰/۱ درصد ازتوباکتر و ۱ درصد آزورایزوبیوم حاصل شد. بنابراین جهت دستیابی به سطوح بالاتر عملکرد زعفران، میزان ۰/۲ درصد ازتوباکتر جهت افزایش عملکرد کمی و تیمارهای ۰/۱ درصد ازتوباکتر و ۱ درصد آزورایزوبیوم برای افزایش مواد موثره توصیه می‌شوند.

کلمات کلیدی: فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کروسین، سافرانال

مقدمه

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus L.*) متعلق به خانواده زنبق^۱ و جنس کروکوس است و از آنجا که گران‌ترین ادویه در جهان است طلای سرخ نامیده می‌شود. (Shahi et al., 2016) کلمه *Saffron* از کلمه لاتین *Safranum* یا اصطلاح فرانسوی *Safran* گرفته شده که آن هم از کلمه فارسی زعفران آمده است (Mehraj et al., 2016). زعفران به صورت گسترده در طب سنتی، صنایع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کلاله قرمز خشک شده زعفران نه تنها یک ادویه، بلکه یک گیاه دارویی بسیار محبوب در طب سنتی است که در برابر گرفتگی عضلات، آسم، اختلالات قاعدگی، بیماری کبد، درمان سرطان و تقویت دستگاه گوارش مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ferrara et al., 2014).

متابولیت‌های ثانویه اصلی زعفران شامل، ترکیب رنگی کروسین، طعم پیکروکروسین و عطر سافرانال است، علاوه بر این حاوی فلاونوئیدها، فنل‌ها، ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه است. موادی مانند فنل و فلاونوئید دارای پتانسیل قوی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد هستند در واقع این مواد با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و منجر به کاهش مرگ سلولی و کاهش بیماری قلبی-عروقی و سرطان می‌شوند (Guijarro-Díez et al., 2017).

نتیجه مصرف کودهای شیمیایی طی سال‌های اخیر بحران آلودگی‌های محیط زیست و به‌ویژه آلودگی منابع خاک و آب بوده که زنجیره‌وار به منابع غذایی انسان راه یافته و سلامت جامعه را مورد تهدید قرار داده است. به این منظور، تلاش‌های با هدف یافتن راهکار مناسب برای بهبود کیفیت خاک، محصولات کشاورزی و حذف آلاینده‌ها آغاز شده است. کاهش این مخاطرات زیست محیطی همگام با افزایش عملکرد گیاهان زراعی نیازمند به‌کارگیری تکنیک‌های نوین زراعی است. از جمله این تکنیک‌ها، بررسی جامعه زنده و فعال خاک به منظور شناسایی ریزموجودات خاک‌زی و استفاده از آنها به‌عنوان کودهای زیستی است (Wani et al., 2016). کودهای زیستی حاوی ریزم موجودات مفید خاک‌زی از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها هستند که به طرق مختلف رشد

گیاه میزبان را تحریک می‌کنند. از باکتری‌های موجود در کودهای زیستی می‌توان به باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن اشاره کرد که دارای میکروارگانسیم‌های مفید برای تامین مواد مغذی به‌ویژه نیتروژن هستند. بارزترین ویژگی این باکتری‌ها قابلیت تثبیت نیتروژن جو از طریق فرآیند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن است. علاوه بر این از طریق سنتز مواد محرک رشد گیاهی سبب بهبود رشد گیاه می‌شوند. از این دسته از باکتری‌ها می‌توان به ازتوباکتر اشاره کرد که مواد مغذی خاصی مانند کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد را از طریق تسریع معدنی شدن از بقایای آلی خاک در دسترس می‌سازد و از جذب فلزات سنگین جلوگیری می‌کند (Zhang et al., 2013). یکی دیگر از این باکتری‌ها آزورایزوبیوم است، این باکتری عضو غیر عادی از خانواده زانتوباکتریاسه^۲ است که توانایی منحصر به فردی برای تثبیت نیتروژن به دو صورت آزادی و هم‌زیست را دارد (Lee et al., 2008).

در آزمایشی طی بررسی اثر کودهای زیستی روی دو گیاه دارویی بابونه^۳ و همیشه بهار^۴ دریافتند که کاربرد این کودها در همیشه بهار باعث افزایش عملکرد گل و بهبود کیفیت دارویی شد در حالی که در بابونه فقط افزایش عملکرد گل را به‌همراه داشت اما بر کیفیت آن اثری نداشت (Sanchez-Govin et al 2005). برخی مطالعات تأثیر نیتروکسین را بر رشد بنه و کیفیت کلاله بسیار بیشتر و در مورد سایر صفات رویشی و زایشی مساوی با کود شیمیایی برآورد کردند و کاربرد ۵ کیلوگرم در هکتار نیتروکسین توانست درصد سافرانال و پیکروکروسین را ارتقا بخشد (Omidi et al., 2010). به‌طور مشابه در مطالعه دیگری تأثیر مثبت تیمار باکتری *Bacillus subtilis* (با سیلوس سوبتیلیس) را بر کلیه صفات رویشی و زایشی زعفران گزارش کردند، به گونه‌ای که این کود عملکرد کلاله خشک را ۱۲ درصد افزایش داد (Sharaf-Eldin et al., 2008). باتوجه به اهمیت زعفران و مصارف گسترده آن در صنایع مختلف این تحقیق با هدف حصول عملکرد کمی و کیفی قابل قبول و کاهش مصرف کودهای شیمیایی در زعفران انجام شد تا در جهت افزایش عملکرد و کیفیت این گیاه مهم گامی برداشته شود و در این تحقیق تأثیر

² *Xanthobacteraceae*

³ *Matricaria chamomilla L.*

⁴ *Calendula officinalis L.*

¹ Iridaceae

کمی و کیفی گیاه زعفران (*Crocus sativus L.*) آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان با عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۵ دقیقه و طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۱ دقیقه با ارتفاع تقریبی ۱۶۶۳ متر از سطح دریا، به اجرا درآمد.

