Plant Production Technology/Volume 24/Issu 2/Pages 141-159/Autumn and Winter 2025
https://doi.org/10.22084/ppt.2024.30080.2141

ORIGINAL RESEARCH PAPER

The Effect of Cold Stress on Some Physiological Traits in Different Populations of *Narcissus Tazetta*

Zabet[1*], M., Najafi[2], F., Alizadeh[3], Z. and Khazaii[4], M.

1, 2, 3 and 4. Associate Professor, Former Master of Student, Assistant Professor and Instructor, Respectively, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment ,University of Birjand, Birjand, Iran
*: Corresponding Author Email: mzabet@birjand.ac.ir

Received: 2024/11/02 Accepted: 2024/12/14

Introduction
Iran has a wealth of flowers and wild plants and has valuable genetic resources. The Narcissus flower, known as the *Narcissus tazetta*, is considered one of the most important ornamental and medicinal plants from the family of *Narcissus tazetta* in temperate regions. The cold is one of the abiotic stresses that cause significant damage to the country's economy and production cycle every year, and most plants in temperate regions cannot successfully withstand freezing temperatures. To obtain a resistant plant, the most effective approach is to investigate and explore the genetic resource of plants that are cold-tolerant. The objective of this study was to investigate the cold tolerance of various populations collected from various parts of Iran.

Materials and Methods
This research was carried out in the molecular plant breeding laboratory and greenhouse of the Plant Production and Genetics Department, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Birjand during 2018-2019. The factor A was included 13 narcissus populations (Azadshahr, Shehlai Shomal, Shastpar Shomal, Shiraz 1, Shiraz 2, Yasouj, Yasouj small perfume, Tabase Golshan, Khusf 1, Khusf 2, Behbahan 1, Behbahan 2 and Gachsaran) and the factor B was included four temperature levels (environment temperature= control, +5, zero and -5 °C). Five leaves were taken from each pot and placed in a refrigerator at temperatures +5°C, 0°C, and -5°C for 5 hours. The measured traits included relative leaf water content, ion leakage, amount of chlorophyll a (mg/gr FW), chlorophyll b (mg/gr FW), total chlorophyll (mg/gr FW), carotenoid (mg/gr FW), chlorophyll a / total chlorophyll, total chlorophyll/carotenoid and percent of chilling stress. Data analysis was performed using the statistical software SAS9.4, Excelv2010, and SPSSv26. Mean comparisons were conducted using Duncan's Multiple Range test, correlation analysis by the Pearson method, and cluster analysis based on the mean traits in both stress and normal environments. It is worth noting that the mean values for the treatments at +5°C, 0°C, and -5°C were considered as stress conditions, while environment temperature was regarded as the normal environment.

Results and Discussion
The analysis of variance showed that there was a significant difference in all traits except for the amount of phenol and malondialdehyde among different archetypes. The temperature had a significant effect on all traits, and population-temperature interactions were significant in all traits except malondialdehyde and total soluble sugars. The highest value of osmotic potential (in the negative direction), the amount of phenol, malondialdehyde, proline and total soluble sugars in treatment 4 (-5°C) and the lowest value of these traits in treatment 1 (the control treatment or environment temperature, 22°C) were observed, respectively. The highest and the lowest of chilling stress percent were observed during February and December, respectively. In other words, with the decrease in temperature, the amount of the aforementioned traits and the Chilling stress percent increased. The correlation and regression analysis revealed that the proline trait was the most significant factor that contributed to Chilling stress in both normal and stress conditions. The cluster analysis grouped the populations in three clusters in both normal (environment temperature) and stress (three temperature treatments +5, zero and -5) conditions. The populations Yasouj, Tabase Golshan, Shiraz1, small aromatic of Yasouj, Shastpar Shomal, Azadshahr and Khosuf1, Gachsaran, and Shehlai Shomal, Shiraz2, Behbahan2, Khosf2, Behbahan1 were placed in the first, second and third clusters, respectively. Cluster analysis revealed that populations with similar chilling stress percent were clustered together, and geographical proximity and closeness were not related to this issue.

Conclusion

In this study, with decreasing temperature, amounts of evaluated traits increased, which was known as one of the methods of cold tolerance in narcissus. The proline trait was more important than other traits, and therefore its measurement is suggested in future studies related to cold in Narcissus. In the context of cold resistance, the populations Khusf 1, and Gachsaran were the best and the populations Yasouj, Tabase-Golshan, Shiraz1, small aromatic Yasouj, Shastpar Shomal, and Azadshahr were the worst populations, respectively. The populations of Shehlai Shomal, Shiraz 2, Behbahan 2, Khusf 2 and Behbahan 1 were recognized as intermediate populations. Based on all analyses, the Gachsaran population was the most resistant population, while the Tabase-Golshan population was the most susceptible population in this investigation. The examination of populations showed that there was enough diversity among these populations, and the cold resistance of populations varied across regions. Due to the increasing importance of medicinal plants and ornamental flowers and climate variability, it is recommended that this test be done in different years, temperatures and environments to determine the superior population. Furthermore, the population Gachsaran (resistant) and Tabase-Golshan (sensitive) and the traits osmotic potential and proline (important identified in this study) to be further analyzed.

Keywords: Osmotic Potential, Proline, Soluble Sugars, Malondialdehyde.

Citations: Zabet, M., Najafi, F., Alizadeh, Z. and Khazaii, M. (2025). The Effect of Cold Stress on Some Physiological Traits in Different Populations of *Narcissus Tazetta*. *Plant Production Technology*, 24(2), 141-159. https://doi.org/10.22084/ppt.2024.30080.2141

© 2022 The Author(s). Bu- Ali Sina University Publication. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Online ISSN: 2476-5651 **Print ISSN:** 2476-6321

فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد بیست و چهارم/ شمارهٔ دوم/ صفحات ۱۴۱-۱۵۹/ پاییز و زمستان ۱۴۰۳
https://doi.org/10.22084/ppt.2024.30080.2141

اثر تنش سرما بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف نرگس شیراز (*Narcissus tazetta*)

The Effect of Cold Stress on Some Physiological and Biochemical Traits in Different Populations of *Narcissus Tazetta*

محمد ضابط[1*]، فروغ نجفی[2]، زهره علیزاده[3] و مسعود خزاعی[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۴
(مقاله پژوهشی)

چکیده

گل نرگس یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی و دارویی از خانواده نرگسیان می‌باشد. سرما یکی از تنش‌های غیرزیستی است که همه‌ساله خسارات قابل‌توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشور تحمیل می‌کند. آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با دو فاکتور در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند طی سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ انجام شد. فاکتور A شامل ۱۳ اکوتیپ نرگس (آزادشهر، شهلای شمال، شصت‌پر شمال، شیراز یک، شیراز دو، یاسوج، کوچک‌عطری یاسوج، طبس، خوسف یک، خوسف دو، بهبهان یک، بهبهان دو و گچساران) و فاکتور B شامل چهار سطح دمایی (شاهد (دمای محیط)، مثبت پنج، صفر و منفی پنج درجه سانتی‌گراد) بود. صفات پتانسیل اسمزی، پرولین، مالون دی‌آلدئید، قندهای محلول، فنل و درصد سرمازدگی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان‌داد که با کاهش دما کلیه صفات افزایش می‌یابند. پتانسیل اسمزی و پرولین مهم‌ترین صفات تأثیرگذار بر سرمازدگی بودند. اکوتیپ‌های یاسوج، طبس‌گلشن، شیراز یک، کوچک عطری یاسوج، شصت‌پر شمال و آزادشهر حساس، اکوتیپ‌های خوسف دو و گچساران مقاوم و اکوتیپ‌های شهلای شمال، شیراز دو، بهبهان دو، خوسف دو و بهبهان یک اکوتیپ‌هایی حد واسط در مقاومت به سرمازدگی شناخته شدند. به‌طورکلی، اکوتیپ گچساران مقاوم‌ترین و اکوتیپ طبس‌گلشن حساس‌ترین اکوتیپ نسبت‌به سرمازدگی شناخته‌شد. توصیه می‌گردد که مقدار تنش در مراحل مختلف رشد گیاه بررسی و آنتی‌اکسیدان‌ها و متابولیت‌های دیگر نیز مدّنظر قرار گیرد. محققینی که علاقمند به تحقیق در زمینه تنش سرما هستند، حتما اکوتیپ‌ها (گچساران مقاوم و طبس گلشن حساس) و صفات مهم شناسایی‌شده (پتانسل اسمزی و پرولین) در این مطالعه را بیشتر مورد واکاوی قرار دهند.

واژه‌های کلیدی: پتانسیل اسمزی، پرولین، قندهای محلول، مالون دی‌آلدئید.

ارجاع به مقاله: ضابط، م.، نجفی، ف.، علیزاده، ز. و خزاعی، م (۱۴۰۳). اثر تنش سرما بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف نرگس شیراز (*Narcissus tazetta*)، *مجله فنآوری تولیدات گیاهی*، ۲۴(۲)، ۱۴۱-۱۵۹. https://doi.org/10.22084/ppt.2024.30080.2141

حق نشر متعلق به نویسنده (گان) است و نویسنده تحت مجوز Commons Creative License Attribution (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) به مجله اجازه می‌دهد مقاله‌ی چاپ شده را در سامانه به اشتراک بگذارد، منوط بر اینکه حقوق مؤلف اثر حفظ و به انتشار اولیه مقاله در این مجله اشاره شود.

شاپا الکترونیکی: ۲۴۷۶-۵۶۵۱ **شاپا چاپی:** ۲۴۷۶-۶۳۲۱

۱، ۲، ۳ و ٤. به‌ترتیب دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و مربی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
*: نویسنده مسئول Email: mzabet@birjand.ac.ir

۱. مقدمه

ایران یکی از کشورهای غنی در زمینه گل و گیاهان وحشی است و منابع ژنتیکی بسیار ارزشمندی دارد. گل نرگس یکی از گیاهان زینتی مناطق معتدل است. نرگس شیراز (*Narcissus tazetta* L) از خانواده آماریلیداسه، گیاهی تک‌لپه و چندساله است (Heath and Heath, 2001) و گونه‌های مختلف آن در سرتاسر دنیا به‌جز مناطق گرمسیری رشد می‌کنند (Kamenetsky and Okubo, 2013). گل نرگس به‌صورت گل بریده، باغچه‌ای و گلدانی استفاده می‌شود (Li *et al*., 2012). گل آغازی در نرگس طی ماه‌های تابستان و در دماهای نسبتا بالا انجام می‌گیرد. نرگس به درجه حرارت نسبتاً بالایی (۱۷ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد) برای گل آغازی و تمایز یابی اولیه نیاز دارد (Ebrahimi *et al*., 2014). گل‌های زیبای نرگس علاوه بر ارزش زینتی، به‌علت معطر بودن و تولید اسانس از ارزش دارویی بالایی نیز برخوردار است (Iranpak *et al*., 2012). مهم‌ترین تولیدکنندگان پیاز نرگس انگلستان، هلند، امریکا و ایران می‌باشند. میزان کل تولید گل شاخه بریده نرگس در ایران حدود ٦٧٠ میلیون شاخه بوده که از سطح ٩٦٩ هکتار برداشت می‌شود. خراسان جنوبی با ٤٠/٢ هکتار رتبه پنجم را در کشور به خود اختصاص داده‌است (SKAJO, 2023).

گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی خاصی نیاز دارند و خارج شدن از این محدوده به‌عنوان یک تنش محسوب می‌شود (Seppanen, 2000). سرما یکی از تنش هاست که همه ساله خسارات قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشور تحمیل می‌کند. بیشتر گیاهان در مناطق معتدله نمی‌توانند دمای یخبندان را با موفقیت پشت سر بگذارند، ولی بعد از سازگاری به سرما می‌توانند مقاومت خود را افزایش دهند (Kexuan *et al*., 2006). در پاسخ به تنش سرما علایم ظاهری متنوعی مثل جوانه‌زنی ضعیف بذر، گیاهچه‌های کوتاه، زردشدن برگ‌ها (کلروز)، کاهش توسعه برگ‌ها و پژمردگی مشاهده می‌شود که ممکن است منتج به مرگ بافت (نکروز) شوند (Yadav, 2010).

یکی از پارامترهای شناسایی تحمل به سرما پرولین است که نقش اساسی در تنظیم اسمزی بازی می‌کند. پرولین اسیدآمینه ذخیره شده در سیتوپلاسم است و احتمالاً در حفاظت از ساختمان ماکرومولکول‌ها و هیدروکسی پرولین در سنتز دیواره سلولی نقش دارد (Heuer, 1994). از شاخص پرولین به‌منظور بررسی اثرات تنش‌های محیطی که میزان آب در دسترس گیاه را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد، استفاده می‌شود. پرولین در مقایسه با سایر اسمولیت‌های سازگارکننده متداول به‌ویژه قندهای معمولی و قندهای الکلی از کارایی بالاتری جهت حفاظت در برابر تنش برخوردار است (Delauney and Verma, 1993). بررسی تنش سرما بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک سه ژنوتیپ برگزیده بزرک[1] نشان داد که با کاهش دما از ۲۵ به منفی دو درجه سانتی‌گراد تغییر معنی‌داری در هیچ یک از صفات مورد بررسی دیده نشد، اما با کاهش دما از صفر به ۲/۵- در ژنوتیپ‌های حساس به سرما قندهای محلول، پرولین و مالون دی‌آلدهید بیشتر از ژنوتیپ‌های مقاوم افزایش یافت (Salimi *et al*., 2019). در ارزیابی مقاومت به سرمازدگی و تعیین مقدار پرولین در جوانه های زایشی ۲۳ ژنوتیپ گلابی درگزی، ژنوتیپ درگز ۲۰ بالاترین مقدار پرولین را در جوانه‌های زایشی داشت. مقاومت نسبت به سرمازدگی در ژنوتیپ‌های مختلف درگزی متفاوت بودند که این امر می‌تواند ناشی از منشاء ژنتیکی متفاوت و یا جهش در کلون‌های این رقم باشد (Khorshidi *et al*., 2016).

بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بافت گیاهی می‌تواند نشان‌دهنده مقدار تخریب غشاء سلولی باشد (Bhattacharjee and Mukherjee, 2002). افزایش محتوای مالون دی‌آلدهید شاخصی از آسیب غشای سلولی توسط ROS و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است (Olennikov *et al*., 2017). تجمع کربوهیدرات‌های محلول نیز یکی از بهترین واکنش‌های شناخته‌شده‌ی گیاهان به تنش سرما است (Tabaei-Aghdael *et al*., 2003). کربوهیدرات‌ها از جمله محافظت کننده‌های اسمزی هستند که تجمع آنها در پاسخ به تنش‌های محیطی در ارتباط با تنظیم اسمزی و یا حفاظت غشاهای سلولی می‌باشد (Kerepesi *et al*., 2004). افزایش مقاومت به سرما با میزان کربوهیدرات‌های محلول در ارتباط است و کربوهیدرات‌هایی مثل ساکاروز، سوربیتول و رافینوز اولین زیر واحدهای محافظت‌کننده گیاه می‌باشند (Levitt, 1980). مطالعات نشان داده است که قندهای محلول

1. *Linum usitatissimum*

دارای وزن مولکولی پایین، نقش کلیدی در تحمل به دمای پایین در گیاهان برعهده دارند. غلظت گلوکز و ساکارز ممکن است چندین بار در معرض دمای پایین افزایش یابد (Cao *et al.*, 2014). تجمع ساکاروز و قند باعث تقویت عملکرد حفاظت کننده‌های اسمزی می‌گردد و به‌دنبال آن باعث ثبات غشای سلولی و حفظ فشار تورژسانس می‌گردد (Emami Bistgani *et al.*, 2017). طی یک مطالعه تحت تنش سرما، سطح مونوساکارید و الیگوساکارید گیاهچه‌های افرای سرخ[1] افزایش یافت. سازگاری با سرما باعث تغییر در پلی‌ساکاریدهای غیرساختاری یا ذخیره شده در گیاهان می‌شود، به‌عنوان مثال نشاسته یا پلی‌ساکارید دیواره یونولین و دیواره سلولی مانند پکتین و پلیمرهای مرتبط با پکتین دچار تغییراتی می‌شوند (Le Gall *et al.*, 2015).

کاهش دما و سازگاری به سرما تجمع فنل کل را القاء می‌کند. تیمار سرمایی سبب تغییرات معنی‌دار در مقدار فنل کل می‌شود (Cansev *et al.*, 2012). گیاهان قادر هستند در شرایط تنش با تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر ترکیبات فنلی از ساختارهای ملکولی خود در مقابل رادیکال‌های فعال تولیدشده در شرایط تنش محافظت کنند (Bettaieb *et al.*, 2010). بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی پیج (از پیوند دو نوع نارنگی است)[2] تحت تنش دمای پایین نشان داد که با کاهش دما مقدار فنل گیاه افزایش پیدا می‌کند (Tadjvar *et al.*, 2011). در گیاه سرخار گل با افزایش شدت تنش تا دمای منفی چهار درجه سانتی‌گراد، مقدار فنل به‌عنوان آنتی‌اکسیدان کاهش معنی‌دار نشان داد. این ترکیب آنتی‌اکسیدانی بیشترین مقدار کاهش را در دمای منفی چهار درجه سانتی‌گراد نشان داد که نسبت‌به تیمار شاهد ۹/۵ درصد کاهش داشت. در واقع کاهش مقدار فنل کل را می‌توان به افزایش تولید ROS و خسارت اکسیداتیو در سرخارگل‌های تحت تنش سرما اشاره نمود که موجب افزایش مقدار مالون دی‌آلدهید، پروتئین و فعالیت بیشتر آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز با کاهش گستره دمایی شد (Asadi-Sanam *et al.*, 2015).

در حدود دو سوم از مناطق جهان، سالیانه تحت دماهای زیر نقطه انجماد قرار می‌گیرند و در نیمی از این مناطق، دماهای زیر ۱۲ درجه سانتی‌گراد عامل بروز آسیب به گیاهان می‌باشند (Ashraf and Foolad, 2007). گیاهان توانایی سازگاری نسبت‌به درجه‌های مختلفی از تنش سرما را دارند. بهترین راهبرد برای دستیابی به گیاه مقاوم، بررسی و جستجوی خزانه ژنتیکی گیاهان برای تحمل به سرما است.

به‌طورکلی مطالعات اندکی در زمینه‌های گوناگون بر روی گل نرگس انجام شده‌است. تنش سرما یکی از مهمترین تنش‌ها بوده که هر ساله خسارات زیادی وارد می‌کند و تهدیدی برای تولید پایدار محصولات مختلف گیاهی است. بهترین راهبرد برای دستیابی به گیاه مقاوم، بررسی و جستجوی خزانه ژنتیکی پیرامون گیاه متحمل‌به سرما است. باتوجه‌به این امر، تأثیر تنش سرما بر مقدار پتانسیل اسمزی، پرولین، مالون دی‌آلدئید، قندهای محلول و مقدار فنل کل جمعیت‌های مختلف گل نرگس و در نهایت ارتباط بین مقاومت به سرما و صفات اندازه‌گیری شده مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد گیاهی

این تحقیق طی سال ۹۸-۱۳۹۷در گلخانه و آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی گروه تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه بیرجند انجام شد. پیازهای جمعیت‌های مختلف نرگس از مناطقی که کشت و زرع آن مرسوم بود جمع‌آوری شد. این جمعیت‌ها شامل نرگس آزادشهر، شهلای شمال، شصت‌پر شمال، دو نمونه از شیراز با نام شیراز یک، شیراز دو، یاسوج، کوچک‌عطری یاسوج، طبس، دو نمونه از خوسف با نام خوسف یک، خوسف دو، دو نمونه از بهبهان با نام بهبهان یک و بهبهان دو و یک جمعیت از گچساران بود.

۲-۲. طرح آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور A شامل ۱۳ جمعیت مختلف نرگس آزادشهر، شهلای شمال، شصت‌پر شمال، شیراز یک، شیراز دو، یاسوج، کوچک‌عطری یاسوج، طبس، خوسف یک، خوسف دو، بهبهان یک، بهبهان دو، گچساران و فاکتور B شامل چهار

1. *Acer palmatum*
2. *Sunburst Tangerines*

سطح دمایی شاهد (دمای معمول محیطی)، مثبت پنج، صفر و منفی پنج درجه سانتی‌گراد بود.

۲-۳. اجرای آزمایش

سه عدد سوخ به تاریخ ۸/۱ /۱۳۹۸ درون گلدان‌هایی با اندازه دهانه ۲۳ و ارتفاع ۲۱/۵ سانتی‌متر کشت شدند و به‌مدت چهار هفته برای رشد اولیه و استقرار خوب گیاه، از آب شرب با EC برابر با ۱/۱ دسی‌زیمنس و PH برابر با ۷/۷۹ آبیاری شدند. از خاک مزرعه به همراه ورمی‌کمپوست به نسبت یک:یک به‌عنوان خاک گلدان‌ها استفاده شد. به‌منظور ایجاد تنش سرمایی پس از حدوداً ۳۰ الی ۴۰ روز بسته به جمعیت موردنظر و رسیدن به مرحله چهار برگی، نمونه‌های برگی (چندین قطعه برگ) به طور تصادفی انتخاب و تیمارهای مورد نظر بر روی برگ‌های جداشده از گیاه اعمال شد (Zeinanloo and Tajik, 2022). برای هر یک از تیمارهای مثبت پنج، منفی پنج و صفر درجه سانتی‌گراد نمونه‌های برگی به‌مدت پنج ساعت در دماهای مدنظر قرار گرفتند و پس از گذشت زمان مدّنظر اندازه‌گیری‌ها انجام شد.

