

## ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی بارهنگ سرنیزه‌ای (*Plantago lanceolata L.*) با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها

مریم جانعلی زاده قزوینی<sup>۱</sup>، احمد نظامی<sup>۲\*</sup>، ابراهیم ایزدی دربندی<sup>۲</sup>، مهدی پارسا<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نبات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. اعضای هیئت‌علمی گروه زراعت و اصلاح نبات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۵/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۷

### چکیده

به منظور بررسی تحمل به سرمای گیاه بارهنگ سرنیزه‌ای آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت شرایط کنترل شده در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. عوامل آزمایش شامل اکوتیپ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای (بجنورد، کلات، مشهد، قاین و بیرجند) و دماهای یخ‌زدگی (۰، -۳، -۶، -۹، -۱۲، -۱۵، -۱۸ و -۲۱ درجه سانتی‌گراد) بود. گیاهان بارهنگ پس از سه ماه رشد و خوسرمایی در شرایط طبیعی، جهت اعمال دماهای یخ‌زدگی در اواخر دی‌ماه سال ۱۳۹۰ به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. جهت تعیین پایداری غشاء سیتوپلاسمی، درصد نشت الکترولیت‌ها و دمای پنجاه درصد کشندگی گیاهان بر اساس نشت الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) محاسبه شد. بقای گیاهان نیز چهار هفته پس از اعمال دماهای یخ‌زدگی با اندازه‌گیری درصد بقاء و دمای پنجاه درصد کشندگی گیاهان بر اساس درصد بقاء ( $LT_{50su}$ ) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که به لحاظ  $LT_{50el}$  اکوتیپ مشهد متحمل‌ترین و اکوتیپ‌های کلات و بیرجند حساس‌ترین اکوتیپ‌ها بودند. اثرات متقابل اکوتیپ و دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء معنی‌دار بود، بطوریکه در دمای -۱۲ درجه سانتی‌گراد اکوتیپ‌های بجنورد و بیرجند به ترتیب کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت را دارا بودند. در همین تیمار اکوتیپ مشهد با ۹۴/۴ درصد بیشترین و اکوتیپ بیرجند با ۲۵/۴ درصد کمترین درصد بقاء را نشان دادند. میزان  $LT_{50su}$  در اکوتیپ مشهد ۵/۳ درجه سانتی‌گراد کمتر از اکوتیپ بیرجند بود. در این آزمایش همبستگی منفی و معنی‌داری بین درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء ( $r = -0.70^{**}$ ) وجود داشت. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری ( $r = 0.53^{**}$ ) بین  $LT_{50el}$  با  $LT_{50su}$  دیده شد. بر طبق این نتایج، اکوتیپ‌های مشهد و بجنورد تحمل به یخ‌زدگی بهتری نسبت به اکوتیپ بیرجند از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، بقاء، دمای پنجاه درصد کشندگی گیاهان، سرما.

### مقدمه

واريته‌های مذکور، عادت رشدی ایستاده نسبت به انواع وحشی، ارزش غذایی بالا (مخصوصاً غلظت‌های بالای سدیم، کلسیم و مس)، سازگاری به خاک‌های فقیر و سایر شرایط نامساعد نظیر خشکی، دمای بالا در تابستان و دماهای پایین در زمستان، ذکر شده است (Stewart, 1996., Fraser and Rowarth, 1996). برگ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای مثل چچم (*Lolium spp.*) دیواره سلولی، سلولز، NDF<sup>۱</sup>

بارهنگ سرنیزه‌ای یا بارهنگ برگ باریک (*Plantago lanceolata L.*) یک گونه علفی چندساله با پراکنش وسیع در اراضی چمنی مرتعی مناطق معتدل جهان است. برگ‌های آن خوش‌خوراکی بسیار بالایی داشته و علوفه‌ای غنی از عناصر معدنی فراهم می‌کنند. این گونه استقرار سریعی داشته و در دامنه وسیعی از خاک‌ها رشد می‌کند. در سال‌های گذشته دو وارته زراعی از این گیاه به نام‌های Grasslands Lancelot و Ceres Tonic برای استفاده به عنوان علوفه در نیوزیلند معرفی شده‌اند. دلیل انتخاب

<sup>۱</sup>. Neutral Detergent Fiber

اندازه‌گیری مقدار نشت الکترولیت‌ها فراهم می‌نماید (Miller and Dickens, 1996).

ارزیابی میزان مقاومت گیاه *Trifolium hirtum* به تنش یخ‌زدگی از طریق اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها نشان داد که با کاهش دما از ۶- به ۱۴- درجه سانتی‌گراد، میزان نشت مواد در برگ‌های این گیاه افزایش یافته است (Eugenia et al., 2003). در بررسی دیگری با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاهچه‌های ۱۴ روزه نخود افزایش یافت و میزان نشت مواد در گیاهچه‌ها خوسرما شده (۱۸/۴ درصد) نسبت به انواع خوسرما نشده (۷۹/۷ درصد) کمتر بود (Nayyar et al., 2005). نتایج آزمایشی بر روی چغندرقد نیز نشان داد که اثرات دمای یخ‌زدگی و رقم بر درصد نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار است بطوریکه کاهش دما به کمتر از ۴- درجه سانتی‌گراد سبب افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها در کلیه ارقام مورد بررسی گردید. در این بررسی شیب منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها در رقم ۷۲۳۳ زودتر از بقیه ارقام شروع شد اما در ارقام لاتیتا و IC نشت الکترولیت‌ها از دمای ۷- درجه سانتی‌گراد افزایش یافت (Hajmohammednia Ghalibaf et al., 2010). در مطالعه دیگری که بر روی تحمل به یخ‌زدگی گونه‌های زویسیاگراس (*Zoysia spp.*) با استفاده از آزمون نشت الکترولیت در اندام برگ صورت گرفت مشاهده شد که دامنه دمای پنجاه درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها در آن‌ها بین ۱/۹- تا ۱۰/۴- درجه سانتی‌گراد با میانگین  $LT_{50} (1/77 \pm 6/4)$  درجه سانتی‌گراد متغیر بود و بیشترین و کمترین مقدار آن به ترتیب در گونه‌های *Z. macrostachia* (حساس) و *Z. japonica* (متحمل) مشاهده شد (Xuan et al., 2009).