کودهای حاوی باکتری‌های ازتوباکتر و آزورایزوبیوم و کود شیمیایی اوره بر صفات کمی و کیفی زعفران ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر کودهای حاوی باکتری‌های *Azotobacter Azorhizobium* و کود اوره بر صفات

جدول ۱. تیمارهای مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Treatments used in experiment

C	U	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
شاهد	۴۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن	۰/۱ درصد ازتوبارور-۱	۰/۲ درصد ازتوبارور-۱	۱ درصد نیتروکارا	۲ درصد نیتروکارا
Control	40 kg/ha N	0.1% Azotobarvar-1	0.2% Azotobarvar-1	0.1% Nitrokara	2% Nitrokara

جدول ۱. ادامه

Table 1. Continued

A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
۰/۱ درصد ازتوبارور-۱ + ۱ درصد نیتروکارا	۰/۱ درصد ازتوبارور-۱ + ۲ درصد نیتروکارا	۰/۲ درصد ازتوبارور-۱ + ۱ درصد نیتروکارا	۰/۲ درصد ازتوبارور-۱ + ۲ درصد نیتروکارا
0.1% Azotobarvar-1 + 1% Nitrokara	0.1% Azotobarvar-1 + 2% Nitrokara	0.2% Azotobarvar-1 + 1% Nitrokara	0.2% Azotobarvar-1 + 2% Nitrokara

هر سال یک بار آبیاری به‌صورت قطره‌ای تا عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک انجام گرفت. هر واحد آزمایش شامل ۵ خط کاشت با فاصله‌ی ۲۰ × ۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. قبل از کاشت، از خاک مزرعه تا عمق ۳۰ سانتی‌متری نمونه برداری شد (جدول ۲).

بنه‌های زعفران از شهرستان بیرجند با متوسط وزن ۱۱ ± ۲ گرم جهت کشت تهیه و در عمق ۲۰ سانتی‌متری از سطح زمین کشت (اویل مرداد سال ۹۴) شدند. اعمال تیمارها به صورت تلقیح بنه‌ها با تهیه سوسپانسیون باکتری‌های فوق در ترکیب با آب مقطر قبل از کاشت انجام گرفت در هفته اول مهر

جدول ۲. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه تحقیقاتی

Table 2. Physical and chemical properties of soil

منیزیم Mg (meq/l)	پتاسیم K (mg/kg)	فسفر P (mg/kg)	نیتروژن N (%)	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dS/m)
1.1	286	9.6	0.09	40	27	33	8.28	0.72

به آزمایشگاه منتقل و قسمت سرگل کلاله‌ها جدا شد. سپس کلاله‌ها در آون (در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و به مدت ۵۵ دقیقه) خشک و وزن خشک آنها با ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شدند. به‌منظور

جهت بررسی تاثیر تیمارها بر صفات مختلف، نمونه‌برداری در مرحله‌ی گلدهی صورت گرفت، گل‌های ظاهر شده (در ۲۱ مهر ۹۵) به‌صورت روزانه (بین ساعات ۶ تا ۸ صبح) جمع‌آوری، شمارش و جهت توزین وزن تر و خشک کلاله

باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن احتمالاً به دلیل عرضه کافی عنصر نیتروژن است. در مجموع در بررسی‌هایی که بر روی تأثیر کاربرد ریز موجودات مختلف بر رشد و عملکرد زعفران انجام شده است مشخص گردیده است که باکتری‌های ریزوسفری از طریق تثبیت نیتروژن اتمسفر، افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی در ناحیه ریزوسفر، افزایش سطح تماس ریشه و بهبود همزیستی مفید با گیاه میزبان در مراحل مختلف رشد سبب افزایش رشد و عملکرد می‌شوند (Wani et al., 2016).

هم‌چنین محققین گزارش کردند که ازتوباکتر، آزوسپیریلوم و سویه‌های ریزوبیوم قادر به سنتز برخی ویتامین‌های گروه B محلول در آب شامل، نیاسین، اسیدپنتوتینیک، تیامین، ریوفلاوین، سیانوکوبالامین، پیریدوکسین و بیوتین در محیط کشت هستند (Osman et al., 2010). از طرفی اتصال سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌ها به یون آهن و تشکیل کلات آهن، این عنصر غذایی را از دسترس انواع عوامل بیماری‌زای گیاهی خارج کرده و به این ترتیب رشد گیاه را مورد حمایت قرار می‌دهند (Wani et al., 2016). هم‌چنین نایک و برمن ارتباط مثبتی بین محتوای نیتروژن برگ و تعداد گل در گیاه ارکیده (*Cymbidium Orchid*) مشاهده کردند (Naik & Barman, 2006).

طول کلاله، وزن تر و خشک کلاله

نتایج ارائه شده حاکی از آن است که نوع کود زیستی و نیتروژن بر طول کلاله و وزن خشک کلاله تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) داشتند ولی اثر تیمارها بر وزن تر کلاله معنی‌دار نشد (جدول ۳) نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول کلاله (۲/۹۸ سانتی‌متر) در تیمار A_2 و بیشترین وزن خشک کلاله (۶/۲۹، ۶/۲۳ میلی‌گرم) به ترتیب در تیمارهای B_2 و A_1 و کمترین مقادیر طول کلاله (۲/۵۰ سانتی‌متر) و وزن خشک کلاله (۴/۶۳ میلی‌گرم) در C به دست آمد (جدول ۴). هم‌چنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین طول کلاله ($r=0.403^*$) با وزن خشک کلاله مشاهده شد (جدول ۷).

