Saffron Agronomy & Technology
Homepage: http://saffron.torbath.ac.ir
Vol. 12, No. 4, Winter 2025, p. 414-435

Assessment of Physiological, Biochemical Parameters, and Saffron Stigma-Related Traits of Different Ecotypes

Saeed Hasanian-Badi[1], Javad Tabatabaeian Nimavard[2*] and Benyamin Torabi[3]

Article type:
Research Article
Article history:
Submitted: 25 September 2024
Revised: 28 November 2024
Accepted: 15 February 2025
Available Online: 15 February 2025

How to cite this article:
Hasanian-Badi, S., Tabatabaeian Nimavard, J., and B Torabi, B. 2025. Assessment of Physiological, Biochemical Parameters, and Saffron Stigma-Related Traits of Different Ecotypes. Saffron Agronomy & Technology, 12(4), 414-435.
DOI: 10.22048/jsat.2025.480420.1542

Abstract

Evaluating the response of various saffron ecotypes regarding physiological and biochemical traits, as well as stigma-related characteristics, is crucial for cultivation in specific regions. Therefore, a study was conducted to assess the physiological, biochemical, and stigma-related traits of five saffron ecotypes (Torqroud: EC1, Natanz: EC2, Kashan: EC3, Qaenat: EC4, and Badroud: EC5) in pots under open field conditions at the Islamic Azad University Research Farm in Ardestan in 2022, following a completely randomized design with three replications. Results indicated significant differences in yield, quality, physiological, and biochemical traits among the examined ecotypes. The EC2 ecotype was significantly superior in yield traits such as stigma diameter (2.09 mm), stigma length (2.43 cm), number of flowers (95.40 per m2), fresh flower yield (47.27 g m-2), and dry stigma yield (0.828 g m-2). The levels of safranal, picrocrocin, and crocin in the EC2, EC3, and EC4 ecotypes were significantly higher compared to other ecotypes, with the highest values of these traits observed in EC2 (53.02, 175.1, and 202.6 $E^{1\%}_{1\ cm}$, respectively). The content of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, and total) was highest in the EC2 ecotype compared to the others. Regarding antioxidant enzyme activity, EC1 and EC4 ecotypes exhibited the highest activity. Correlation results indicated a positive relationship between yield and quality traits. Overall, this study clearly demonstrates that environmental conditions can significantly impact the quality and yield of saffron, which aids the selection of the best ecotypes for cultivation in different regions. The EC2 ecotype is recommended for cultivation in the studied area after field trials.

Keywords: Antioxidant enzymes, Photosynthetic pigments, Safranal, Flower yield, Stigma.

1- Ph.D. Candidate in Agrotechnology-Crop Physiology, Department of Agronomy, Agricultural Sciences, Islamic Azad University (IAU), Ardestan Branch, Ardestan, Iran
2- Professor, Department of Agricultural Sciences, Islamic Azad University (IAU), Ardestan Branch, Ardestan, Iran
3- Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.
Corresponding author email: taba805@gmail.com

© 2022, University of Torbat Heydarieh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY NC 4.0)
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0).

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳ ص. ۴۳۵-۴۱۴
Homepage: http://saffron.torbath.ac.ir

مقاله پژوهشی

ارزیابی پارامترهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ویژگی‌های مرتبط با کلاله زعفران در اکوتیپ‌های مختلف

سعید حسنیان‌بادی[۱]، جواد طباطبائیان نیم‌آورد[۲*] و بنیامین ترابی[۳]

تاریخ دریافت: ۴ مهر ۱۴۰۳
تاریخ بازنگری: ۸ آذر ۱۴۰۳
تاریخ پذیرش: ۲۷ بهمن ۱۴۰۳

حسنیان‌بادی، س. ح.، طباطبائیان نیم‌آورد، ج.، و ترابی، ب. ۱۴۰۳. ارزیابی پارامترهای فیزیولوژیکی، بیو شیمیایی و ویژگی‌های مرتبط با کلاله زعفران در اکوتیپ‌های مختلف. زراعت و فناوری زعفران، ۱۲(۴): ۴۳۵-۴۱۴.

چکیده

ارزیابی واکنش اکوتیپ‌های مختلف زعفران از نظر صـــفات فیزیولوژیکی، بیوشـــیمیایی و ویژگی‌های مرتبط با کلاله، برای کشـــت در منطقه‌ی خاص از اهمیت بالایی برخوردار است. از این‌رو، پژوهشی با هدف ارزیابی صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ویژگی‌های مرتبط با کلاله در پنج اکوتیپ زعفران (طرق‌رود: EC1، نطنز: EC2، کاشان: EC3، بادرود: EC4 و قائنات: EC5) به‌صورت گلدانی در فضای باز در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان در سال ۱۴۰۱ در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد که صفات عملکردی، کیفی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در اکوتیپ‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار داشتند. اکوتیپ EC2 از نظر صفات عملکردی نظیر قطر کلاله (۲/۰۹ میلی‌متر)، طول کلاله (۲/۴۳ ســـانتی‌متر)، تعداد گل (۹۵/۴۰ در مترمربع)، عملکرد تر گل (۴۷/۲۷ گرم در مترمربع) و عملکرد خشـــک کلاله (۰/۸۲۸ گرم در مترمربع) به‌طور معنی‌داری برتر بود. مقادیر ســـافرانال، پیکروکروســـین و کروســـین در اکوتیپ‌های EC2، EC3 و EC4 به‌طور قابل توجهی نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بالاتر بود و بالاترین مقادیر این صفات در EC2 (به‌ترتیب ۵۳/۰۲، ۱۷۵/۱ و ۲۰۲/۶ $E_{1\,cm}^{1\%}$) مشاهده شد. محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کل) در اکوتیپ EC2 در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها از میانگین بالایی برخوردار بود. در مورد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکســـیدانی، اکوتیپ‌های EC1 و EC4 بالاترین فعالیت را نشـــان دادند. نتایج همبستگی بین صفات نیز بیانگر ارتباط مثبت بین صفات عملکردی و کیفی بود. به‌طور کلی، این پژوهش به‌خوبی نشان می‌دهد که شرایط محیطی می‌توانند تأثیرات قابل توجهی بر کیفیت و عملکرد زعفران داشته باشند و به انتخاب بهترین اکوتیپ‌ها برای کشت در مناطق مختلف کمک کنند. برای کشت در منطقه مورد مطالعه اکوتیپ EC2 قابل توصیه بعد از آزمایشات مزرعه‌ای می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، رنگیزه‌های فتوسنتزی، سافرانال، عملکرد گل، کلاله.

۱- دانشجوی دکتری آگروتکنولوژی-فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: taba805@gmail.com)

DOI: 10.22048/jsat.2025.480420.1542

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.)، گیاهی چندساله از خانواده زنبقیان، به‌عنوان گران‌بهاترین ادویه جهان و یکی از داروهای مهم، جایگاه ویژه‌ای در اقتصاد ایران و جهان دارد (Kafi et al., 2018; Marrone et al., 2024). ایران، یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان این محصول ارزشمند است. کشورهای هند، اسپانیا، افغانستان، مراکش و یونان نیز به ترتیب از دیگر تولیدکنندگان عمده زعفران محسوب می‌شوند (Cardone et al., 2020; Farrokhi et al., 2021). تولید جهانی زعفران حدود ۴۱۸ تن در سال است که بیش از ۹۰ در صد تولید آن در داخل ایران انجام می‌شود. میزان تولید براساس آخرین آمارنامه جهاد کشاورزی (۱۴۰۱) ۴۰۸ تن، از سطح زیر کشتی معادل ۱۱۲۰۰۰ هکتار است. خراسان‌های رضوی، جنوبی و شمالی و همچنین اصفهان و کرمان از بزرگ‌ترین استان‌های تولیدکننده زعفران محسوب می‌شود.

کلاله یکی از اندام‌های گیاه زعفران است که جنبه اقتصادی دارد و یکی از گران‌ترین ادویه‌های جهان محسوب می‌شود. عوامل متعددی از جمله تعداد کلاله‌ها در هر گل، تعداد گل‌های هر گیاه، کارایی برداشت، اندازه گل، طول کلاله‌ها، میزان کروسین، سافرانال و پیکروکروسین بر عملکرد و کیفیت زعفران تأثیر می‌گذارند (Alinaghizadeh & Azimi Gandomani, 2024; Farajzadeh Memari Tabrizi, 2024). کیفیت زعفران به دلیل حضور متابولیت‌های ثانویه اصلی و ترکیبات مشتق آن تعیین می‌شود. زعفران به‌واسطه سه ترکیب زیست‌فعال مهم به نام‌های کروسین، پیکروکروسین و سافرانال به‌عنوان یکی از گران‌ترین ادویه‌های جهان شناخته شده است و خواص مفیدی برای سلامتی انسان دارد (Aminifard et al., 2024). کروسین، به‌عنوان عامل رنگ زرد زعفران شناخته می‌شود، پیکروکروسین عامل ایجاد طعم تلخ و سافرانال مسئول رایحه و عطر خاص زعفران است. این ترکیبات علاوه بر اثرات حسی، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی نیز هستند که به اثرات درمانی زعفران کمک می‌کنند (Marrone et al., 2024).