بقای گیاهان پس از دریافت دماهای یخ‌زدگی در شرایط مصنوعی نیز به‌عنوان یکی از روش‌های ارزیابی تحمل به سرما مورد استفاده محققان قرار گرفته است. در این روش پس از تعیین درصد بقای گیاهان، دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد بقا ( $LT_{50su}$ )<sup>۴</sup> نیز تعیین می‌شود (Azizi et al., 2007). نتایج مطالعه اثر تنش یخ‌زدگی بر چند گونه گیاه دارویی هب (*Hebe sp.*) نشان داد که با کاهش دما درصد بقای گونه‌های مورد مطالعه کاهش یافت، با وجود این کاهش درصد بقای بسته به گونه متفاوت بود و

و ADF<sup>۱</sup> کمی دارد اما پروتئین خام و کربوهیدرات‌های محلول در آب موجود در برگ‌های آن از چچم کمتر است (Derrick et al., 1993). همچنین بارهنگ دارای خواص دارویی متعددی است. به‌عنوان مثال برگ و بذرها این گیاه دارای موسیلاژ می‌باشند که از این مواد برای فرمولاسیون تعدادی از داروهای خاص (Brautigam and Franz, 1985) و درمان بیماری‌های ویروسی و باکتریایی استفاده می‌شود (Franz, 1989). در طب عوام نیز، بخش‌های هوایی بارهنگ به‌عنوان یک داروی ضدالتهاب، ملین، مدر و ضد آسم مصرف می‌شود (Fons et al., 1998). این گونه در زمستان رشد متوسطی داشته و دوران اصلی رشد آن بیشتر در بهار و پاییز به همراه رشد فرصت‌طلبانه<sup>۲</sup> در تابستان است (Moore et al., 2006). با این وجود برخی نتایج حاکی از این است که این گونه تحمل کمی به سرما دارد (Skinner and Gustine, 2002) که ممکن است مانع معرفی و استفاده از آن به‌عنوان یک گیاه پاییزه به‌ویژه در مناطقی با زمستان‌های شدید شود. بنابراین شناسایی ارقام و یا اکوتیپ‌های متحمل به سرمای بارهنگ برای موفقیت آن در کشت پاییزه ضروری است.

در تحقیقات تحمل به سرما در گیاهان، محققان به دنبال آزمون‌هایی هستند که ضمن دارا بودن سهولت، سرعت و اعتبار کافی، قابل تکرار نیز باشند (Teutonico et al., 1993). در این راستا انواع مختلفی از آزمون‌های مصنوعی، جهت مطالعه اثرات تنش سرما ابداع شده است که ضمن کنترل دما، این امکان را نیز فراهم می‌سازند تا در طول زمان، تکرار آزمون صورت پذیرد (Gusta and Fowler, 1977). یکی از این روش‌ها اعمال تیمارهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده و سپس مطالعه درصد نشت الکترولیت‌ها و تعیین دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس آن ( $LT_{50el}$ )<sup>۳</sup> است (Xuan et al., 2009). از آنجائی که آشکارترین و معمول‌ترین نتیجه قابل مشاهده خسارت ناشی از سرما به غشای پلاسمایی، افزایش نشت محلول‌های سلولی نظیر پتاسیم، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها و در مجموع الکترولیت‌های مختلف به خارج از سلول است، لذا این مسئله امکان ارزیابی خسارت نسبی سرما را با

<sup>۱</sup>. Acid Detergent Fiber

<sup>۲</sup>. Opportunistic

<sup>۳</sup>. Lethal Temperature 50% of plants according to the electrolyte leakage percentage

<sup>۴</sup>. Lethal Temperature 50 % of plants according to the survival percentage

برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Murray et al., 1988). به‌منظور جلوگیری از پدیده فراسرد شدن و ایجاد هستک یخ در گیاهان (Lindow et al., 1982) و اطمینان از اینکه مکانیسم مقاومت به سرما از نوع تحمل است و نه اجتناب، در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد محلول‌پاشی باکتری‌های مولد هستک یخ (INAB)<sup>۱</sup> بر روی نمونه‌ها به نحوی انجام شد که سطح گیاهان به‌صورت قشری از این محلول پوشانده و خیس شد. همچنین به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگهداشته و سپس به اتاقک سرد با دمای ۲±۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و در طول شب در آنجا نگهداری شدند.

برای تعیین پایداری غشای سیتوپلاسمی از روش اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها استفاده شد. برای این منظور، روز بعد از اعمال تیمارهای یخ‌زدگی، سه بوته از گیاهان هر گلدان به‌طور تصادفی انتخاب و از سطح خاک بریده شدند. بعد از شستشوی آن‌ها با آب مقطر (برای حذف آلودگی‌های احتمالی)، بوته‌ها در داخل ویال‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار مقطر قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شده و سپس نشت اولیه با استفاده از دستگاه EC<sup>۱</sup> متر (مدل Jenway) اندازه‌گیری شد (EC<sub>1</sub>). به‌منظور اندازه‌گیری میزان نشت کل الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، ویال‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (با فشار ۱/۲ بار و دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط آزمایشگاه منتقل شده و بعد از ۲۴ ساعت، نشت نهایی (EC<sub>2</sub>) اندازه‌گیری شد. درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد.

$$EL\% = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \quad [1]$$

در این معادله EC<sub>1</sub> و EC<sub>2</sub> به ترتیب نشان‌دهنده‌ی درصد نشت الکترولیت‌ها، نشت الکترولیت اولیه و نشت الکترولیت نهایی بودند.

