

واکنش گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) به تنش یخزدگی در شرایط کنترل شدهاحمد نظامی^۱، شهرام رضوان بیدختی^۲، سارا سنجانی^۳

۱. استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دامغان.

۳. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج.

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۶/۳۰

چکیده

رشد و نمو گیاه زعفران عمدتاً منطبق بر فصل‌های پاییز و زمستان است و گیاه در طی این مدت در معرض تنش سرما و یخزدگی قرار می‌گیرد. این مطالعه باهدف بررسی اثر تنش یخزدگی بر سه اکوتیپ زعفران (قائن، کاشمر و تربت حیدریه) در شرایط کنترل شده در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. به منظور ایجاد خوسرمایی گیاهان در محیط طبیعی رشد داده شده و سپس برای اعمال دماهای یخزدگی به فریزر ترموگرادبان منتقل شدند و در معرض شش دما (صفر، -۴، -۸، -۱۲، -۱۶، -۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. میزان پایداری غشاء سیتوپلاسمی با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس آن تعیین گردید. درصد بقاء گیاهان سه هفته پس از تیمارهای یخزدگی و رشد آن‌ها در شاسی سرد از طریق شمارش تعداد بوته‌ها و تعیین نسبت آن‌ها به تعداد بوته قبل از تیمار یخزدگی تعیین گردید. درصد نشت الکترولیت‌ها، LT_{50el} و درصد بقاء به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند. بیشترین و کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب مربوط به اکوتیپ کاشمر و اکوتیپ تربت حیدریه بود. نتایج اثر متقابل دما و اندام نشان داد که بیشترین و کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب مربوط به اندام برگ در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد و بینه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بود. اکوتیپ‌های قائن و کاشمر بیشترین و اکوتیپ تربت حیدریه کمترین مقدار LT_{50el} را داشتند. همبستگی معنی‌داری ($r = 0.83^{**}$) بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} بینه زعفران مشاهده شد، به طوری که با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای ۵۰ درصد کشندگی کاهش یافت. هر سه اکوتیپ زعفران تا دمای -۱۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰۰ درصد بقاء داشتند و با کاهش بیشتر دما درصد بقاء کاهش یافت و کمترین درصد بقاء در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که اکوتیپ تربت حیدریه از کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها، کمترین LT_{50el} و بیشترین تحمل نسبت به تنش یخزدگی برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، درصد بقاء، دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها، نشت الکترولیت‌ها.

مقدمه

جغرافیایی ۱۰ درجه غربی تا ۸۰ درجه شرقی در مناطق کم باران ایران-تورانی که دارای زمستان‌های سرد و تابستان گرم هستند، گسترش دارد. هرچند کشت زعفران از قدیم‌الایام در برخی از نقاط دنیا مانند ایران، هند، ایتالیا و یونان متداول بوده است (Bolhasani et al., 2005)، ولی امروزه ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده زعفران در دنیا است و تقریباً ۹۰ درصد از تولید زعفران دنیا متعلق به کشور ایران

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله و علفی است و به خانواده زنبقیان^۱ تعلق دارد و تکثیر آن به وسیله بینه یا پیازهای توپر^۲ صورت می‌گیرد (Behnia, 1991). این گیاه در شرایط آب و هوایی مدیترانه‌ای و در مناطقی از دنیا با عرض جغرافیایی ۳۰ تا ۵۰ درجه شمالی و طول

۱. Iridaceae

۲. Corms

۵۰ درصد کشندگی (LT_{50el}^1) پیشنهاد شده است (Nezami et al., 2007).

در آزمایشی پایداری غشاء پلاسمایی اندام‌های مختلف گیاهچه (ریشه، طوقه و برگ) دو اکوتیپ گیاه رازیانه (خراسان و کرمان) پس از اعمال تیمارهای دمایی مختلف (۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵- سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اکوتیپ خراسان درصد نشت الکترولیت بیشتری در مقایسه با اکوتیپ کرمان داشت. همچنین با کاهش دمای یخ‌زدگی، درصد نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های مختلف، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفت و بیشترین نشت الکترولیت در ریشه به میزان ۷۴/۷ درصد و کمترین آن در برگ به میزان ۶/۶۶ درصد مشاهده شد (Nezami et al., 2010). در آزمایش دیگری تحمل به یخ‌زدگی دو گونه *Gaura* و *Gaura coccinea* از طریق آزمون نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های مختلف گیاه (طوقه، ساقه، ریزوم) و رشد مجدد گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. از لحاظ نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاه تفاوت‌هایی وجود داشت و کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب در طوقه و ریزوم مشاهده شد. دو گونه مورد مطالعه از نظر رشد مجدد نیز متفاوت بودند، به‌طوری‌که گونه *G. coccinea* پس از قرار گرفتن در معرض دمای ۹- درجه سانتی‌گراد رشد مجدد خوبی داشت و در دماهای پایین‌تر رشد مجدد آن به‌کندی انجام شد، در حالی‌که در گونه *G. drummondii* رشد مجدد گیاهان پس از قرار گرفتن در معرض دمای ۶- درجه سانتی‌گراد شروع شد ولی دماهای یخ‌زدگی شدیدتر رشد مجدد گیاه را به تأخیر انداخت (Pietsch et al., 2009). در بررسی تحمل به یخ‌زدگی سه اکوتیپ گیاه داروئی موسیر نیز مشاهده شد که درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ شیروان بیشتر از دو اکوتیپ کلات و تندوره بود. همچنین با کاهش دما میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به حداکثر رسید. در مطالعه مذکور اکوتیپ‌های کلات و تندوره با دارا بودن کمترین درصد نشت از تحمل به یخ‌زدگی بهتری نسبت به اکوتیپ شیروان برخوردار بودند (Rezvan-Beydokhti et al., 2011).