تفاوت بین اکوتیپ های زعفران که در مناطق مختلف و شرایط محیطی گوناگون سازگاری پیدا کرده‌اند، به تحت تأثیر عوامل متعددی همچون آب و هوا، خاک، ارتفاع از سطح دریا و تاریخچه کشت آن‌ها ایجاد شده است (Cardone et al., 2021). این تفاوت‌ها در ویژگی‌هایی مانند زمان گلدهی، طول دوره رویش، رنگ کلاله، عطر و طعم، میزان عملکرد و مقاومت به آفات و بیماری‌ها مشاهده می‌شود (Ghanbari, 2023; Alavi-Siney et al., 2023). شناسایی و استفاده از اکوتیپ‌های مناسب برای هر منطقه، به بهبود عملکرد، کیفیت محصول و حفظ تنوع ژنتیکی زعفران کمک شایانی می‌کند (Alavi-Siney et al., 2023). به‌عنوان مثال، اکوتیپی که در منطقه‌ای با زمستان‌های سرد سازگار شده است، ممکن است مقاومت به سرما بیشتری نسبت به اکوتیپی داشته باشد که در منطقه‌ای با زمستان‌های معتدل کشت می‌شود (Kumar et al., 2022; Choudhary et al., 2024). در پژوهشی، وزن تر و خشک کلاله، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) و محتوای آنتوسیانین گلبرگ تفاوت معنی‌داری در اکوتیپ‌های مختلف زعفران (نطنز و زنجان) داشت (Salehi et al., 2022). با توجه به کشت زعفران در مناطق مختلف و سازگاری آن با شرایط آب و هوایی خاص، اکوتیپ‌های متنوعی از این گیاه در مناطق مختلف به وجود آمده‌اند. پارامترهایی مانند طول و وزن خشک کلاله، عملکرد کلاله، تعداد گل و وزن بنه‌های دختری تحت تأثیر منشأ جغرافیایی بنه قرار دارند (Soukrat et al., 2019). عملکرد اکوتیپ‌ها بسته به منطقه تغییر می‌کند که نشان‌دهنده تأثیر متقابل اکوتیپ‌ها و محیط است (Salehi et

al., 2022). بیات و همکاران (Bayat et al., 2016) در آزمایشی گزارش کردند که اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و مشهد و اکوتیپ های قاین و گناباد به ترتیب بیشترین (۰/۹۵ و ۰/۸۵ کیلوگرم در هکتار) و کمترین عملکرد (۰/۵۴ و ۰/۵۲ کیلوگرم در هکتار) را در شرایط آب و هوایی ارومیه داشتند. علاوه بر این، عملکرد زعفران و کلیه اجزای آن همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. با توجه به رتبه چهارم استان اصفهان از نظر تولید زعفران با میانگین ۵ تن، ارزیابی واکنش اکوتیپ‌های مختلف در شرایط اقلیمی این استان لازم و ضروری به نظر می‌رسد. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف ارز یابی پارامتر های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ویژگی های مرتبط با کلا له زعفران (صفات عملکردی، محتوای کروسین، سافرانال و پیکروکروسین، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان) در اکوتیپ‌های مختلف (طرق‌رود، نطنز، کاشان، قائنات و بادرود) اجرا شد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و مواد گیاهی

پیاز اکوتیپ های مختلف زعفران با قطر افقی ۲/۵ تا ۳/۵ سانتی‌متر با میانگین وزنی حدوداً ۱۰ تا ۱۵ گرم که از طرق‌رود، نطنز، کا شان و بادرود ا ستان ا صفهان و همچنین قائنات ا ستان خراسان جنوبی تهیه شدند که اطلاعات جغرافیایی این مناطق در جدول ۱ ارائه شده است. این پژوهش به‌صورت گلدانی در فضای باز در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردستان در سال ۱۴۰۱ در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. در انتخاب اکوتیپ‌ها، سعی بر انتخاب مزارعی بود که از مدیریت یک سانی برخوردار ه ستند. علاوه بر این، اکوتیپ‌های از مزارع زعفرانی که حداقل سابقه ۵ دوره کشت دارد انتخاب شدند. در این پژوهش از گلدانی با ارتفاع ۳۰ و قطر ۲۵ سانتی‌متر استفاده شد (با مساحت ۰/۰۴۹ مترمربع) که حاوی هشت کیلوگرم خاک مزرعه بود که هر یک از گلدان‌ها به عنوان یک واحد آزمای شی در نظر گرفته شده بودند. نتایج آنالیز ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی خاک مورد ا ستفاده در جدول ۲ ارائه شده ا ست. براساس مطالعات انجام گرفته توسط فرخی و همکاران (Farrokhi et al., 2021) کاشت بنه‌های دختری دوساله (در هر واحد آزمای شی دو عدد) در اوایل شهریور صورت گرفت. آب آبیاری در مراحل همزمان با کاشت، دوره رشد رویشی و آغاز گلدهی به ازای ۲۵۰ میلی‌لیتر برای هر واحد آزمایشی صورت گر فت. پیاز ها با روش کود آبیاری با استفاده از کود NPK (۳۶ــــ۱۲ــــ۱۲) در دی ماه برای تقویت پیاز زعفران و افزایش خصوصیات کیفی استفاده شد (Alhasan, 2023).

جدول ۱- اطلاعات اقلیمی و جغرافیایی مناطق جمع‌آوری اکوتیپ‌های زعفران

Table 1- Climatic and geographical information of the regions collecting saffron ecotypes

منطقه (اکوتیپ) Region (ecotype)	عرض جغرافیایی Latitude (N)	طول جغرافیایی Longitude (E)	ارتفاع Altitude (m)	اقلیم Climate
طرقرود Torqroud (EC1)	33°26′	51°47′	~1,372	متوسط تا سرد، کوهستانی Moderate to cold, mountainous
نطنز Natanz (EC2)	33°31′	51°54′	~1,656	سرد تا معتدل، کوهستانی Cold to temperate, mountainous
کاشان Kashan (EC3)	33°58′	51°26′	~942	اقلیم گرم بیابانی Hot desert climate
قاین Qaenat (EC4)	33°43′	59°11′	~1,413	نیمه خشک، قاره‌ای Semi-arid, continental
بادرود Badroud (EC5)	33°42′	51°48′	~1,372	نیمه خشک Semi-arid

اندازه‌گیری صفات مرتبط با کلاله و گل

گلدهی در اوایل آبان ماه به مدت تقریبی ۲۰ روز به طول انجامید. بعد برداشت گل و کلاله، ویژگی‌های مرتبط با آن از قبیل قطر کلاله برحسب میلی‌متر (میانگین وسط کلاله)، طول کلاله برحسب سانتی‌متر، تعداد گل در واحد سطح و همچنین عملکرد تر گل و عملکرد خشک کلاله (به‌صورت گرم در واحد سطح) با استفاده از ترازو با دقت بالا توزین شدند (Mollafilabi et al., 2020).

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده برای اجرای آزمایش

Table 2- Physicochemical properties of the soil used for the experiment

بافت Texture	شنی لوم Sandy loam
شن Sand (2-0.05 mm, %)	52.86
سیلت Silt (0.05-0.002 mm, %)	28.52
رس Clay (< 0.002 mm, %)	18.38
شاخص واکنش pH	7.66
هدایت الکتریکی در عصاره اشباع EC in saturated extract ($dS.m^{-1}$)	1.84
ماده آلی OC (%)	0.94
درصد نیتروژن کل Nitrogen $_{Total}$ (%)	1.91
فسفر قابل استخراج با بی کربنات سدیم Extractable Phosphorus with sodium Bicarbonate ($mg.kg^{-1}$ of soil)	9.42
Extractable Potassium ($mg.kg^{-1}$ of soil)	3.14
Extractable Iron with DTPA ($mg.kg^{-1}$ of soil)	2.18
Extractable Manganese with DTPA ($mg.kg^{-1}$ of soil)	2.87
Extractable Copper with DTPA ($mg.kg^{-1}$ of soil)	0.75
Extractable Zinc with DTPA ($mg.kg^{-1}$ of soil)	0.54

تعیین کیفیت زعفران

تعیین کیفیت زعفران بر اساس استاندارد ISO 3632-1 (۲۰۱۱) از کلاله همراه با خامه صورت گرفت. قبل از اندازه‌گیری، خشک کردن نمونه‌ها در داخل آون (مدل M-55E, Fanazma-Gostar Company, Iran) با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه صورت گرفت (Farrokhi et al., 2021). بدین صورت که، عصاره‌های آبی زعفران با استفاده از اسپکتروفتومتر (PerkinElmer- Lambda 25 (USA)) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند تا محتوای پیکروکروسین (عامل ایجاد طعم)، سافرانال (عامل ایجاد عطر) و کروسین (عامل ایجاد رنگ) برای ارزیابی تلخی، قدرت طعم‌دهی و قدرت رنگ‌دهی زعفران تعیین شود. داده‌ها به درصد ماده خشک مرتبط شده و به‌صورت جذب یک محلول آبی ۱ در صد زعفران خشک شده در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر ثبت شد. مقادیر جذبی در طول موج‌های ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر به‌ترتیب نشان دهنده پیکروکروسین، سافرانال و کروسین، به صورت مقدار جذب در در محلول ۱ در صد آبی در طول موج مورد نظر [$E^{1\%}_{1cm}$] بیان شده و طبق فرمول زیر محاسبه گردید (ISO 3632-1, 2011; Caser et al., 2019):

$$E^{1\%}_{1\,cm}(\lambda\ \max) = \frac{D \times 10000}{M \times (100 - wMV)} \quad (۱)$$

که در آن، D جذب ویژه است؛ m جرم محلول ارزیابی شده برحسب گرم؛ و wMV میزان رطوبت برحسب درصد جرم نمونه است.

محتوای رطوبت کلاله تازه (wMV) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲):

$$wMV(\%) = \frac{(m0 - m1)}{(\frac{100}{m0})} \quad (۲)$$

که در آن: (m0) جرم (برحسب گرم) زعفران قبل از خشک

کردن است و (m1) جرم (برحسب گرم) باقی‌مانده خشک پس از انکوباسیون، که به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲ ± ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد در آون (مدل M-55E, Fanazma-Gostar Company, Iran) قرار داده شده است، می‌باشد. تمام مراحل آنالیز در تاریکی انجام شد تا از تخریب آنالیت‌ها جلوگیری شود. اندازه‌گیری خاکستر کل و نیتروژن تام براساس روش استاندارد ۱۱۹۷ و ۱۵۲۲ انجام شد. بدین صورت که برای تعیین خاکستر کل، نمونه‌های خشک شده در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت سوزانده شدند تا تمام مواد آلی حذف شده و مواد معدنی باقی بمانند. وزن خاکستر باقی‌مانده به عنوان خاکستر کل محاسبه شد. روش اندازه‌گیری نیتروژن تام بر اساس روش کجدال انجام شد (Yaghoubi et al., 2017). این روش شامل سه مرحله اصلی است: (۱) هضم نمونه با اسید سولفوریک غلیظ و کاتالیزور (مانند سولفات پتاسیم و سلنیوم) برای تبدیل نیتروژن به یون آمونیوم، (۲) تقطیر آمونیوم آزاد شده پس از قلیایی کردن محلول هضم شده، و (۳) تیتراسیون آمونیاک تقطیر شده با اسید استاندارد برای تعیین میزان نیتروژن. محاسبات انجام‌شده به‌طور مستقیم محتوای نیتروژن تام را ارائه می‌دهد.

اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی و آنزیمی

برای سنجش ویژگی‌های بیوشیمیایی و آنزیمی، برگ‌های گیاه در مرحله گلدهی جمع‌آوری شد. میزان کلروفیل a، b و کل و با روش لیچتنتالر و ویلبورن (Lichtenthaler & Wellburn, 1983) اندازه‌گیری شد. برای این کار، ۰/۲۵ گرم از برگ گیاه با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ در صد هموژنیزه شده و محلول به دست آمده با اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان رنگیزه‌ها با استفاده از روابط مشخص شده محاسبه گردید.

$$\text{Total chlorophyll } (\mu g\, g^{-1}\, FW) = 20.2(A_{645}) + 8.02\,(A_{663}) \quad (۳)$$

$$\text{Chlorophyll a } (\mu g\, g^{-1}\, FW) = 12.7(A_{663}) - 2.69\,(A_{645}) \quad (۴)$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu g\, g^{-1}\, FW) = 22.9(A_{645}) - 4.68\,(A_{663}) \quad (۵)$$

برای اندازه‌گیری میزان پرولین آزاد از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد. در این روش، ۰/۵ میلی‌گرم برگ نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ در صد سولفوسالیسیلیک اسید هموژنیزه شده و پس از صاف شدن، ۲ میلی‌لیتر از محلول با معرف نین هیدرین و استیک اسید مخلوط گردید. مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد و سپس در حمام یخ سرد شد. پس از افزودن تولوئن (۴ میلی‌لیتر) و همزدن کردن (۱۵ تا ۲۰ ثانیه)، فاز بالایی محلول برای اندازه‌گیری غلظت پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده گردید و مقدار پرولین از عادله زیر محاسبه شد.

$$FP = \frac{R \times T \times W}{115/5} \times 1000 \quad (۶)$$

FP= محتوای پرولین آزاد (واحد آن $\mu mol.g^{-1}$ FW می باشد)، R= عدد قرائت شده از دستگاه اسپکتروفتومتر، T= میزان تولوئن مصرف شده، که در همه نمونه‌های مصرفی یکسان و به مقدار ۴ میلی‌لیتر می‌باشد. W= وزن نمونه

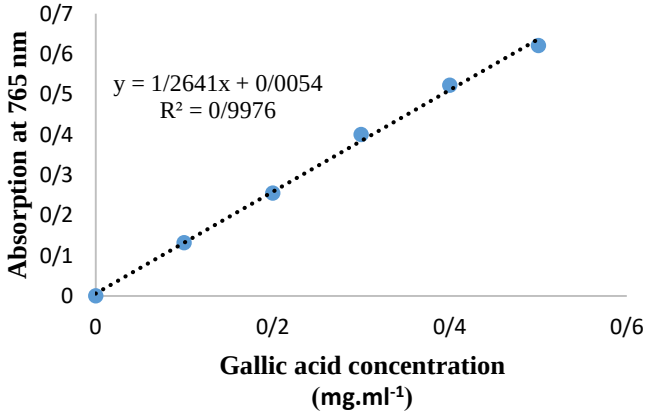
برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، از روش هندیسا و همکاران (Dhindsa et al., 1981) استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم (pH=7) و ۱۵ میلی‌مول پراکسید هیدروژن مخلوط گردید. سپس جذب نوری این مخلوط در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شد. برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز عدد بدست آمده از اسپکتروفتومتر (جذب اول منهای جذب آخر) را در عدد ۱۰۰۰ ضرب کرده و بر ۳۹/۲ تقسیم شد، سپس عدد حاصل در

۲ ضرب گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده روش چانس و ماهلی (Chance & Maehly, 1995) صورت گرفت. در این روش، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۵۰ میکرولیتر گایاکول (به‌عنوان دهنده الکترون) و ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد (به‌عنوان گیرنده الکترون) مخلوط شدند. تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۳۶ نانومتر با اسپکتروفتومتر هر ۱۵ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. برای به دست آوردن میزان پراکسیداز، عدد حاصل از اسپکتوفتومتر را در عدد ۱۰۰۰ ضرب کرده و بر ۲۶/۶ تقسیم شد و سپس عدد حاصل را در ۲ ضرب گردید.

از روش بیچامپ و فردوویچ (Beauchamp & Fridovich, 1971) برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) استفاده شد. این روش بر اساس توانایی آنزیم SOD در مهار احیای فیتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) توسط رادیکال‌های سوپراکسید تحت نور و در حضور ریبوفلاوین انجام می‌شود. در این فرآیند، ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم (pH=7.8)، ۷۵ میکرومول NBT، ۱۳ میلی‌مول L–متیونین، ۱۰۰ میلی‌مول EDTA، و ۲ میکرومول ریبوفلاوین مخلوط شد. محلول ریبوفلاوین در ظرف تیره نگهداری شده و در لحظه آخر به ترکیب اضافه گردید. سپس این مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار داده شد و میزان جذب نوری محلول در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای تبدیل سوپراکسید دیسموتاز عدد به دست آمده از اسپکتروفتومتر را در عدد ۱۰۰۰ ضرب کرده سپس عدد حاصل در ۲ ضرب گردید.

برای اندازه‌گیری فنل به روش فولین سیوکالچو، ابتدا ۰/۵ تا ۱ گرم از نمونه فریز شده یا تازه با ۸۰ درصد اتانول همگن‌سازی شد. سپس مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و محلول صاف شده به فالکون جدید منتقل شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره به همراه ۷ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیکالتو اضافه گردید. پس از ۳ دقیقه، ۴ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم یک مولار افزوده و محلول به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. در نهایت، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Ebrahimzadeh et al., 2008). برای تهیه منحنی استاندارد از اسید گالیک در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم استفاده شد (شکل ۱).

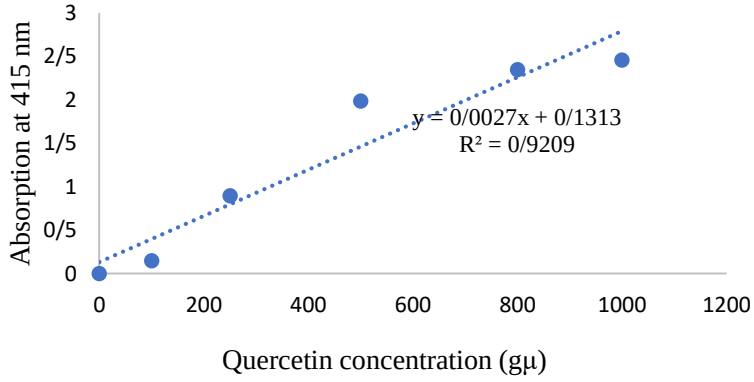


شکل ۱- منحنی استاندارد گالیک اسید برای محاسبه مقدار فنل کل

Figure 1- Standard curve of gallic acid for determining total phenolic content.

برای اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA)، ۰/۲۵ گرم برگ با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد گرم شد. پس از سرد شدن سریع در یخ، مخلوط مجدداً با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر و جذب رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و از هم کسر گردید (Heath & Packer, 1968).

برای اندازه‌گیری فلاونوئید برگ، ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد استخراج شد. عصاره به‌دست‌آمده سانتریفیوژ شده و به فاز مایع منتقل گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داشته شده و سپس جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد (Nogata et al., 2006). برای تهیه منحنی استاندارد از کوئرسین در غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی استاندارد کوئرسین برای محاسبه مقدار فلاونوئید
Figure 2- Standard curve of quercetin for determining flavonoid content.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بعد از جمع‌آوری داده‌های آزمایش، تست نرمال بودن خطای آزمایش انجام شد. تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. مقایسه سه میانگین داده‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. همبستگی ساده بین صفات با استفاده از نرم‌افزارهای Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۳ و Minitab نسخه ۱۸ انجام شد. تجزیه کلاستر و همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار Minitab صورت گرفت.

نتایج و بحث

صفات عملکردی

براساس نتایج به‌دست آمده، قطر کلاله ($p\leq0.01$)، طول کلاله ($p\leq0.05$)، تعداد گل در بوته ($p\leq0.05$)، عملکرد گل

($p\leq0.01$) و عملکرد کلا له ($p\leq0.01$) در اکوت یپ های مورد آزمایش تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ۳). براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، اکوتیپ EC2 از نظر صـــفات قطر کلاله (۲/۰۹ میلی‌متر)، طول کلاله (۲/۴۳ ســانتی‌متر)، تعداد گل (۹۵/۴۰ گل در مترمربع)، عملکرد تر گل (۴۷/۲۷ گرم در مترمربع) و عملکرد خشــک کلاله (۰/۸۲۸ گرم در مترمربع) دارای بالاترین میانگین در بین اکوتیپ های مورد آز مایش بود. علاوه بر این، اکوتیپ EC4 از نظر صـــفات طول کلاله و تعداد گل در بوته در گروه مشترک با برترین تیمار قرار داشت. کمترین میانگین صفات قطر کلا له (۱/۶۹ میلی‌متر)، ت عداد گل (۵۰/۵۷ گل در مترمربع)، عملکرد تر گل (۱۷/۷۵ گرم در مترمربع) و عملکرد خشک کلاله (۰/۲۸۸ گرم در مترمربع) در اکوتیپ EC5 م شاهده شد (جدول ۳).

به نظر می‌رســـد که از دلایل برتری اکوتیپ EC2 از لحاظ صفات عملکردی سازگاری بیشترین این اکوتیپ با شرایط اجرای آزمایش بود. این نتیجه‌گیری قابل انتظار بود، زیرا اکوتیپ‌های زعفران را از نقاط مختلف ا ستان‌های ا صفهان و خرا سان جنوبی جمع‌آوری شـــده بود. این مناطق از نظر شـــرایط آب و هوایی و جغرافیایی با یکدیگر تفاوت‌های قابل توجهی دا شتند (جدول ۱). در این راســـتا، پژوهشـــگران نتایج مشـــابهی گزارش کردند که می‌توان به مطالعه ارزیابی تنوع عملکردی شـش اکوتیپ زعفران که از مناطق مختلف دو اســـتان خراســـان جنوبی و رضـــوی جمع‌آوری شده بودند، اشاره کرد (Bayat et al., 2016). در بین پارامترهای اقلیمی مناطقی که اکوتیپ‌ها از آنجا جمع‌آوری شـــده بودند، بیشترین ارتفاع از سطح دریا مربوط به منطقه نطنز (EC2) بود.

