

بررسی تغییرات آنزیمی و غیر آنزیمی در فرآیند گلدهی گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.)

رویا حقیقی^۱، سید علی محمد میرمحمدی میبدی^{۱*}، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی^۲

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۳۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۱/۰۲)

چکیده

دستیابی به تولید بیشتر و کیفیت بالاتر گیاه زعفران مستلزم درک جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی فرآیند گلدهی است. به منظور بررسی تأثیر تغییرات آنزیمی و غیر آنزیمی در چهار مرحله رشدی (خواب، خروج گل از برگ فلسی، گلدهی کامل و رشد رویشی) بر فرآیند گلدهی، در سال ۱۳۹۶، بنه‌های زعفران سالم و یکنواخت از نظر وزن انتخاب و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، در اتاقک رشد گلخانه دانشگاه صنعتی اصفهان کشت شدند. در چهار مرحله رشدی از بنه‌ها به صورت مجزا نمونه‌گیری و محتوی قند، نشاسته، پروتئین و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز آنها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد میزان قند گیاهان در مرحله گلدهی ۶۵/۶٪ نسبت به مرحله خواب گیاه افزایش یافت و محتوی نشاسته در مرحله رشد رویشی ۶۰٪ نسبت به مرحله گلدهی کاهش داشت. آنزیم کاتالاز در مرحله خواب (۳ میکرومول هیدروژن پراکسید در گرم وزن تر در دقیقه) و آنزیم پراکسیداز در مرحله رویشی (۲/۶ واحد در گرم وزن تر در دقیقه) در حداکثر میزان فعالیت خود قرار داشتند. با توجه به وجود نشاسته کمتر گیاهان در مرحله گلدهی نسبت به آن دسته از گیاهان که در مرحله خروج گل از برگ فلسی فاقد ساقه گل بودند می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً گیاه با توجه به نیاز خود در مرحله گلدهی، نشاسته موجود در بنه گیاه زعفران را به قند تبدیل و این دو ماده بر حسب ضرورت در تبادل با هم تغییر می‌کنند. در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شده مشخص شد آنزیم پراکسیداز معمولاً به صورت یک آنزیم چندمنظوره عمل می‌کند و می‌تواند گل‌انگیزی را تقویت و یا مهار کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، زعفران، قند و نشاسته، پروتئین، گلدهی

مقدمه

مرحله جداگانه شامل مرحله خواب، دوره زمانی رشد زایشی شامل مرحله خروج برگ فلسی (Appearance of flower cataphylls) و مرحله گلدهی کامل و در نهایت رشد رویشی تفکیک کرد. در زعفران تغییر مرحله رشد به زایشی به دلیل نقش تعیین‌کننده آن در تعیین عملکرد از اهمیت زیادی برخوردار است (Kumar et al., 2009; Andres and

بیش از ۳۵۰۰ سال است که کلاله‌های خشک گل‌های گیاه زراعی زعفران (*Crocus sativus*) براساس طعم، عطر، رنگ درجه‌بندی و برای مصارف غذایی و دارویی استفاده می‌شود (Gohari et al., 2013; Esmaeili et al., 2011; Gaamoune et al., 2019). مراحل فنولوژیکی زعفران را می‌توان به چهار

به شناخته شدن بیان برخی از ایزوزایم‌ها به عنوان نشانگر تمایز گیاه و مورفوژنز، امکان تحلیل وضعیت گل‌انگیزی گیاه از طریق اندازه‌گیری ایزوزایم‌ها و تعیین تغییرات ایجاد شده در فعالیت آنزیم پراکسیداز (افزایش یا کاهش) وجود دارد. برخی از گزارش‌ها مؤید افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در انتهای دوره خواب و در طی مرحله اندام‌زایی برگ‌ها و اجزای گل و کاهش تدریجی میزان فعالیت این آنزیم پس از ورود به مرحله رشد سریع برگ‌ها و اندام‌های گل تا مرحله گلدهی است (Ebrahimzadeh and Abrishamchi, 2001).

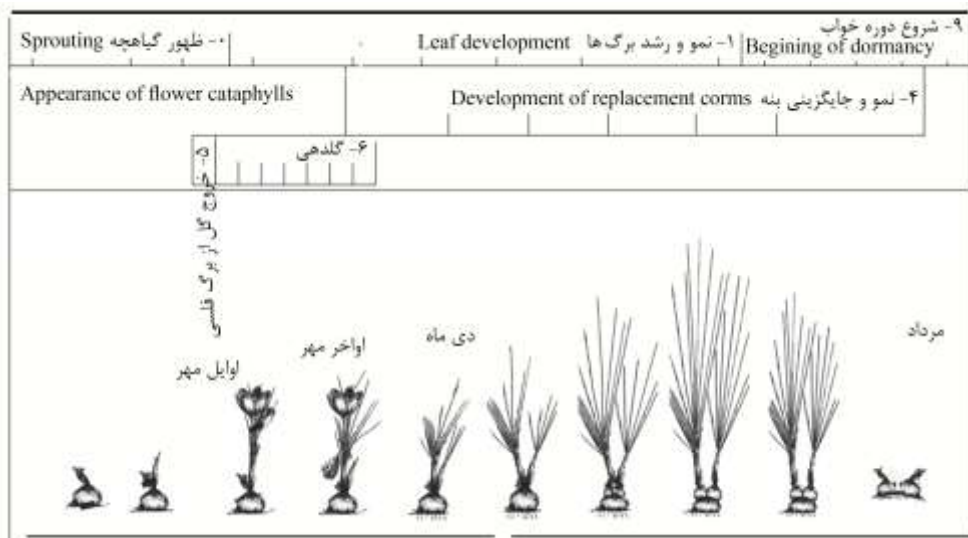
کاتالاز یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی مؤثر در فرآیند گلدهی و تنظیم فعالیت روزنه‌های گیاهان تحت تنش است (Anjum et al., 2016). این آنزیم که در پراکسی‌زوم و گلی‌اکسی‌زوم تولید می‌شود، به همراه آنزیم آسکوربات پراکسیداز قادر است موجب حذف سمیت هیدروژن پراکسید (Hydrogen Peroxide) از طریق تبدیل آن به آب و مولکول اکسیژن در گیاه شود (Vandenabeele et al., 2004). در مرحله خواب در بنه زعفران می‌توان سه ایزوآنزیم کاتالاز با وزن مولکولی ۳۲۳۰۰۰، ۲۹۵۰۰۰ و ۲۶۸۰۰۰ دالتون شناسایی کرد (Keyhani et al., 2002). همچنین در این گیاه دو ایزوفریم از پراکسیداز، که در فرآیندهای مختلف رشد و نمو مؤثرند، شناسایی شده است. افزایش بیش از ۷۰ میلی‌مولار سوبسترای گایاکول (Guaiacol) مراحل خواب و رشد گیاه زعفران موجب کاهش فعالیت پراکسیداز شده است (رحمانی و همکاران، ۱۳۹۲).