درصد بقای گیاهان نیز از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و از طریق معادله (۲) محاسبه شد.

$$SU\% = \frac{A}{B} \times 100 \quad [2]$$

گونه *H. cupressoides* درصد بقای بالاتری نسبت به گونه *H. albicans* داشت. همچنین گونه‌هایی که درصد بقای بالاتری بعد از اعمال تنش یخ‌زدگی نشان دادند از LT<sub>50su</sub> کمتری برخوردار بودند (Warrington and Southward, 1995). در بررسی پاتون و ریچر (Patton and Reicher, 2007) بر روی ارقام زویسیاگراس تحمل به یخ‌زدگی رقم های Diammond, Palisades, J-36 و Meyer بر مبنای LT<sub>50</sub> بقای استولون به ترتیب ۸/۴-، ۱۱-، ۱۰/۸- و ۱۱/۵- درجه سانتی‌گراد بود درحالی‌که در آزمایش دیگری، مقدار آن برای همین ارقام به ترتیب ۷/۱-، ۵/۷-، ۱۱/۶- و ۱۰/۵- درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Xuan et al., 2009).

با توجه به کمبود اطلاعات در مورد تحمل به سرمای اکوتیپ‌های بومی بارهنگ در استان خراسان، آزمایش حاضر باهدف بررسی تحمل به سرمای تعدادی از اکوتیپ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها، در شرایط کنترل‌شده انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

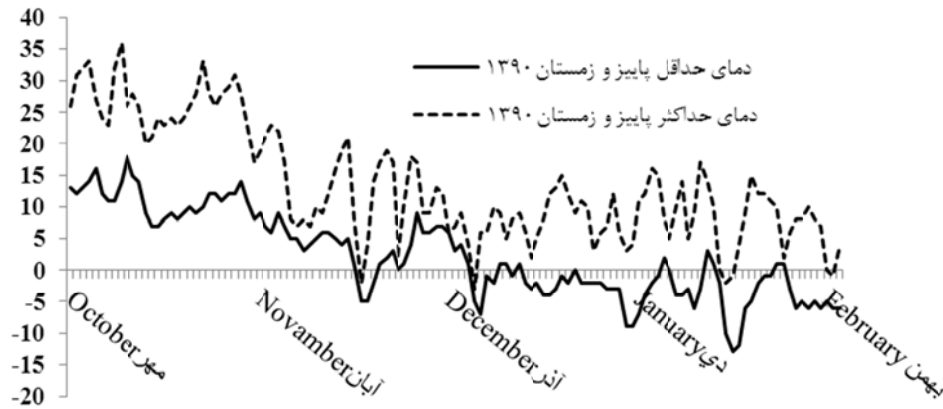
این آزمایش در سال ۱۳۹۰ در محل گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل پنج اکوتیپ بارهنگ سرنیزه‌ای (بجنورد، کلات، مشهد، قاین و بیرجند) و هشت دمای یخ‌زدگی (صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد) بود. در شروع آزمایش، بذور در آب معمولی خیس‌انده شده و بعد از یک شبانه‌روز قرار گرفتن در دمای یخچال (صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد) برای شکستن خواب، در اواسط مهرماه ۱۳۹۰ در گلدان‌های پلاستیکی (حاوی نسبت برابری از خاک، ماسه و خاک‌برگ) با قطر ۱۲ سانتی‌متر با تراکم ۱۰ بوته در هر گلدان کشت شدند. گیاهان تا مرحله ۴-۲ برگی در شرایط طبیعی و در فضای آزاد رشد یافته و در معرض خوسرمایی قرار گرفتند (شکل ۱). به‌منظور حفظ مواد آزمایشی، گلدان‌ها در شب‌هایی با دمای کمتر از ۲- درجه سانتی‌گراد در شاسی سرد قرار داده شدند.

در اواخر دی‌ماه گلدان‌ها به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. این وضعیت شرایط را

<sup>1</sup> . Ice nucleation active bacteria

<sup>2</sup> . Electrical conductivity

<sup>3</sup> . Electrolyte leakage percentage



شکل ۱. دماهای حداقل و حداکثر روزانه پاییز و زمستان ۱۳۹۰ در مشهد.

Fig. 1. Minimum and maximum temperatures of autumn and winter of 2011- 2012 in Mashhad.

اکوتیپ مشهد پایین‌ترین درصد نشت الکترولیت‌ها را دارا بود (شکل ۲).

محققان اظهار داشته‌اند که اختلال در ساختار و فعالیت غشاهای سلولی در اثر تنش سرما، سبب نشت الکترولیت‌ها از سلول شده و اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت از بافت‌ها یا اکوتیپ‌های تحت تنش می‌تواند معیار قابل قبولی برای سنجش مقاومت به تنش سرما فراهم کند (Baeka and Skinner, 2003; Han and Bischof, 2004). به‌طور کلی انتظار می‌رود که گیاهان حساس به سرما، درصد نشت الکترولیت بیشتری در مقایسه با گیاهان متحمل به سرما داشته باشند (Beirami zadeh et al., 2006). لذا بر اساس نتایج این آزمایش، پایین بودن درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ مشهد می‌تواند حاکی از تحمل بالاتر این اکوتیپ به تنش یخ‌زدگی نسبت به چهار اکوتیپ دیگر باشد. همچنین بالا بودن میانگین درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ بیرجند می‌تواند نشان از حساسیت آن به تنش یخ‌زدگی باشد. در بررسی مشتاقی و همکاران (Moshtaghi et al., 2009) نیز بین ژنوتیپ‌های نخود از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها اختلاف معنی‌داری ( $p \geq 0.05$ ) مشاهده شد. در آزمایش آن‌ها ژنوتیپ MCC 505 نسبت به MCC 426 از درصد نشت الکترولیت بیشتری برخوردار بود.