جدول ۳- ارزیابی صفات عملکردی و فیتوشیمیایی مرتبط با کلاله و گل زعفران در اکوتیپ‌های مختلف

Table 3- Evaluation of yield and phytochemical traits related to saffron stigma and flower in different ecotypes

اکوتیپ Ecotype	قطر کلاله Stigma diameter (mm)	طول کلاله Stigma length (cm)	تعداد گل Number of flowers (m^2)	عملکرد تر گل Fresh flower yield ($g.m^{-2}$)	عملکرد خشک کلاله Dry stigma yield ($g.m^{-2}$)	سافرانال Safranal ($E^{1\%}_{1\ cm}$)	پیکروکروسین Picrosin ($E^{1\%}_{1\ cm}$)	کروسین Crosin ($E^{1\%}_{1\ cm}$)	رطوبت گل تازه Fresh flower moisture content (%)	خاکستر کل Total ash (%)	نیتروژن Nitrogen (%)
EC1	1.81±0.06b	2.35±0.03ab	67.81±12.10bc	20.81±1.27c	0.728±0.11ab	25.32±6.21b	99.7±11.3bc	126.2±7.05b	84.35±1.05b	4.99±0.08ab	3.12±0.13b
EC2	2.09±0.1a	2.43±0.04a	95.40±17.35a	47.27±3.22a	0.828±0.06a	53.02±5.46a	175.1±29.5a	202.6±27.9a	90.36±1.36a	5.1±0.12a	3.47±0.06a
EC3	1.69±0.01b	2.28±0.03b	85.05±10.53ab	48.16±1.06a	0.544±0.11bc	40.43±5.11ab	145.2±20.8ab	150.4±18.1ab	76.71±1.24c	4.57±0.09c	2.78±0.12c
EC4	1.78±0.03b	2.46±0.03a	70.11±8.67abc	30.20±5.65b	0.412±0.086c	53.53±2.77a	116.6±17.6ab	131.1±14.3b	84.98±1.5b	4.98±0.03ab	3.19±0.01b
EC5	1.69±0.01b	2.36±0.03ab	50.57±18.99c	17.75±4.77c	0.288±0.012c	28.77±4.91b	53.55±3.71c	104.1±17.3b	81.47±1.86b	4.7±0.14bc	3.05±0.05bc
LSD=0.05	0.175	0.103	20.66	6.70	0.210	15.84	59.57	57.47	4.49	0.311	0.272

جدول ۳- ارزیابی صفات عملکردی و فیتوشیمیایی مرتبط با کلاله و گل زعفران در اکوتیپ‌های مختلف

Table 3- Evaluation of yield and phytochemical traits related to saffron stigma and flower in different ecotypes

اکوتیپ Ecotype	قطر کلاله Stigma diameter (mm)	طول کلاله Stigma length (cm)	تعداد گل Number of flowers (m^2)	عملکرد تر گل Fresh flower yield ($g.m^{-2}$)	عملکرد خشک کلاله Dry stigma yield ($g.m^{-2}$)	سافرانال Safranal ($E^{1\%}_{1\ cm}$)	پیکروکروسین Picrosin ($E^{1\%}_{1\ cm}$)	کروسین Crosin ($E^{1\%}_{1\ cm}$)	رطوبت گل تازه Fresh flower moisture content (%)	خاکستر کل Total ash (%)	نیتروژن Nitrogen (%)
EC1	1.81±0.06b	2.35±0.03ab	67.81±12.10bc	20.81±1.27c	0.728±0.11ab	25.32±6.21b	99.7±11.3bc	126.2±7.05b	84.35±1.05b	4.99±0.08ab	3.12±0.13b
EC2	2.09±0.1a	2.43±0.04a	95.40±17.35a	47.27±3.22a	0.828±0.06a	53.02±5.46a	175.1±29.5a	202.6±27.9a	90.36±1.36a	5.1±0.12a	3.47±0.06a
EC3	1.69±0.01b	2.28±0.03b	85.05±10.53ab	48.16±1.06a	0.544±0.11bc	40.43±5.11ab	145.2±20.8ab	150.4±18.1ab	76.71±1.24c	4.57±0.09c	2.78±0.12c
EC4	1.78±0.03b	2.46±0.03a	70.11±8.67abc	30.20±5.65b	0.412±0.086c	53.53±2.77a	116.6±17.6ab	131.1±14.3b	84.98±1.5b	4.98±0.03ab	3.19±0.01b
EC5	1.69±0.01b	2.36±0.03ab	50.57±18.99c	17.75±4.77c	0.288±0.012c	28.77±4.91b	53.55±3.71c	104.1±17.3b	81.47±1.86b	4.7±0.14bc	3.05±0.05bc
LSD=0.05	0.175	0.103	20.66	6.70	0.210	15.84	59.57	57.47	4.49	0.311	0.272

جدول ٤- ارزیابی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با کلاله زعفران در اکوتیپ‌های مختلف

Table 4- Evaluation of physiological and biochemical traits related to saffron stigma in different ecotypes

اکوتیپ Ecotype	کلروفیل *a* Chlorophyll *a* ($\mu g.g^{-1}$ FW)	کلروفیل *b* Chlorophyll *b* ($\mu g.g^{-1}$ FW)	کلروفیل کل Total chlorophyll ($\mu g.g^{-1}$ FW)	پرولین Proline ($\mu mol.g^{-1}$ FW)	کاتالاز CAT (U mg protein.min^{-1})	پراکسیداز POX (U mg protein.min^{-1})	سوپراکسید دیسموتاز SOD (U mg protein.min^{-1})	فنل Phenol (mg GA.g^{-1} FW)	مالون دی آلدئید MDA ($nmol.mL^{-1}$)	فلاونوئید Flav (mg QA.g^{-1} FW)
EC1	15.64±1.31a	5.33±0.3ab	20.98±1.13b	1.19±0.07c	6.56±0.5a	26.63±2.96a	14.51±1.7ab	3.63±0.81c	1.88±0.03d	4.51±0.79b
EC2	16.43±0.83a	8.01±0.26a	24.44±0.95a	1.54±0.08b	5.37±0.28bc	23.78±2.31ab	9.83±0.17c	5.19±0.14b	2.37±0.05c	6.34±0.46ab
EC3	16.87±0.93a	5.14±1.58ab	22.02±0.66ab	1.34±0.13bc	4.95±0.47c	20.35±1.74b	10.99±0.72bc	5.6±0.1ab	3.16±0.13ab	6.92±0.85ab
EC4	15.31±0.62a	7.81±0.1a	23.13±0.62ab	1.37±0.05bc	7.26±0.41a	19.09±0.59bc	15.99±1.8a	5.84±0.14ab	2.92±0.24b	8.99±0.28a
EC5	12.24±0.82b	3.26±1.4b	15.5±1.46c	1.95±0.16a	4.13±0.51c	13.38±1.4c	9.59±0.55c	6.66±0.44a	3.49±0.18a	6.95±1.26ab
LSD=0.05	2.92	3.03	3.18	0.339	1.39	6.21	3.72	1.33	0.469	2.52

علاوه بر این، اقلیم کوه ستانی و معتدل سرد در این منطقه از پارامترهای اقلیمی شاخص در این منطقه محسوب می‌شود که می‌توان بر صـفات عملکردی و کیفی زعفران اثرگذار باشـد. در این راسـتا، فرخی و همکاران (Farrokhi et al., 2021) بیان داشتند که مابین صفات عملکردی و کیفی زعفران و پارامترهای اقلیمی از قبیل ارتفاع از سـطح دریا همبسـتگی معنی‌داری وجود دارد. با توجه به نتایج به دسـت آمده از این بخش، اگر هدف به‌دست آوردن عملکرد بالا باشد، کاشت اکوتیپ نطنز در شرایط اقلیمی اجرای آز مایش م ناسـب‌ترین و مطلوب‌ترین اکوت یپ شناخته شد.

در نقطه مقابل، کاشـت اکوتیپ بادرود (EC5) و انتخاب آن برای کاشـت در منطقه مورد مطالعه از نامناسـب‌ترین اکوتیپ‌ها می‌تواند با شد. در پژوهش حا ضر، اکوتیپ EC4 (قائنات ا ستان خراسـان جنوبی) نیز از میانگین عملکردی مطلوبی برخوردار بود. به‌طور کلی اسـتان‌های خراسـان شـمالی، رضـوی و جنوبی از تولیدکنندگان شاخص زعفران در ایران و دنیا مح سوب می شود که سابقه ک شت و کار این گیاه در این مناطق بسیار بالا ست. از این‌رو، زعفران‌های این مناطق از صفات کیفی و کمی مطلوب و بالایی نیز برخوردار هسـتند. از این‌رو با توجه به ویژگی های ژنتیکی این اکوتیپ، انتظار عملکرد بالا از نظر صـفات کیفی و کمی از اکوتیپ‌های به‌دسـت آمده از این مناطق دور از انتظار نبود. بیات و همکاران (Bayat et al., 2016) بیان داشـتند که اگر شرایط آب و هوایی و مدیریت مزرعه مناسب‌تر باشد، کیفیت پیاز زعفران بهتر خواهد بود و این به افزایش تعداد جوانه‌های گل منجر خواهد شـد. سـیراچوسـا و همکاران (Siracusa et al., 2010) نیز گزارش کردند که تعداد گل ها و میزان تولید کلاله به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر محیط و منبع پیاز قرار داشـتند. علوی سینی و همکاران (Alavi Siney et al., 2015) گزارش کردند که از نظر عملکرد گل و عملکرد کلاله، بین اکوتیپ‌های زعفران تفاوت‌های ژنتیکی وجود دارد.

صفات کیفی

کیفیت زعفران برا ساس محتوای سافرانال، پیکروکرو سین و کرو سین سنجش می شود. از نظر این صفات، اکوتیپ‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری داشتند. اکوتیپ EC2 از نظر سافرانال، پیکروکروسـین و کروسـین دارای بالاترین میانگین (به‌ترتیب ۵۳/۰۲، ۱۷۵/۱ و ۲۰۲/۶ $E_{1\,cm}^{1\%}$) بود. علاوه بر این، از نظر سـافرانال و پیکروکروسـین، اکوتیپ های EC3 و EC4 نیز بالاترین میانگین را داشـتند. اکوتیپ‌های EC1 و EC5 از نظر ترکیبات کیفی از جمله کروسـین، پیرکوکروسـین و سـافرنال کمترین میانگین را دا شتند (جدول ۳). نتایج به‌د ست‌آمده در این مطالعه نشـان‌دهنده تأثیرات قابل توجه اکوتیپ‌های مختلف بر کیفیت زعفران اسـت. کیفیت زعفران معمولاً بر اسـاس محتوای سافرانال، پیکروکروسین و کروسین سنجیده می‌شود که هر یک از این ترکیبات نقش حیاتی در طعم، عطر و رنگ زعفران ایفا می‌کنند.