محاسبه طول کلاله، روزانه نصف گل‌های برداشت شده از هر تکرار به تصادف انتخاب و با استفاده از کولیس دیجیتالی برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد و در پایان میانگین طول کلاله‌ها در طول دوره گلدهی به‌عنوان میانگین طول کلاله برای هر کرت در نظر گرفته شد.

ترکیبات اصلی زعفران، کروستین و سافرانال، با استفاده از روش استاندارد $ISO 3632-1/2$ (۳۶۳۲ ISO, 2003) خوانده شد، هم‌چنین سنجش فنلی کل بر اساس روش فولین-سیوکالچو (Meda et al., 2005)، محتوای فلاونوئید با روش کلرید آلومینیوم (Chang et al., 2002) و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی و با ۲،۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل^۱ (Miliauskas et al., 2004) به کمک اسپکتروفتومتر (UV-6505, Germany) انجام گرفت. برای تعیین کلروفیل a و b از روش آرنون (Arnon, 1967) و جهت اندازه‌گیری عنصر نیتروژن از نمونه‌های برگ استفاده شد (Kalra, 1998) و با دستگاه کج‌دال (500 - PGU) برحسب درصد اندازه‌گیری شدند. آنالیز داده‌ها با نرم افزار SAS 9.1 و همبستگی پیرسون با SPSS و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

تعداد گل و عملکرد کلاله

مصرف کودهای حاوی ازتوباکتر، آزورایزوبیوم و اوره بر تعداد گل و عملکرد کلاله تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) داشت (جدول ۳) به‌طوری که تیمارهای A_2 (۴۹/۹۴ گل در متر مربع و ۳۱۲/۰۲ میلی‌گرم وزن خشک کلاله در متر مربع) و B_2 (۲۸۴/۲۲ میلی‌گرم عملکرد کلاله در متر مربع) بالاترین میزان را نشان دادند. هم‌چنین کمترین تعداد گل (۲۴/۱۶ گل در مترمربع) و عملکرد کلاله (۱۱۲/۲۳ میلی‌گرم در مترمربع کلاله خشک) در C مشاهده شد (جدول ۴). بررسی میزان همبستگی مشخص کرد که بین کلروفیل a ($r=0.801^{**}$) و نیتروژن برگ ($r=0.773^{**}$)، طول کلاله ($r=0.661^{**}$) و عملکرد کلاله ($r=0.842^{**}$) با تعداد گل ارتباط مثبت و معنی‌دار وجود دارد (جدول ۷). افزایش عملکرد گل و کلاله با استفاده از

^۱ DPPH

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر تیمارها بر صفات کمی گیاه زعفران

Table 3. Analysis of variance of the effect of treatments on qualitative traits of saffron

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات (MS)				
		عملکرد کلاله خشک Dry stigma yield	تعداد گل Flower number	وزن خشک کلاله Dry weight of stigma	وزن تر کلاله Fresh weight of stigma	طول کلاله Stigma length
بلوک Block	2	4135.40*	72.443*	0.1938 ^{ns}	0.0112 ^{ns}	0.065*
تیمار Treatment	9	11280.0**	222.905**	0.5246*	0.3731 ^{ns}	0.0468*
خطا Error	18	1147.52	16.597	0.0844	0.6852	0.0142
ضریب تغییرات CV (%)	-	15.10	10.208	5.232	3.428	4.312

*, ** و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال یک و پنج درصد و معنی دار نمی باشد. **and * significant at 1 and 5% probability level, and ns no significant respectively

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مورد بررسی بر صفات کمی گیاه زعفران

Table 4. Mean Comparisons of the effect of treatments on quantitative traits of saffron

تیمار Treatment	تعداد گل Flower number (No.m ²)	عملکرد کلاله Dry stigma yield (mg/m ²)	طول کلاله Stigma length (cm)	وزن خشک کلاله Dry weight of stigma (mg)
C	24.167 ^f	112.23 ^d	2.506 ^c	4.63 ^e
U	46.650 ^{bac}	244.31 ^{ab}	2.76 ^b	5.23 ^{edc}
A ₁	40.33 ^{bdc}	251.09 ^{ab}	2.78 ^{ab}	6.23 ^a
A ₂	49.940 ^a	312.02 ^a	2.98 ^a	6.16 ^{ba}
B ₁	29.83 ^{ef}	149.14 ^{dc}	2.64 ^{bc}	5.00 ^{ed}
B ₂	46.167 ^{bac}	284.22 ^a	2.81 ^{ba}	6.29 ^a
A ₁ ×B ₁	33.167 ^{edf}	192.15 ^{bc}	2.80 ^{ba}	5.79 ^{bac}
A ₁ ×B ₂	48.16 ^{ba}	260.94 ^{ba}	2.83 ^{ba}	5.36 ^{dc}
A ₂ ×B ₁	37.170 ^{edc}	198.52 ^{bc}	2.82 ^{ba}	5.33 ^{dc}
A ₂ ×B ₂	43.497 ^{bac}	237.90 ^{ba}	2.73 ^b	5.50 ^{bdc}
LSD	9.574	79.61	0.204	0.683

C=شاهد، U=۴۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، A₁=۰/۱ درصد از توبروز-۱، A₂=۰/۲ درصد از توبروز-۱، B₁=۱ درصد نیتروکارا، B₂=۲ درصد نیتروکارا، C=(Control) U=(40 kg/ha N) A₁=(0.1% Azotobarvar-1), A₂=(0.2% Azotobarvar-1) B₁=0.1% Nitrokara, B₂=0.2% Nitrokara

در هر ستون میانگین های دارای حرف مشترک از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری باهم ندارند.