این تحقیق با هدف شناسایی رابطه بین میزان شکوفایی گل و محتوی نسبی قند، نشاسته و پروتئین مؤثر بر نمو گل براساس تخمینی از محتوی قند، نشاسته، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان وارد شده به مرحله گلدهی و گیاهان ناموفق در تولید گل در مرحله خروج گل از برگ فلسی زعفران انجام شد. تعیین دوره گلدهی طبیعی و الگوی شکوفایی گل براساس چگونگی تغییرات این صفات در بافت بنه زعفران در مراحل مختلف رشد زعفران (دوره خواب، دوره خروج گل از برگ فلسی، دوره گلدهی و دوره رشد رویشی)

(Fernando, 2012). القای گلدهی (گل‌انگیزی)، شروع گلدهی (گل‌آغازی)، اندام‌زایی (تمایز اجزای گل)، رشد و کامل شدن اجزای گل و شکوفایی گل در زعفران معمولاً کم و بیش به‌طور متوالی انجام می‌شوند و به‌شدت تحت تأثیر عوامل درونی و بیرونی کنترل‌کننده آن هستند. به‌منظور درک بیشتر چگونگی تأثیر عوامل مختلف بر گل‌دهی و فرآیند تولید مثل زعفران (De Hertogh et al., 1983)، ضرورت دارد فرآیندهای گل‌انگیزی، مدت زمان فرآیند گلدهی و تشکیل بذر و میوه به‌خوبی مطالعه شوند. در این گیاه حذف برخی از مهارکننده‌های گل‌دهی می‌تواند موجب القا گل‌دهی شود (Srikanth and Schmid, 2011). از عوامل بیرونی مؤثر بر فرآیند گل‌دهی می‌توان به فتوپریود، کیفیت نور، دمای محیط، سن گیاه، محتوی قند و بخصوص فاکتورهایی مثل دمای پایین در زمستان و یا فراهم بودن آب و عناصر غذایی اشاره کرد (Behdani et al., 2008).

قند از تولیدات مهم فنوستت است و نوع ساکارز آن در گونه‌های گیاهی مختلف به‌عنوان عامل مهم القای گل‌دهی و تنظیم‌کننده فرآیندهای دیگر نمودی مانند جوانه‌زنی، پیری و پاسخ به تنش‌ها شناخته شده است (میرشمسی کاخکی و همکاران، ۱۳۹۲). Corbesier و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که موتاسیون‌هایی که بر تجمع قند و نشاسته در برگ‌ها و رأس ساقه اثر دارند می‌توانند زمان انتقال گیاه *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. به مرحله گل‌دهی را تغییر دهند، به‌گونه‌ای که غلظت‌های پایین ساکارز (۱٪) با تأثیر معکوس بر گلدهی، موجب گلدهی زودتر از موعد موتانت‌های *ld, co, fca, gi, fha* این گیاه شدند، ولی تیمار ۵٪ ساکارز، تعداد برگ‌های روزت و ساقه را افزایش داد.

در کنار عوامل بیرونی، می‌توان به نقش عوامل و سیگنال‌های درونی مانند نقش آنزیم چندمنظوره پراکسیداز در فرآیند مورفوژنز گیاهی و آغاز فرآیند گلدهی اشاره کرد (رحمانی و همکاران، ۱۳۹۲). این آنزیم می‌تواند موجب مهار یا تقویت گل‌انگیزی و در غلظتی خاص باعث تغییر فرآیند نمو از رشد رویشی به زایشی و در نهایت تمایز گل شود. با توجه



شکل ۱- نمایش شماتیک دوره زندگی یکساله و مراحل مختلف نموی گیاه زعفران در ماه‌های مختلف سال براساس مقیاس معرفی شده به وسیله Lopez-Corcolesm و همکاران (۲۰۱۵)

از اهداف دیگر این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

بنه‌های (پیازهای ریزومی) زعفران زراعی (*Crocus sativus*) مورد استفاده در این مطالعه از منطقه دستگرد واقع در شرق شهرستان برخوار و حدود پانزده کیلومتری شمال شهر اصفهان، برداشت و به آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، برای انجام آزمایش‌ها و اندازه‌گیری‌ها منتقل شد. در ابتدا بنه‌ها از لحاظ آلودگی بررسی و براساس وزن و اندازه گروه‌بندی شدند و بنه‌هایی با اندازه متوسط (حدود هشت تا ۱۰ گرم) انتخاب شدند. سپس در هفته اول مرداد ماه ۱۳۹۶ در گلدان‌های ۲۰×۲۰ حاوی خاک شنی - رسی (مقدار کمی آهک) با pH بین ۷/۶ - ۷ به صورت خطی و با فاصله ۸ سانتی‌متر از هم در محیط گلخانه دانشکده در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت شدند و بلافاصله به اتاقک رشد با دمای ۲۵°C و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت ۴۰ درصد انتقال داده شدند. اولین آبیاری گلدان‌ها در نیمه اول مهرماه صورت گرفت. در طی دوره آزمایش علف‌های هرز گلدان‌ها به صورت دستی وجین شدند و هیچ نوع کودی استفاده نشد. در مراحل تعریف‌شده رشدی

براساس مقیاس تعریف‌شده (BBCH Scale) به وسیله Lopez-Corcolesm و همکاران (۲۰۱۵) شامل مرحله دوره خواب (Dormancy) (اواسط مرداد)، مرحله خروج گل از برگ فلسی (اوایل مهر)، مرحله گلدهی (Flowering) (اواخر مهر) و رشد رویشی (Leaves growth) (دی ماه) (شکل ۱) از بافت بنه زعفران در هر یک از مراحل رشدی نمونه‌گیری شد. با توجه به هدف تعریف‌شده در آزمایش در مرحله خروج گل از برگ فلسی تنها از نمونه‌های فاقد گل و در سایر مراحل از بنه قرارگرفته در مرحله رشدی خود نمونه‌گیری شد.