اکوتیپ EC2 با بالاترین میانگین‌ها در این صـفات، احتمالاً به دلیل سـازگاری بهتر با شـرایط محیطی خاص، از جمله نوع خاک، دما و رطوبت، توانسـته اسـت ترکیبات شـیمیایی را به‌طور بهینه تولید کند. به‌علاوه، اکوتیپ های EC3 و EC4 نیز با کیفیت بالای خود نشـان‌دهنده توانمندی های ژنتیکی و ویژگی‌های خاص خود در پاسخ به شـرایط محیطی هسـتند. در مقابل، اکوتیپ های EC1 و EC5 که کمترین مقادیر را در ترکیبات کیفی داشـتند، ممکن اسـت تحت تأثیر عوامل محیطی نامسـاعد یا کمبود مواد مغذی قرار گرفته باشـند. این عدم سـازگاری می‌تواند به تداخل با فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشـیمیایی منجر شـود که بر کیفیت نهایی زعفران تأثیر می‌گذارد (Farrokhi et al., 2021; Cardone et al., 2021). بیات و همکاران (Bayat et al., 2016) بیان کردند که سافرانال تحت شرایط خشک‌کردن و ذخیره سازی از پیکروکرو سین تولید

می‌شـــود و همچنین مقداری از آن در کلاله زعفران با توجه به شرایط اقلیمی نیز به وجود می‌آید.

عوامل مؤثر بر متابولیت‌های ثانویه زعفران شـــامل شـــرایط اقلیمی و شیوه‌های زراعی هستند. زعفران به دلیل توانایی‌اش در ســازگاری با شــرایط آب و هوایی متنوع، در نقاط مختلف دارای اکوتیپ‌های متفاوتی است (Vakili-Ghartavol & Alizadeh-Salteh, 2016). تحقیقات نشـــان داده‌اند که تفاوت های معنی‌داری در متابولیت‌های ثانویه بین مناطق مختلف وجود دارد. به‌عنوان مثال، عبدالله‌و ارتگا (Abdullave & Ortega, 2007) اختلافات ترکیبات زعفران در مکان‌های گوناگون را به تنوع محیطی، واریته و روش های کشـــت مرتبط می‌دانند. همچنین، پژوهشـگران خاطرنشـان کردند که غلظت‌های بالاتر ترکیبات مؤثر در زعفران قائن به دلیل تفاوت در ارتفاع از سـطح دریا و شرایط اقلیمی خاص این منطقه است (Zarinkamar et al., 2011; Vakili-Ghartavol & Alizadeh-Salteh, 2016). یکی از ویژگی‌های شـاخص منطقه نطنز (EC2) ارتفاع بالاتر این منطقه در مقایسه با سایر مناطق می‌باشد که منجر به بهبود صفات کیفی و کمی در این اکوتیپ می‌شود. این موضوع، یعنی اثر مثبت ارتفاع از ســطح دریا بر محتوای صـــفات کیفی زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال توسط سایر پژوهشگران نیز تأیید شده است (Lage & Cantrell, 2009; Farrokhi et al., 2021).

مقدار ســـافرانال در اکوتیپ‌ها از ۲۵/۳۲ تا ۵۳/۵۳، مقادیر پیکروکروســـین از ۵۳/۵۵ تا ۱۷۵/۱ و کروســـین از ۱۰۴/۱ تا ۲۰۲/۶ $E_{1\,cm}^{1\%}$ متغیر بود. طبق اســـتاندارد ISO/TS 3632، زعفران اکوتیپ‌های EC2، EC3 و EC4 در دسته I (بین ۲۰ تا ۵۰) قرار می‌گیرد که نشـان‌دهنده کیفیت بالای زعفران اسـت. محتویات کروسـین، پیکروکروسـین و سـافرانال در کشـورهای مختلف تفاوت‌های معنی‌داری دارند، همچنین بین زعفران‌های کشت شده در یک کشور که تحت شرایط خاکی–اقلیمی مشابه قرار دارند (Urbani et al., 2016).

محتوای رطوبت، خاکستر کل و نیتروژن تام

از نظر صـفات محتوای رطوبت، خاکسـتر کل و نیتروژن تام، اکوتیپ EC2 دارای برتری معنی‌دار در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها بود. محدوده تغییرات این صـــفات به‌ترتیب ۷۶/۷۱ تا ۹۰/۳۶ درصـد برای رطوبت، ۴/۵۷ تا ۵/۱ درصـد برای خاکسـتر کل و ۲/۷۸ تا ۳/۴۷ درصـــد برای نیتروژن تام به‌دســـت آمد. کمترین میانگین رطوبت، خاکســـتر کل و نیتروژن تام در اکوتیپ EC3 مشـــاهده شـــد (جدول ۳). خاکســـتر کل، رطوبت و نیتروژن تام زعفران از ویژگی‌های کلیدی هستند که تأثیر زیادی بر کیفیت و عملکرد این گیاه دارند و به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر اکوتیپ‌های مختلف و شـرایط محیطی قرار می‌گیرند (Sarfraz et al., 2024). میزان خاکستر کل نشان‌دهنده محتوای معدنی زعفران است که از نوع خاک و تغذیه ناشی می‌شود، در حالی که رطوبت بالای کلاله می‌تواند به کاهش کیفیت و ماندگاری زعفران منجر شود و اکوتیپ‌های کشت‌شده در مناطق خشک‌تر معمولاً رطوبت کمتری دارند (Kafi et al., 2018). همچنین، نیتروژن تام به‌عنوان یکی از عناصـر کلیدی برای رشـد و تولید متابولیت‌های ثانویه، بســـته به شـــرایط زراعی و نوع کودهای اســـتفاده‌شـــده، می‌تواند کیفیت زعفران را تحت تأثیر قرار دهد (Aboueshaghi et al., 2023).

میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

یافته‌های آزمایش نشان داد که میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کل) در اکوتیپ های مورد آزمایش تفاوت معنی‌دار داشتند. اکوتیپ‌های EC2، EC3 و EC4 از نظر میزان این رنگیزه‌ها بالاترین میانگین را نشان دادند. در بین اکوتیپ‌ها، EC5 از نظر میانگین این رنگیزه‌های کمترین میزان را به‌ترتیب با میانگین ۱۲/۲۴، ۳/۲۶ و ۱۵/۵ میکروگرم بر گرم وزن تر

داشت (جدول ۴). علوی سینی و همکاران (Alavi Siney et al., 2015) نشان دادند که ویژگی‌های فیزیولوژیکی اکوتیپ‌های زعفران در مناطق مختلف متفاوت است و این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از شرایط محیطی باشد. این نتایج به‌وضوح تأثیرات متقابل اکوتیپ‌ها و محیط را نمایان می‌کند. تفاوت میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، به‌ویژه کلروفیل، در اکوتیپ‌های مختلف زعفران به تنوع ژنتیکی و سازگاری این اکوتیپ‌ها با شرایط محیطی مرتبط است. هر اکوتیپ ممکن است به‌طور خاصی به عوامل اقلیمی، نوع خاک و شیوه‌های مدیریت زراعی پاسخ دهد، که منجر به تغییرات قابل توجهی در میزان کلروفیل و در نتیجه ظرفیت فتوسنتزی آن‌ها می‌شود (Fazil et al., 2024). نتایج نشان داد که مابین میزان کلروفیل کل و پرولین همبستگی منفی وجود دارد و از طرف دیگر، EC5 که دارای کمترین میزان کلروفیل کل بود، بیشترین محتوای پرولین را نشان داد. یکی از دلایل احتمالی رقابت و پیشی‌گرفتن گلوتامین کیناز (آنزیم کاتالیزکننده پرولین) در EC5، فعالیت آنزیم گلوتامات لیگاز (اولین آنزیم مسیر بیوسنتز کلروفیل) است. این امر موجب می‌شود پیش ساز گلوتامات (پیش ساز مسیر سنتز کلروفیل و پرولین) بیشتر به مصرف پرولین برسد و به این ترتیب، بیوسنتز کلروفیل با محدودیت مواجه گردد (Isazadeh Matak et al., 2023).

محتوای پرولین

نتایج نشان داد که اکوتیپ‌های مورد آزمایش از نظر اسید آمینه پرولین تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد داشتند. بیشترین محتوای پرولین مربوط به اکوتیپ EC5 با میانگین ۱/۹۵ میکرومول بر گرم وزن تر بود در حالی که اکوتیپ EC1 کمترین میانگین این صفت را داشت (۱/۱۹ میکرومول بر گرم وزن تر) (جدول ۴). پرولین، به‌عنوان یک اسید آمینه غیرضروری، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده در زعفران ایفا می‌کند. تفاوت در محتوای پرولین در اکوتیپ‌های مختلف زعفران می‌تواند ناشی از شرایط زیست‌محیطی، تنوع ژنتیکی، و پاسخ به تنش‌های مختلف باشد. اکوتیپ‌هایی که در مناطق خشک‌تر رشد می‌کنند، معمولاً پرولین بیشتری تولید می‌کنند تا از آسیب‌های سلولی جلوگیری کنند (Hamidian et al., 2023). هم‌راستا با یافته‌های پژوهش حاضر، تفاوت در محتوای اسید آمینه پرولین در اکوتیپ های گیاهان مختلف همچون *Silybum marianum* (Hammami et al., 2020) و *Foeniculum vulgare* (Mohammadi et al., 2023) گزارش شده است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

از نظر فعالیت آنزیم CAT، POX و SOD، تفاوت معنی‌داری در بین اکوتیپ‌های زعفران مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم CAT، مربوط به اکوتیپ های EC1 و EC4 (۶/۵۶ و ۷/۲۶ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) بود در حالی که کمترین فعالیت این آنزیم در اکوتیپ های EC3 و EC5 (به‌ترتیب ۴/۹۵ و ۴/۱۳ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) به‌دست آمد (جدول ۴). اکوتیپ‌های EC1 و EC5 به‌ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم POX (به‌ترتیب ۲۶/۶۳ و ۱۳/۳۸ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) را نشان دادند (جدول ۴). از نظر فعالیت آنزیم SOD، اکوتیپ‌های EC2 و EC5 کمترین فعالیت (به‌ترتیب ۹/۸۳ و ۹/۵۹ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین) را داشتند در حالی که EC4 بیشترین فعالیت این آنزیم (۱۵/۹۹ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین) را به خود اختصاص داد (جدول ۴). این نتایج نشان‌دهنده نقش کلیدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بهبود تحمل به تنش‌های محیطی و پایداری فیزیولوژیکی اکوتیپ‌های زعفران هستند و می‌توانند به انتخاب و بهبود اکوتیپ‌های مقاوم‌تر در برابر شرایط نامساعد کمک کنند.