۲-۴. صفات مورد اندازه‌گیری

صفات اندازه‌گیری‌شده شامل پتانسیل اسمزی، پرولین، مالون دی‌آلدئید، قندهای محلول کل، فنل کل و درصد سرمازدگی بود. برای بررسی مقاومت به سرما، نمونه‌های کشت‌شده در گلدان‌ها به محیط آزاد منتقل شدند و مقدار سرمازدگی طی سه مرحله در ماه آذر، دی و بهمن موردارزیابی قرار گرفت. هدف از این کار این بود که شرایط مشابه با آنچه در سه فصل مورد نظر در مکان‌های کشت نرگس اتفاق می افتد، باشد. متوسط دمای حداقل، حداکثر و میانگین دمای بیرجند طی این سه ماه در جدول یک آمده است. از مقیاس صفر الی ۱۰۰ برای سرمازدگی استفاده‌شد. به نمونه‌های با سرمازدگی کامل عدد ۱۰۰ و به نمونه‌هایی که سرمازدگی در آنها رویت نشد، عدد صفر و به سایر نمونه ها بر حسب مقدار سرمازدگی عددی بین صفر تا ۱۰۰ داده‌شد. برای اندازه‌گیری درصد سرمازدگی، مقدار زردشدن و در نهایت نکروزشدن برگ‌ها، پژمردگی برگ‌ها و دمگل‌ها و مقدار آبدارشدن سطح برگ‌ها مورد توجه قرار گرفت و در این زمینه از افراد خبره‌ی محلی نیز کمک گرفته شد.

Table 1: The minimum, maximum and average monthly temperature of Birjand meteorological station in winter 2023

Month	Average minimum temperature°C	Average maximum temperature°C	Average annual temperature°C
November	1.36	14.27	7.81
December	-1.99	11.09	4.55
January	-0.68	14.59	6.95

پتانسیل اسمزی به روش (Curtis, 2003) محاسبه شد (رابطه یک). یک گرم از برگ‌تر با استفاده از نیتروژن مایع خرد گردید. نمونه‌ی پودرشده در سیلندر سرنگ دو میلی‌گرمی که در انتهای آن کاغذ صافی بود، قرار داده‌شد و با فشاردادن پیستون سرنگ از نمونه عصاره گرفته شد و با دستگاه اسمومتر قرائت گردید. با استفاده از رابطه زیر (معادل وانت هوف) عدد به‌دست آمده به مگا پاسکال تبدیل شد.

رابطه یک: $\varphi S = -MRIT$

M عدد مولاریته (عدد اسمومتر تقسیم بر۱۰۰۰)، T دما برحسب کالوین، I ضریب یونیزاسیون و R ثابت گازها است.

اندازه‌گیری پرولین به‌روش (Bates *et al.*, 1973) انجام شد. ۰/۵ گرم برگ تازه همراه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک سه درصد سائیده‌شد. محلول به‌دست‌آمده صاف و سپس دو میلی‌لیتر از محلول صاف شده با دو میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک در یک لوله آزمایش ریخته و به‌مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از سرد شدن محلول، چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و لوله آزمایش ۱۵ تا ۲۰ ثانیه به‌شدت به‌هم زده شد. جذب نوری محلول روئی واکنش در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از محلول بلانک تولوئن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و غلظت اسید آمینهٔ پرولین آزاد نمونه با استفاده از یک منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین و مقدار آن براساس رابطه‌ی دو، در گرم وزن‌تر نمونه محاسبه گردید.

رابطه دو:

$$A = \frac{B \times C \div 115/5}{D \div 5}$$

A: مقدار پرولین بر حسب میکرومول بر گرم مادهی تر، B: عدد خوانده شده توسط دستگاه، C: مقدار تولوئن مصرفی، D: وزن نمونه بر حسب گرم میباشد.

اندازهگیری مالون دیآلدئید بهروش (Heath and Packer, 1968) صورت گرفت. ۰/۲ گرم از بافت تر گیاهی در پنج میلیلیتر TCA یک درصد سایده و بهمدت ده دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. روی یک میلیلیتر از محلول رویی چهار میلیلیتر از محلول TCA ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید پنج درصد اضافه شد. نمونهها بهمدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد گذاشته و بلافاصله در یخ سرد قرار داده شد و پنج دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و در نهایت جذب نمونهها در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر (مجموعه قرمز تیوباربیتوریک – مالون دیآلدئید) و ۶۰۰ نانومتر (بقیه رنگیزههای غیراختصاصی) توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. مقدار مالون دیآلدئید از کسر عدد اول و دوم بهدست آمد.

اندازهگیری قند محلول کل به روش (Mocready *et al.*, 1950) انجام شد. برای اندازه گیری قند کل، ۰/۲ میلیلیتر از عصارهی تغلیظ شده با سه میلیلیتر معرف آنترون (۱۵۰ میلیگرم آنترون در ۱۰۰ میلیلیتر سولفوریک اسید ۱۳ مولار) مخلوط و بهمدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجهی سانتیگراد قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونهها، میزان جذب هر یک از آنها در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت میزان قندهای محلول کل با منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد.

سنجش محتوای فنل کل با روش (Singleton and Rossi, 1965) انجام شد. ۰/۰۵ گرم از بافت تازهی برگ گیاه در دو میلیلیتر متانول ۸۰ درصد با معرف فولین – سیوکالتو ساییده و همگن شد و در بن ماری در دمای ۷۰ درجهٔ سانتیگراد بهمدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه بهمدت ۱۵ دقیقه به یک میلیلیتر از محلول متانولی رویی، ۱/۸ میلیلیتر آب مقطر و ۰/۲ میلیلیتر معرف فولین اضافه و محلول بهمدت پنج دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شد. در پایان یک میلیلیتر سدیم کربنات ۱۲ درصد به محلول بالا اضافه و پس از دو ساعت قرارگرفتن در دمای آزمایشگاه، جذب محلول حاصل در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازهگیری شد. غلظت فنل براساس میلیگرم گالیک اسید بر گرم وزن تر بیان شد و از گالیک اسید برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد.

۲-۵. تجزیه آماری

پس از بررسی نرمال بودن دادهها تجزیه و تحلیل دادهها با نرم افزارهای آماری $SAS_{9.4}$، Excel و Spss انجام شد. مقایسه میانگینها مطابق با آزمون چند دامنهی دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام پذیرفت.

۳. نتایج

۳-۱. تجزیه واریانس

تجزیه واریانس صفات مختلف نشان داد که بین جمعیتهای مختلف به غیر از صفات مقدار فنل و مالون دیآلدئید تفاوت آماری معنیدار وجود داشت. دما بر تمامی صفات اثر معنیدار داشت و اثرات متقابل جمعیت × دما در تمامی صفات به غیر از صفات مالون دیآلدئید و قندهای محلول کل معنیدار بود (جدول ۲). تجزیه واریانس صفت درصد سرمازدگی نیز نشان داد که بین جمعیتهای مختلف تفاوت آماری معنیدار وجود داشت. دما بر این صفت اثر معنیدار داشت و اثرات متقابل جمعیت × دما نیز برای این صفت معنیدار بود (جدول ۳). بررسی مقادیر ضریب تغییرات نشانداد که جمعیتهای مختلف دارای ضریب تغییرات نسبتاً بالایی در اکثر صفات بودند و لذا از تنوع لازم برای مقاومت به سرما برخوردار بودند. در صفات مالون دیآلدئید بالاترین مقدار تنوع وجود داشت و پایینترین ضریب تغییرات در مقدار فنل مشاهده شد.

Table 2: Analysis of variance of different traits in narcissus populations under different temperature

S.O.V	D.F	MS				
		Proline (µMol/gr)	Soluble Sugar (mgr/gr)	Malondialdehyde (nMol/gr)	Phenol (mgr/gr)	Osmotic Potential (MPa)
A=Population	12	4.58*	9.75**	7.25ns	0.20ns	0.16**
B=Temperature	3	2592.26**	1824.97**	1018.13**	259.80**	4.66**
AB=Population×Temperature	36	3.88**	4.44ns	4.96ns	0.46**	0.05**
Error	104	2.10	3.81	6.07	0.18	0.01
CV	-		15.61	24.24	8.85	8.67

ns, *and** are non-significant, significant at 5% and 1% levels, respectively.

Table 3: Analysis of variance of chilling stress in narcissus populations

S.O.V	D.F	MS
		Chilling stress (%)
Population (A)	12	728.42**
Month (B)	2	11453.85**
A ×B	24	72.61**
Error	78	19.25
CV	19.55	-

ns, *and** are non-significant, significant at 5% and 1% levels, respectively

۳-۲. مقایسه میانگین جمعیت‌ها

مقایسه میانگین جمعیت‌های مختلف نرگس نشان داد که در همه دماها بین جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بالاترین مقدارپتانسیل اسمزی مربوط به جمعیت یک (بهبهان دو) و کمترین مقدار آن مربوطه به جمعیت هشت (طبس‌گلشن) بود. بالاترین مقدار فنل مربوط به جمعیت نه (خوسف یک) و کمترین مقدار آن مربوط به جمعیت یک (شهلای شمال) بود. بالاترین مقدار مالون دی‌آلدئید مربوط به جمعیت یک (بهبهان یک) و کمترین مقدار آن مربوطه به جمعیت یک (شهلای شمال) بود. بالاترین مقدار قندهای محلول کل مربوط به جمعیت یک (خوسف دو) و کم‌ترین مقدار آن مربوطه به جمعیت یک (شهلای شمال)، بالاترین مقدار پرولین مربوط به جمعیت پنج (شیراز دو) و کمترین را جمعیت دو (شصت‌پر شمال)، بالاترین درصد سرمازدگی مربوط به جمعیت هشت (طبس‌گلشن) و کمترین مقدار آن مربوطه به جمعیت ۱۳ (گچساران) بود (**جدول ٤**).