In each column, means followed by the same letter do not significantly differ at P<0.05

تولید و صدور هورمون سیتوکینین از ریشه به اندام های هوایی دارد، موجب افزایش سرعت تقسیم سلولی و رشد و افزایش طول قسمت های مختلف گیاه

می توان گفت که باکتری های تثبیت کننده نیتروژن سبب دسترسی بیشتر گیاه به نیتروژن می شوند که از مهم ترین عناصر موثر بر رشد می باشد و به واسطه نقشی که در

همراه با کود شیمیایی می‌تواند موجب افزایش معنی‌دار عملکرد کلالة خشک زعفران شود.

نیترژن برگ

تیمارها بر میزان نیترژن برگ تاثیر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) داشتند (جدل ۵). به‌طور که بیشترین درصد نیترژن برگ ($1/117$ و $2/112$ درصد) به ترتیب در تیمارهای A_2 و U و پایین‌ترین میزان ($1/116$ درصد) در تیمار C مشاهده شد (جدول ۶). نتایج همبستگی، ارتباط فراوانی را بین این صفت با صفات دیگر نشان داد (جدول ۷). افزایش میزان نیترژن جذب شده احتمالاً به واسطه تثبیت نیترژن بالاتر به دلیل افزایش فعالیت آنزیم نیترژناز در ریزوسفر فعالیت نیترات ردوکتاز باکتری‌های محرک رشد و یا جذب یون آمونیوم و آمینواسید تولید شده توسط این باکتری‌ها نسبت داده می‌شود (Aseri et al., 2008). باکتری‌های محرک رشد به دو طریق مستقیم (جذب و انتقال نیترژن محلول) و غیر مستقیم (با ترشح ترکیبات آلی و تبدیل نیترژن نامحلول خاک به فاز محلول و سپس انتقال آن) سبب افزایش نیترژن گیاه می‌شوند (Osman et al., 2010)

می‌شود (Fageria, 2007). در چندین آزمایش مشاهده شد که کاربرد منابع نیترژن، از طریق سیتوکنین به‌طور غیر مستقیم بر هورمون جیبرلین تاثیر می‌گذارد که سبب افزایش رشد و ارتفاع شده و با تاثیر مثبت بر تولید هورمون‌هایی مانند اکسین، جیبرلین و ایندول استیک اسید رشد را بهبود می‌بخشند (Wani et al., 2016). افزایش رشد اندام هوایی در حضور باکتری‌های موثر بر رشد توسط کاپور و همکاران قبلاً گزارش شده است (Kapoor et al., 2004). تحقیقات نشان داد که استفاده از منابع مختلف نیترژن بر سرعت فتوسنتز و رشد گیاه تاثیر می‌گذارد و سطوح بالاتر عرضه نیترژن سبب تحریک رشد رویشی، کاهش ذخیره‌سازی منبع کربن و افزایش تخصیص ماده خشک گیاه می‌شود. ارتباط بین نیترژن، کلروفیل و کربن-دی‌اکسید، ضرورت عنصر نیترژن را در تولید ماده خشک نشان می‌دهد. از سوی دیگر باکتری‌های تثبیت کننده نیترژن با افزایش سرعت تقسیم و رشد سلول‌ها، ماده خشک را افزایش می‌دهند (Fageria, 2007) که می‌تواند دلیلی بر افزایش وزن خشک کلالة باشد. امیدی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که مصرف کود زیستی به‌تنهایی و یا

جدول ۵. تجزیه واریانس اثر تیمارها بر صفات کیفی گیاه زعفران

Table 5. Analysis of variance of the effect of treatments on qualitative traits of saffron

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات (MS)							
		نیترژن برگ Leaf nitrogen	کلروفیل <i>a</i> Chlorophyll <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i> Chlorophyll <i>b</i>	سافرانال <i>Safranal</i>	کروسین <i>Crocin</i>	فنل <i>Phenol</i>	فلاونوئید <i>Flavonoid</i>	آنتی‌اکسیدان <i>Antioxidant</i>
بلوک Block	2	0.268*	0.0406*	0.0097	79.600	90.130	1.6020	0.0064	24.8030
تیمار Treatment	9	0.288**	0.3913**	0.00259 ^{ns}	158.242**	371.75*	5.5025*	0.1050*	130.161*
خطا Error	18	0.0521	0.0093	0.0029	42.562	107.904	2.0465	0.0436	45.417
ضریب تغییرات CV (%)	-	12.73	6.03	15.58	13.877	6.676	8.723	6.361	13.23

**، * و ^{ns} به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال یک و پنج درصد و معنی‌دار نمی‌باشد.

** and * significant at 1 and 5% probability level, and ns no significant respectively

بیشترین میزان کلروفیل a ($2/096$ و $2/159$ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در تیمارهای A_2 و U و کمترین مقدار ($1/090$ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در تیمار C مشاهده شد (جدول ۶). همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان

کلروفیل a و b

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمارها بر کلروفیل a تاثیر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) داشتند در صورتی-که اثر تیمارها بر کلروفیل b معنی‌دار نشد (جدول ۵).

منابع نیتروژن بر تشکیل کلروپلاست برگ گزارش شده است (Hong et al., 2010).