که در آن A, B و %SU<sup>۱</sup> به ترتیب تعداد بوته بعد و قبل از یخ‌زدگی و درصد بقاء بود. به‌منظور محاسبه دمای ۵۰ درصد کسندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء، به ترتیب منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گیاهان در مقابل دماهای یخ‌زدگی ترسیم شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام و رسم شکل‌های مربوط به آن‌ها، توسط نرم‌افزار MS Excel صورت گرفت. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای در جدول یک آورده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های مورد بررسی دارای تفاوت معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) بود، به‌طوری‌که اکوتیپ‌های مشهد و بیرجند به ترتیب از کمترین و بیشترین میزان نشت الکترولیت برخوردار بودند. مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که بین اکوتیپ‌های قاین و کلات به لحاظ درصد نشت الکترولیت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و اکوتیپ بجنورد نیز بدون اختلاف معنی‌داری با

<sup>۱</sup>. Survival percentage

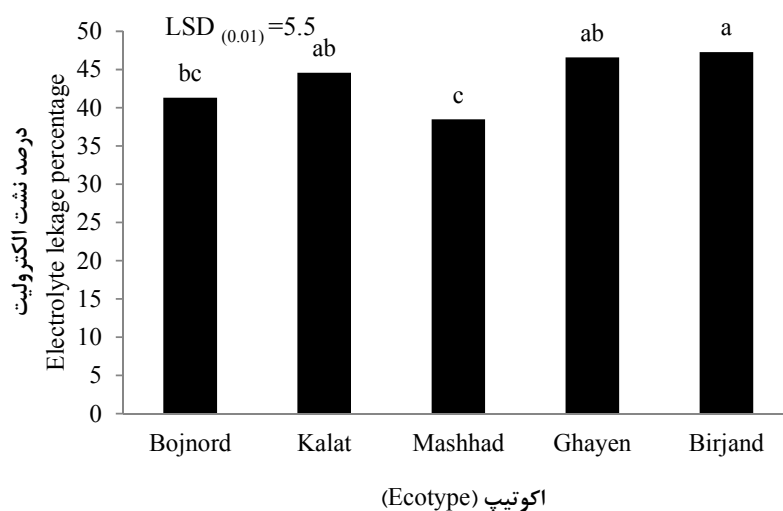
جدول ۱. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گیاه بارهنگ سرنیزه‌ای پس از اعمال دماهای یخ‌زدگی.

Table 1- Source of variation, degree of freedom and mean of squares of electrolyte leakage and survival percentage of Lancelot Plantain plant after applying freezing temperatures.

Source of variation	منبع تغییر	درجه آزادی Degree of freedom	درصد نشت الکترولیت‌ها Electrolyte leakage%	درصد بقاء Survival percentage
Ecotype	اکوتیپ	4	328.310**	1939.302**
Temperature	دما	7	14087.361**	30159.225**
Ecotype × Temperature	دما × اکوتیپ	28	291.656**	603.745**
Error	خطا	80	51.555	111.727
Total	کل	119		
CV	ضریب تغییرات		16.45	18.46

\*\* Significant in 1% probability level

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱.



شکل ۲. درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای پس از اعمال دماهای یخ‌زدگی.

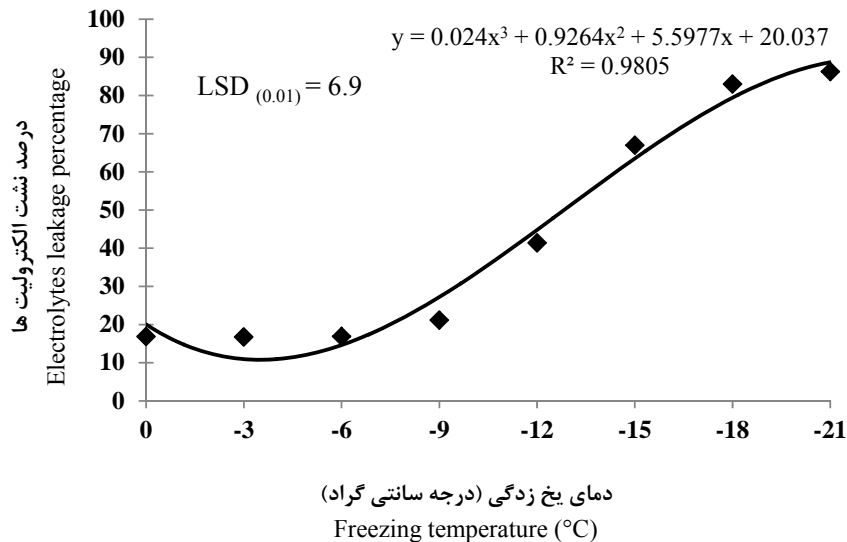
Fig. 2. Electrolytes leakage percentage in Lancelot Plantain ecotypes after applying freezing temperature.

بیشتر از دمای صفر درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۳). به نظر می‌رسد با کاهش دما خسارت ناشی از تنش یخ‌زدگی بر غشاهای سلولی زیاد شده و منجر به افزایش میزان نشت مواد درون‌سلولی می‌شود (Nezami and Naghedinia, 2010). نتایج آزمایش رضوان بیدختی و همکاران (Rezwan-Bidokhti et al., 2011) بر روی موسیر (*Allium altissimum* Regel.) نیز نشان داد که با کاهش دما میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت، به طوری که در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد درصد نشت

اثر دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها نیز معنی‌دار بود (جدول ۱) و با کاهش دما از ۳- درجه سانتی‌گراد به تدریج بر درصد نشت الکترولیت‌ها افزوده شد (شکل ۳). باین‌وجود کاهش دما تا ۹- درجه سانتی‌گراد تأثیر معنی‌داری در افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها نداشت، اما افزایش شدت تنش یخ‌زدگی به کمتر از ۹- درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری نشت مواد از سلول‌ها را افزایش داد، به طوری که درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۶۶ و ۶۹/۴ درصد

الکترولیت‌ها تا دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت بود، ولی پس‌از آن به تدریج افزایش یافت و در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد به بیشترین مقدار خود رسید.