است (Kafi et al., 2002). این محصول غالباً در مناطقی از شمال شرق ایران که دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های گرم هستند، کشت می‌شود.

هرچند زعفران در مناطق معتدله و خشک پرورش می‌یابد، ولی اندام‌های هوایی و قابل‌رؤیت آن در نیمه سرد سال سر از خاک درآورده و رشد می‌نمایند و بخش اعظمی از طول فصل رشد این گیاه مواجه با سرمای پاییز و یخبندان‌های زمستان است و لذا دماهای پایین زمستان یکی از عوامل محدودکننده تولید زعفران ذکر شده است (Kafi et al., 2002). از این‌رو در اثر وقوع سرمای شدید در برخی سال‌ها بقاء و رشد و نمو زعفران تحت تأثیر قرار گرفته و عملکرد آن کاهش یافته است.

جهت ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی و مقاومت به سرما در گیاهان انواع آزمون‌ها در شرایط کنترل‌شده مورد بررسی قرار گرفته است. در یکی از این روش‌ها نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های گیاهی پس از اعمال تنش یخ‌زدگی اندازه‌گیری می‌شود (Eugenia et al., 2003). کاهش آماس سلولی و افزایش نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی به دنبال بروز تنش یخ‌زدگی، نقش غشاء سلولی را در حفاظت گیاه از خسارت تنش سرما به‌خوبی نشان داده است و در همین خصوص قوی‌ترین تئوری مطرح‌شده در مورد اثر تنش یخ‌زدگی، تئوری خسارت غشاء سلولی است (Steponkus et al., 1993; Mckersie and Leshem, 1994). بر طبق این تئوری سرما باعث تغییر حالت غشاء از فاز مایع به ژل می‌شود که با این تغییر فیزیکی، فعالیت غشاء مختل می‌گردد (Baek and Skinner, 2003). غشای پلاسمایی اولین مکانی است که در معرض تنش یخ‌زدگی دچار خسارت می‌شود (Uemura et al., 2006). از این‌رو محققان اظهار داشته‌اند که تداوم انسجام غشاء پلاسمای از جمله عوامل اصلی بقای گیاه در شرایط تنش یخ‌زدگی است و هرگونه اختلال در ساختار غشاء، سبب بروز خسارت و حتی مرگ آن می‌شود (Mckersie and Leshem, 1994). به همین دلیل اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی به‌عنوان یک روش مناسب برای تخمین تراوایی غشاء و ارزیابی اثر تنش‌های محیطی بر ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان مورد استفاده قرار گرفته و دمایی که سبب ۵۰ درصد نشت از سلول‌های گیاهی می‌شود به‌عنوان دمای

¹. Lethal temperature 50 according to electrolyte leakage percentage

گیاهچه‌ها به دو قسمت برگ و بنه تفکیک و مجدداً توسط آب مقطر شسته شده و به‌طور جداگانه درون ویال حاوی ۷۵ میلی‌لیتر آب دو بار مقطر قرار گرفتند. ویال‌ها به مدت ۶ ساعت بر روی شیکر قرار گرفته و سپس هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (مدل جنوی^۲) اندازه‌گیری شد (EC_1). برای اندازه‌گیری نشت کامل الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، ویال‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC_2). با استفاده از معادله ۱، درصد نشت الکترولیت‌های هر تیمار محاسبه شد.

$$[1] \quad \text{نشت الکترولیت‌ها} = (EC_2/EC_1) \times 100$$

درجه حرارت کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50ei}) با استفاده از معادله ۲ (Anderson et al., 1998) تعیین شد.

$$[2] \quad EL_p = EL_i + \{(EL_m - EL_i) / (1 + e^{-B(T - T_m)})\}$$

که در آن EL_p : مقدار نشت الکترولیت پیش‌بینی شده، EL_i : حداقل مقدار نشت الکترولیت‌ها در دماهای مختلف، EL_m : حداکثر مقدار نشت الکترولیت‌ها در دماهای مختلف، B : سرعت افزایش شیب منحنی، T : دما، T_m نقطه عطف منحنی (نقطه میانی بین بخش پایینی و بالایی خط منحنی که نشان‌دهنده خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از سلول است).

جهت تعیین درصد بقاء، گلدان‌ها به شاسی سرد منتقل شده و پس از چهار هفته درصد بقاء آن‌ها ارزیابی شد. درصد بقاء گیاهان از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و از طریق معادله ۳ محاسبه شد.

$$[3] \quad 100 \times \frac{\text{تعداد گیاهان زنده سه هفته بعد از یخ زدگی}}{\text{تعداد گیاهان قبل از یخ زدگی}} = \text{تعداد بوته زنده}$$

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MINITAB Ver. 15 صورت گرفت. برای رسم نمودارها و تعیین LT_{50} از نرم‌افزارهای SigmaPlot و Slide Write استفاده شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مقایسه شدند.