سافرانال و کروسین

نتایج نشان داد که کودهای حاوی ازتوباکتر، آوزاریزیوم و نیتروژن بر میزان کروسین (حداکثر جذب محلول آبی ۱ درصد در طول موج ۲۵۴ نانومتر بر حسب ماده خشک) و سافرانال (حداکثر جذب محلول آبی ۱ درصد در طول موج ۳۳۰ نانومتر - بر حسب ماده خشک) تاثیر معنی داری (به ترتیب در سطح احتمال $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$) داشتند (جدول ۵)، به طوری که بالاترین میزان کروسین در تیمار A_1 و سافرانال در تیمار B_1 و کمترین مقادیر این صفات در C به دست آمد (جدول ۶). ارتباط مثبت و معنی داری بین صفات کروسین ($r=0.486^*$)، فنل ($r=0.398^*$)، فلاونوئید ($r=0.426^*$) و آنتی اکسیدان ($r=0.356^*$) با میزان سافرانال مشاهده شد (جدول ۷).

نیتروژن برگ ($r=0.706^{**}$) و کلروفیل برگ مشاهده شد (جدول ۷). باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن سبب افزایش نیتروژن موجود در خاک می‌شوند، این عنصر در ساختمان مولکول‌های پروتئینی گوناگون، آنزیم‌ها، کوآنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و سیتوکروم‌ها نقش دارد به علاوه نیتروژن یک جزء لازم مولکول کلروفیل هم هست و درای اثرات قابل توجهی در رشد و توسعه گیاه است هم‌چنین یکی از اجزای اصلی تشکیل دهنده در ساختمان برگ است، به‌ویژه آنهایی که با دستگاه فتوسنتز، از جمله کربوکسیله شدن آنزیم‌ها و پروتئین غشاء مرتبط هستند (Pandey et al., 2000). تحقیقات نشان داده است نیتروژن به سبب تاثیر قابل توجهی در تشکیل رنگدانه‌های فتوسنتزی فعال از طریق افزایش مقدار استروما و پروتئین تیلاکوئید در برگ دارد سبب افزایش میزان کلروفیل گیاهان می‌شود هم‌چنین اثرات مثبت

جدول ۶. مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مورد بررسی بر صفات کیفی

Table 6. Mean comparison of the effect of treatments on qualitative traits of saffron

تیمار Treatment	نیتروژن برگ Leaf nitrogen (%)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	سافرانال Safranal $A_1^{1\%}$ cm(2330)	کروسین Crocic $A_1^{1\%}$ cm(2440)	فنل Phenol (mg/g)	فلاونوئید Flavonoid (mg/g)	آنتی اکسیدان Antioxidant (%)
C	1.1160 ^c	1.090 ^f	35.887 ^c	137.770 ^d	15.750 ^{bc}	3.15 ^{bdc}	46.760 ^{bc}
U	2.1120 ^a	2.1598 ^a	42.923 ^{bc}	165.450 ^{ba}	15.180 ^{bc}	3.10 ^{dc}	48.117 ^{bc}
A ₁	1.602 ^{bac}	1.4351 ^{ed}	57.460 ^{ba}	177.200 ^a	16.910 ^{bc}	3.73 ^a	57.330 ^{ab}
A ₂	2.1173 ^a	2.0960 ^a	43.8 ^{bac}	145.330 ^{dc}	15.747 ^{bc}	2.94 ^d	50.070 ^{bc}
B ₁	1.340 ^{bc}	1.2862 ^{ef}	58.940 ^a	164.330 ^{bac}	19.410 ^a	3.64 ^{ba}	62.390 ^a
B ₂	1.700 ^{ba}	1.6084 ^{cd}	53.720 ^{ba}	155.7 ^{bdc}	16.080 ^{bc}	3.17 ^{bdc}	46.050 ^{bc}
A ₁ ×B ₁	1.50 ^{bc}	1.2220 ^{ef}	42.580 ^{bc}	156.180 ^{bdc}	17.500 ^{ba}	3.4 ^{bdac}	51.08 ^{ab}
A ₁ ×B ₂	1.61 ^{bac}	1.5434 ^{cd}	43.480 ^{bc}	148.960 ^{bdc}	16.750 ^{bc}	3.48 ^{bac}	56.930 ^{ab}
A ₂ ×B ₁	1.786 ^{ba}	1.8665 ^b	42.220 ^{bc}	155.97 ^{bdc}	16.080 ^{bc}	3.09 ^{dc}	50.84 ^{abc}
A ₂ ×B ₂	1.743 ^{ba}	1.7245 ^{cb}	52.120 ^{ba}	146.950 ^{dc}	14.580 ^c	3.15 ^{bdc}	39.420 ^c
LSD	0.5368	0.227	15.33	17.819	2.454	0.4912	11.561

C= شاهد، U= ۴۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، A₁= ۱ درصد از توباروز-۱، A₂= ۲ درصد از توباروز-۱، B₁= ۱ درصد نیتروکارا، B₂= ۲ درصد نیتروکارا، C= (Control) U = (40 kg/ha N) A₁= (0.1% Azotobarvar-1), A₂= .2% Azotobarvar-1 B₂= 2% Nitrokarara, B₁=0.1% Nitrokarara

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری باهم ندارند.