از نمونه‌ها منبع عصاره آنزیمی تهیه و از آن برای انجام اندازه‌گیری‌های بعدی استفاده شد. عمل عصاره‌گیری از بنه‌ها با تهیه محلول بافر بافت به نسبت ۱:۲ (میلی‌لیتر بافر: گرم بافت) به روش Ghamsari و همکاران (۲۰۰۷) و با قراردادن بافت بنه زعفران در ۴°C به وسیله بافر استخراج Tris-HCl (Tris hydrochloride) یک مولار (pH=۶/۸) پس از ساییدن آنها و همگن‌سازی انجام‌شده منظور سنجش محتوی پروتئین و تعیین فعالیت آنزیم‌ها، از محلول منبع عصاره آنزیمی استفاده و پس از همگن‌سازی نمونه‌ها، همگنای عصاره حاصل (homogenized sample) با شتاب ۱۳۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع روشنوار

آب اکسیژنه ۳٪ و ۳۳ میکرومول عصاره آنزیمی تهیه شد و از آن برای خواندن میزان جذب این آنزیم در طول موج ۲۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. میزان فعالیت این آنزیم بر حسب هر میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

برای اندازه گیری میزان قند ۰/۱ گرم از بافت بنه با ۵ میلی لیتر اتانول ($Ethanol, C_2H_5OH$) ۸۰٪ در هاون کوبیده شد، سپس عصاره مخلوط کوبیده شده استخراج و به بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. پس از ۱۰ دقیقه، مخلوط گرم شده از بن ماری خارج و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس مخلوطی از ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به همراه معرف آنترون ($Anthrone, C_{14}H_{10}O$) برای خواندن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر آماده شد و از رسوب حاصل برای اندازه گیری میزان نشاسته استفاده شد. سپس به رسوب بقایا ۵ میلی لیتر آب مقطر و ۶/۵ میلی لیتر اسید پرکلرید ۵۲٪ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد، سپس مخلوطی از عصاره موجود و معرف آنترون تهیه و از آن برای خواندن میزان نشاسته توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر استفاده شد. برای آنالیز داده ها از نرم افزار آماری SAS و روش تجزیه واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگین ها از روش LSD استفاده شد (Soltani, 2007).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر مراحل رشدی برای کلیه صفات بجز فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از نظر آماری معنی دار بود (جدول ۱).

بیشترین انباشت محتوی قند در بنه زعفران مربوط به مرحله گلدهی و کمترین آن در مرحله رویشی حاصل شد (جدول ۲). محتوی قند گیاهان در مرحله گلدهی نسبت به مرحله خواب ۶/۶٪ کاهش نشان داد. این کاهش برای گیاهان در مرحله رشد رویشی نسبت به گیاهان در مرحله گلدهی ۵۲/۸٪ بود. محتوی قند بنه گیاهان ب در مرحله گلدهی در مقایسه با بنه گیاهان ناموفق در تولید ساقه گل در مرحله

(Supernatant) حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای استخراج و سنجش محتوی پروتئین های محلول از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrometer) مدل Hitachi U-1900 استفاده شد. بررسی کمی محتوی پروتئین ها با روش Bradford (۱۹۷۶) با کمک منحنی استاندارد (با استفاده از آلبومین سرم گاوی در محدوده صفر تا ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر) انجام شد.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (Peroxidase, POD) از طریق بررسی حضور این آنزیم در عصاره های نسبتاً خالص شده به وسیله ستون کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion Exchange Chromatography, IEC) (Raghavarao et al., 1995) و به روش Maehly و Chance (۱۹۹۵) با اندکی تغییر و براساس میزان اکسیدشدن گایاکول اندازه گیری شد. در این روش از مخلوط ۳۳ میکرومول از عصاره استخراج شده با ۵ میلی مولار هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، ۱۳ میلی مولار گایاکول و ۵۰ میلی مولار بافر فسفات با pH=۷ استفاده و از آن برای انتقال به دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. مخلوط به مدت ۲ دقیقه و با فواصل ۳۰ ثانیه جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر میزان اکسیدشدن گایاکول در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خوانده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (Ascorbate Peroxidase, APX) به روش Nakona و Asada (۱۹۸۱) اندازه گیری شد. بدین منظور مخلوط ۳۳ میکرومول از عصاره گیاهی به همراه ۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (Potassium phosphate) (pH=۷)، ۰/۵ میلی مولار آسکوربیک اسید (Ascorbic acid, ASA) و ۰/۱۵ میلی مولار هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تهیه شد و سپس از آن در دستگاه اسپکتروفتومتر برای خواندن میزان جذب آنزیم موجود در مخلوط در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه و به فاصله هر ۳۰ ثانیه استفاده شد. غلظت آنزیم کاتالاز (Catalase, CAT) به روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) مبتنی بر میزان تجزیه H_2O_2 و اندازه گیری تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفات pH=۷، ۰/۱۵ میلی مول

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر مراحل رشدی مختلف بر محتوی قند، پروتئین، نشاسته و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بنه زعفران

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		قند	نشاسته	پروتئین	کاتالاز	پراکسیداز
مراحل رشدی	۳	۴/۳۵*	۰/۱۳**	۰/۰۰۰۶**	۴/۶۶**	۴/۸۹**
خطا	۸	۰/۸۹۹	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۰۱۶	۰/۰۱۰۴	۰/۹۸
کل	۱۱					
ضریب تغییرات CV (%)		۲۵/۸	۱۳/۳	۸/۳	۲۶	۳۷

*، **، ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌داری است.

جدول ۲- مقایسه میانگین محتوی قند، نشاسته و پروتئین و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مراحل مختلف رشدی بنه زعفران

مراحل رشد	محتوی قند	محتوی نشاسته	محتوی پروتئین	میانگین مربعات		
				پراکسیداز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
				($\mu\text{mol APX min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)		
خواب	۳/۲ ^b	۰/۶۷ ^b	۰/۰۴ ^b	۳/۰۳ ^a	۰/۲۲ ^b	۰/۲۳ ^a
مرحله خروج گل از برگ فلسی (ناموفق در تولید ساقه گل)	۳/۷ ^{ab}	۰/۵۶ ^b	۰/۰۶ ^a	۰/۲۸ ^c	۰/۰۴ ^b	۰/۳۳ ^a
گلدهی	۵/۳ ^a	۰/۳۳ ^c	۰/۰۶ ^a	۱/۱ ^b	۰/۰۵ ^b	۰/۸۲ ^a
رویشی	۲/۵ ^b	۰/۸۳ ^a	۰/۰۳ ^c	۰/۵۱ ^c	۲/۶ ^a	۰/۶۹ ^a

اختلاف ستون‌های دارای حروف الفبای مشابه از لحاظ آماری در سطح ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

نشاسته موجود در بنه زعفران در هنگام آماده‌شدن جوانه برای برانگیزی و تولید گل‌ها شکسته و به قند تبدیل می‌شود. در مجموع افزایش قند در مرحله گلدهی را می‌توان به تجزیه قندهای نامحلول و یا سنتز این ترکیب‌ها از مسیرهای غیرفتوسنتزی و متوقف‌شدن رشد مربوط دانست. نقش ساکارز در القا گل‌دهی در گونه‌های گیاهی مختلف نیز قبلاً به‌وسیله Madhusudanan و Nandakumar (۱۹۸۳) گزارش شده بودند. در مطالعه Behdani و همکاران (۲۰۱۶) میزان تجمع ماده خشک در ریشه و برگ پس از دوره گلدهی زعفران ابتدا افزایش و پس از آن کاهش یافت. زمانی که رشد برگ و ریشه در گیاه زعفران متوقف شد مرحله رشد نمایی بنه‌های جایگزین به‌عنوان محل ذخیره اصلی شروع شد. بنابراین پس از دوره گلدهی قند به نشاسته تبدیل شده و ابتدا در برگ و ریشه و سپس در بنه‌های جایگزین ذخیره شد. Corbesier

خروج گل از برگ فلسی ۱/۴ برابر بیشتر بود. بیشترین محتوی نشاسته در مرحله رشد رویشی مشاهده شد و نسبت به مرحله گلدهی ۶۰٪ کاهش یافت. محتوی نشاسته در بنه گیاهان ناموفق در تولید ساقه گل در مرحله خروج گل از برگ فلسی در مقایسه با بنه گیاهان در مرحله گلدهی ۱/۷ برابر بیشتر بود (جدول ۲). این نتایج بیانگر ضرورت حضور قند برای القای گل‌انگیزی است.

مقایسه بین محتوی قند و نشاسته بیانگر انباشت ۴/۸ برابر قند بیشتر در دوره خواب زعفران (اوایل اردیبهشت تا اواسط خرداد) بود. نتایج نشان داد بعد از سپری‌شدن دوره خواب، به تدریج از اواسط خرداد به بعد محتوی نشاسته کاهش یافت و تا اواخر مهرماه، زمان برانگیزی گل تا شکوفایی گل مقدار نشاسته به نصف مقدار دوره خواب رسید. همزمان با این کاهش محتوی قند به میزان ۶۰ درصد افزایش یافت. بنابراین

بیشتر دیده شد. تغییرات فعالیت آنزیمی به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی و شرایط درونی گیاه تغییر می‌کند و متابولیسم آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان تحت تأثیر تغییرات مراحل رشدی که متأثر از فصل است (Bartolini et al., 2001).

در این مطالعه اگر چه فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله گل‌دهی نسبت به مرحله خواب کاهش داشت، با این حال این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت بنه زعفران در مرحله رشد رویشی در بیشترین میزان خود قرار داشت. فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله رشد رویشی ۵۰ برابر بیشتر از فعالیت آن در مرحله گلدهی بود (جدول ۲). از آنجایی که آنزیم پراکسیداز یک آنزیم چند منظوره است و می‌تواند گل‌انگیزی را تقویت و یا مهار کند و در سیستم بیولوژیک قادر است از طریق مصرف هیدروژن پراکسید، این ماده را از محیط سیستم حذف کند (Chance and Maehly, 1995) و با تجزیه ایندول تری‌استیک اسید (-Indole-3-acetic acid, IAA)، نقش مؤثری را در تولید لیگنین که در سلول گیاه نقش ساختاری و استحکامی ایفا نماید، دارد می‌توان انتظار داشت که در مرحله رویشی که گیاه در حال تولید برگ و تولید بنه جایگزین است، میزان این آنزیم حداکثر باشد. با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین فعالیت‌های آنزیم پراکسیداز در دو مرحله خواب و گلدهی و تفاوت معنی‌دار آن با مرحله رویشی می‌توان نتیجه گرفت افزایش در میزان فعالیت پراکسیداز در بنه در مرحله پیش‌گلدهی به‌منظور تسهیل در سرعت رشد و نمو برگ‌ها و اندام‌های گل است. این یافته با نتایج به‌دست آمده از مطالعه رحمانی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی غلظت‌های مختلف سوبسترای گایاکول در مرحله خواب و بیداری (رشد رویشی و گلدهی) زعفران مطابقت دارد. آنها نشان دادند که سرعت واکنش پراکسیدازی در مرحله رشد به مراتب بیشتر از مرحله خواب بوده است. خادم مقدم و همکاران (۱۳۹۸) در گیاه کلزا نیز فعالیت بیشتر آنزیم پراکسیداز در مرحله قبل از گلدهی در مقایسه با مرحله گلدهی را گزارش کرده‌اند. احتمالاً در مرحله خواب تمایل آنزیم پراکسیداز برای اتصال به سوبسترا نسبت به مرحله رشد

همکاران (۱۹۹۸) با مطالعه چگونگی حرکت نشاسته از برگ به ساقه و اندازه‌گیری میزان تجمع ساکارز در رأس ساقه در موتانت‌های بدون نشاسته *pgm sex1* گیاه *Arabidopsis thaliana* نحوه تبدیل فاز رویشی به زایشی و انتقال این گیاه به مرحله گلدهی را شناسایی کردند. Coupland و Corbesier (۲۰۰۶) ضمن مرور مطالعات انجام‌شده در مورد پاسخ گیاه به محرک‌های گلدهی و چگونگی حرکت محرک‌ها از برگ به سمت مریستم انتهایی و توقف تولید برگ و آغاز گلدهی نشان دادند انتقال نشاسته برای افزایش محتوی ساکارز در رأس ساقه ضروری است و در شرایط روز بلند همزمان با افزایش انتقال کربوهیدرات در برگ، القا گل‌دهی نیز دیده می‌شود. نتایج این تحقیق در تطابق با این نتایج بود. علاوه بر گلدهی، قند حاصل از فتوسنتز در تنظیم فرایندهای جوانه‌زنی، پیری و پاسخ به تنش‌ها نیز نقش ایفا می‌کند (Farooq and Chrungoo, 1985).