با توجه به اینکه پراکنش، فصل رشد و کشت گیاه زعفران در شرایط و مناطق اکولوژیکی خاصی می‌باشد که وقوع تنش سرما، نوسانات شدید دمایی، کاهش سریع دما و تنش یخ‌زدگی محتمل است و از طرفی اطلاعات چندانی در مورد تحمل به سرمای این گیاه در دسترس نیست، لذا این مطالعه باهدف بررسی اثرات تنش یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده بر این گیاه اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۸ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل آزمایش شامل سه اکوتیپ زعفران (قائن، کاشمر و تربت‌حیدریه)، شش تیمار دمایی (۰، -۴، -۸، -۱۲، -۱۶ و -۲۰ درجه سانتی‌گراد) و دو اندام (برگ و بنه) بودند. در پاییز سال ۱۳۸۸ دو عدد بنه زعفران (به وزن تقریبی ۶-۸ گرم) در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۲۵ سانتیمتر و ارتفاع ۲۳ سانتی‌متری در عمق هشت سانتی‌متری کشت شدند. خاک گلدان‌ها حاوی نسبت مساوی از شن، خاک‌برگ و خاک مزرعه بود. به‌منظور ایجاد خوسرمایی گیاهان در محیط طبیعی قرار داده شده و رشد کردند. سپس برای اعمال دماهای یخ‌زدگی، گیاهان در اواخر بهمن‌ماه به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. در شروع آزمایش دمای فریزر پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس‌از آن با سرعت ۲- درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. به‌منظور جلوگیری از پدیده فراسرما و ایجاد هستک یخ، در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد بر روی گیاهان، محلول باکتری‌های ایجادکننده هستک یخ^۱ به نحوی پاشیده شد که قشر نازکی از این محلول روی اندام هوایی گیاه را پوشاند. به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط آزمایش، گیاهان در هر تیمار دمایی، به مدت یک ساعت نگه داشته و سپس از فریزر خارج شدند. به‌منظور کاهش سرعت ذوب، گلدان‌ها بلافاصله به اتاقک سرد با دمای 5 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در آن نگهداری شدند.

به‌منظور تعیین درصد نشت الکترولیت‌ها گیاهچه‌های مربوط به هر تیمار از گلدان‌ها خارج شده و ابتدا جهت تمیز شدن، نمونه‌ها با آب مقطر دو تا سه بار شسته شده و سپس

². Genway

¹. Ice Nucleation Active Bacteria

نتایج و بحث

درصد نشت الکترولیت‌ها نتایج تجزیه واریانس نشان داد که از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها تفاوت معنی‌داری ($p \geq 0.01$) بین اکوتیپ‌های زعفران وجود دارد (جدول ۱). بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ کاشمر مشاهده شد و اکوتیپ‌های قائن و تربت‌حیدریه بدون تفاوت معنی‌داری ($p \geq 0.01$) کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشتند (جدول ۲). بررسی محققان دیگر بر روی موسیر نیز بیانگر وجود تفاوت اکوتیپ‌های مختلف از نظر میزان نشت الکترولیت‌ها در شرایط تنش یخ‌زدگی است (Rezvan-Beydokhti et al., 2011).

با کاهش دما نیز میزان نشت الکترولیت‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به حداکثر مقدار خود رسید (جدول ۲). افزایش میزان نشت مواد با کاهش دما حاکی از آن است که در نتیجه اعمال تنش یخ‌زدگی، انسجم و فعالیت غشاء سلولی مختل شده است و در نتیجه آن نشت مواد از درون سلول‌ها اتفاق افتاده است. این امر در مطالعات سایر پژوهشگران نیز مشاهده شده است (Nayyar et al., 2005). در بین اندام‌های مختلف زعفران نیز تفاوت معنی‌داری از نظر نشت الکترولیت‌ها وجود داشت و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در برگ و کمترین آن در بنه زعفران مشاهده شد (جدول ۲). این

وضعیت احتمالاً بیانگر حساسیت بیشتر غشاء سلول‌های برگ در برابر تنش یخ‌زدگی در مقایسه با اندام بنه زعفران است. در بررسی اثر تنش یخ‌زدگی بر میزان نشت الکترولیت‌ها در گیاه موسیر مشاهده شد که تحمل به یخ‌زدگی در اندام‌های مختلف گیاه موسیر متفاوت بود و پیازهای گیاه موسیر نسبت به ریشه و برگ به تنش یخ‌زدگی متحمل‌تر بودند (Rezvan-Beydokhti et al., 2011).

در بررسی اثر دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های زعفران مشاهده شد که اکوتیپ کاشمر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و اکوتیپ تربت‌حیدریه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به ترتیب بیشترین و کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشتند. با وجود این اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ تربت‌حیدریه و قائن در دمای صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد (جدول ۳). تأثیر تنش سرما بر اختلال فعالیت غشاهای سلولی و به دنبال آن نشت الکترولیت‌ها بسته به تحمل به یخ‌زدگی ارقام گیاهی متفاوت است (Cardona et al., 1997).

تأثیر دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های برگ و بنه اکوتیپ‌های زعفران معنی‌دار ($p \geq 0.01$) بود (جدول ۳).

جدول ۱. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاه زعفران تحت تأثیر یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده.

Table 1. Source of variation, degree of freedom and mean square of electrolyte leakage for Saffron at freezing temperature in controlled conditions.

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	درصد نشت الکترولیت‌ها Electrolyte leakage (%)
replication	تکرار	2	0.7
ecotype	اکوتیپ	2	398.4**
temperature	دما	5	5218.1**
ecotype × temperature	اکوتیپ × دما	10	32.9**
organ	اندام	1	529.7**
ecotype × organ	اکوتیپ × اندام	2	9.6 ^{ns}
temperature × organ	دما × اندام	5	60.5**
ecotype × temperature × organ	اکوتیپ × دما × اندام	10	3.0**
Error	خطا	70	3.4
Total	کل	107	

^{ns} و ^{**} به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

^{ns} and ^{**} are nonsignificant and significant at 1% levels, respectively.