Table 4: Mean comparison of different populations of narcissus

Populations	Phenol (mgr/gr)	Proline (µMol/gr)	Osmotic potential (MPa)	Malondialdehyde (nMol/gr)	Total soluble sugars (mgr/gr)	Chilling stress (%)
Shehlai North	4.60^{b}	9.03^{bc}	-1.26^{c}	8.58^{b}	10.36^{c}	20.66^{cd}
Shastpar North	5.00^{ab}	8.71^{c}	-1.13^{c}	9.44^{ab}	12.91^{ab}	24.00^{d}
Azadshahr	4.99^{ab}	9.62^{abc}	-1.07^{ab}	10.00^{ab}	12.44^{ab}	24.00^{d}
Shiraz 1	4.85^{ab}	9.07^{bc}	-1.12^{ab}	9.97^{ab}	12.64^{ab}	29.33^{c}
Shiraz 2	4.75^{ab}	10.61^{a}	-1.16^{b}	10.04^{ab}	11.53^{bc}	21.00^{cd}
Small Fragrant Yasouj	4.78^{ab}	9.13^{bc}	-1.28^{c}	9.52^{ab}	12.85^{ab}	28.66^{c}
Yasouj	4.92^{ab}	8.97^{bc}	-1.14^{ab}	11.26^{a}	12.17^{ab}	34.33^{b}
Tabase Golshan	4.74^{ab}	10.26^{ab}	-1.47^{d}	10.02^{ab}	11.80^{bc}	39.00^{a}
Khusf 1	5.05^{a}	9.58^{abc}	-1.31^{c}	9.82^{ab}	12.82^{ab}	10.66^{gh}
Khusf 2	4.79^{ab}	9.57^{abc}	-1.131^{c}	10.66^{ab}	13.94^{a}	17.55^{ef}
Behbahan 1	4.97^{ab}	9.26^{abc}	-1.12^{ab}	11.33^{a}	12.72^{ab}	14.33^{fg}
Behbahan 2	4.82^{ab}	10.33^{ab}	-1.05^{a}	10.42^{ab}	13.15^{ab}	20.77^{cd}
Gachsaran	4.78^{ab}	10.29^{ab}	-1.08^{ab}	11.02^{a}	13.31^{ab}	7.33^{h}

ns, *and** are non-significant, significant at 5% and 1% levels, respectively.

۳-۳. مقایسه میانگین دماها

مقایسه میانگین دماهای مختلف مورد مطالعه نشان داد که در کلیّه صفات بین دماها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در صفات پتانسیل اسمزی (در جهت منفی)، مقدار فنل، مالون دی‌آلدئید، پرولین و قندهای محلول کل، بالاترین مقدار این صفات در تیمار چهار (منفی پنج درجه سانتی‌گراد) و کمترین مقدار این صفات در تیمار یک یا تیمار شاهد (دمای محیط، ۲۲ درجه سانتی‌گراد) مشاهده شد (جدول ٥). با کاهش دما مقدار

این صفات افزایش نشان‌داد، به‌طوری‌که بالاترین پتانسیل اسمزی، فنل، مالون دی‌آلدئید، پرولین و قندهای محلول کل در دمای منفی پنج درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار این صفات در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد یا تیمار شاهد (دمای محیط) دیده‌شد. بیشترین سرمازدگی در طی بهمن ماه و کمترین سرمازدگی در آذر ماه دیده‌شد. در اینجا نیز با کاهش دما درصد سرمازدگی افزایش یافت (شکل ۱).

Table 5: Mean comparison of the different temperatures in narcissus populations

	Temperature	Phenol (mgr/gr)	Proline (µMol/gr)	Osmotic potential (MPa)	Malondialdehyde (nMol/gr)	Total soluble sugars (mgr/gr)	Chilling stress (%)	
1	Control (22°C)	2.22^{d}	2.99^{d}	-0.84^{a}	4.99^{d}	4.99^{d}	Azar	2.69^{c}
2	+5°C	3.64^{c}	5.33^{c}	-1.07^{b}	8.04^{c}	9.38^{c}	Day	31.15^{b}
3	0°C	5.31^{b}	8.81^{b}	-1.18^{c}	10.61^{b}	14.89^{b}	Bahman	33.46^{a}
4	-5°C	8.23^{a}	21.24^{a}	-1.66^{d}	17.01^{a}	20.78^{a}	-	-

ns, *and** are non-significant, significant at 5% and 1% levels, respectively

۳-٤. مقایسه میانگین اثرات متقابل جمعیت × سرما برای صفات در دماهای مختلف

باتوجه‌به آنکه مقایسه میانگین اثرات متقابل جمعیت × سرما در تمامی سطوح دمایی نتایج ملموسی را در پی نداشت، لذا در دو تیمار دمایی منفی پنج و صفر درجه که در بحث مقاومت به سرما از اهمیت بالاتری برخوردار بود، مورد واکاوی قرار گرفت. در دمای منفی پنج درجه بالاترین پرولین را جمعیت شیراز دو و کمترین مقدار را جمعیت‌های شهلای شمال، آزادشهر، شیراز یک، یاسوج، خوسف دو و بهبهان یک و در دمای صفر درجه بالاترین مقدار را جمعیت‌های آزادشهر و گچساران و کمترین مقدار را جمعیت شصت‌پر شمال به خود اختصاص دادند. در صفت مقدار فنل در دمای منفی پنج درجه بالاترین مقدار را جمعیت یاسوج و کمترین مقدار را جمعیت شیراز دو و در دمای صفر درجه تمامی جمعیت‌ها مشابه بودند و تفاوتی نداشتند (**جدول ٦**).

در صفت مقدار مالوندی آلدئید در دمای منفی پنج درجه تمامی جمعیت‌ها مشابه بودند و در دمای صفر درجه بالاترین مقدار را جمعیت‌های خوسف دو، بهبهان یک و بهبهان دو و کمترین مقدار را جمعیت شهلای شمال به خود اختصاص دادند. در صفت مقدار قندهای محلول کل در دمای منفی پنج درجه بالاترین مقدار را جمعیت گچساران و کمترین مقدار را جمعیت‌های یاسوج و آزادشهر و در دمای صفر درجه بالاترین مقدار را جمعیت خوسف دو و کمترین مقدار را جمعیت شهلای شمال به خود اختصاص دادند (جدول ۷).

در صفت پتانسیل اسمزی در دمای منفی پنج درجه بالاترین مقدار را (با علامت منفی) جمعیت یاسوج و کمترین مقدار را (با علامت منفی) جمعیت‌های شهلای شمال، خوسف یک، خوسف دو و گچساران و در دمای صفر درجه بالاترین مفدار را جمعیت شصت‌پر و کمترین مقدار را جمعیت‌های طبس‌گلشن و شهلای شمال به خود اختصاص دادند. در صفت درصد سرمازدگی در ماه دی و بهمن بالاترین سرمازدگی را جمعیت طبس‌گلشن و کمترین سرمازدگی را جمعیت گچساران نشان دادند (جدول ۸). بررسی صفات مختلف نشان می‌دهد که در صفات مختلف، جمعیت‌های مختلفی بالاترین و کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. آنچه مسلّم است این است که بدون در نظر گرفتن رابطه و همبستگی این صفات با درصد سرمازدگی نمی‌توان قضاوت منصفانه‌ای در مورد بهترین و یا بدترین جمعیت ارائه نمود؛ لذا در ادامه مبحث همبستگی صفات و سایر تجزیه‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد تا بتوان نتیجه‌ی منطقی‌تری بر اساس کلّیه صفات ارائه نمود.

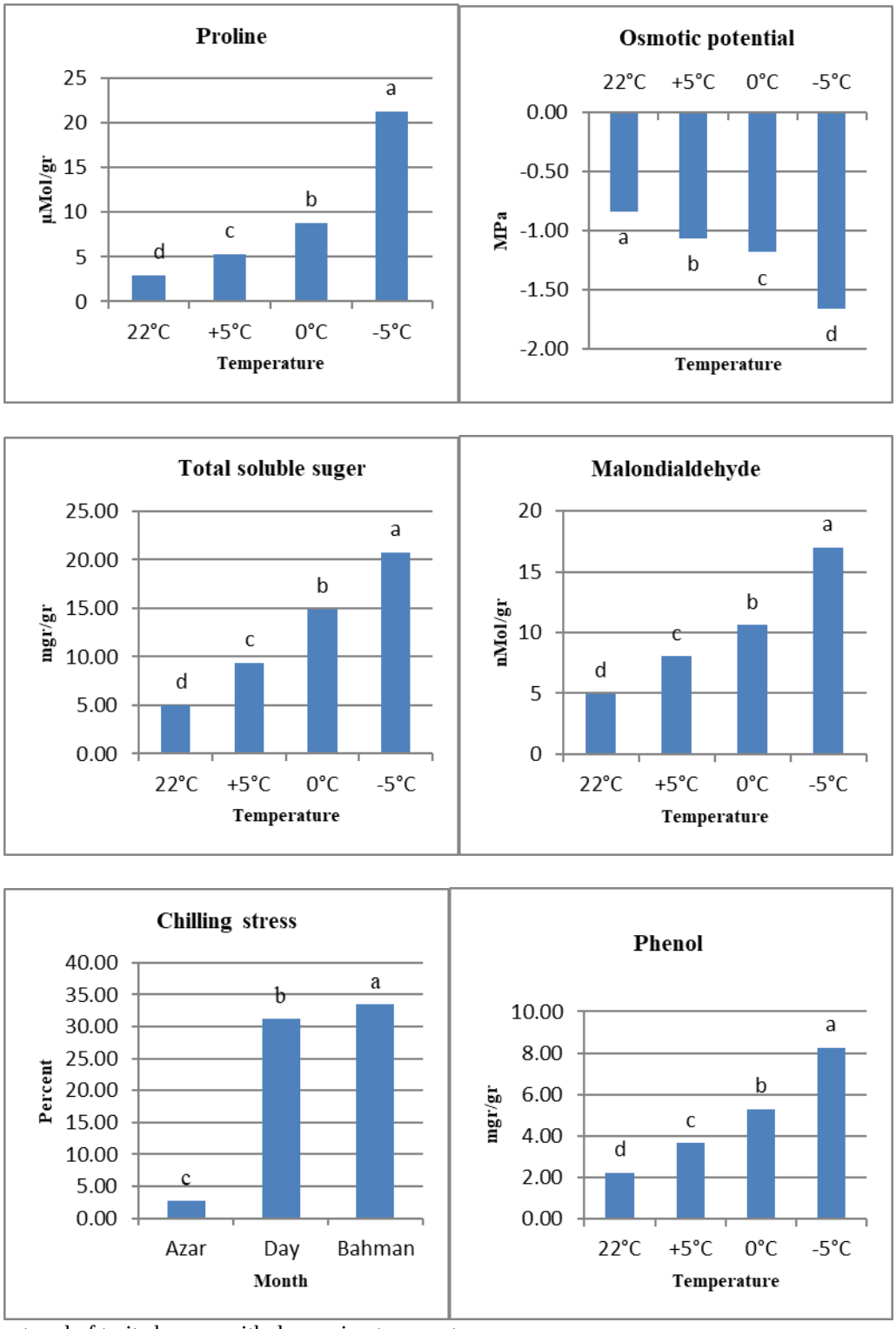

Fig. 1**:** The trend of trait changes with decreasing temperature

Table 6: Mean comparison of population × cold interaction effects for proline and phenol traits