In each column, means followed by the same letter do not significantly differ at $P < 0.05$

جدول ۷. ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده در زعفران

Table 7. Correlation between traits

	تعداد گل <i>Flower number</i>	عملکرد کلاله خشک <i>Dry stigma yield</i>	وزن خشک کلاله <i>weight of stigma dry</i>	طول کلاله <i>Stigma length</i>	نیترژن برگ <i>Leaf nitrogen</i>	کلروفیل <i>a</i> <i>Chlorophyll a</i>	سافرانا <i>Safranal</i>	کروسین <i>Crocin</i>	فنل <i>Phenol</i>	فلاونوئید <i>Flavonoid</i>	آنتی‌اکسیدان <i>Antioxidant</i>
تعداد گل <i>Flower number</i>	1										
عملکرد کلاله خشک <i>Dry stigma yield</i>	0.842**	1									
وزن خشک کلاله <i>Dry weight of stigma</i>	0.80	0.396*	1								
طول کلاله <i>Stigma length</i>	0.661**	0.712**	0.403*	1							
نیترژن برگ <i>Leaf nitrogen</i>	0.773**	0.765**	0.187	0.673**	1						
کلروفیل <i>a</i> <i>Chlorophyll a</i>	0.801**	0.840**	0.05	0.489*	0.706**	1					
سافرانا <i>Safranal</i>	0.078	0.162	0.348	0.195	0.295	0.054	1				
کروسین <i>Crocin</i>	-0.157	-0.131	0.164	0.222	0.007	0.074	0.486*	1			
فنل <i>Phenol</i>	-0.386*	-0.266	0.361	0.040	-0.392*	-0.386*	0.398*	0.406*	1		
فلاونوئید <i>flavonoid</i>	-0.378	-0.354	0.060	-0.058	-0.389*	-0.131	0.426*	0.691**	0.521**	1	
آنتی‌اکسیدان <i>Antioxidant</i>	-0.128	-0.167	-0.002	0.185	-0.401*	-0.099	0.356	0.517**	0.727**	0.511**	1

درصد) در تیمار B_1 و کمترین مقادیر (۳۹/۴۲ درصد) در تیمار $A_2 \times B_2$ مشاهده شد (جدول ۶). هم‌چنین بین میزان فنل با فلاونوئید (** $r=0.521$) و درصد آنتی‌اکسیدان* (**) $r=0.727$) ارتباط مثبتی مشاهده گردید در صورتی که با میزان نیتروژن* (** $r= -0.392$) و کلروفیل برگ* (** $r= -0.386$) همبستگی منفی داشت (جدول ۷).

می‌توان این همبستگی منفی بین سطوح بالاتر باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و فنل کل را با مدل رقابت پروتئین (PCM) یا تعادل تمایز رشد (GDB) توضیح داد. طبق تئوری PCM: زمانی که بیوماس در پاسخ به دسترسی بیشتر نیتروژن افزایش می‌یابد، غلظت ترکیبات فنلی کاهش می‌یابد، چرا که افزایش نیاز گیاه به پروتئین برای رشد، ترکیبات فنلی را کاهش می‌دهد هم‌چنین افزایش تجمع وزن خشک غلظت ترکیبات فنلی را رقیق می‌کند (J-Mattson et al., 2005). احتمال دیگر این‌که با کاهش عرضه منابع کودی عملکرد فتوسنتز کمتر می‌شود بنابراین چرخه نیتروژن آنزیمی به متابولیت‌های ثانویه نیاز دارد که این امر موجب افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌شود در واقع با کاهش مصرف نیتروژن میزان فنل و فلاونوئید افزایش می‌یابد چرا که در مقادیر پایین نیتروژن گیاه، کربوهیدرات اضافی انباشته شده به سمت تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فنل و فلاونوئید هدایت می‌شود (Ibrahim et al., 2010). هم‌چنین مشخص شده است که کودهای نیتروژن فنل و تانن را بافت‌های گیاهی کاهش می‌دهند در واقع دسترسی بیشتر به عنصر نیتروژن با تاثیر منفی در بیوسنتز فلاونوئیدها و اسید کلروژنیک در گیاهان همراه است افزایش میزان فنل و فلاونوئید تحت مقادیر کم نیتروژن در گیاه *Labisia pumila* گزارش شده است (Nybakken et al., 2013).

افزایش در فلاونوئیدها تحت تاثیر مقادیر پایین منابع نیتروژن ممکن است به دلیل افزایش فنیل‌آلانین به دلیل محدودیت دسترسی به سنتز پروتئین نسبت داده شده افزایش فنیل‌آلانین به طور قابل توجهی فلاونوئید را افزایش می‌دهد چرا که فنیل‌آلانین پیش ماده‌ای برای تشکیل فلاونوئیدها است، لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت موثری به‌عنوان اهدا کننده هیدروژن عمل نموده، لذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر عمل می‌کنند.

کروسین یا همان رنگیزه‌ی اصلی زعفران، حاصل تخریب کاروتنوئیدها است و به‌عنوان آپوکارتنوئید شناخته می‌شود که از شکستن اکسیداتیو کاروتنوئید-زیگزانتین مشتق شده‌اند (Tajik & Niknam, 2015). مطالعات نشان داده است که استفاده از منابع تامین کننده نیتروژن بر تولید کاروتنوئید کل موثر است افزایش میزان رنگیزه‌های کاروتنوئیدی در دو خانواده شب‌بوییان (*Brassicaceae*) و اسفنجیان (*Chenopodiaceae*) تحت تاثیر منابع نیتروژن گزارش شده است (Kopsell et al., 2007). تحقیقات این امر را که در دسترس بودن مواد مغذی گیاهی می‌تواند از عوامل مهم در تعیین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان باشد را نشان داده است در واقع تامین نیتروژن مورد نیاز گیاه یکی از عوامل مهم در رشد، کنترل عملکرد و کیفیت گیاه است که بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را تعدیل می‌کند (Aires et al., 2006). از آنجا که ساخت ترکیبات ترپنوئیدی نظیر فیتوالکسین‌ها و سافرانال، نیاز مبرم به ترکیب‌های فسفردار دارد و برای تامین انرژی لازم (*NADPH* و *ATP*) برای چرخه آن به نیتروژن وابسته هستند (Loomis & Correau, 1972) در نتیجه حضور باکتری‌ها سبب دسترسی بیشتر به منبع نیتروژن می‌شود به‌طور کلی می‌توان گفت افزایش نیتروژن قابل دسترس از طریق افزایش میزان بازده زیست توده در واحد سطح، توسعه سطح برگ و فتوسنتز، درصد اسانس و عملکرد گیاهان معطر را افزایش می‌دهد (Singh et al., 2016). هم‌چنین استفاده از کود حاوی آزورایزوبیوم در گیاه به لیمو (*lippa citrodora*) سبب افزایش اسانس گیاه نسبت به شاهد شد (Mohammadi et al., 2013).