جدول ۲. اثرات اکوتیپ، دما و اندام گیاهی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاه زعفران در شرایط کنترل‌شده.

Table 2. Effects of ecotype, temperature and plant organ on electrolyte leakage of Saffron in controlled conditions.

Treatment	تیمار	درصد نشت الکترولیت‌ها Electrolyte leakage (%)	LSD (0.01)
Ecotype	اکوتیپ		
Ghaen	قائن	22.10	1.51
Kashmar	کاشمر	29.90	
Torbati-heydarieh	تربت‌حیدریه	24.40	
دماهای یخ‌زدگی (درجه سانتی‌گراد)			
Freezing temperature (°C)			
0	۰	11.57	2.14
-4	-۴	15.81	
-8	-۸	19.00	
-12	-۱۲	22.72	
-16	-۱۶	29.75	
-20	-۲۰	54.04	
Organ	اندام		
Leaf	برگ	29.11	
Corm	بنه	24.68	

جدول ۳. اثرات متقابل اکوتیپ و دما و اثرات متقابل دما و اندام بر درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاه زعفران در شرایط کنترل‌شده.

Table 3. Interaction effects of ecotype and temperature and temperature and organ on electrolyte leakage of Saffron in controlled conditions.

		دما (درجه سانتی‌گراد)					
		Temperature (°C)					
		0	-4	-8	-12	-16	-20
Ecotype	اکوتیپ						
Ghaen	قائن	10.7	13.4	15.9	19.6	31.6	59.6
Kashmar	کاشمر	13.6	21.3	26.0	27.6	32.6	63.1
Torbati-heydarieh	تربت‌حیدریه	10.6	12.8	18.5	23.1	29.8	53.7
		LSD (0.01) = 2.81					
Organ	اندام						
Leaf	برگ	12.6	16.8	21.4	25.8	33.3	64.6
Corm	بنه	10.7	14.8	18.9	21.1	29.4	53.0
		LSD (0.01) = 2.3					

الکترولیت‌ها را در بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه داشتند. درصد نشت الکترولیت‌های برگ و بنه زعفران در اکوتیپ‌های قائن و تربت‌حیدریه با کاهش دما از صفر به -۴- درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری نداشت، این در حالی

بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ و بنه زعفران در اکوتیپ کاشمر در دمای -۲۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، این در حالی است که برگ و بنه‌های اکوتیپ تربت‌حیدریه در دمای فوق کمترین درصد نشت

در مقایسه دو اندام گیاه نیز اندام برگ LT_{50el} بالاتری داشت (شکل ۲-ب). بررسی همبستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} در برگ و بنه زعفران نشان داد که بین این دو پارامتر همبستگی معنی‌داری (به ترتیب $r^{**}=0/61$ و $r^{**}=0/82$) وجود دارد و با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای ۵۰ درصد کشنده گیاه کاهش یافته است (شکل ۳). مطالعه دیگری نشان داد که بین نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} همبستگی وجود دارد (Nezami et al., 2009). و لذا این همبستگی احتمالاً نشان‌دهنده کارایی این روش در ارزیابی تحمل به سرما در گیاهان می‌باشد.