الکترولیت‌ها به حداکثر رسید. در بررسی ایزدی دربندی و همکاران (Izadi-Darbandi et al., 2011) بر روی گیاه قرفل (*Dianthus barbatus*) هم درصد نشت



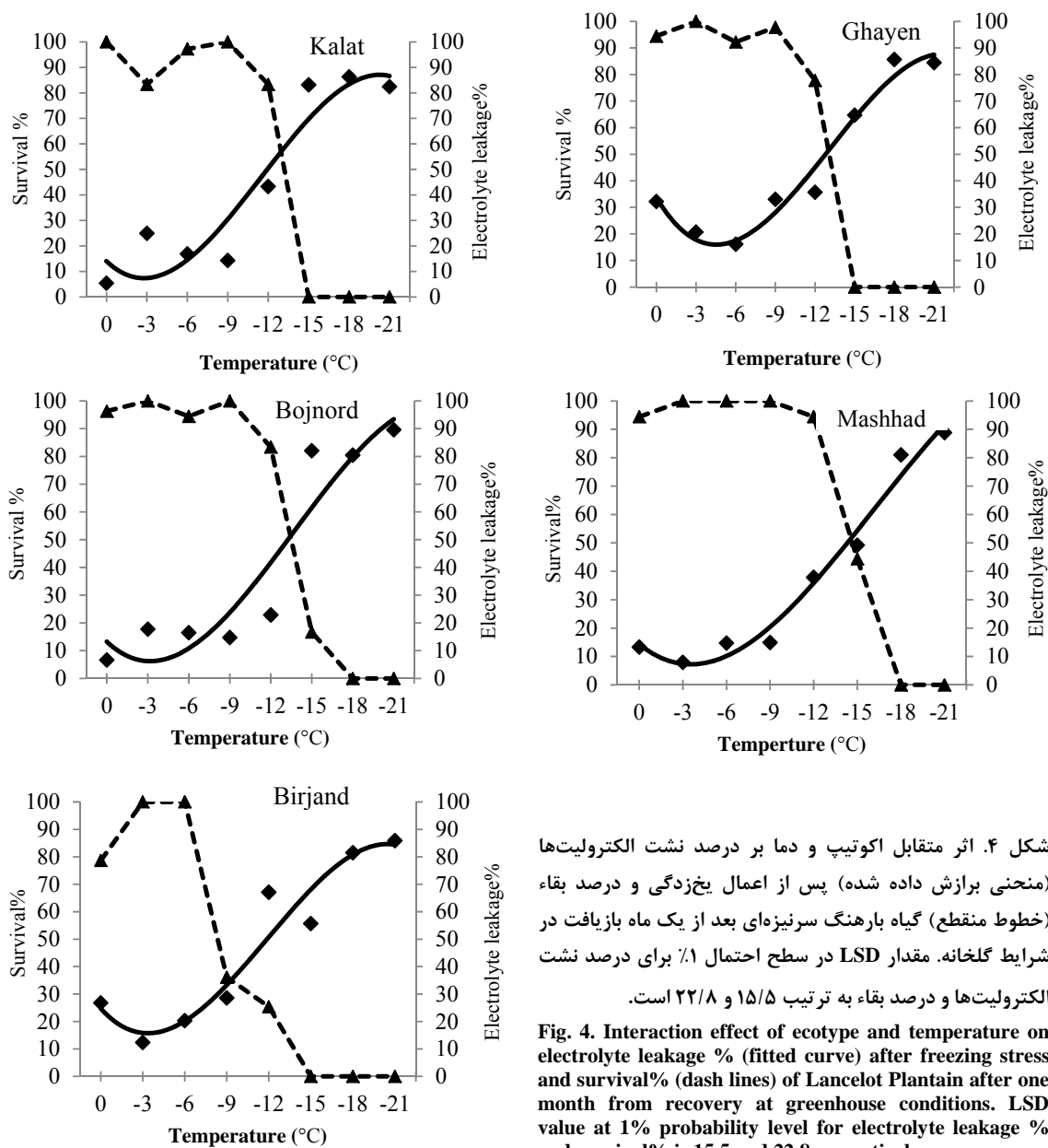
شکل ۳. اثر تنش یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاه بارهنگ سرنیزه‌ای.

Fig. 3. Effect of freezing stress on electrolyte leakage percentage in Lancelot Plantain plant.

دو گونه گیاه گوارا (*Gaura sp.*) شد، به طوری که در گستره دمایی صفر تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت‌ها در گونه *G. coccinea* تغییرات اندکی داشت، حال آنکه کاهش دما به کمتر از ۶- درجه سانتی‌گراد منجر به افزایش معنی‌دار درصد نشت الکترولیت‌ها در گونه *G. drummondii* شد. بررسی پرومندرزا زاده و همکاران (Boroumand Rezazadeh et al., 2013) بر روی گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague) نیز نشان داد که هرچند تا دمای ۴/۵- درجه سانتی‌گراد اختلاف چندانی میان اکوتیپ‌های این گیاه به لحاظ درصد نشت الکترولیت وجود نداشت اما با افزایش شدت تنش یخ‌زدگی، تفاوت بین اکوتیپ‌ها بیشتر شد بطوریکه در گستره دمای ۶- تا ۹- درجه سانتی‌گراد منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ بیرجند از شیب ملایم‌تری نسبت به دو اکوتیپ نیشابور و تربت حیدریه برخوردار بود.

بر اساس نتایج حاصل، اثر متقابل اکوتیپ و دمای یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار ( $p \leq 0.01$ ) بود (جدول ۱). اکوتیپ بجنورد در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد بیشترین و اکوتیپ کلات در دمای صفر درجه سانتی‌گراد، کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها را دارا بودند (شکل ۴). هرچند در اکوتیپ مشهد روند افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۹- درجه سانتی‌گراد آغاز شد ولی شیب آن کمتر بود بطوریکه در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت آن بسیار کمتر از سایر اکوتیپ‌ها بود. همچنین نتایج نشان داد که افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در محدوده دمایی ۱۲- و ۱۵- درجه سانتی‌گراد، در اکوتیپ مشهد ۳/۷۶ درصد و در اکوتیپ‌های کلات و قاین به ترتیب ۱۳/۲۶ و ۹/۶۶ درصد به ازای هر درجه سانتی‌گراد کاهش دما بود (شکل ۴).