بیشترین محتوی پروتئین در مرحله گلدهی زعفران دیده شد و کمترین مقدار آن مربوط به رشد رویشی بود (جدول ۲)، به‌طوری که در مرحله گلدهی محتوی پروتئین دو برابر محتوی آن در مرحله رشد رویشی بود. بالا بودن محتوی پروتئین در مرحله گلدهی احتمالاً به دلیل نیاز گیاه برای سنتز اسیدآمینوهای جدید برای شکوفایی و ظهور گل بوده است. در مرحله گلدهی گیاه معمولاً همه انرژی خود را برای تولید گل هزینه می‌کند و نسبت به تنش‌ها بسیار حساس است. نتایج آزمایش حاضر نیز مؤید این یافته بود که در طی دوره خواب محتوی پروتئین زعفران در بافت بنه ثابت مانده و بلافاصله با ورود به مراحل بعدی تا شروع گلدهی محتوی پروتئین افزایش می‌یابد که با نتایج آزمایش Farooq و Chrungoo (۱۹۸۵) مطابقت داشت.

از سوی دیگر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در مراحل مختلف رشدی بسیار متنوع و در مراحل در حداقل میزان خود بودند. میزان فعالیت آنزیمی کاتالاز بنه زعفران در مقایسه با دو آنزیم دیگر در هر دو مرحله گلدهی و خواب بیشتر بود. در مرحله رویشی نیز فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با دو آنزیم دیگر

خشکی آخر فصل در کلزا را در مرحله گلدهی مطالعه کردند و نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلزا افزایش و همزمان میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. محمدی و همکاران (۱۳۹۴) مشاهده کردند در گیاه کلزا فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت شرایط تنش افزایش ولی فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در جهت مخالف یکدیگر عکس‌العمل نشان می‌دهند. اگر چه میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به مرحله خواب افزایش یافت با این حال فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در این آزمایش در کلیه مراحل رشدی مورد مطالعه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

اطلاع از همبستگی‌های بین صفات و تجزیه ضرایب همبستگی (r) بین ویژگی‌های مختلف (مانند همبستگی محتوی قند و یا محتوی پروتئین با دیگر صفات نظیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) می‌تواند محقق را در تصمیم‌گیری در مورد اهمیت نسبی هر یک از این صفات و ارزش نسبی آنها به‌عنوان معیارهای انتخاب کمک کند (Ario *et al.*, 1986). این تصمیم‌گیری بالاخص در زمانی که انتخاب براساس دو یا چند صفت و به‌طور همزمان بر مبنای شاخص انتخاب صورت می‌گیرد حائز اهمیت است (Agrama, 1996). در شرایطی که همبستگی‌ها نتوانند به‌خوبی ارتباطها را روشن کنند، روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal Component Analysis) از طریق خلاصه‌کردن متغیرهای همبسته اولیه به شکل مؤلفه‌هایی مستقل و محدود امکان دسته‌بندی افراد در فضای دو بعدی یا سه بعدی را به‌وجود می‌آورد (مقدم و همکاران، ۱۳۷۳). در این مطالعه از روش همبستگی برای تعیین ارتباط بین ارزش‌های مقداری صفات محتوی قند و پروتئین با برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. برآورد ضریب‌های همبستگی ساده محاسبه‌شده برای صفات مرتبط با گل‌انگیزی در جدول ۳ ثبت شده است. برای همبستگی‌های اندازه‌گیری شده نمی‌توان روند کلی مشخصی در مراحل مختلف رشدی مشاهده کرد. با این حال همبستگی مثبت و معنی‌داری بین

افزایش می‌یابد، اما سرعت فعالیت این آنزیم در مرحله رشد بسیار بیشتر از مرحله خواب است. در کل فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو مرحله خواب و گلدهی بین ۱۰ تا ۲۰ برابر کمتر از فعالیت آنزیم کاتالاز بود که احتمالاً بتوان آسیب‌پذیری این دو مرحله را با توجه به نقش اصلی آنزیم کاتالاز در کاهش خسارت اکسیداتیوی در این مرحله از زندگی زعفران توجیه کرد، با این حال میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله رویشی در مقایسه با فعالیت آنزیم کاتالاز پنج برابر بیشتر دیده شد. این یافته با نتایج تحقیقات Bhar و Randforth (۱۹۶۹) و ونایی و همکاران (۱۳۹۰) در گیاه *Pharbitis nil* مطابقت دارد. Ebrahimzadeh و Abrishamchi (۲۰۰۱) گزارش کردند که فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در مرحله تشکیل گل زعفران در جوانه در مقایسه با بافت بنه رفتار متفاوتی نشان داد به‌طوری که در بافت بنه میزان فعالیت این آنزیم در مرحله تشکیل گل کاهش یافت، انتقال زعفران از مرحله رویشی به مرحله گلدهی با فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز مرتبط است.

نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به مرحله خواب بنه زعفران تعلق داشت، به‌گونه‌ای که در مرحله گل‌دهی فعالیت آنزیم کاتالاز سه برابر نسبت به مرحله خواب کاهش یافت (جدول ۲). احتمالاً در مرحله خواب، این آنزیم بیان کمتری نسبت به مرحله رشد دارد که حتی با وجود میل ترکیبی زیاد این آنزیم به سوستر، باز هم در نهایت سرعت انجام واکنش پراکسیدازی در مرحله رشد بسیار بیشتر از مرحله خواب است. آنزیم کاتالاز بنه‌ها در مرحله گلدهی چهار برابر بنه گیاهان ناموفق به تولید ساقه گل در مرحله خروج گل از برگ فلسی بودند. کاتالاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با سرعت فعالیت بالا است و قادر است سمیت رادیکال آزاد اکسیژن در گیاه ناشی از قطع سیستم انتقال الکترون در تنش‌های زیستی و غیرزیستی را به‌طور کامل از طریق تبدیل هیدروژن پراکسید به آب و اکسیژن حذف کند (Dhindsa *et al.*, 1981).