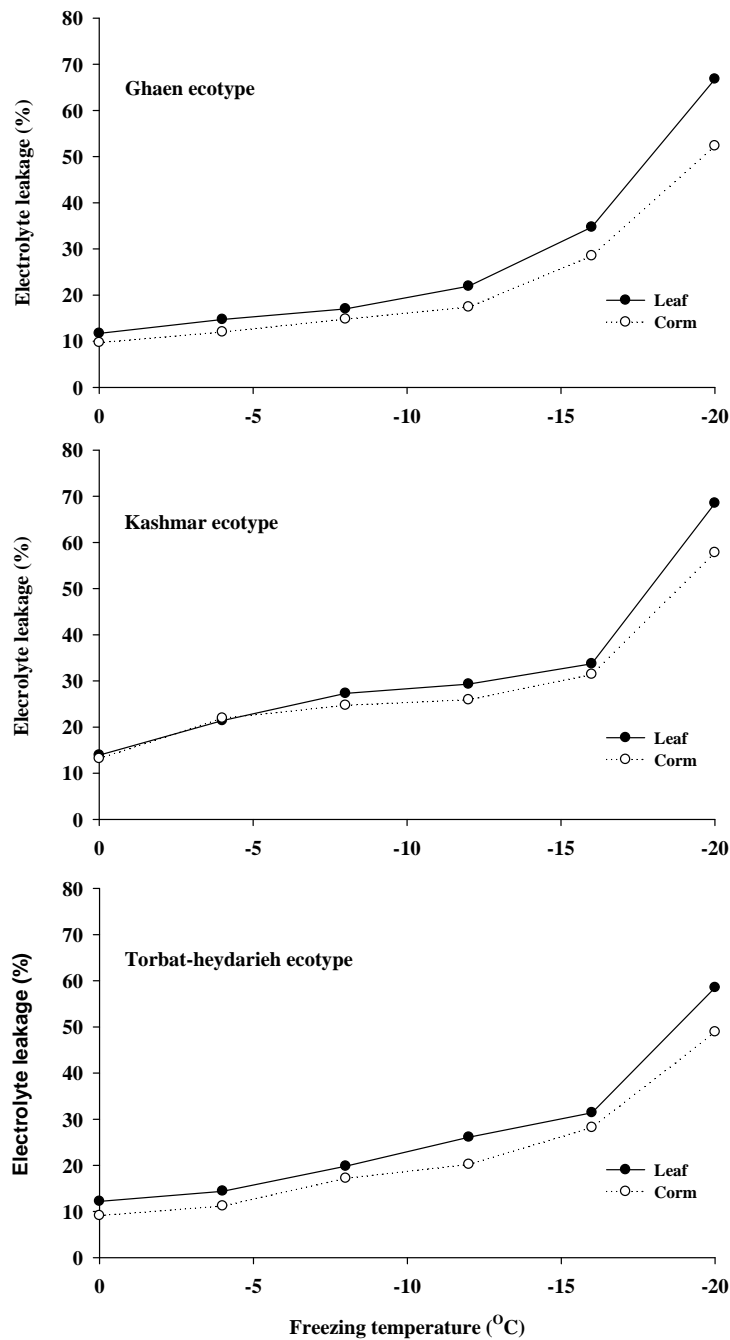
درصد بقاء نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات دما، اکوتیپ و اثر متقابل اکوتیپ و دما بر درصد بقاء معنی‌دار ($p \geq 0/01$) بود (جدول ۵). کاهش دما به کمتر از ۱۶- درجه سانتی‌گراد سبب کاهش درصد بقاء گیاهان شد (جدول ۶) و بیشترین و کمترین درصد بقاء به ترتیب مربوط به اکوتیپ تربت‌حیدریه (۹۶/۱ درصد) و کاشمر (۹۴/۴ درصد) بود که اکوتیپ اخیر تفاوت معنی‌داری را از نظر درصد بقاء با اکوتیپ قائن نداشت (جدول ۶). در مطالعه‌ای بر روی گیاه قرنفل گزارش شد که درصد بقاء گیاهان تا دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر قرار نگرفت، درحالی‌که با کاهش دما به ۲۲- درجه سانتی‌گراد درصد بقاء گیاهان به صفر رسید (Izadi-Darbandi et al., 2011).

هر سه اکوتیپ زعفران مورد بررسی تا دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد ۱۰۰ درصد بقاء داشتند و با کاهش بیشتر دما درصد بقاء کاهش یافت و کمترین درصد بقا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. کاهش درصد بقاء اکوتیپ‌های قائن و کاشمر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد حدود ۲۴/۵ درصد نسبت به شاهد بود، درحالی‌که در اکوتیپ تربت‌حیدریه در دمای مذکور ۱۶/۷ درصد کاهش درصد بقاء نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۷) و به همین دلیل امکان تعیین دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس درصد بقاء امکان‌پذیر نشد.

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد به بعد، درصد بقاء اکوتیپ‌های زعفران نیز کاهش یافته است. با وجود این در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، در اکوتیپ تربت‌حیدریه ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها مرگ ۱۷

است که با کاهش دما از صفر به ۴- درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ کاشمر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). بررسی درصد نشت الکترولیت برگ و بنه اکوتیپ‌های زعفران در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نشان داد که اکوتیپ تربت‌حیدریه به‌طور معنی‌داری دارای کمترین درصد نشت الکترولیت در این دما است، از این‌رو به نظر می‌رسد درصد نشت الکترولیت کمتر در اکوتیپ تربت‌حیدریه در دماهای بسیار پایین یخ‌زدگی (۱۶-، ۲۰- درجه سانتی‌گراد) احتمالاً نشان‌دهنده خسارت کمتر غشاهای سلولی گیاهان این اکوتیپ و لذا تحمل بیشتر آن به دماهای شدید مورد مطالعه می‌باشد. در همین راستا و با وجود اینکه جوانمرد و همکاران (Javanmard et al., 2002) حداکثر سرمای قابل تحمل زعفران را ۱۸- درجه سانتی‌گراد گزارش کردند، اما اکوتیپ زعفران تربت‌حیدریه قادر به تحمل دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد در شرایط طبیعی بوده است، هرچند که در این شرایط عملکرد گیاه شدیداً کاهش یافته است.

دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) برخی از محققان دمایی را که سبب ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی می‌شود به‌عنوان دمای ۵۰ درصد کشنده گیاهی (LT_{50el}) پیشنهاد کرده‌اند (Cardona et al., 1997). از نظر LT_{50el} بین اکوتیپ‌های زعفران تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴)، به‌طوری‌که اکوتیپ تربت‌حیدریه کمترین و اکوتیپ‌های قائن و کاشمر بیشترین مقدار LT_{50el} را داشتند (شکل ۲-الف). پایین‌تر بودن LT_{50el} در اکوتیپ تربت‌حیدریه با نشت سلولی کمتر این اکوتیپ نسبت به اکوتیپ‌های دیگر در شرایط تنش یخ‌زدگی همراه بوده است. در همین راستا آزمایشی بر روی هشت رقم پنجه مرغی نشان داد که ارقام مقاوم به سرما LT_{50el} کمتری نسبت به ارقام حساس داشتند (Shashikumar and Nus, 1993). در آزمایشی با بررسی LT_{50el} از طریق آزمون نشت الکترولیت‌ها و همچنین رشد مجدد در ارقام مختلف برمودا گراس مشاهده شد که بین ارقام مختلف تفاوت معنی‌داری از این نظر وجود دارد و LT_{50el} ارقام مورد مطالعه بین دماهای ۷- تا ۱۱- درجه سانتی‌گراد متغیر بود (Anderson et al., 1993).