در مطالعه پیتش و همکاران (Pietsch et al., 2009) نیز تنش یخ‌زدگی سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در



شکل ۴. اثر متقابل اکوتیپ و دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها (منحنی برازش داده شده) پس از اعمال یخ‌زدگی و درصد بقاء (خطوط منقطع) گیاه بارهنگ سرنیزه‌ای بعد از یک ماه بازیافت در شرایط گلخانه. مقدار LSD در سطح احتمال ۱٪ برای درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء به ترتیب ۱۵/۵ و ۲۲/۸ است.

Fig. 4. Interaction effect of ecotype and temperature on electrolyte leakage % (fitted curve) after freezing stress and survival% (dash lines) of Lancelot Plantain after one month from recovery at greenhouse conditions. LSD value at 1% probability level for electrolyte leakage % and survival% is 15.5 and 22.8 respectively.

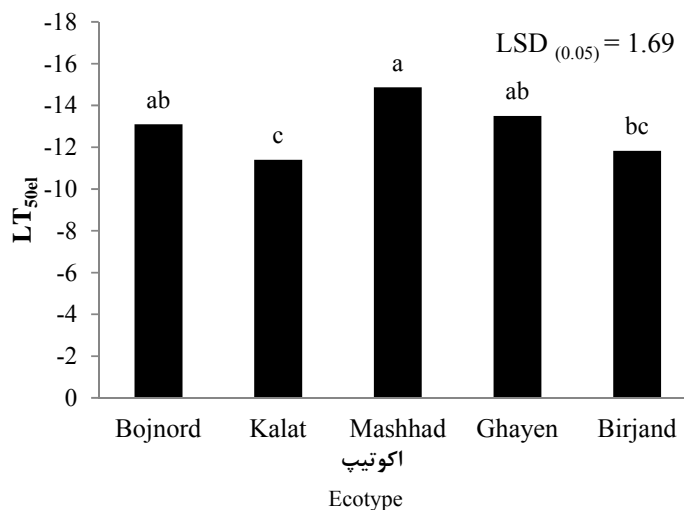
اکوتیپ‌های بجنورد، قاین و بیرجند از این نظر باهم اختلاف معنی‌داری ( $p \leq 0.05$ ) نداشتند. هرچند اکوتیپ قاین از نظر این شاخص نسبت به اکوتیپ‌های بجنورد و بیرجند تحمل به یخ‌زدگی بیشتری نشان داد (شکل ۵).

در بررسی رضوان بیدختی و همکاران (Rezwan-Bidokhti et al., 2011) بر روی گیاه موسیر نیز از نظر  $LT_{50el}$  بین اکوتیپ‌ها، تفاوت معنی‌داری وجود داشت

شاشیکومار و ناس (Shashikumar and Nus, 1993) دمایی را که در آن ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها اتفاق می‌افتد، به‌عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) پیشنهاد کرده‌اند. در بررسی حاضر از نظر  $LT_{50el}$  بین اکوتیپ‌ها، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $p \leq 0.05$ ) و اکوتیپ‌های کلات و مشهد به ترتیب از بالاترین و پایین‌ترین  $LT_{50el}$  برخوردار بودند، درحالی‌که

در این بررسی همبستگی مثبت و معنی‌داری ( $r=0.70^{**}$ ) بین  $LT_{50el}$  با درصد نشت الکترولیت‌ها مشاهده شد، به عبارت دیگر با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها نیز کاهش یافت (جدول ۲). مشتاقی و همکاران (Moshtaghi et al., 2009) هم با بررسی تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های نخود در شرایط کنترل‌شده گزارش کردند که با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها از میزان  $LT_{50el}$  کاسته شد. در بررسی همبستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها و  $LT_{50el}$  نیز ژنوتیپ‌های یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* L.) مشاهده شد که با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها کاهش یافت (Izadi-Darbandi et al., 2012).

بطوریکه اکوتیپ‌های تندوره و کلات (متحمل‌ترین اکوتیپ‌ها به دماهای یخ‌زدگی) کمترین و اکوتیپ شیروان (حساس‌ترین اکوتیپ‌ها به دماهای یخ‌زدگی) بیشترین مقدار  $LT_{50el}$  را داشتند. در بررسی حاج محمد نیا و همکاران (Hajmohammadnia Ghalibaf et al., 2010) که بر روی هشت رقم چغندر قند انجام شد نیز میزان  $LT_{50el}$  بین ارقام چغندر قند متفاوت بود و بیشترین و کمترین مقدار آن را به ترتیب ارقام ۷۲۳۳ و IC داشتند. در بررسی تحمل به یخ‌زدگی ۵۴ نمونه از زویسیاگرس در چین با استفاده از روش نشت الکترولیت، لی و همکاران (Li et al., 2003) دریافتند که دمای ۵۰٪ کشندگی برگ ( $LT_{50}$ ) بر اساس درصد نشت الکترولیت این نمونه‌ها به ترتیب زیر بود:  
*Z. japonica* < *Z. sinica* < *Z. matrella* < *Z. tenuifolia* < *Z. sinica* var. *longiflora* < *Z. macrostachya*.