فنل، فلاونوئید و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

تیمارهای مورد استفاده بر میزان فنل کل و محتوای فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (قدرت حذف رادیکال آزاد) تاثیر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) داشتند (جدول ۵). بیشترین میزان فنل (۱۹/۴۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در تیمار B_1 و کمترین مقدار (۱۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) در تیمار $A_2 \times B_2$ مشاهده شد. هم‌چنین داده‌ها نشان داند که بیشترین میزان فلاونوئید (۳/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار A_1 و کمترین میزان (۳/۰۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) A_2B_1 مشاهده شد. بیشترین درصد آنتی‌اکسیدانی کل (۶۲/۳۹)

¹ Protein competition model

² Growth differentiation balance

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق، مصرف ۰/۲ درصد ازتوبارور-۱ موجب افزایش تعداد گل، عملکرد کلاله و وزن خشک کلاله گردید. بنابراین جهت دستیابی به حداکثر عملکرد کمی قابل توصیه می‌باشد. هم‌چنین تیمارهای ۱ درصد نیتروکارا و ۰/۱ درصد ازتوبارور-۱ با داشتن متابولیت‌های ثانویه و خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتر بهترین تیمارها از نظر تأثیر بر عملکرد کیفی بودند. باید اشاره کرد که مصرف جداگانه هر دو کود باکتریایی اثرات بهتری در مقایسه با مصرف توأم آن‌ها نشان داد. در واقع این احتمال وجود دارد هنگامی که دو گونه از منابع یکسانی استفاده می‌کنند موجب به‌وجود آمدن حالت رقابت بین آنها در استفاده از منابع مشترک می‌شود. (Castro et al., 2014) هم‌چنین لازم است که سطوح پیشنهادی در این تحقیق، در آزمایشات دیگری هم مورد تایید قرار گیرد.

برخی محققین براین باورند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها، به علت قابلیت در اختیار گذاشتن هیدروژن آنها می‌باشد (Gulluce et al., 2007). علاوه بر این، وجود همبستگی مثبت بین فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برخی از سبزیجات و میوه‌جات گزارش شده است (Pyo et al., 2004) هم‌چنین نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که عرضه بالاتر منابع نیتروژن به‌طور قابل توجهی مقدار رادیکال آزاد را در گیاهان کاهش می‌دهد (Meda et al., 2005) هم‌چنین در تحقیقی دیگر مشخص شده است که بین تجمع زیست توده و متابولیت‌های ثانویه همبستگی منفی وجود دارد (Herms & Mattson, 2005).

منابع

- Ferrara, L., Naviglio, D., Gallo, M., 2014. Extraction of Bioactive Compounds of Saffron (*Crocus sativus* L.) by Ultrasound Assisted Extraction (UAE) and by Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE). *European Scientific Journal* .10(3), 1-13.
- Guijarro-Díez, M., Castro-Puyana, M., Crego, A.L., Marina, M.L., 2017. Detection of Saffron adulteration with gardenia extracts through the determination of geniposide by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 55, 30-37.
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*. 103(4), 1449-1456.
- Hong, L., Li, M., Luo, J., Cao, X., Qu, L., Gai, Y., Jiang, X., Liu, T., Janz, H., Bai, D., Polle, A., Peng, C., Luo, Z.B., 2012. N fertilization has different effects on the growth, carbon and nitrogen physiology, and wood properties of slow- and fastgrowing *Populus* species. *Journal of experimental botany*. 63, 6173-6185.
- 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.
- Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy journal*. 23, 112-121.
- Aseri, G.K., Jain, N., Panwar, J., Rao, A.V., Meghwal, P.R., 2008. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae*. 117, 130-135.
- Castro, S.A., Escobedo, V.M., Aranda, J., Carvallo, G.O., 2014. Evaluating Darwin's naturalization hypothesis in experimental plant assemblages: phylogenetic relationships do not determine colonization success. *Public Library of Science one*. 9(8)105535.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10, 178-182.
- Fageria, N.K., 2007. Yield physiology of rice. *Journal of Plant Nutrition*. 30, 843-879.