شکل ۱. اثرات متقابل اکوتیپ و دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های برگ و بونه زعفران تحت تأثیر یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده.

Fig. 1. Interaction effect of ecotype and temperature on electrolyte leakage of Saffron's leaf and corm in controlled conditions.

و درصد بقاء گیاهان مشاهده شد (جدول ۸). آزمایشی بر روی سه رقم کلزا نشان داد همبستگی خوبی بین درصد نشت الکترولیت‌های گیاه کلزا و درصد بقای آن‌ها وجود داشت، به طوری که بر اساس نتایج آزمایش فوق با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء گیاهان کاهش یافت (Rife and Zeinali, 2003).

درصدی گیاهان را به دنبال داشته است، در صورتی که در دو اکوتیپ قاین و کاشمر نشت به ترتیب حدود ۵۵ و ۵۸ درصدی الکترولیت‌ها باعث مرگ بیش از ۲۴ درصد نمونه‌های مورد آزمایش شده است. در این مطالعه همبستگی منفی و بسیار معنی‌داری ($p \leq 0.01$) بین درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام برگ و بنه

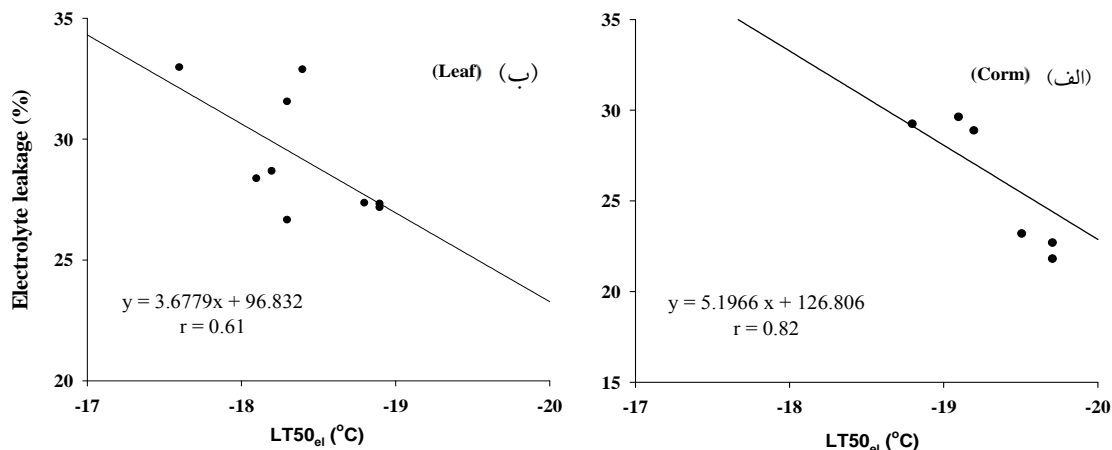
جدول ۴. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) در گیاه زعفران در شرایط کنترل شده.

Table 4. Source of variation, degree of freedom and mean square of lethal temperature 50 of sample according to electrolyte leakage (LT_{50el}) from Saffron in controlled conditions.

S.O.V	منابع تغییر	دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس نشت الکترولیت‌ها	
		درجه آزادی	LT_{50el}
replication	تکرار	2	0.07
ecotype	اکوتیپ	2	1.4**
organ	اندام	1	6.9**
ecotype × organ	اکوتیپ × اندام	2	0.1 ^{ns}
Error	خطا	10	0.04
Total	کل	17	

^{ns} و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱.

^{ns} and ** are insignificant and significant at 1% levels, respectively.



شکل ۲. رابطه بین درصد نشت الکترولیت‌ها و دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها در بنه (الف) و برگ (ب) گیاه زعفران.

Fig 2. Relationship between electrolyte leakage percentage and lethal temperature 50 according to electrolyte leakage (LT_{50el}) of leaf and corm in Saffron.

جدول ۵. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد بقاء گیاه زعفران تحت تأثیر دماهای یخ زدگی در شرایط کنترل شده.

Table 5. Source of variation, degree of freedom and mean square of Saffron's survival percentage at freezing temperature in controlled conditions.

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	درصد بقاء Survival(%)
Replication	تکرار	2	9.8
Ecotype	اکوتیپ	2	16.3**
Temperature	دما	1	702.5**
Ecotype × Temperature	اکوتیپ × دما	2	9.6**
Error	خطا	10	1.6
Total	کل	17	

** اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۱

** : significant at 1% levels.

جدول ۶. مقایسه میانگین درصد بقاء گیاه زعفران تحت تأثیر اکوتیپ و دماهای یخ زدگی در شرایط کنترل شده.

Table 6. Mean comparison of saffron's survival percentage at the effect of ecotype and freezing temperature in controlled conditions.