Populations	Proline (µMol/gr)				Phenol (mgr/gr)			
	22°C	+5°C	0°C	-5°C	22°C	+5°C	0°C	-5°C
Shehlai North	2.25^{bc}	4.74^{cd}	9.20^{ab}	19.94^{b}	2.13^{abc}	3.56^{abc}	5.26^{a}	7.46^{de}
Shastpar North	1.51^{bc}	4.21^{d}	6.99^{b}	22.12^{ab}	2.54^{a}	3.72^{abc}	5.44^{a}	8.30^{abcd}
Azadshahr	3.69^{abc}	5.76^{bc}	8.35^{a}	20.68^{b}	2.62^{a}	3.42^{bc}	5.32^{a}	8.61^{abc}
Shiraz 1	2.04^{bc}	5.29^{bcd}	8.47^{ab}	20.50^{b}	2.31^{abc}	4.00^{ab}	5.27^{a}	7.84^{cde}
Shiraz 2	2.08^{bc}	5.26^{bcd}	9.84^{a}	25.29^{a}	2.65^{a}	3.57^{abc}	5.56^{a}	7.24^{e}
Small Fragrant	1.16^{c}	4.51^{cd}	9.19^{ab}	21.69^{ab}	2.28^{abc}	3.25^{c}	4.93^{a}	8.67^{abc}
Yasouj	1.74^{bc}	5.04^{cd}	9.00^{ab}	20.10^{b}	1.92^{abc}	3.62^{abc}	5.08^{a}	9.09^{a}
Tabase Golshan	3.88^{ab}	7.12^{a}	8.23^{ab}	21.81^{ab}	2.44^{ab}	3.47^{abc}	5.24^{a}	7.84^{cde}
Khusf 1	3.85^{ab}	5.35^{bcd}	7.91^{ab}	21.22^{ab}	1.74^{bc}	3.87^{abc}	5.85^{a}	8.79^{ab}
Khusf 2	4.90^{a}	5.21^{bcd}	8.87^{ab}	19.30^{b}	2.00^{abc}	3.87^{abc}	5.28^{a}	8.01^{bcde}
Behbahan 1	3.31^{abc}	4.72^{cd}	10.09^{ab}	18.92^{b}	2.59^{a}	3.55^{abc}	5.02^{a}	8.71^{abc}
Behbahan 2	3.74^{abc}	6.46^{ab}	9.02^{ab}	22.08^{ab}	2.12^{abc}	3.45^{abc}	5.45^{a}	8.27^{abcd}
Gachsaran	3.53^{abc}	5.68^{bc}	9.36^{a}	22.59^{ab}	1.59^{c}	4.07^{a}	5.30^{a}	8.19^{bcd}

Table 7: Mean comparison of population × cold interaction effects for malondialdehyde and total soluble sugars traits

Populations	Malondialdehyde (nMol/gr)				Total soluble sugars (mgr/gr)			
	22°C	+5°C	0°C	-5°C	22°C	+5°C	0°C	-5°C
Shehlai North	3.83^{bc}	7.23^{a}	7.51^{b}	15.77^{a}	3.53^{c}	6.81^{b}	12.04^{c}	19.06^{b}
Shastpar North	4.23^{abc}	5.93^{a}	10.90^{ab}	16.70^{a}	3.86^{bc}	11.25^{a}	15.63^{abc}	20.90^{ab}
Azadshahr	3.47^{c}	8.10^{a}	8.90^{ab}	19.57^{a}	4.60^{abc}	10.16^{ab}	15.89^{abc}	19.13^{b}
Shiraz 1	3.97^{abc}	7.60^{a}	10.23^{ab}	18.07^{a}	5.37^{abc}	11.59^{a}	13.36^{abc}	20.22^{ab}
Shiraz 2	3.97^{abc}	9.73^{a}	10.13^{ab}	16.33^{a}	4.35^{abc}	8.16^{ab}	13.02^{abc}	20.60^{ab}
Small Fragrant	4.10^{abc}	7.70^{a}	9.47^{ab}	16.83^{a}	6.01^{a}	8.61^{ab}	16.27^{ab}	20.53^{ab}
Yasouj	6.67^{ab}	8.33^{a}	10.80^{ab}	19.23^{a}	5.26^{abc}	8.99^{ab}	15.36^{abc}	19.06^{b}
Tabase Golshan	6.73^{a}	8.93^{a}	10.33^{ab}	14.10^{a}	5.79^{ab}	8.77^{ab}	12.69^{bc}	19.96^{ab}
Khusf 1	6.17^{abc}	5.90^{a}	11.47^{ab}	15.77^{a}	4.66^{abc}	10.84^{ab}	14.80^{abc}	21.02^{ab}
Khusf 2	6.13^{abc}	7.73^{a}	12.23^{a}	16.53^{a}	6.32^{a}	10.50^{ab}	17.17^{a}	21.77^{ab}
Behbahan 1	5.90^{abc}	8.60^{a}	12.63^{a}	18.20^{a}	5.22^{abc}	8.16^{ab}	14.80^{abc}	22.71^{ab}
Behbahan 2	3.70^{c}	8.77^{a}	11.76^{a}	17.47^{a}	4.96^{abc}	10.01^{ab}	16.79^{ab}	20.83^{ab}
Gachsaran	6.00^{abc}	9.97^{a}	11.60^{ab}	16.53^{a}	4.96^{abc}	8.16^{ab}	15.78^{abc}	24.37^{a}

Table 8: Mean comparison of population × cold interaction effects for osmotic potential and chilling stress traits

Populations	Osmotic potential (MPa)				Chilling stress (%)		
	22°C	+5°C	0°C	-5°C	Azar	Day	Bahman
Shehlai North	-0.80^{bcde}	-1.06^{bcd}	-1.40^{d}	-1.79^{e}	0.00^{c}	30.00^{de}	32.00^{cd}
Shastpar North	-0.82^{cde}	-0.94^{ab}	-0.99^{a}	-1.76^{de}	0.00^{c}	35.00^{cd}	37.00^{bcd}
Azadshahr	-0.55^{a}	-1.01^{abcd}	-1.07^{ab}	-1.64^{cd}	0.00^{c}	35.00^{cd}	37.00^{bcd}
Shiraz 1	-0.79^{bcde}	-1.12^{bcd}	-1.08^{ab}	-1.49^{ab}	5.00^{c}	40.00^{bc}	43.00^{abc}
Shiraz 2	-0.81^{cde}	-1.03^{abcd}	-1.14^{ab}	-1.66^{cde}	0.00^{c}	30.00^{de}	33.00^{cd}
Small Fragrant	-0.99^{ef}	-1.32^{f}	-1.36^{cd}	-1.46^{ab}	5.00^{c}	40.00^{bc}	41.00^{abc}
Yasouj	-0.93^{def}	-1.04^{abcd}	-1.17^{abc}	-1.44^{a}	10.00^{b}	45.00^{ab}	48.00^{ab}
Tabase Golshan	-1.23^{g}	-1.30^{ef}	-1.40^{d}	-1.72^{cde}	15.00^{a}	50.00^{a}	52.00^{a}
Khusf 1	-1.06^{fg}	-1.16^{de}	-1.25^{bcd}	-1.79^{e}	0.00^{c}	15.00^{gh}	17.00^{fg}
Khusf 2	-1.09^{fg}	-1.12^{cd}	-1.24^{bcd}	-1.80^{e}	0.00^{c}	25.00^{ef}	27.00^{de}
Behbahan 1	-0.72^{abcd}	-0.97^{abc}	-1.12^{ab}	-1.69^{cde}	0.00^{c}	20.00^{fg}	23.00^{ef}
Behbahan 2	-0.57^{ab}	-0.94^{ab}	-1.10^{ab}	-1.58^{bc}	0.00^{c}	30.00^{de}	32.00^{cd}
Gachsaran	-0.60^{abc}	-0.87^{a}	-1.08^{ab}	-1.79^{e}	0.00^{c}	10.00^{h}	12.00^{h}

۳-۵. تجزیه همبستگی و رگرسیون

تجزیه همبستگی بین صفات مختلف نشان داد که در شرایط نرمال (شاهد) سرمازدگی با پرولین همبستگی منفی و در شرایط تنش (سه تیمار دمایی مثبت پنج، صفر و منفی پنج) سرمازدگی با پتانسیل اسمزی همبستگی منفی و با پرولین همبستگی مثبت معنی‌داری داشت (جدول ۹).

Table 9: Correlation analysis of different traits in narcissus populations in normal and stress conditions

Traits	Condition	Osmotic Potential (MPa)	Proline (µMol/gr)	Malondialdehyde (nMol/gr)	Soluble Sugar (mgr/gr)	Phenol (mgr/gr)	Chilling stress (%)
Proline (µMol/gr)	Normal	-0.08					
	Chilling	-0.89**					
Malondialdehyde (nMol/gr)	Normal	-0.39*	0.27				
	Chilling	-0.78**	0.93**				
Soluble Sugar (mgr/gr)	Normal	-0.22	0.11	0.08			
	Chilling	-0.81**	0.90**	0.88**			
Phenol (mgr/gr)	Normal	0.09	-0.07	-0.22	-0.19		
	Chilling	-0.84**	0.95**	0.94**	0.93**		
Chilling stress (%)	Normal	-0.26	-0.33*	-0.11	0.15	0.28	1
	Chilling	-0.32*	0.32*	0.27	0.24	0.29	1

ns, *and** are non-significant, significant at 5% and 1% levels, respectively

نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون نشان داد که در هر دو شرایط نرمال و تنش تنها صفت پرولین وارد مدل گردید و لذا مهم‌ترین صفت موثر بر سرمازدگی شناخته شد. پرولین در شرایط نرمال با علامت منفی و در شرایط تنش با علامت مثبت وارد مدل گردید. باتوجه‌به همبستگی منفی و مثبت آن با درصد سرمازدگی به‌ترتیب در شرایط نرمال و تنش نتیجه گرفته می‌شود که تجزیه رگرسیون نتایج تجزیه همبستگی را تأیید نمود و به نوعی تأکیدی مجدد بر اهمیت این صفت در شناسایی جمعیت‌های متحمل به سرمازدگی است (جدول ۱۰).

Table 10: Regression analysis of different traits in narcissus populations in normal and chilling stress conditions

Condition	Model	B	Std. Error	Beta	T value	Sig.
Normal temperature	Constant	38.51	3.90	-	9.87	0.00
	Proline	-2.54	1.89	-0.33	-2.14	0.03
Chilling stress	Constant	24.70	3.65	-	6.78	0.00
	Proline	0.55	0.27	0.32	2.05	0.04

ns, *and** are non-significant, significant at 5% and 1% levels, respectively.