- Mehraj, S.S., Kamili, A.N., Nazir, R., Haq, E., Balkhi, H.M., 2016. Comparative evaluation of extraction methods for total proteins from *Crocus sativus* L.(Saffron). *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Vanbeek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85, 231-237.
- Mohammadi, M., Tobeh, A., Vahidipour, H.R., Fakhari, R., 2013. Effects of biological fertilizers on essential oil components and quantitative and qualitative yield of lemon verbena (*Lippia citriodora*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5(12), 1374-1380.
- Naik, S.K., Barman, D., 2006. Response of foliar application of nitrogen on flowering in *Cymbidium* hybrid. *Journal of Ornamental Horticulture*. 9(4), 270-273.
- Nybakken, L., Selås, V., Ohlson, M., 2013. Increased growth and phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) following forest clear-cutting. *Scandinavian journal of forest research*. 28(4), 319-330.
- Omidi, H., Naghdibadi, H.A., Golzad, A., Torbati, H., Fotookian, M.H., 2009. Effect of chemical and bio-fertilizer nitrogen on qualitative and quantitative yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Med Plants*. 30(2), 98-109. [in Persian with English Summary].
- Osman, M.E.H., El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H., Saly, F., Gheda, S.F., 2010. Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biology and Fertility of Soils*. 46, 861-875.
- Pandey, R.K., Maranville, J.W., Admou, A., 2000. Deficit irrigation and nitrogen effects on maize in a Sahelian environment: I. Grain yield and yield components. *Agricultural Water Management*. 46(1), 1-13.
- Pyo, Y.H., Lee, T.C., Logendra, L., Rosen, R.T., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food chemistry*. 85(1), 19-26.
- Sanches-Govin, E., Rodrigues-Gonzales, H. and Carballo-Guerra, C. 2005. Influencia de los abonos organicos y biofertilizantes en Herms, D.A., Mattson, W. J., 1992. The dilemma of plants: to growth or defend. *Quarterly Review of Biology*. 67, 283-335.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z., Rahmat, A., Rahman, Z.A., 2010. The relationship between phenolics and flavonoids production with total nonstructural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization. *Molecules*. 16(1), 162-174.
- ISO/TS 3632-1/2., 2003. Technical Specification. *Crocus sativus* L. Saffron. Ed. ISO, Geneva, Switzerland.
- J-Mattson, W., Julkunen-Tiitto, R., Herms, D.A., 2005. CO₂ enrichment and carbon partitioning to phenolics: do plant responses accord better with the protein competition or the growth differentiation balance models. 111(2), 337-347.
- Kapoor, R., Giri, B., Mukerji, K.G., 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill. on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology*. 93, 307 - 11.
- Kalra, Y., 1998. *Hanbook of reference methods for plant analysis*. CRC Press.
- Kopsell, D.A., Kopsell, D.E., Curran-Celentano, J., 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87(5), 900-907.
- Lee, K.B., de Backer, P., Aono, T., Liu, C.T., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabat, S., Kupfer, D.M., Najar, F.Z., Wiley, G.B., Roe, B., Binnewies, T.T., Ussery, D.W., Haeze, W.D., Herder, J.D., Gevers, D., Vereecke, .D., Holsters, M., Oyaizu, H., 2008. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics*. 281, 28981-28992.
- Loomis, W.D., Croteau, R., 1972. Essential oil biosynthesis. *Journal of Recent Advance in Phytochemistry*. 6, 147-185.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chemistry*. 91, 571-577.

- Society of Agricultural Sciences*. 15(2), 171-178.
- Tajik, S., Niknam, V., 2015. *Effects of Salicylic Acid on Carotenoids and Antioxidant Activity of Saffron (Crocus sativus L.)*. *Applied Food Biotechnology*. 2(4). 33-37.
- Wani, S.A., Chand, S., Wani, M.A., Ramzan, M., Hakeem, K.R., 2016. *Azotobacter chroococcum—A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview*. In *Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives* (pp. 333- 8). Springer International Publishing. pp. 8-333.
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., Zhang, R., 2013. *Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains*. *Plant and Soil*. 374, 689-700.
- la calidad de las especies medicinales calendula officinalis ly Matricaria recutita L.* *Revista Cubana .de Plantas Medicinales*10 (1): 1.
- Shahi, T., Assadpour, E., Jafari, S.M., 2016. *Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; Saffron*. *Trends in Food Science & Technology*. 58,69-78.
- Sharaf-Eldin, M. A., Elkholy, S., Fernández, J.A., Junge, H., Cheetham, R.D., Guardiola, J.L., Weathers, P.J., 2008. *The effect of Bacillus subtilis FZB24 on flowers quantity and quality of Saffron (Crocus sativus L.)*. *Planta Medica*. 74,1316-1320.
- 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*



The effect of nitrogen-fixing biofertilizers and urea on quantitative and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.)

Hajar Parsa¹, Azizollah Kheiry^{*2}, Mohsen Sani Khani², Farhang Razavi²

1- M.Sc. Student, Physiology and Medicinal Plants Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

**Corresponding Author Email: Kheiry@znu.ac.ir*

Received 26 July 2017; Accepted 27 November 2017

Abstract

*In order to investigate the effect of different nitrogen sources on some quantitative and biochemical characteristics of Saffron, an experiment was conducted based on randomized complete block design with three replications at the Research Farm of Zanjan University. The treatments were Azotobarvar-1 bio-fertilizer (containing free-living nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter vinelandii*) at two levels (0.1 and 0.2 %), Nitrokara (containing symbiotic and free-living nitrogen-fixing bacteria *Azorhizobium caulinodan*) at two levels (1 and 2 %), and combination of both at four levels (1% Nitrokara + 0.1 % Azotobarvar-1, 1 % Nitrokara + 0.2 % Azotobarvar-1, 2 % Nitrokara + 0.1 % Azotobarvar-1, 2 % Nitrokara + 0.2 % Azotobarvar-1) compared to control and one nitrogen level (40 kg/ha) in the form of urea. The results showed that the highest number of flowers, performance of stigma and the maximum length of stigma was Obtain from plants inoculated with 0.2 % Azotobacter. The highest leaf nitrogen content and chlorophyll a obtained in 0.2 % Azotobacter and 40 kg/ha nitrogen. Also 0.1% Azotobacter and 2 % Azorhizobium treatments resulted in highest dry weight of stigma. The highest amounts of antioxidant and total phenol of stigmas were achieved with 1 % Azorhizobium and the highest amount of flavonoids was observed with 0.1 % Azotobacter. The Highest amounts of crocin and safranal were obtained with 0.1 % Azotobacter and 1 % Azorhizobium treatments respectively. In general, to obtain higher production of saffron 0.2 % Azotobacter, and to achieve higher content of active substances 0.1 % Azorhizobium are recommended.*

Keywords: Antioxidant activity, Crocin, Flavonoid, Phenol, Safranal.