شکل ۵. دمای پنجاه درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) در اکوتیپ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای.  
**Fig. 5. Lethal temperature 50% of plants according to the electrolyte leakage % ( $LT_{50el}$ ) in Lancelot Plantain ecotypes.**

اکوتیپ‌ها دارا بود (شکل ۴). در همین دما اکوتیپ مشهد با درصد بقاء بالاتر نسبت به اکوتیپ‌های بجنورد، کلات و قاین برتری محسوسی داشت. همچنین در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد درصد بقاء در اکوتیپ‌های بجنورد و مشهد به ترتیب ۱۶/۷ و ۴۴/۴ درصد بود، درحالی‌که اکوتیپ‌های دیگر در این دما از بین رفته بودند (شکل ۴). مشتاقی و

اثر متقابل اکوتیپ و دما بر بقای بارهنگ سرنیزه‌ای معنی‌دار ( $p \leq 0.01$ ) بود (جدول ۱). به طوری‌که در اغلب اکوتیپ‌ها با کاهش دما از ۱۲- درجه سانتی‌گراد، درصد بقاء گیاهان به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما کاهش درصد بقاء اکوتیپ بیرجند از دمای ۶- درجه سانتی‌گراد آغاز شد و در دمای ۱۲- سانتی‌گراد کمترین درصد بقاء را نسبت به سایر



همکاران (Javadmousavi et al., 2011) نیز بین درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گیاه مینای چمنی (*Bellis perennis*) همبستگی منفی و بسیار معنی‌داری ( $r = -0.91^{***}$ ) گزارش شد. آزمایشی بر روی کلزا نیز نشان داد که همبستگی خوبی بین درصد نشت الکترولیت‌های سه رقم کلزا و درصد بقاء آن‌ها وجود دارد، به‌طوری با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء گیاهان کاهش یافت (Rife and Zeinali, 2003).

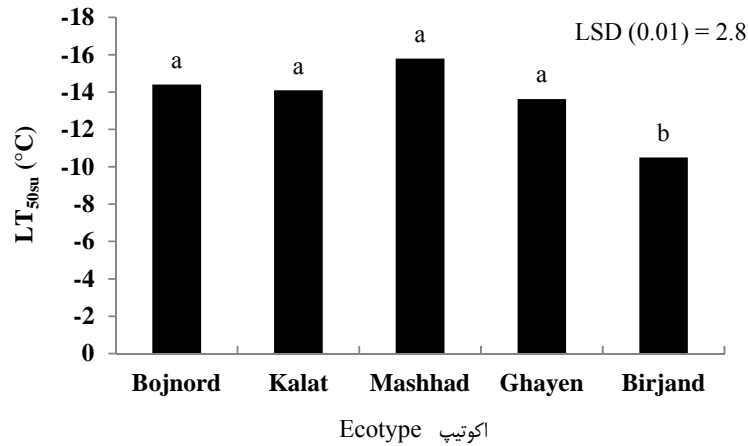
همچنین در این آزمایش، بین درصد بقاء،  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  همبستگی منفی و معنی‌دار (به ترتیب  $r = -0.59^*$  و  $r = -0.96^{***}$ ) مشاهده شد، که به ترتیب نشان‌دهنده افزایش درصد بقاء گیاهان با کاهش دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها و کاهش  $LT_{50su}$  با افزایش درصد بقاء است (جدول ۲). در بررسی ژوان و همکاران (Xuan et al., 2009) بر روی گونه‌های زویسیا گراس در چین نیز نمونه‌هایی با نشت الکترولیت کمتر و  $LT_{50el}$  برگ پایین‌تر درصد بقاء ریزوم و استولون بهتری ( $LT_{50}$  بقاء کمتر) نشان دادند در بررسی نامبردگان ضریب تبیین ( $R^2$ ) میان  $LT_{50}$  بقاء استولون و ریزوم با  $LT_{50}$  نشت الکترولیت از برگ به ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۶۷ بود.

در مجموع تنش یخ‌زدگی سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها و کاهش درصد بقاء گیاه بارهنگ سرنیزه‌ای شد. درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های مورد مطالعه، از دماهای کمتر از ۹- درجه سانتی‌گراد به‌طور شدیدی افزایش یافت، در صورتی که درصد بقاء در اکثر اکوتیپ‌ها (به‌استثنای اکوتیپ بیرجند) تا دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد به‌طور جدی تحت تأثیر قرار نگرفت و دماهای کمتر از آن باعث افزایش تلفات گیاهی شد. وجود همبستگی بالا میان درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء و همچنین میان  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  در این آزمایش سودمندی این شاخص‌ها را در ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی بارهنگ نشان می‌دهد. بنابراین استفاده از روش نشت الکترولیت‌ها به دلیل نیاز به مواد گیاهی کم، تولید داده‌های کمی و نیز وقت‌گیر نبودن نسبت به ارزیابی بقاء بعد از اعمال دماهای یخ‌زدگی، بهتر به نظر می‌رسد.

همکاران (Moshtaghi et al., 2009) نیز با بررسی تحمل به یخ‌زدگی دو ژنوتیپ خود دریافتند که بقای ژنوتیپ متحمل به سرما (MCC426) تا دمای ۹- درجه سانتی‌گراد چندان تحت تأثیر قرار نگرفت. درصد بقاء ژنوتیپ متحمل در این دما، ۸۸ درصد و ۱/۴ برابر ژنوتیپ حساس (MCC505) بود. همچنین درصد بقاء در ژنوتیپ حساس در فاصله دمایی صفر تا ۹- به‌اندازه ۲۷ درصد کاهش یافت، در حالی که در ژنوتیپ مقاوم این کاهش تنها هشت درصد بود. در آزمایش ژوان و همکاران (Xuan et al., 2009) بر روی نمونه‌های زویسیاگراس نیز انواع متحمل (J-137, Z137, Z136 (J-36), Z201, Z202, Z141) تا دمای ۱۴- درجه سانتی‌گراد را تحمل و از دو اندام استولون و ریزوم، رشد مجدد داشتند در حالی که درصد بقاء نمونه‌های دیگر در این دما، صفر بود.