جباری و همکاران (۱۳۹۳) از طریق قطع آبیاری، تنش

جدول ۳- مقادیر ضریب‌های همبستگی ساده (پیرسون) بین ویژگی‌های فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیوی و محتوی قند و پروتئین در بنه زعفران در مراحل مختلف رشد (تعداد نمونه ۱۲=)

پراکسیداز	کاتالاز	پروتئین	نشاسته	قند	
				۰/۶۱*	نشاسته
			۰/۸۵*	۰/۵ ^{ns}	پروتئین
		۰/۲۴ ^{ns}	۰/۰۸ ^{ns}	۰/۱۰ ^{ns}	کاتالاز
	۰/۳۰ ^{ns}	۰/۸۱*	۰/۷۵*	۰/۵۳ ^{ns}	پراکسیداز
۰/۲۶ ^{ns}	۰/۴۲ ^{ns}	۰/۰۸ ^{ns}	۰/۲۵ ^{ns}	۰/۱۳ ^{ns}	آسکوربات پراکسیداز

ns عدم معنی داری، * نشان دهنده سطح معنی دار منبع تغییر مربوط در سطح احتمال پنج درصد

بزرگ و مثبت برای محتوی قند و محتوی پروتئین و ضریب منفی برای محتوی نشاسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز بود. با توجه به حضور این صفات در این دسته می‌توان نام این مؤلفه را مؤلفه گل‌انگیزی بیان کرد. عامل دوم که ۲۹/۲۴ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند دارای ضرایب بزرگ برای صفت کاتالاز بود که با توجه به اجزای گروه می‌توان آن را مهم‌ترین جز مؤثر بر خواب نامید. بنابراین، انتخاب هر یک از این مؤلفه‌ها می‌تواند منجر به انتخاب ارقام با گل‌انگیزی یا خواب بیشتر شود.

نمودار بای‌پلات براساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم براساس صفات مورد ارزیابی و مراحل مختلف رشدی بنه‌های زعفران ترسیم شد (شکل ۲). این نمودار نشان داد که بالاترین مقادیر در مؤلفه اول متعلق به صفات محتوی قند و محتوی پروتئین در مرحله گلدهی با ضریب مثبت بود. این صفات بردارهایی نزدیک به یکدیگر در نیمه راست نمودار را تشکیل دادند که ارتباط نزدیک آنها را نشان می‌دهد. در نیمه چپ نمودار، بردارهای مرحله رشد رویشی و خواب و صفات محتوی نشاسته و فعالیت آنزیمی پراکسیداز که از ضریب منفی برخوردار بودند و صفت فعالیت آنزیم کاتالاز از بیشترین ضریب مثبت برخوردار بود قرار داشتند. این یافته اهمیت فعالیت آنزیمی پراکسیداز را در شرایط خواب بنه در حفاظت آنها نشان می‌دهد. همچنین براساس نتایج بای‌پلات، مرحله رشد رویشی بیشترین همبستگی را با آنزیم پراکسیداز داشت.

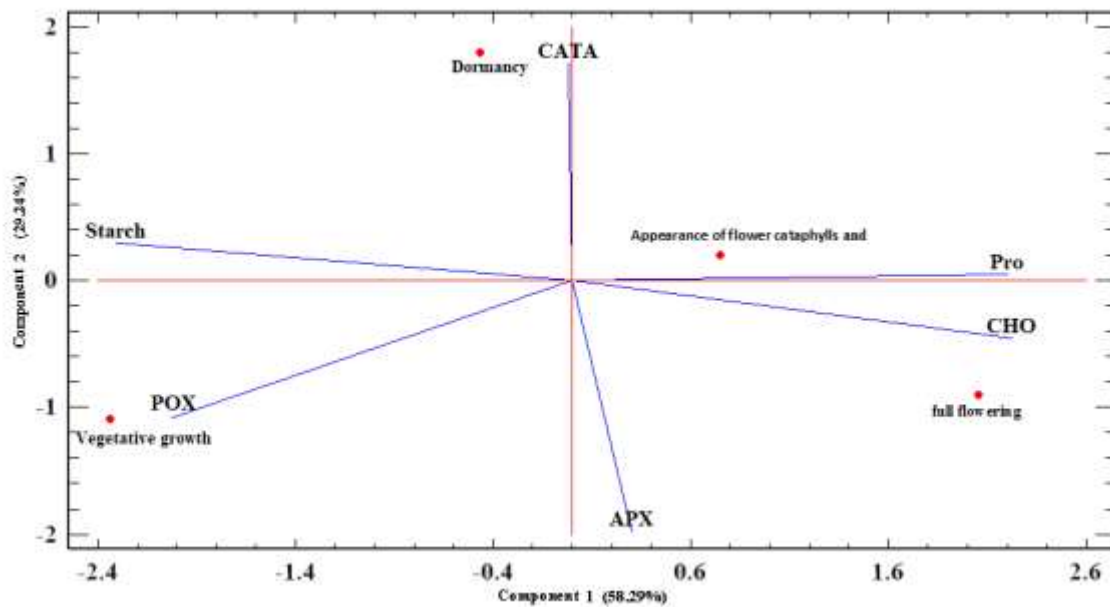
صفات فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با گل‌انگیزی و محتوی قند، پروتئین و نشاسته وجود داشت. از ۱۵ ضریب همبستگی محاسبه شده، تعداد چهار ضریب همبستگی در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شدند. بیشترین میزان همبستگی مثبت بین فعالیت آنزیمی پراکسیداز و محتوی نشاسته (۰/۷۵) و بیشترین همبستگی منفی بین محتوی نشاسته با محتوی پروتئین (۰/۸۵-) دیده شد که در سطح آماری پنج درصد معنی دار بودند (جدول ۳). همچنین بین فعالیت آنزیمی پراکسیداز و محتوی پروتئین (۰/۸۱-) و محتوی نشاسته با محتوی قند (۰/۶۱-) همبستگی معنی داری دیده شد. این نتایج دلالت بر این موضوع دارد که به منظور دستیابی به تولید بیشتر در این گیاه می‌توان محتوی قند و نشاسته را بررسی و با تخمین مناسب و قابل قبول از ارزش مقداری گل‌انگیزی، وضعیت گل‌انگیزی گیاه را تحلیل کرد.