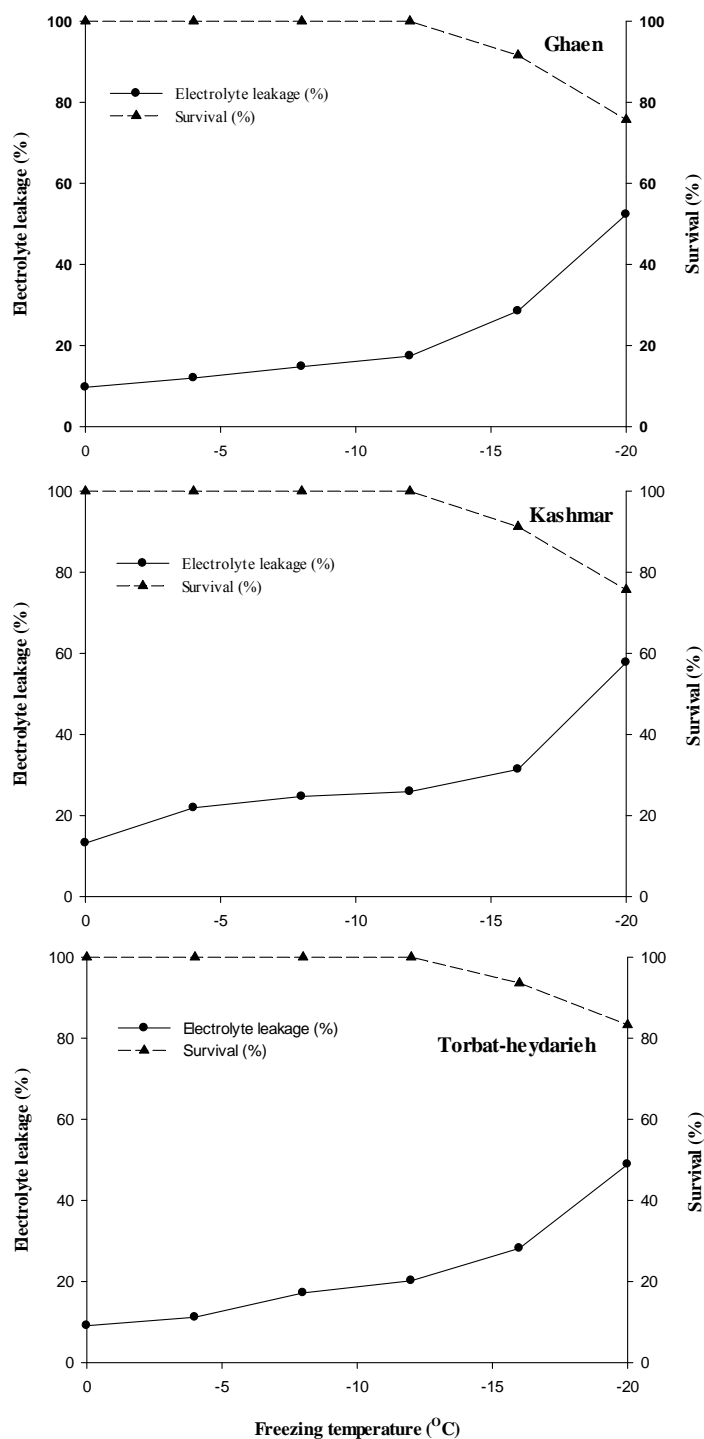
Treatment	تیمار	درصد بقاء Survival(%)	LSD (0.01)
Ecotype	اکوتیپ		
Ghaen	قائن	94.5	1.1
Kashmar	کاشمر	94.4	
Torbat-heydarieh	تربت حیدریه	96.1	
دماهای یخ زدگی (درجه سانتی گراد)			
Freezing temperature (°C)			
0		100	1.6
-4		100	
-8		100	
-12		100	
-16		92.2	
-20		78.1	

جدول ۷. مقایسه میانگین اثرات متقابل اکوتیپ و دما بر درصد بقاء گیاه زعفران تحت تأثیر دماهای یخ زدگی در شرایط کنترل شده.

Table 7. Mean comparison of ecotype and temperature interaction on Saffron's survival percentage at freezing temperature in controlled conditions.

Ecotype	اکوتیپ	Temperature					
		0	-4	-8	-12	-16	-20
Ghaen	قائن	100	100	100	100	91.6	75.7
Kashmar	کاشمر	100	100	100	100	91.3	75.7
Torbat-heydarieh	تربت حیدریه	100	100	100	100	93.6	83.3

LSD (0.01) = 3. 1



شکل ۳. روند درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء اکوتیپ‌های زعفران تحت تأثیر دماهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده.

Fig 6. Survival percentage and electrolyte leakage percentage in saffron affected by freezing temperature in controlled conditions.

جدول ۸. ضرایب همبستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گیاه زعفران.

Table 8. Coefficient of correlation between electrolyte leakage percentage and survival percentage in Saffron.

اکوتیپ	اندام	ضریب همبستگی
Ecotype	Organ	Coefficient of correlation
Ghaen	برگ Leaf	-0.98**
	بنه Corm	-0.98**
Kashmar	برگ Leaf	-0.93**
	بنه Corm	-0.92**
Torbat-heydarieh	برگ Leaf	-0.94**
	بنه Corm	-0.96**

نتیجه‌گیری

تخمین خسارت ناشی از تنش سرما با استفاده از روش‌های اندازه‌گیری نشت الکترولیت می‌تواند معیارهای نسبتاً قابل قبولی را فراهم سازد، با این وجود نشت الکترولیت‌ها الزاماً نشان‌دهنده خسارت غیرقابل برگشت به سلول‌ها نیست و به همین جهت اندازه‌گیری هدایت الکتریکی و تعیین درجه حرارت کشنده بر اساس صفت مذکور احتمالاً برای ارزیابی مراحل ابتدائی خسارت ناشی از تنش سرما مفید است (Palta, 1994). نتایج این آزمایش نشان داد که بین اکوتیپ‌های زعفران مورد مطالعه، اکوتیپ تربت‌حیدریه از کمترین درصد نشت الکترولیت، کمترین LT_{50el} ، بیشترین درصد بقا و بیشترین تحمل نسبت به تنش یخ‌زدگی برخوردار است. در بین اندام‌های مورد مطالعه در زعفران اندام بنه در مقایسه با برگ حساسیت کمتری نسبت به دماهای یخ‌زدگی نشان داد، ضمن اینکه همبستگی بسیار بالایی بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} در برگ و بنه زعفران مشاهده شد. با وجود این و با توجه به اینکه که در گیاه زعفران رشد مجدد گیاه از ناحیه بنه آغاز می‌شود و