محتوای فنل کل

از نظر محتوای فنل کل اکوتیپ های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری نشـــان دادند ($p\leq0.01$). به‌طوری که اکوتیپ EC5 بیشترین محتوای (۶/۶۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) را داشـــت در حالی که کمترین میانگین این صـــفت مربوط به اکوتیپ EC1 با میانگین ۳/۶۳ میلی‌گرم گالیک اســـید بر گرم وزن تر بود (جدول ۴). در آزمایشـــی، مابین ده اکوتیپ زعفران تفاوت‌های معنی‌دار آماری بر اساس رطوبت، فنل کل، فلاونوئید کل، پیکروکروسین، کروسین و سافرانال گزارش شد که تأییدی بر یافته های پژوهش حاضـــر بود (Kabiri et al., 2023). تحقیقات اخیر نشان داده است که شرایط اقلیمی کشاورزی و نوع اســـتخراج منجر به تغییرات زیادی در محتوای فنل کل می‌شود. محتوای فنل کل در زعفران نسبت به سایر افزودنی‌های غذایی و ادویه‌ها، بسیار مهم است (Caser et al., 2020).

محتوای مالون دی آلدئید

یافته‌های آزمایش نشان داد که اکوتیپ‌های مورد آزمایش از نظر محتوای MDA تفاوت معنی‌داری ($p<0.01$) داشـــتند. رنج تغییرات این ترکیب از ۱/۸۸ تا۳/۴۹ نانومول بر میلی‌لیتر بود. کمترین میانگین مربوط به اکوتیپ EC1 بود در حالی که اکوتیپ EC5 بیشـــترین محتوای این ترکیب را نشـــان داد (جدول ۴). MDA یکی از محصـولات جانبی اکسـیداسـیون لیپیدها در سلول‌های گیاهی است و به‌عنوان یک نشانگر مهم برای ارزیابی تنش اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از تنش‌های زنده و غیرزنده شـناخته می‌شـود. اکوتیپ‌های مختلف زعفران ممکن اسـت در واکنش به شـرایط محیطی گوناگون، سـطوح متفاوتی از MDA تولید کنند. عواملی که می‌توانند بر این تفاوت‌ها تأثیر بگذارند شامل عوامل ژنتیکی، شرایط محیطی و تاریخچه کشت هستند (Alavi-Siney et al., 2023).

محتوای فلاونوئید

از نظر محتوای فلاونوئیـد، اکوتیـپ‌هـای زعفران تفـاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند. بیشترین محتوای فلاونوئید مربوط به اکوتیپ EC4 با میانگین ۸/۹۹ میلی‌گرم کوئرسین بر گرم وزن تر بود در حالی که اکوتیپ EC1 کمترین میانگین این صفت (۴/۵۱ میلی‌گرم کوئرسین بر گرم وزن تر) را نشان داد. سایر اکوتیپ‌ها از نظر محتوای فلاونوئید حد وسط این دو اکوتیپ قرار داشـتند (جدول ۴). در آزمایشـی توسـط کبیر و همکاران (Kabiri et al., 2023) گزارش شد که بالاترین سطح فلاونوئید کل در اکوتیپ ES7 مشاهده شد که پس از آن اکوتیپ ES8 قرار داشـــت، در حالی که کمترین میزان در ES1 ثبت گردید. این نتایج نشان داد که یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر تفاوت معنی‌دار در محتوای فلاونوئید در اکوتیپ ها مختلف زعفران کاملاً مورد تأیید می‌باشد.

جدول ۵- همبستگی ساده بین صفات عملکردی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در اکوتیپ‌های مختلف زعفران

Table 5- Simple correlation between functional, physiological, and biochemical traits in different saffron ecotypes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	0.28																			
3	0.33																			
4	0.37		0.75																	
5	0.53		0.60	0.43																
6	0.42	0.37	0.40	0.58																
7	0.41		0.84	0.81	0.50	0.51														
8	0.39	0.38	0.65	0.67	0.54	0.43	0.69													
9	0.74	0.52			0.54	0.44		0.35												
10	0.72	0.47			0.32	0.41		0.27	0.77											
11	0.83	0.47				0.40	0.28	0.27	0.75	0.86										
12	0.28		0.33	0.55	0.54	0.27	0.49	0.42												
13	0.54	0.31	0.64	0.39	0.28	0.61	0.65	0.31	0.38	0.40	0.56									
14	0.53		0.63	0.59	0.52	0.57	0.73	0.46	0.38	0.40	0.35	0.76	0.80							
15			-0.39		-0.39		-0.42					-0.41	-0.32	-0.46						
16		0.49			0.33	0.28			0.30	0.32			0.35	0.33	-0.66					
17	0.40		0.37		0.46		0.56	0.43		0.50	0.38	0.33	0.33	0.42	-0.61	0.33				
18								-0.26		0.23			0.27		-0.56	0.82	0.29			
19	-0.29				-0.43	0.28	-0.25			-0.47		-0.56		-0.40	0.51	-0.27	-0.73			
20	-0.48		-0.26		-0.72		-0.42	-0.27	-0.56	-0.59	-0.41	-0.36	-0.25	-0.39	0.53	-0.53	-0.78	-0.41	0.79	
21					-0.52	0.34							0.34				-0.39		0.51	0.61

ضرایب کمتر از ۰/۲۵ (که ارائه نشده‌اند) غیر معنی‌دار (ns)، ضرایب مابین ۰/۲۵ تا ۰/۴۰ معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (*) و ضرایب بیش از ۰/۴۱ معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (**).

۱- قطر کلاله، ۲- طول کلاله، ۳- تعداد گل، ۴- عملکرد تر گل، ۵- عملکرد خشک کلاله، ۶- سافرانال، ۷- پیکروکروسین، ۸- کروسین، ۹- محتوای رطوبت، ۱۰- خاکستر کل، ۱۱- نیتروژن کل، ۱۲- کلروفیل *a*، ۱۳- کلروفیل *b*، ۱۴- کلروفیل کل، ۱۵- پرولین، ۱۶- کاتالاز، ۱۷- پراکسیداز، ۱۸- سوپراکسید دیسموتاز، ۱۹- فنل کل، ۲۰- مالون دی آلدئید و ۲۱- فلاونوئید.

Coefficients less than 0.25 (not shown) are non-significant (ns), coefficients between 0.25 and 0.40 are significant at the 5% probability level (*), and coefficients greater than 0.41 are significant at the 1% probability level (**).

1. Stigma diameter, 2. Stigma length, 3. Number of flowers, 4. Flower fresh yield, 5. Stigma dry yield, 6. Safranal, 7. Picrocrocin, 8. Crocin, 9. Moisture content, 10. Total ash, 11. Total nitrogen, 12. Chlorophyll *a*, 13. Chlorophyll *b*, 14. Total chlorophyll, 15. Proline, 16. CAT, 17. POX, 18. SOD, 19. Total phenols, 20. MDA, 21. Flavonoids

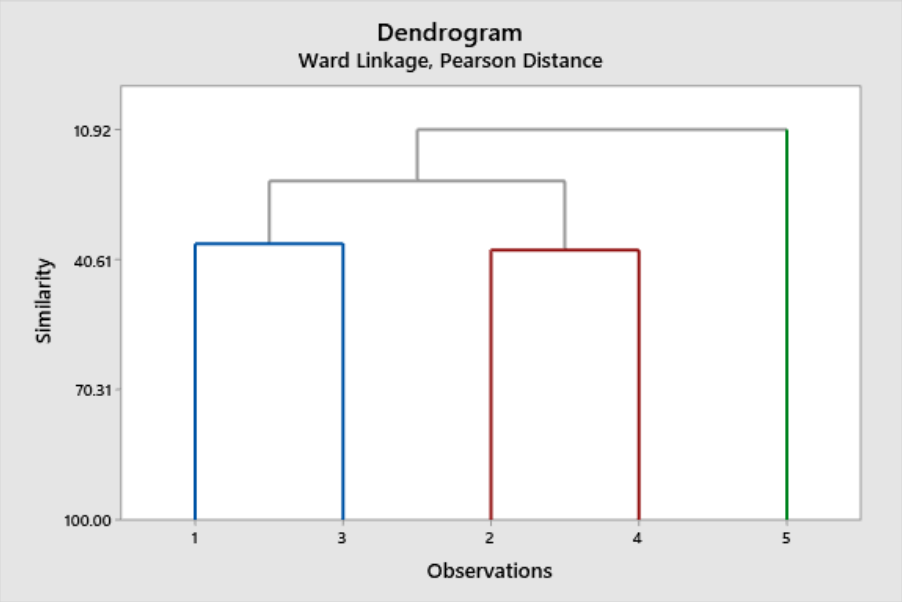
همبستگی بین صفات

نتایج همبستگی ساده بین صفات عملکردی، کیفی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اکوتیپ های مختلف زعفران در جدول ۵ ارائه شده است. براساس این نتایج، عملکرد تر گل و عملکرد خشک کلاله با صفات قطر کلاله، تعداد گل، پیکروکروسین، کروسین، کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل همبستگی مثبت و معنی‌دار داشتند. در حالی که عملکرد کلاله با صفات پرولین، فنل کل، MDA و فلاونوئید همبستگی منفی و معنی‌دار نشان داد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که صفات کیفی زعفران شامل محتوای پیکروکروسین و کروسین تحت تأثیر منفی صفات SOD، فنل کل، MDA و فلاونوئید قرار داشتند. به‌بیان دیگر، افزایش محتوای این پارامتر ها، اثر کاهنده بر میانگین صفات کیفی زعفران داشت. همراستا با یافته‌های این آزمایش، علوی سینی و همکاران (Alavi Siney et al., 2015) گزارش کردند اکثر صفات عملکردی زعفران رابطه معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند و از میان صفات مورد مطالعه، تعداد کلاله و وزن خشک کلاله به‌طور مثبت با عملکرد کلاله زعفران همبستگی داشتند. این موضوع نشان‌دهنده این است که پتانسیل اکوتیپ‌ها از نظر تولید تعداد گل متفاوت بوده و ژنوتیپ‌هایی که تعداد گل بیشتری تولید می‌کنند، دارای میانگین وزن خشک کلاله بالاتری نیز هستند که در نهایت منجر به عملکرد بالاتری خواهد شد. امیرنیا و همکاران (Amirnia et al., 2014) نیز گزارش کردند که بیشترین همبستگی بین صفات مطالعه شده و عملکرد کلاله خشک زعفران به صفات تعداد گل و وزن خشک کلاله مربوط می‌شود.