به منظور ارزیابی صفات مرتبط با گل‌انگیزی زعفران در چهار مرحله فنولوژیکی و تعیین عامل‌های توجیه‌کننده مؤثر در هر یک از این مراحل، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار STATGRAPHICS 2.1 با در نظر گرفتن مقادیر ویژه بزرگ‌تر از یک دو عامل در بنه‌های زعفران شناسایی شدند.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در بنه‌های مورد ارزیابی، براساس صفات مورد مطالعه و ماتریس همبستگی صفات نشان داد که دو مؤلفه ۸۷ درصد از تغییرات کل صفات را توجیه کردند (جدول ۴). مؤلفه اول که بیشترین سهم (۵۸/۲۹ درصد) از تغییرات داده‌ها را نشان داد دارای ضریب

جدول ۴- اجزای تشکیل دهنده دو مؤلفه اول (همبستگی بین مراحل مختلف رشدی زعفران و صفات مرتبط با گل‌انگیزی) برای هر یک از صفات مورد مطالعه

متغیر	مؤلفه اول	مؤلفه دوم
قند	۰/۵۱	-۰/۱۶
نشاسته	-۰/۵۲*	۰/۱۰
پروتئین	۰/۵	۰/۰۲
کاتالاز	۰-/۰۰۵	۰/۵۹
پراکسیداز	-۰/۴۶	-۰/۳۸
آسکوربات پراکسیداز	۰/۰۷	-۰/۶۸



شکل ۲ - نمودار بای پلات یا رسته‌بندی مراحل مختلف رشدی و صفات محتوی قند، پروتئین، نشاسته و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش PCA مبتنی بر دو مؤلفه اصلی برای صفات مورد ارزیابی.

برتر خواهد شد و گزینش براساس مؤلفه دوم منجر به گزینش ژنوتیپ‌هایی با مرحله خواب طولانی‌تر خواهد بود.

نتیجه‌گیری

تأثیر قند و نشاسته در گیاه بر فرآیند گل‌انگیزی گیاهان معمولاً به صورت عکس یکدیگر است. برخورداری بیشتر گیاهان ناموفق در تولید ساقه گل در مرحله خروج از برگ فلسی از محتوی نشاسته نسبت به گیاهان موفق در تولید جوانه گل و

تفکیک مراحل مختلف رشدی و قرارگرفتن مرحله گلدهی در نیمه سمت راست نمودار و در مجاورت صفات محتوی پروتئین و محتوی قند، این موضوع را نشان می‌دهد که این دو صفت در مرحله گلدهی حائز اهمیت هستند. مرحله خواب نیز بیشترین همبستگی را با فعالیت آنزیم کاتالاز داشت و مراحل گلدهی و خروج گل از برگ فلسی هر دو با پروتئین و قند همبستگی بالایی داشتند. به طور کلی می‌توان گفت گزینش بر مبنای مؤلفه اول منجر به گزینش ژنوتیپ‌هایی با گل‌انگیزی

توجه داشت که عمل ذخیره‌سازی قند تا اتمام فرآیند گلدھی ادامه خواهد داشت و در مرحله گلدھی به حداکثر خود می‌رسد. پس از دوره گلدھی تا زمان اتمام فرآیند تولید بنه‌های جایگزین، روند ذخیره‌سازی از قند به نشاسته تغییر کرده و میزان قند گیاه کاهش می‌یابد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت بنه زعفران در مرحله رشد رویشی بسیار بیشتر از مراحل خواب و گلدھی بود.

انتقال به مرحله گلدھی را می‌توان به دلیل شکسته‌شدن تدریجی این ماده در فاصله بین دوره خواب تا دوره گلدھی، به قند و ذخیره آن در گیاه دانست. بنابراین تغییر محتوی قند محلول در آماده‌سازی گیاه برای تغییر مرحله رشدی گیاه به زایشی و تشکیل گل مؤثر است و فاکتورهای محتوی قند و نشاسته از عوامل مهم درونی مؤثر در تعیین سرنوشت گیاه برای انتقال به مرحله گلدھی است. این عامل می‌تواند به‌عنوان معیاری در تعیین وضعیت گل‌انگیزی گیاهان مورد توجه قرار گیرد. باید