میزان مقاومت بنه به تنش یخ‌زدگی نقش بسزایی در بقای گیاه دارد، بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از درصد نشت الکترولیت‌ها از بنه به‌عنوان شاخصی از تحمل این گیاه به یخ‌زدگی اعتبار خوبی داشته باشد. همچنین در گستره دماهای مورد مطالعه هر سه اکوتیپ قادر به بقا بالاتر از ۵۰ درصد بودند و لذا تعیین دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس درصد بقا امکان‌پذیر نبود. تحقیقات بیشتر در مورد تحمل به سرمای اکوتیپ‌های زعفران ایران در شرایط طبیعی و کنترل‌شده و بررسی شاخص‌های تحمل به سرمای زعفران اطلاعات بیشتری را در مورد تحمل به سرمای این گیاه فراهم خواهد کرد.

قدردانی

بودجه این تحقیق از محل اعتبارات معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

- Anderson, J.A., P. Michael, Taliaferro C.M., 1998. Cold hardiness of Midiron and Tifgreen. Horticultural Science. 23(4), 748-750.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z., 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. Plant Science. 165, 1221-1227.
- Behnia, M.R., 1993. Saffron Agriculture. Tehran University Publication, Iran. 360p. [In Persian].
- Bolhasani, A., Bathaie, S.Z., Yavari, I., Moosavi-Movahedi, A.A., Ghaffari, M., 2005. Separation and purification of some components of Iranian saffron. Asian Journal of Chemistry. 17, 725-729.

- Cardona, C.A., Duncan, R.R., Lindstrom, O., 1997. Low temperature tolerance assessment in paspalm. *Crop Science*. 37, 1283-1291.
- Eugenia, M., Nunes, S., Ray Smith, G., 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Science*. 43, 1349-1357.
- Izadi-Darbandi, A., Yusefsani, M., Nezami, A., Moosavi, M.J., Keykhah, F., Nezami, S., 2011. The effects of freezing stress on Sweet William (*Dianthus barbatus*) under controlled conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 4(2), 117-125. [In Persian with English Summary].
- Jvanmard, S., Ahmadiyan, J., Malboosi, S., Dashtiyani, D., 2002. Study and risk comparison of saffron agronomy in south of Khorasan province. Proceedings of the 2th Saffron congress, 2 -3 Dec. 2002. Ghaen, Iran.
- Kafi, M., Rashed Mohassel, M.H., Koocheki, A., Mollafilabi, A., 2002. Saffron Production and Processing. Ferdowsi University of Mashhad Publication, Iran. 279p. [In Persian].
- Mckersie, B.D., Leshem, Y.Y., 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Nayyar, H., Bains, T.S., Kumar, S., 2005. Chilling stressed chickpea seedling: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*. 54, 275-285.
- Nezami, A., Azizi, G., Siahmarghooee, A., and Mohamadabadi, A.A., 2010. Effects of freezing stress on electrolyte leakage of fennel (*Foeniculum vulgare*). *Iranian Journal of Field Crops Research*. 8, 587-593. [In Persian with English Summary].
- Nezami, A., Borzooei A., Jahani Kondori, M., Azizi, M., Javad Moosavi, M., 2009. Evaluation of freezing tolerance of canola (*Brassica napus* L.) cultivars after cold acclimation under controlled conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 7(2), 711-722. [In Persian with English Summary].
- Nezami, A., Borzooei A., Jahani Kondori, M., Azizi, M., Sharif, A., 2007. Electrolyte leakage as an index of freezing damage in canola (*Brassica napus* L.). *Iranian J. Field Crops Research*. 5(1), 167-175. [In Persian with English Summary].
- Palta, J.A., Kobata, T., Turner, N.C., Fillery, I.R., 1994. Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by phostanthesis water deficits. *Crop Science*. 34, 118-124.
- Pietsch, G., Anderson, N.O., Li, P.H., 2009. Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura coccinea* and *Gaura drummondii*. *Scientia Horticulture*. 120, 418-425.
- Rife, C.L., Zeinali, H., 2003. Cold tolerance in oilseed rape over varying acclimation durations. *Crop Science*. 43, 96-100.
- Rezvan-Beydokhti, S., Nezami, A., Kafi, M., Khazaii, H.R., 2011. Effect of freezing stress on electrolyte leakage of Persian shallot (*Allium altissimum* Regal.) under controlled condition. *Agroecology Journal* 3, 371-382. [In Persian with English Summary].
- Shashikumar, K., Nus, J.L., 1993. Cultivar and winter cover effects on Bermuda grass cold acclimation and crown moisture content. *Crop Science*. 33, 813-817.
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Webb, M.S., 1993. Redesigning crops for increased tolerance to freezing stress. PP. 697-714. In M.B. Jackson and C.R. Black (eds.), *Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate*. Springer-Verlag, Berlin.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A., Kawamura, Y., 2006. Responses of plasma membrane to low temperature. *Physiologia. Plantarum*. 126, 81-89.