۳-٦. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه عاملی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که در شرایط نرمال (شاهد) در مجموع دو مؤلفه بیش از ۵۰ درصد (۵۳/٦٤ درصد) از واریانس داده‌ها را توجیه نمودند. تجزیه عاملی در شرایط نرمال نشان داد که عامل اول با صفات مقدار فنل و درصد سرمازدگی همبستگی مثبت و با صفت پرولین همبستگی منفی و عامل دوم با صفات مالون دی‌آلدئید و قندهای محلول کل همبستگی مثبت و با پتانسیل اسمزی همبستگی منفی بالایی داشت. با در نظر گرفتن همبستگی عامل‌ها با صفات مورد نظر، عامل اول، عامل سرمازدگی و عامل دوم، باتوجه‌به همبستگی قندها (هیدرات کربن) با تنظیم اسمزی و توجیه نمودن پتانسیل اسمزی، عامل اسمزی نام‌گذاری شد. در شرایط تنش (سه تیمار دمایی) تنها یک مؤلفه درصد بالایی (۷۷/۵۸ درصد) از واریانس داده‌ها را توجیه نمود. تجزیه عاملی در شرایط تنش نشان داد که این یک عامل با کلیه صفات همبستگی بالایی داشت و اگرچه با درصد سرمازدگی همبستگی بالایی نداشت، لیکن قابل‌توجه و بالا بود و لذا این عامل آنرا نیز توجیه نمود. با در نظر گرفتن همبستگی این عامل با کلیه صفات، این عامل، عامل فیزیولوژی کل نام‌گذاری شد. علت اینکه تنها یک عامل تمامی واریانس را توجیه نمود همبستگی تقریباً بالای کلیه صفات با یکدیگر بود (جدول ۱۱).

۳-۷. تجزیه خوشه‌ای

براساس تجزیه خوشه‌ای در شرایط نرمال جمعیت‌ها در سه خوشه قرار گرفتند. در خوشه اول جمعیت‌های یاسوج، طبس‌گلشن، شیراز یک، کوچک عطری یاسوج، شصت‌پر شمال و آزادشهر در خوشه دوم جمعیت‌های خوسف یک و گچساران و در خوشه سوم جمعیت‌های شهلای شمال، شیراز دو، بهبهان دو، خوسف دو و بهبهان یک قرارگرفتند (شکل ۲).

در شرایط تنش نیز جمعیت‌ها در سه خوشه قرار گرفتند. در خوشه اول جمعیت‌های شیراز دو، بهبهان دو، شهلای شمال، خوسف دو و بهبهان یک، در خوشه دوم جمعیت‌های خوسف یک و گچساران و در خوشه سوم جمعیت‌های شیراز یک، کوچک عطری یاسوج، شصت‌پر شمال، آزادشهر، یاسوج و طبس‌گلشن قرار گرفتند (شکل ۳).

بررسی خوشه‌ها نشان می‌دهد که در هر دو شرایط جمعیت‌های قرار گرفته در خوشه‌ها مشابه است و تنها جایگاه خوشه‌ها تغییر کرده است. خوشه اول در شرایط نرمال مشابه با خوشه سوم در شرایط تنش، خوشه سوم در شرایط نرمال مشابه با خوشه اول در شرایط تنش و خوشه دوم در هر دو شرایط یکی است. نکته دیگری که مشاهده می‌شود این است که دوری و نزدیکی جمعیت‌ها کمی تغییر کرده‌است. به‌عنوان مثال در خوشه اول در شرایط نرمال جمعیت خوسف دو در بین جمعیت‌های بهبهان یک و بهبهان دو قرار گرفته است، ولی در شرایط تنش در بین جمعیت‌های بهبهان یک و شهلای شمال قرار گرفته است.در هر صورت خوشه‌ها در هر دو شرایط تغییر چندانی نکرده است.

آنچه مسلم است این است که قرارگیری جمعیت‌ها در خوشه‌ها بر اساس دوری و یا نزدکی جغرافیایی نبوده‌است و بر اساس مقدار مقاومت به سرما در یک خوشه و یا در دو خوشه متفاوت قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال قرارگیری جمعیت‌های مختلف با فاصله جغرافیایی دور، مثلاً خوسف دو (از خراسان جنوبی) با گچساران (کهگیلویه و بویراحمد) و بهبهان دو (خوزستان) با شهلای شمال در یک خوشه و قرارگیری جمعیت‌های با فاصله جغرافیایی نزدیک مانند طبس گلشن و خوسف (هر دو نمونه از خراسان جنوبی) در دو خوشه متفاوت نشان از آن دارد که تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌نماید. قرارگیری جمعیت‌های طبس گلشن با یاسوج در یک خوشه مبین این است که جمعیت‌های هر دو ناحیه حساس به سرما بوده و بر این اساس در یک گروه قرار گرفته‌اند.

Table11: Factor analysis in normal and chilling stress conditions in narcissus populations

Traits	Normal temperature		Chilling stress
	F1	F2	F1
Osmotic Potential	0.01	-0.83	-0.91
Proline	-0.67	0.09	0.98
Malondialdehyde	-0.51	0.55	0.95
Soluble Sugar	-0.05	0.58	0.94
Phenol	0.57	-0.18	0.98
Chilling stress	0.77	0.46	0.38
Eigenvalue	1.64	1.58	4.66
Variance%	27.27	26.37	77.58
Cumulative Variance%	27.27	53.64	77.58

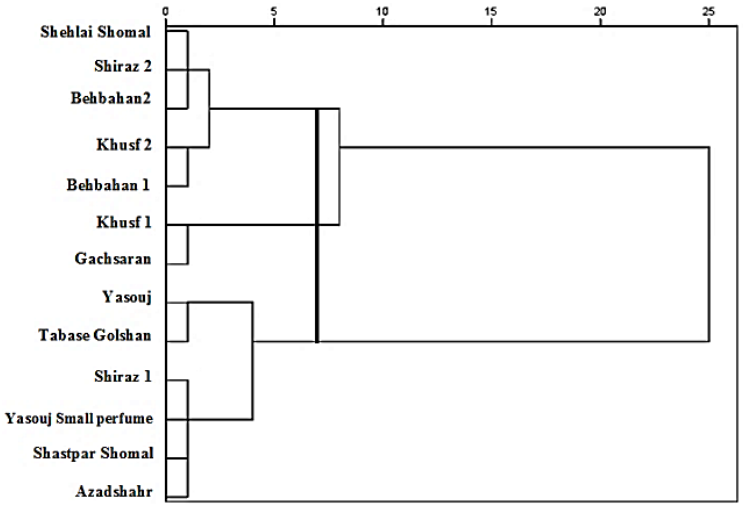

Fig. 2: Cluster analysis of different traits in narcissus populations in normal condition

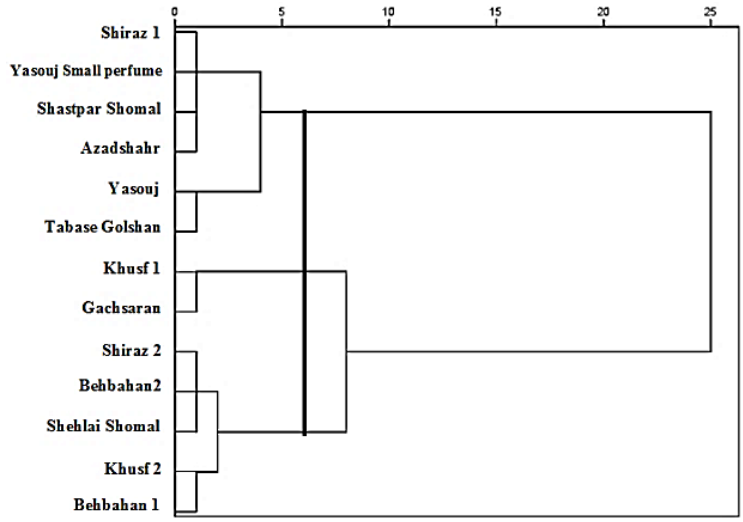

Fig. 3: CorrelClusteration analysis of different traits in narcissus populations in stress condition

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که با کاهش دما پتانسیل اسمزی افزایش (در جهت منفی) پیدا نمود. سرما به‌عنوان یک تنش اسمزی جذب آب از ریشه گیاه را محدود کرده و باعث افت پتانسیل آب می‌شود (Joshi *et al.*, 2007) که کم آبی شدیدی را به دنبال خواهد داشت و به معنی افزایش پتانسیل اسمزی در جهت منفی است. خسارت سرمازدگی در گونه‌های حساس در درجه حرارت‌هایی اتفاق می‌افتد که از حد طبیعی برای رشد گیاه کمتر باشد، ولی این درجه حرارت‌ها باعث شکل‌گیری یخ نشوند. در شرایط خسارت سرما مقدار فتوسنتز و انتقال کربوهیدرات‌ها کاهش یافته و تنفس آهسته‌تر و ساخت پروتئین‌ها کاهش می‌یابد و در الگوی جریان سیتوپلاسمی اختلال ایجاد می‌گردد (Rahnama, 2019). گیاه باتوجه‌به شرایط تنش سرما سعی می‌کند پتانسیل اسمزی خود را از راه تنظیم‌کننده اسمزی افزایش دهد تا تحمل آن در مقابل سرما افزایش یابد (Olennikov *et al.*, 2017).

در این مطالعه با کاهش دما مقدار مالون دی‌آلدهید افزایش پیدا نمود. سرمازدگی باعث تنش اکسیداتیو شدید و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان می‌شود که خود عامل بروز خسارت در گیاهان هستند. تحت شرایط سرمازدگی، تولید بیش از اندازه ROS ها از جمله پراکسید هیدروژن باعث تجمع و بروز خسارت در گیاهان می‌شود، چون ROS ها باعث اکسیدشدن ترکیبات آلی و در نتیجه چربی‌های غشاء می‌شوند. سمیت ROS ها اغلب از طریق اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها مشاهده می‌شود. مالون‌دی-آلدئید یکی از فرآورده‌های نهایی پراکسیداسیون لیپیدها در نتیجه‌ی تنش است که به‌عنوان یک نشانگر جهت حساسیت به سرما به‌کار می‌رود (Prasad *et al.*, 1994). در توت فرنگی کاهش دما سبب افزایش خطی مقدار مالون‌دی‌آلدهید گردید (Gulen *et al.*, 2008). بررسی بافت برگ D. palmatum تحت شرایط دمای پایین نشان‌دهنده افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار مالون دی‌آلدهید بود و موید این مطلب است که تنش سرما باعث آسیب به لیپیدهای غشاء شده است (Olennikov *et al.*, 2017). تنش دمای پایین سبب افزایش معنی‌دار محتوای مالون دی آلدهید در گیاهچه‌های سرخارگل شد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار مالون دی‌آلدئید در دمای منفی چهار درجه سانتی‌گراد به‌دست‌آمد که نسبت به دمای شاهد ۵۰/۷ درصد افزایش داشت (Asadi-Sanam *et al.*, 2015). تغییرات مالون دی‌آلدهید در ژنوتیپ‌های مختلف کنجد در زمان‌های مختلف متفاوت بود و با افزایش تنش سرما مقدار مالون دی‌آلدئید افزایش یافت که نشان‌دهنده حداکثر آسیب وارد شده به غشاء بود (Aki *et al.*, 2016).