تجزیه کلاستر و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

براساس صفات عملکردی، کیفی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در این آزمایش، پنج اکوتیپ زعفران در سه خوشه دسته‌بندی شدند (شکل ۳). در خوشه اول که از نظر صفات عملکرد خشک کلاله، کلروفیل *a* و POX برتری داشتند، دو اکوتیپ EC1 و EC3 قرار داشتند. در خوشه دوم که از نظر غالب صفات اندازه‌گیری شده دارای بالاترین میانگین بودند که این صفات شامل: قطر کلاله، طول کلاله، تعداد گل، عملکرد تر گل، سافرانال، پیکروکروسین، کروسین، محتوای رطوبت، خاکستر کل، نیتروژن کل، کلروفیل *b*، کلروفیل کل، CAT، POX و فلاونوئید بودند اکوتیپ‌های EC2 و EC4 قرار داشتند. در نهایت در خوشه آخر که EC5 قرار داشت از نظر صفات پرولین، فنل کل و MDA برتری معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۶). نتایج تجزیه کلاستر در سه خوشه نشان می‌دهد که مابین این سه خوشه اختلافات زیادی وجود داشت که این اختلافات نشان از وجود تفاوت‌های ژنتیکی و یا فنوتیپی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه دارد. بیات و همکاران (Bayat et al., 2016) نیز در آزمایشی مشابهی شش اکوتیپ زعفران را در دو خوشه دسته‌بندی کردند و نتایج مشابهی گزارش نمودند.

در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، دو مؤلفه اول به‌ترتیب ۴۹/۹ و ۱۹/۱ درصد (در مجموع ۶۹ درصد) از تغییرات را توجیه می‌کردند. در مؤلفه اول، دو صفت کلروفیل کل و پرولین بالاترین ضریب را داشتند، در حالی که در مؤلفه دوم، محتوای پراکسیداز بالاترین اثر را نشان داد. بدین ترتیب مؤلفه اول را می‌توان به نام مؤلفه فیزیولوژیکی و مؤلفه دوم را به‌عنوان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نام‌گذاری کرد (شکل ۴). پژوهشگران بیان داشتند که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌عنوان روش مکمل برای تجزیه کلاستر، منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثری اطلاعات از مجموعه داده‌های مورد اندازه‌گیری می‌شود. در این راستا، گزارش شد که شش اکوتیپ زعفران با استفاده از دو مؤلفه اول، ۱۰۰ از تغییرات کل را توجیه می‌کردند (Bayat et al., 2016).



شکل ۳- تجزیه کلاستر اکوتیپ‌های مختلف زعفران براساس صفات عملکردی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

Figure 3- Cluster analysis of different saffron ecotypes based on yield, physiological, and biochemical traits.

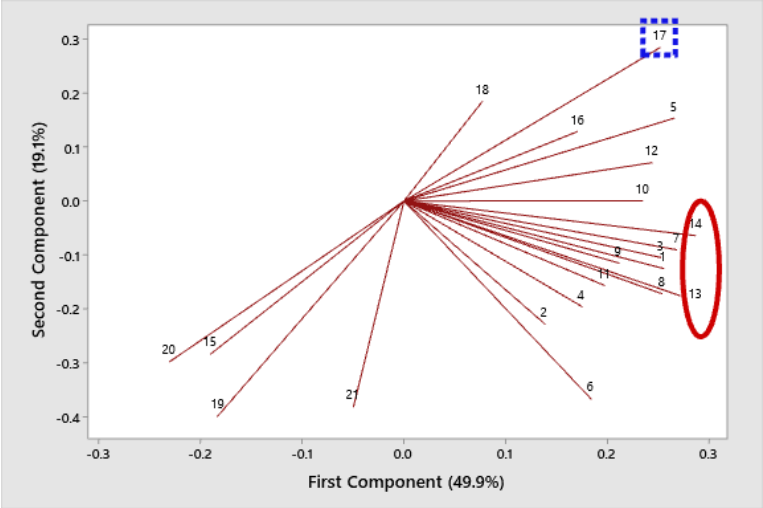
جدول ٦- تجزیه کلاستر اکوتیپ‌های مختلف زعفران براساس صفات عملکردی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

Table 6- Cluster analysis of different saffron ecotypes based on yield, physiological, and biochemical traits

متغیر Variable	کلاستر ۱ Cluster 1	کلاستر ۲ Cluster 2	کلاستر ۳ Cluster 3	Grand centroid
1	1.7483	1.9350	1.6933	1.8120
2	2.3150	2.4417	2.3567	2.3740
3	67.8161	90.2299	60.3448	73.7931
4	20.8163	47.7211	23.9796	32.8435
5	0.7280	0.6860	0.3500	0.5600
6	32.8766	106.5532	86.3202	75.25
7	61.25	145.9	50.3202	85.8234
8	46.11	111.2668	104.1402	87.17233
9	80.5333	87.6717	81.4667	83.5753
10	4.7833	5.0400	4.7000	4.8693
11	2.9500	3.3333	3.0467	3.1227
12	16.2586	15.8723	12.2412	15.3006
13	5.2385	7.9121	3.2619	5.9126
14	21.4971	23.7844	15.5032	21.2132
15	1.2644	1.4558	1.9512	1.4783
16	5.7559	6.3145	4.1304	5.6542
17	23.4892	21.4341	13.3755	20.6444
18	12.7516	12.9109	9.5888	12.1827
19	4.6153	5.5149	6.6610	5.3843
20	2.5215	2.6462	3.4946	2.7660
21	5.7163	7.6615	6.9520	6.7415
تعداد اکوتیپ‌ها Number of ecotypes	2	2	1	

۱- قطر کلاله، ۲- طول کلاله، ۳- تعداد گل، ۴- عملکرد تر گل، ۵- عملکرد خشک کلاله، ۶- سافرانال، ۷- پیکروکروسین، ۸- کروسین، ۹- محتوای رطوبت، ۱۰- خاکستر کل، ۱۱- نیتروژن کل، ۱۲- کلروفیل *a*، ۱۳- کلروفیل *b*، ۱۴- کلروفیل کل، ۱۵- پرولین، ۱۶- کاتالاز، ۱۷- پراکسیداز، ۱۸- سوپراکسید دیسموتاز، ۱۹- فنل کل، ۲۰- مالون دی آلدئید و ۲۱- فلاونوئید.

1. Stigma diameter, 2. Stigma length, 3. Number of flowers, 4. Flower fresh yield, 5. Stigma dry yield, 6. Safranal, 7. Picrocrocin, 8. Crocin, 9. Moisture content, 10. Total ash, 11. Total nitrogen, 12. Chlorophyll *a*, 13. Chlorophyll *b*, 14. Total chlorophyll, 15. Proline, 16. CAT, 17. POX, 18. SOD, 19. Total phenols, 20. MDA and 21. Flavonoids.



شکل ٤- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات عملکردی، کیفی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پنج اکوتیپ زعفران

Figure 4- Principal component analysis of yield, qualitative, physiological, and biochemical traits of five saffron ecotypes.

۱- قطر کلاله، ۲- طول کلاله، ۳- تعداد گل،۴- عملکرد تر گل، ۵- عملکرد خشک کلاله، ۶- سافرانال، ۷- پیکروکروسین، ۸- کروسین، ۹- محتوای رطوبت، ۱۰- خاکستر کل، ۱۱- نیتروژن کل، ۱۲- کلروفیل *a*، ۱۳- کلروفیل *b*، ۱۴- کلروفیل کل، ۱۵- پرولین، ۱۶- کاتالاز، ۱۷- پراکسیداز، ۱۸- سوپراکسید دیسموتاز، ۱۹- فنل کل، ۲۰- مالون دی آلدئید و ۲۱- فلاونوئید.

1. Stigma diameter, 2. Stigma length, 3. Number of flowers, 4. Flower fresh yield, 5. Stigma dry yield, 6. Safranal, 7. Picrocrocin, 8. Crocin, 9. Moisture content, 10. Total ash, 11. Total nitrogen, 12. Chlorophyll *a*, 13. Chlorophyll *b*, 14. Total chlorophyll, 15. Proline, 16. CAT, 17. POX, 18. SOD, 19. Total phenols, 20. MDA, and 21. Flavonoids.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به‌دست‌آمده، تنوع قابل‌توجهی در صفات عملکردی، کیفی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اکوتیپ های زعفران مورد بررسی مشاهده شد. اکوتیپ EC2 به‌طور مکرر به‌عنوان بهترین اکوتیپ از نظر عملکرد گل، عملکرد کلاله، کیفیت ترکیبات شیمیایی (سافرانال، پیکروکروسین و کروسین)، میزان رطوبت، خاکستر کل، و نیتروژن تام معرفی شد. این برتری احتمالاً به دلیل سازگاری ژنتیکی این اکوتیپ با شرایط خاص اقلیمی منطقه آزمایش، ازجمله ارتفاع بالاتر از سطح دریا و اقلیم معتدل و کوهستانی، است. در مقابل، اکوتیپ EC5 با عملکرد پایین‌تر در اغلب صفات، به‌ویژه میزان کلروفیل، محتوای ترکیبات کیفی و عملکرد کلاله، تحت تأثیر محدودیت های محیطی یا ویژگی‌های ژنتیکی ضعیف‌تر قرار گرفت. اکوتیپ‌های ضعیف‌تر، مانندEC5 ، ممکن است به دلیل عوامل تنش‌زای محیطی و مدیریت ناکافی عملکرد ضعیفی داشته باشند. به‌طورکلی، نتایج این تحقیق بر اهمیت انتخاب اکوتیپ های مناسب، با توجه به ویژگی‌های اقلیمی و مدیریتی منطقه، تأکید دارد. از این‌رو، کاشت اکوتیپ نطنز (EC2) در شرایط مشابه منطقه آزمایش به‌عنوان گزینه‌ای ایده‌آل برای دستیابی به عملکرد بالا توصیه می‌شود. علاوه بر این، توجه به صفات کیفی زعفران، ازجمله میزان سافرانال، کروسین و پیکروکروسین، و نیز صفات فیزیولوژیکی، همچون محتوای پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند به بهبود کیفیت و بهره‌وری این محصول ارزشمند کمک کند.

منابع

Abdullave, F., & Ortega, C. (2007). HPLC quantification of major active components from different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry*, *10*, 1126-1131.

Aboueshaghi, R. S., Omidi, H., & Bostani, A. (2023). Assessment of changes in secondary

metabolites and growth of saffron under organic fertilizers and drought. *Journal of Plant Nutrition*, *46*, 386-400. https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2068439.