منابع

- جباری، ح.، اکبری غ. ع.، خوش خلق سیما ن. ا.، اله‌دادی ا.، شیرانی‌راد ا. ح. و طباطبایی، ع. (۱۳۹۳) مقایسه نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین در تحمل به تنش خشکی در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.). تولید گیاهان روغنی ۱: ۳۱-۱۵.
- خادم مقدم، ن.، متشعزاده، ب. و معالی امیری، ر. (۱۳۹۸) تأثیر تیمارهای روی و پتاسیم بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های فیزیولوژیک کلزا در خاک شور. تحقیقات آب و خاک ایران ۵۰: ۱۳۱-۱.
- رحمانی، ع.، صیقلی، ن. و ابراهیم‌زاده، ح. (۱۳۹۲) بررسی سینتتیکی فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های مختلف گایاکول در بنه‌های زعفران زراعی. تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی ۳: ۸۱-۷۷.
- محمدی، ن.، باقی‌زاده، ا. و رجایی، پ. (۱۳۹۴) تأثیر بتا آمینوبوتیریک اسید بر روی محتوی آب نسبی، تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش خشکی. مجله پژوهش‌های گیاهی ۲۸: ۸۶۰-۸۴۴.
- مقدم، م.، محمدی شوطی، ا. و آقایی سربرزه، م. (۱۳۷۳) آشنایی با روش‌های آماری چندمتغیره. انتشارات پیش‌تاز علم.
- میرشمسی کاخکی، ا.، بهرامی، ا.، شهریاری احمدی، ف. و گری، ج. (۱۳۹۲) بررسی بیان ژن *ein2* در گیاه اطلسی (*Petunia x hybrida*) و مطالعه نقش تنظیم‌کنندگی آن در مسیر انتقال پیام اتیلن. نشریه پژوهش‌های سلولی مولکولی (زیست‌شناسی ایران) ۲۶: ۵۸۶-۵۷۲.
- ونایی، س.، سی‌وسه مرده، ع. و حیدری، غ. (۱۳۹۰) اثرات تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود (*Cicer arietinum*). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۹: ۵۲۴-۵۱۴.
- Agrama, H. A. (1996) Sequential path analysis of grain yields its components in maize. *Plant Breeding* 115: 343-346.
- Andres, F. and Fernando, G. (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* 13: 627-639.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., Vasudhevan, P. and Sofo, A. (2016) Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂ detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 19002-19029.
- Ario, O. J., Pkenova, M. E. and Fatokun, C. A. (1986) Plant character correlations and path analysis of pod yield in okra. *Euphytica* 36: 677-686.
- Bartolini, S., Zanol, G. and Viti, R. (2001) Changes in antioxidant compounds in flower buds of two apricotcultivars during winter season 12th International Symposium on Apricot Culture and Decline 701.
- Behdani, M. A., Al-Ahmadi, M. J. and Fallahi, H. R. (2016) Biomass partitioning during the life cycle of saffron (*Crocus sativus* L.) using regression models. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 19: 71-76.
- Behdani, M. A., Koocheki, A., Nassiri, M. and Rezvani, P. (2008) Models to predict flowering time in the main saffron production regions of khorasan province. *Journal of Applied Sciences* 8: 907-909.
- Bhar, D. S. and Radforth, N. W. (1969) Vegetative and reproductive development of shoot apices of *Pharbitis nil* as influenced by photoperiodism. *Canadian Journal of Botany* 47: 1403-1406.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1995) Assay of catalase and peroxidase. In: *Methods in Enzymology* (eds. Culowic, S. P. and Kaplan, N. O.) Pp. 764-765. Academic Press, New York.
- Corbesier, L., Lejeune, P. and Bernier, G. (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131-137.
- Corbesier, L. and Coupland, G. (2006) The quest for florigen: A review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* 57: 3395-3403.
- De Hertogh, A. A., Aung, L. H. and Benschop, M. (1983) The tulip: Botany, usage, growth and development. *Horticulture Review* 5: 45-125.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
- Ebrahimzadeh, H. and Abrishamchi, P. (2001) Changes in IAA, phenolic compounds, peroxidase, IAA oxidase, and polyphenol oxidase in relation to flower formation in *Crocus sativus*. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 190-195.
- Esmaili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K. and Safarian, S. (2011) Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. *Pharmacognosy Magazine* 7: 74-80.
- Farooq, S. and Chrungoo, N. K. (1985) Correlative changes in carbohydrate content and starch hydrolysing enzymes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 180: 55-61.
- Ghamsari, L., Keyhani, E. and Golkhoo, Sh. (2007) Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal* 11: 137-146.
- Gohari, A. R., Saeidnia, S. and Kourepaz Mahmoodabadi, M. (2013) An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. *Pharmacognosy Review* 7: 61-66.
- Keyhani, J., Keyhani, E. and Kamali, J. (2002) Thermal stability of catalases active in dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corms. *Molecular Biology Reports* 29: 125-128.
- Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M. K. and Ahuja, P. S. (2009) State of art of saffron (*Crocus sativus* L.) agronomy: A comprehensive review. *Food Reviews International* 25: 44-85.
- Lopez-Corcoles, H., Brasa-Ramos, A., Montero-Garcia, F., Romero-Valverde, M. and Montero-Riquelme, F. (2015) Phenological growth stages of saffron plant (*Crocus sativus* L.) according to the BBCH scale. *Spanish Journal of Agricultural Research* 13:e09sc01.
- Madhusudanan, K. N. and Nandakumar, S. (1983) Carbohydrate changes in shoot tip and subtending leaves during ontogenetic development of pineapple. *Pflanzenphysiologie* 110: 429-438.
- Nakona, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Raghavarao, K. S. M. S., Rastogi, N. K., Gowthaman, M. K. and Karanth, N. G. (1995) Aqueous two-phase extraction for downstream processing of enzymes/proteins. *Advances in Applied Microbiology* 41: 97-171.
- Soltani, A. (2007) Application of SAS in Statistical Analysis. Mashhad University Jihad Press, Mashhad, Iran.
- Srikanth, A. and Schmid, M. (2011) Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2013-2037.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H. K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39: 45-58.

Evaluation of enzymatic and non-enzymatic changes in flowering process of saffron (*Crocus sativus L.*)

Roya Haghighi¹, Sayed Ali Mohammad Mirmohammady Maibody^{1*}, and Badraddin Ebrahim Sayed Tabatabaei³

¹ Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

² Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: 22/10/2019, Accepted: 22/01/2020)

Abstract

Knowledge concerning some physiological and biochemical basis of flowering process is essential for achieving higher yield and quality of saffron. This study was aimed to elucidate the enzymatic and non-enzymatic changes at four growth stages (dormancy, appearance of flower cataphylls, full flowering and vegetative growth), affecting flower development. In order to investigate the enzymatic and non-enzymatic changes in four growth stages, 120 healthy and uniform weight saffron corms were selected in 1396 and were grown in a completely randomized design (CRD) with three replicates in Isfahan University of Technology greenhouse growth chamber. Corms were sampled separately and their sugar, starch, protein and activity levels of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase enzymes were measured. The results showed that sugar content of plants at flowering stage was increased 65.6% compared to complete dormancy stage and the starch content was decreased 32% in vegetative growth stage compared to the flowering stage. Catalase enzyme activity was at its maximum level ($3 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) and peroxidase at vegetative stage ($2.6 \mu\text{mol POX min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$). Due to the lower starch content in plants at flowering stage than non-blooming saffron plants at appearance of flower cataphylls, it can be concluded that the plant may convert the starch in the corm of saffron into sugar, depending on its need at the flowering stage, and exchange these two substances as needed. Among the antioxidant enzymes investigated, it was found that the peroxidase enzyme usually acted as a multifunctional enzyme and could enhance or inhibit flower induction.

Key words: Antioxidant Enzyme, Dormancy, Flowering, saffron, Sugar, Protein and Starch