در مطالعه کنونی با کاهش دما مقدار پرولین افزایش پیدا نمود. در بسیاری از گیاهان هنگامی که گیاه در معرض تنش-های محیطی قرار می‌گیرد پرولین تجمع می‌یابد. پرولین از طریق تنظیم فشار اسمزی، جلوگیری‌از تخریب آنزیم‌ها و زدودن رادیکال‌های هیدروکسیل، تحمل گیاهان را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (Kuznetsov and

Shevykova, 1999) و باعث کاهش از دست دادن آب و نگهداری آماس سلول می‌شود. در تعدادی از گیاهان تحت تنش سرما مقدار پرولین تا ۱۰۰ برابر شرایط نرمال افزایش می‌یابد. مقدار تجمع پرولین در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر می‌باشد (Matysik *et al.*, 2002). میزان پرولین گوجه فرنگی در اثر تنش سرما کاهش و در آرابیدوپسیس افزایش پیدا می‌کند (Soleimani Aghdam *et al.*, 2014). در پایه‌های مرکبات افزایش پرولین همبستگی خوبی با مقدار مقاومت نسبی به سرمازدگی نداشت. در گیاهان حساس افزایش پرولین سلولی به اندازه‌ای نیست که موجب افزایش مقاومت به سرما شود و افزایش پرولین سلولی همیشه موجب افزایش مقاومت به سرما نمی‌شود (Young, 1977). در بررسی کلون‌های عناب مقدار پرولین در کلون آسیب‌دیده از سرمازدگی، بالاتر از کلون مقاوم بود و پرولین نشانه‌ای از آسیب تا یک عکس العمل سازشی بود (Khalafalla and Palzkill, 1990). تأثیر سرما بر خصوصیات فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های مختلف کنجد نشان‌داد که روند تغییرات پرولین به‌صورت افزایشی بوده و با افزایش سرما همه ژنوتیپ‌ها با تجمع پرولین همراه بودند (Aki *et al.*, 2016). همبستگی منفی بالایی بین مقدار پرولین و مقاومت به سرما دیده شده است (Barka and Audran, 1997). در بررسی ارقام انار مقدار بالای پرولین واقعاً مقاومت بالا به سرمازدگی را نشان نداد، زیرا سطح پرولین همچنان بعد از شکستن مقاومت بالا بود (Soloklui *et al.*, 2012). پرولین محلول با تغییر حلالیت پروتئین‌های مختلف باعث افزایش پایداری آنها گشته و از تغییر ماهیت آنها جلوگیری می‌کند (Li *et al.*, 2008). همه گیاهان در شرایط تنش (زیستی و غیرزیستی) پرولین را در بافت‌های خود ذخیره می‌کنند، ولی مقدار آن بسته‌به گونه گیاهی و شدت تنش ممکن است متفاوت باشد. بنابراین به‌طورکل ارتباط بین تجمع پرولین و مقاومت به سرما برای هر گونه گیاهی حتی رقم متفاوت است و نمی‌توان به طور قطع درباره نقش آن سخن گفت.

طی این بررسی مقدار مالون دی آلدئید با کاهش دما افزایش یافت. انتظار می‌رود که تحت تنش سرما به علت فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تخریب غشاء، مقدار مالون دی‌آلدهید آزادشده افزایش یابد. تحقیقات نشان داده که مقدار مالون‌دی‌آلدهید در ارقامی که مقاومت بیشتری در مقابل تنش داشته‌باشند کمتر و در ارقام حساس‌تر، بیشتر خواهد بود. بررسی پراکسیداسیون لیپید در گونه‌های مختلف آرابیدوپسیس تحت تنش سرما، افزایش مقدار مالون دی‌آلدهید در گونه حساس‌تر را نشان داد (Distelbarth, *et al.*, 2012). در پژوهشی دیگر، (Wang *et al.*, 2013) دو گونه از گیاه برنج را تحت تنش سرما مورد بررسی قرار داده و شاهد آسیب بیشتر غشاء و تجمع چشمگیر مالون دی‌آلدهید در گونه حساس بودند.

گیاهان عموماً از طریق فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی، شامل آنزیم‌ها (کاتالاز، پراکسیداز،...) و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی (فنل، کاروتنوئیدها) سازگاری خویش به تنش دمای پایین را افزایش می‌دهند (Jafari *et al.*, 2007). در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که با وقوع تنش خشکی میزان کل فنل افزایش یافت. (Peterlunger *et al.*, 2005) با مطالعه بر روی ژنوتیپ های انگور دریافتند که در شرایط تنش محتوای ترکیب‌های فنولیک گیاه انگور چندین برابر در مقایسه با شرایط عدم تنش افزایش داشت. (Ma *et al.*, 2004) نیز دریافتند که محتوی فلاونوئید، فنل و آنتوسیانین کل در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط تنش افزایش نشان داد. ترکیب‌های پلی‌فنولیک مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های انار ایرانی در شرایط تنش افزایش یافت؛ هرچند با افزایش شدت تنش از نظر محتوی فنل تام تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (Faraji *et al.*, 2020). یکی از سازوکارهای دفاعی گیاه در شرایط تنش افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها به‌عنوان شناخته شده‌ترین مسیر در متابولیسم متابولیت‌های ثانویه و مشتق شده از مسیر سنتز فنیل پروپانوئید است (Shih *et al.*, 2008). آنچه مسلم است این است که نتایج این مطالعه با گزارش‌های فوق مطابقت دارد و در اکثر مطالعات با افزایش شدت تنش (خشکی، شوری، سرما و...) مقدار فنل کل افزایش می‌یابد. این نتایج با گزارش (Tadjvar *et al.*, 2011) در گیاه نارنگی همخوانی دارد.

نتایج نشان داد که با کاهش دما مقدار قندهای محلول افزایش پیدا نمود. به‌صورت‌کلی افزایش قندهای محلول در برگ و ریشه را می‌توان یکی از مهم‌ترین عکس‌العمل‌های گیاهان در مقابل تنش سرما در نظر گرفت (Kerepesi *et al.*,

2004). مطالعات قبلی نشان داده‌است که قندهای محلول دارای وزن مولکولی پایین نقش کلیدی را در تحمل به دمای پایین در گیاهان دارند. غلظت گلوکز و ساکارز ممکن است چندین بار در معرض دمای پایین افزایش یابد (Cao *et al.*, 2014). تجمع قند باعث تقویت عملکرد حفاظت کننده‌های اسمزی می‌گردد که در واقع به‌دنبال آن ثبات غشای سلولی و حفظ فشار تورژسانس می‌گردد (Emami Bistgani *et al.*, 2017). در شناسایی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی مرتبط با مقاومت به سرما در گندم غلظت قندهای محلول برگ گیاهان نسبت‌به قبل از سرمادهی افزایش یافت و به‌علاوه فرآیند تجمع قند پس از تنش سرما در گیاهان رویش‌یافته در دمای پائین بهتر صورت گرفت (Ahmadi *et al.*, 2005). قندها سبب تنظیم فشار اسمزی و کاهش از دست دادن آب سلول و نگهداری آماس می‌شوند (Karimi *et al.*, 2012). در گیاه بادرنجبویه قندهای محلول در شدت‌های متوسط تنش، افزایش قابل‌توجهی داشت و با شدیدتر شدن تنش، مقدار قند شروع به کاهش نمود (Abbaszadeh *et al.*, 2007). در این مطالعه گیاه از یک سو با افزایش قندهای محلول و از سوی دیگر با افزایش مقدار پرولین که نشان‌دهنده تجمع مواد سازگارکننده جهت حافظت اسمزی است، شرایط سازگاری گیاه با شرایط تنش فراهم شده‌است.

از مجموع نتایج تجزیه همبستگی و رگرسیون بر می‌آید که صفات پتانسیل اسمزی و پرولین صفات شاخصی در شناسایی جمعیت‌های متحمل به سرما در این مطالعه است. باتوجه‌به همبستگی منفی پتانسیل اسمزی با درصد سرمازدگی در هر دو شرایط این گونه قضاوت می‌شود که هر چه پتانسیل اسمزی بیشتر باشد درصد سرمازدگی کمتر و در نتیجه مقاومت به سرما بیشتر خواهد بود. باتوجه‌به همبستگی منفی و مثبت پرولین با سرمازدگی در شرایط نرمال و تنش می‌توان این‌گونه قضاوت نمود که هرچقدر مقدار پرولین در ابتدا بیشتر باشد (دمای محیط=شرایط نرمال) و پس از متحمل شدن یک دوره سرما (شرایط تنش) کم‌تر گردد، جمعیت مقاوم‌تر به سرمازدگی خواهد بود. علت این امر می‌تواند مصرف پرولین در ساخت محافظت‌کننده‌های اسمزی در گیاه باشد. به‌عبارت‌دیگر گیاه پرولین خود را صرف مقابله با سرمازدگی نموده‌است. بالاترین درصد سرمازدگی را جمعیت هشت (طبس‌گلشن) و کمترین را جمعیت ۱۳ (گچساران) به خود اختصاص دادند. نتایج تجزیه عاملی نیز نشان داد که صفات مقدار فنل و پرولین همراه با سرمازدگی در یک عامل توجیه شدند و لذا این صفات مهم‌تر از سایر صفات در شناسایی جمعیت‌های متحمل به سرما می‌باشند. بررسی خوشه‌ها در تجزیه کلاستر نشان‌داد که خوشه جمعیت‌های یاسوج، طبس‌گلشن، شیراز یک، کوچک عطری یاسوج، شصت‌پر شمال و آزادشهر به‌عنوان خوشه حساس به سرمازدگی، خوشه جمعیت‌های خوسف یک و گچساران خوشه مقاوم و خوشه جمعیت‌های شهلای شمال، شیراز دو، بهبهان دو، خوسف دو و بهبهان یک به‌عنوان خوشه حد واسط در مقاومت به سرمازدگی بودند. به‌طورکل و با درنظر گرفتن نتایج حاصل از تمامی تجزیه‌ها جمعیت گچساران مقاوم‌ترین و جمعیت طبس‌گلشن حساس‌ترین جمعیت در این مطالعه شناخته شد.

باتوجه‌به اهمیت روزافزون به گیاهان داروئی و گل‌های زینتی و تنوع آب‌وهوایی موجود توصیه می‌گردد که این آزمایش در سال‌ها و دماهای مختلف و محیط‌های دیگر غیر از خراسان جنوبی برای تعیین جمعیت برتر صورت گیرد. به بررسی مقدار تنش در مراحل مختلف رشد گیاه و بررسی دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها و متابولیت‌های درگیر در فعالیت سلولی پرداخته شود و در صورت در اختیار داشتن امکانات گلخانه‌ای پیشرفته آزمایش در سطوح دمایی پایین‌تر مورد مطالعه قرار گیرد. محققینی که تمایل به مطالعه در زمینه مقاومت به سرما دارند، حتما جمعیت‌ها (گچساران مقاوم و طبس گلشن حساس) و صفات مهم شناسایی‌شده (پتانسل اسمزی و پرولین) در این مطالعه را بیشتر مورد واکاوی قرار دهند.