Alavi-Siney, S. M., Saba, J., Siahpirani, A. F., & Nasiri, J. (2023). ISSR-assisted spatial genetic structure, population admixture, and biodiversity estimates across locally adopted saffron ecotypes from 18 different provenances of Iran. *Journal of Applied Research on Medicinal & Aromatic Plants*, *35*, 100467. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100467.

Alavi Siney, S. M., Saba, J., Andalibi, B., Alavikia, S. S., & Azimi, M. R. (2015). Determination of effective agronomical traits on saffron ecotypes stigma yield in Zanjan conditions. *Saffron Agronomy & Technology*, *3*, 97-106. (In Persian with English Abstract). https://doi.org/10.22048/jsat.2015.10382.

Alhasan, A. S. (2023). Effect of NPK fertilizer on stigma and corm production in saffron (*Crocus sativus* L.). *International Journal of Agricultural & Statistical Sciences*, *19*, 311-316. https://doi.org/10.59467/IJASS.2023.19.311.

Alinaghizadeh, M., & Azimi Gandomani, M. (2024). Impact of phosphate-solubilizing, potassium-solubilizing, and nitrogen-fixing biofertilizers on the characteristics of saffron corm under different irrigation regimes. *Saffron Agronomy & Technology*, *12*, 179-194. (In Persian with English Abstract) https://doi.org/10.22048/jsat.2024.470677.1537.

Amırnıa, R., Bayat, M., & Tajbakhsh, M. (2014). Effects of nano fertilizer application and maternal corm weight on flowering at some saffron (*Crocus sativus* L.) ecotypes. *Turkish Journal of Field Crops*, *19*, 158-168. https://doi.org/10,17557/tjfc,46269.

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

Bayat, M., Amirnia, R., Tajbakhsh, M., & Ramezani, M. (2016). Evaluation of saffron ecotypes for stigma yield and yield components using different maternal corm weights. *Journal of Plant Physiology & Breeding*, *6*, 53-64.

Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *44*, 276-287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8.

Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., & Candido, V. (2020). Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Scientia Horticulturae*, *272*, 109560. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109560.

Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., Molina, R.V., Renau-Morata, B., Nebauer, S.G., & Candido, V. (2021). *Crocus sativus* L. ecotypes from mediterranean countries: Phenological, morpho-productive, qualitative and genetic traits. *Agronomy*, *11*, 551. https://doi.org/10.3390/agronomy11030551.

Caser, M., Demasi, S., Stelluti, S., Donno, D., & Scariot, V. (2020). *Crocus sativus* L. cultivation in alpine environments: Stigmas and tepals as source of bioactive compounds. *Agronomy*, *10*, 1473. https://doi.org/10.3390/agronomy10101473.

Caser, M., Demasi, S., Victorino, Í. M. M., Donno, D., Faccio, A., Lumini, E., Bianciotto, V., & Scariot, V. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi modulate the crop performance and metabolic profile of saffron in soilless cultivation. *Agronomy*, *9*, 232. https://doi.org/10.3390/agronomy9050232.

Chance, B., & Maehly, A. (1995). Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology, Academic Press*. *2*, 764-775. https://doi.org/10,1002/9780470110171,ch14.

Choudhary, V., Choudhary, A., Gahlaut, V., & Jaiswal, V. (2024). Genetic and molecular

advancements in saffron (*Crocus sativus* L.). *Genetics & Genomics of High-Altitude Crops* (Springer). https://doi.org/10.1007/978-981-99-9175-4_3.

Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & 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. https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93.

Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Bekhradnia, A. R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, *7*, 21-28.

Farajzadeh Memari Tabrizi, E. (2024). The effect of strengthening various types of moisture absorbents with plant hormones and food supplements on the growth and performance of saffron plant. *Journal of Saffron Research*, *12*, 80-94. (In Persian with English Abstract). https://doi.org/10.22077/jsr.2024.7742.1234.

Farrokhi, H., Asgharzadeh, A., & Samadi, M.K. (2021). Yield and qualitative and biochemical characteristics of saffron (*Crocus sativus* L.) cultivated in different soil, water, and climate conditions. *Italian Journal of Agrometeorology*, *12*, 43-55. https://doi.org/10.36253/ijam-1216.

Fazil, S., Iqbal, A. M., Sofi, M., Mahdi, S., Jeelani, F., Khan, M., Dar, N., Mir, G., Shikari, A. B., & Bangroo, S. (2024). Estimation of genetic variability in saffron (*Crocus sativus* L.) germplasm for morphological and quality traits. *Journal of Scientific Research & Reports*, *30*, 745-763. https://doi.org/10.9734/jsrr/2024/v30i62092.

Ghanbari, J. (2023). Response of saffron ecotypes to growing season: growth analysis, plant nutrition, and dry matter production. *Journal of Agricultural Science & Technology*, *25*, 911-924. https://doi.org/10.22034/jast.25.4.10

Hamidian, M., Movahhedi-Dehnavi, M., Sayyed, R., Almalki, W. H., Gafur, A., & Fazeli-Nasab, B. (2023). Co-application of mycorrhiza and methyl jasmonate regulates morpho-physiological and antioxidant responses of *Crocus sativus* (Saffron) under salinity stress conditions. *Scientific Reports*, *13*, 7378. https://doi.org/10.1038/s41598-023-34359-6.

Hammami, H., Saadatian, B., & Hosseini, S. A. H. (2020). Geographical variation in seed germination and biochemical response of milk thistle (*Silybum marianum*) ecotypes exposed to osmotic and salinity stresses. *Industrial Crops & Products*, *152*, 112507. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112507.

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

Aminifard, M. H., Behdani, M. A., Shakeri, M., & Tabatabaei, S. J. (2024). Effects of gibberellic acid and plant density on antioxidant activity and secondary metabolites of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Saffron Research*, *12*, 51-64. (In Persian with English Abstract). https://doi.org/10.22077/jsr.2021.4318.1159.

Isazadeh Matak, M., Navabpour, S., & Atashi, S. (2023). Evaluation of morphological and biochemical reactions of saffron plant to salinity stress. *Journal of Saffron Research*, *11*, 124-138. (In Persian with English Abstract). https://doi.org/10.22077/jsr.2023.6509.1217.

ISO 3632-1. 2011. Spices—Saffron (*Crocus sativus* L.); Food products SC 7, Spices, culinary herbs and condiments; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, September 2011

Kabiri, G., Hssaini, L., Naim, N., Houmanat, K., Ennahli, S., Fauconnier, M. L., & Hanine, H. (2023). Aromatic potential, quality and antioxidant activity of saffron grown in Morocco. *Flavour & Fragrance Journal*, *38*, 13-

26. https://doi.org/10.1002/ffj.3722.

Kafi, M., Kamili, A. N., Husaini, A. M., Ozturk, M., & Altay, V. (2018). An expensive spice saffron (*Crocus sativus* L.): a case study from Kashmir, Iran, and Turkey. In: Ozturk, M., Hakeem, K., Ashraf, M., Ahmad, M. (eds) *Global Perspectives on Underutilized Crops*. p. 109-149. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77776-4_4.

Kumar, A., Devi, M., Kumar, R., & Kumar, S. (2022). Introduction of high-value *Crocus sativus* (saffron) cultivation in non-traditional regions of India through ecological modelling. *Scientific Reports*, *12*, 11925. https://doi.org/10.1038/s41598-022-15907-y.

Lage, M., & Cantrell, C. L. (2009). Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae*, *121*, 366-373. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.02.017.

Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans, 11* (5): 591–592 https://doi.org/10.1042/bst0110591.

Marrone, G., Urciuoli, S., Di Lauro, M., Cornali, K., Montalto, G., Masci, C., Vanni, G., Tesauro, M., Vignolini, P., & Noce, A. (2024). Saffron (*Crocus sativus* L.) and Its By-Products: Healthy Effects in Internal Medicine. *Nutrients*, *16*, 2319. https://doi.org/10.3390/nu16142319.

Mohammadi, M., Pouryousef, M., & Farhang, N. (2023). Study on germination and seedling growth of various ecotypes of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under salinity stress. *Journal of Applied Research on Medicinal & Aromatic Plants*, *34*, 100481. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100481.

Mollafilabi, A., Khorramdel, S., & Shabahang, J. (2020). Effects of different drying methods on moisture content, drying time and qualitative criteria of saffron stigma. *Journal of Saffron Research*, *7*, 177-188. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22077/jsr.2018.1872.1072.

Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, *70*, 178-192. https://doi.org/10.1271/bbb.70.178.

Salehi, F., Aelaei, M., Mortazavi, S. N., Salami, S. A., & Chahardeh, H. R. (2022). Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on FLOWER and corm features in two saffron ecotypes. *Journal of Agricultural Science & Sustainable Production*, *33*, 33-50. (In Persian with English Abstract) https://doi.org/10.22034/saps.2022.49262.2780.

Sarfraz, M., Khaliq, A., Tahir, M. M., Iqbal, M. A., Rehman, Z. U., & Shan, Q. (2024). Saffron spice quality in response to integrated nutrient management under lesser Himalayan conditions of Rawalakot Azad Jammu & Kashmir. *Journal of Plant Nutrition*, *47*, 18-29. https://doi.org/10.1080/01904167.2023.2254322.

Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., & Ruberto, G. (2010). Influence of corm provenance and environmental condition on yield and apocarotenoid profiles in saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Composition & Analysis*, *23*, 394-400. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.02.007.

Soukrat, S., Metougui, M., Gabone, F., Nehvi, F., Abousalim, S., & Benlahabib, O. (2019). Study of diversity in some Moroccan population of saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Agricultural Research, 14*, 759-769, https://doi.org/10.5897/AJAR2018.13769.

Urbani, E., Blasi, F., Simonetti, M. S., Chiesi, C., & Cossignani, L. (2016). Investigation on secondary metabolite content and antioxidant activity of commercial saffron powder. *European Food Research & Technology*, *242*,

(2011). Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in *Crocus sativus* L. *Australian Journal of Crop Science*, *5*, 831-838.

Yaghoubi, F., Jami Al-Ahmadi, M., & Bakhshi, M. R. (2017). Investigation of some factors affecting saffron stigma nitrogen content. *Journal of Saffron Research*, *5* (1), 100-110. (In Persian with English Abstract) https://doi.org/10.22077/jsr.2017.605.

987-993. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2687-z.

Vakili-Ghartavol, M., & Alizadeh-Salteh, S. (2016). Comparison between metabolites and antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.) from Kashmar and Marand regions. *Saffron Agronomy & Technology*, *4*, 215-224. (In Persian with English Abstract). https://doi.org/10.22048/jsat.2016.38671.

Zarinkamar, F., Tajik, S., & Soleimanpour, S.