۵. منابع

Abbaszadeh, B., Sharifi Ashourabadi, E., Lebaschi, M. H., Naderi Haji Bagherkandi, M. and Moghadami, F. (2007). The effect of drought stress on proline contents, soluble sugars, chlorophyll and relative water contents of Balm (*Melissa officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23 (4): 504-513. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2008.10090. (In Persian with English abstract).

Ahmadi, A., Yazdi Samadi, B. and Zargarnataj, J. (2005). Physiological responsed of Wheat seedlings to low temperatures. *Journal of Agricultural Knowledge*, 15 (2): 27-43. (In Persian with English abstract).

Aki, F., Kazemitabar, S. K., Hashemi, S. H. and Najafi Zarini, H. (2016). Evaluated of effect of cold stress on proline, malondialdehyde and photosynthetic pigments in seedling stage of Sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes. *Journal of Crop Breeding*, 8 (18): 166-175. https://doi.org/10.29252/jcb.8.18.166.

Asadi-Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., sefidcan, F. and Nematzadeh, G. (2015). Evaluation of biochemical and physiological responses of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) medicinal plant to low temperature stress. *Plant Process and Function*, 4 (12) :11-28. https://doi.org/20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8. (In Persian with English abstract).

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007). Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 206-216. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.

Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39 (1): 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060.

Bettaieb, I., Bourgou, S., Aidi Wannes, W., Hamrouni, I., Limam, F. and Marzouk, B. (2010). Essential oils, phenolics, and antioxidant activities of different parts of Cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (19): 10410-10418. https://doi.org/10.1021/jf102248j. PMid:20809647.

Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A. K. (2002). Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology*, 30: 279287. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:89234851.

Cao, Y. Y., Tao Yang, M., Li, X., Qing, Z., Juan, X., Ji, W. and Bai, G. (2014). Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents. *Scientia Horticulturae*, 179: 67-77. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.016

Cansev, A., Gulen, H., Celik, G. and Eris, A. (2012). Alterations in total phenolic content and antioxidant capacity in response to low temperatures in Olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). *Plant Archives*, 12: 489-494.

Curtis, I. S. (2003). The noble radish: past, present and future. *Trends in Plant Science*, 8 (7): 305-307. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00127-4. PMid:12878009

Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4 (2): 215-223. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x

Distelbarth, H., Neagele, T. and Heyer, A. G. (2012). Responses of antioxidant enzymes to cold and high light are not correlated to freezing tolerance in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 15 (6): 982-990. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00718.x. PMid:23578291

Ebrahimi, A., Hatamzadeh, A. and Hassanpour Asil, M. (2014). Evaluation effect of low temperature on rowth and flowering processes of ornamental bulbous plants. *In: proceeding of the First Electronic Congress of New Findings in the Environment and Agricultural Ecosystems, Tehran, Iran.*

Emami Bistgani, Z., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M. (2017). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of Thymus daenensis Celak. *The Crop Journal*, 5: 407-415. https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003. (In Persian with English abstract).

Faraji, S., Hadadinejad, M., Abdoosi, V., Basaki, T. and Karami, S. (2020). Effects of drought stress on the phenol, flavonoid and cyanidin 3-glocoside content of juice and fruit yield in native pomegranate genotypes (*Punica granatum* L). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 35 (6): 889-901. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2019.123934.2426. (In Persian with English abstract).

Gulen, H., Çetinkaya, C., Kadıoğlu, M., Kesici, M., Cansev, A. and Eriş, E. (2008). Peroxidase activity and lipid peroxidation in Strawberry (Fragaria X ananassa) plants under low temperature. *Journal of Biology and Environment Science*, 2: 95-100.

Heath, B. and Heath, B. (2001). *Daffodils: for north american gardens*. Bright Sky Press, 144p.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Journal of Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1. PMid:5655425

Heuer, B. (1994). *Osmoregulatory role of proline in water-and salt -stressed plants*. Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker publication, New York.

Iranpak, N., Kalateh Jari, S. and Kalantari, S. (2012). Effects of explant and plant growth regulators on callus induction and shoot formation in *Narcissus tazetta* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28 (2): 356-369. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2012.3052. (In Persian with English abstract).

Jafari, S. R., Manoochehri Kalantari, K. H. and Ahmadi Mosave, E. S. (2007). The role of paclobutrazol on accumulation of antioxidant in tomato plants (*Lycopersicum esculentom* L.) under cold stress. *Iranian Journal of Biology*, 20 (3): 206-218. (In Persian with English abstract).

Joshi, S. C., Chandra, S. and Palni, L. M. S. (2007). Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. *Photosynthetica*, 45 (4): 594-600. https://doi.org/10.1007/s11099-007-0102-5

Kamenetsky, R. and Okubo, H. (2013).*Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 578 p. https://doi.org/10.1201/b12881

Karimi, S., Abbaspour, H., Sinaki, J. M. and Makarian, H. (2012). Effects of water deficit and chitosan spraying on osmotic adjustment and soluble protein of cultivars castor bean (*Ricinus communis* L.). *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 8: 160-169.

Kerepesi, I., Bányai-Stefanovits, E. and Galiba, G. (2004). Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. *Plant Physiology*, 161 (1): 131-133. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00766. PMid:15002675

Kexuan, T., XingLong, W., XiaoFen, S., ZhongXiang, D. and Teixeira da Silva, J. (2006). Cold: a double-edged sword to plants. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 102-107.

Khalafalla, M. S. and Palzkill, D. A. (1990). Seasonal patterns of carbohydrates and proline in jojoba clones that differ in frost susceptibility. *HortScience*, 25 (1): 103-105. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.1.103

Khorshidi, S. H., Davarynejad , G. H., Samiei, L. and Moghaddam, M. (2016). Investigation the frost resistance of vegetative and reproductive buds of pear cultivars in Mashhad climate condition. *Journal of horticulture science*, 30 (3): 581 - 589. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v30i3.50169

Kuznetsov, V. I. and Shevykova, N. I. (1999). Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46: 274-287.

Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J. and Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4 (1):112-166. https://doi.org/10.3390/plants4010112. PMid:27135320. PMCid:PMC4844334.

Levitt, J., 1980. *Responses of plant to environmental stress. Water, radiation, salt and other stresses.* Academic Press, New York.

Li, X. F., Shao, X. H., Deng, X. J., Wang, Y., Zhang, X. P., Jia, L.Y. and Xu, L. (2012). Necessity of high temperature for the dormancy release of *Narcissus tazetta* var. chinensis. *Journal of plant physiology*. 169 (14): 1340-1347. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.017. PMid:22795676.

Li, Q. Y., Niu, H. B., Yin, J., Wang, M. B., Shao, H. B., Deng, D. Z., Chen, X. X., Ren, J. P. and Li, Y. C. (2008). Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 56 (2): 220-225. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.007. PMid:18502620.

Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y. and Guo, T. (2014). Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 60-66. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.024. PMid:24727789.

Matysik, J., Bhalu, A. B. and Mohnty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82 (5): 525-532.

Mocready, R., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry*, 22 (9): 1156-1158. https://doi.org/10.1021/ac60045a016

Olennikov, D. N., Chirikova, N. K., Kashchenko, N. I., Gornosta, T. G., Selyutina, Y. I. and Zilfikarov, I. N. (2017). Effect of low temperature cultivation on the phytochemical profile and bioactivity of arctic Plants: A case of Dracocephalum palmatum. *International journal of Molecular Science*, 1-29. https://doi.org/10.3390/ijms18122579. PMid:29189749. PMCid:PMC5751182.

Peterlunger, E., Siviloti, P. and Colussi, V. (2005). Water stress and polyphenolic quality in 'Merlot' grapes. *Acta horticulturae*, 689: 293-300. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.689.34

Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A. and Stewart, C. R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 6: 65-74. https://doi.org/10.1105/tpc.6.1.65. PMid:12244221 PMCid:PMC160416.

Rahnama, A. (2019). Plant physiology. Puran Pazhohesh Publications, 399 p.

Salimi, M., Madahhosseini, S. H., Azari, A. and Mohammadi Mirik, A. A. (2019). Effect of cold stress on some physiological characteristics and antioxidant systems in (*Linum usitatissimum* L.) genotypes at seedling stage. *Journal of Plant Process and Function*, 9 (33): 449-461. https://doi.org/20.1001.1.23222727.1398.8.33.4.4. (In Persian with English abstract).

Seppanen, M. M. (2000). Characterization of freezing tolerance in Solanum commersonii Dun with special reference to the relationship between freezing and oxidative stress. PhD Thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

Shih, C. H., Chu, H., Tang, L. K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I. K., Wang, M. F. and Lo, C. (2008). Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta*, 228: 1043-1054. https://doi.org/10.1007/s00425-008-0806-1. PMid:18726614

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3): 144-158. https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144

SKAJO. (2023). South Khorasan Agricultural Jihad Organization. Available at: www. https://kj-agrijahad.ir/pr/index.php.

Soleimani Aghdam, M., Asghari, M. R., Khorsandi, O., Moradbeygi, H., Mohammadkhani, N., Mohayeji, M. and Hassanpouraghdam, M. B. (2014). Possible mechanisms of salicylic acid effects for alleviation of postharvest chilling injury on tomato fruit. *Journal of Plant Research*, 27 (2): 216-227.(In Persian with English abstract). https://doi.org/20.1001.1.23832592.1393.27.2.6.6

Soloklui, A. A. G., Ershadi, A. and Fallahi, E. (2012). Evaluation of cold hardiness in seven Iranian ommercial pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *HortScience*, 47 (12): 1821-1825. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.12.1821

Tabaei-Aghdael, R., Pearce, R.S. and Harrison, P. (2003). Sugars regulaate cold-induced gene expression and freezing tolerance in barley culture. *Journal of Experimental Botany*, 54 (387):1565-1575. https://doi.org/10.1093/jxb/erg173. PMid:12730262

Tadjvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, Y. and Sajedi, R.H. (2011). Physiological and biochemical responses of Page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. *Journal of Plant Biology*, 3 (9): 1-12. https://doi.org/20.1001.1.20088264.1390.3.9.2.2.

Wang, X., Fang, G., Li, Y., Ding, M., Gong, H. and Li, Y. (2013). Differential antioxidant responses to cold stress in cell suspension cultures of two subspecies of rice. *Plant Cell Tissue Organisms Culture*, 113: 353-361. https://doi.org/10.1007/s11240-012-0273-z

Yadav, S.K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 30 (3): 515-527. https://doi.org/10.1051/agro/2009050

Young, R.H. (1977). The effect of rootstocks on citrus cold hardiness. *President of the international society of citriculture*, 2: 518-522. https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1978093

Zeinanloo, A. and Tajik, H. (2022). Assessment of cold stress tolerance in the leaves of some olive (Olea europaea L.) cultivars. *Seed and Plant*, 38 (3): 323-338. https://doi.org/10.22092/spj.2023.360267.1278