علی‌رغم اینکه دماهای ۱۱/۴- و ۱۴/۹- درجه سانتی‌گراد به ترتیب سبب خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های کلات و مشهد شد (شکل ۳)، اما ۵۰ درصد تلفات اکوتیپ‌های مذکور در دماهای پایین‌تری (به ترتیب ۱۴/۱- و ۱۵/۸- درجه سانتی‌گراد) رخ داد (شکل ۶) با وجود این ضریب همبستگی میان  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  مثبت و معنی‌دار ( $r = 0.53^*$ ) بود (جدول ۲). این موضوع نشان‌دهنده سودمندی و امکان جایگزینی هر یک از این شاخص‌ها در ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی بارهنگ سرنیزه‌ای است. در بررسی نظامی و همکاران (Nezami et al., 2012) بر روی گیاه بنفشه (*Viola gracilis* L.)،  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  به ترتیب ۲۰- و ۱۹/۴- درجه سانتی‌گراد تعیین شد و با وجود اینکه همبستگی خوبی بین دو صفت مذکور وجود داشت، ولی نشت ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از سلول منجر به مرگ ۵۰ درصد گیاهان نشد، بلکه مرگ ۵۰ درصدی گیاهان هنگامی حادث شد که ۲۵ درصد الکترولیت‌ها از بافت‌های برگ گیاه به خارج از آن نشت کردند.

در این آزمایش همبستگی منفی و بالایی میان درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء ( $r = -0.70^{***}$ ) مشاهده شد (جدول ۲)، که نشان‌دهنده کاهش درصد بقاء با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها است. در بررسی جواد موسوی و



شکل ۶. دمای ۵۰ درصد کشندگی گیاهان بر اساس درصد بقاء (LT<sub>50su</sub>) در اکوتیپ‌های بارهنگ سرنیزه‌ای.  
**Fig. 6. Lethal temperature 50% of plants according to the Survival% (LT<sub>50su</sub>) in Lancelot Plantain ecotypes.**

جدول ۲. ضرایب همبستگی پیرسون بین درصد نشت الکترولیت‌ها، LT<sub>50el</sub>، LT<sub>50su</sub> و درصد بقاء بارهنگ سرنیزه‌ای.

**Table 2. Pearson correlation coefficients between electrolytes leakage %, LT<sub>50el</sub>, LT<sub>50su</sub> and survival % of Lancelot Plantain.**

		1	2	3	4
1	درصد نشت الکترولیت‌ها Electrolytes leakage %	1			
2	LT <sub>50el</sub>	0.70**	1		
3	Survival %	-0.70**	-0.59*	1	
4	LT <sub>50su</sub>	0.69**	0.53*	-0.96***	1

\*\*\*, \*\*, \*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح پنج، یک و ۰/۱ درصد.

\*\*\*, \*\*, \*: significant in 5, 1 and 0.1 % levels respectively.

### منابع

- Azizi, H., Nezami, A., Nassiri, M., Khazaie, H.R., 2007. Evaluation of cold tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under controlled conditions. Iranian Journal of Field Crops Research. 5, 109-121. [In Persian with English Summary].
- Baeka, K. H., Skinner, D.Z., 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. Plant Science. 165, 1221-1227.
- Beirami zadeh, E., Yazdi-Samadi, B., Arshad, Y., Bihanta, M., R. 2006. A genetic analysis of frost resistance in ten bread wheat through diallele method. Journal of Agricultural Science. 37, 45-59.
- Boroumand rezazadeh, Z., Nezami, A., Nezami, S., 2013. Evaluation of freezing stress tolerance in 3 Ecotypes of Ajowan (*Trachyspermum ammi* (Linn). Sprague) under controlled conditions. Iranian Journal of Field Crops Research. 11 (1), 121-130. [In Persian with English Summary].
- Brautigam, N., Franz, G., 1985. Experiments with tissue culture of mucilage- producing plant tissues. Science Pharm. 53, 237-246.
- Derrick, R.W., Mosely, G., Wilman, D., 1993. Intake by sheep and digestibility of

- chickweed, dandelion, dock, ribwort, and spurrey compared with perennial ryegrass. *Journal of Agricultural Science*. 120, 51–61.
- Eugenia, M., Nunes, S., Ray Smith, G., 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Science*. 43, 1349-1357.
- Fons, F., Gargadennec, A., Gueiffier, A. Roussel, J. L. Andary, C., 1998. Effects of Cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*. *Phytochemistry*. 49(3), 697-702.
- Franz, G., 1989. Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts. *Planta Medica*. 55, 493-497.
- Fraser, T.J., Rowarth, J.S., 1996. Legumes, herbs or grass for lamb performance? Proceeding New Zealand Grassland Association. 58, 49–52.
- Gusta, L.V., Fowler, D.B., 1977. Cold resistance and injury in winter cereals. In: Mussel H., Staples, R.C., (Eds.) *Stress Physiology in Crop Plants*. John Wiley & Sons, New York, PP. 159-178.
- Hajmohammadnia- Ghalibaf, K., Nezami, A., Kamandi, A., 2010. Study the possibility of using the electrolyte leakage index for evaluation of cold tolerance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 8(3), 465-472. [In Persian with English Summary].
- Han, B., Bischof, J.C., 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology*. 48, 8-21.
- Izadi darbandi, E., Nezami, A., Abbasian, A., Heidari, M., 2012. Evaluation of freezing stress tolerance in Wild Oat (*Avena ludoviciana* L.) by electrolytes leakage test. *Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences*. 5 (1), 81-94. [In Persian with English Summary].
- Izadi-Darbandi, E., Yousef Sani, M., Nezami, A., Javadmousavi, M., Keykha, F., Nezami, S., 2011. Effect of freezing stress on Sweet William (*Dianthus barbatus*) under Controlled Conditions. *Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences*. 4 (2), 117-125. [In Persian with English Summary].
- Javad Mousavi, M., Nezami, S., Izadi, E., Nezami, A., Yousef Sani, M., Keykha Akhar, F., 2011. Evaluation of freezing tolerance of English daisy (*Bellis perennis*) under controlled conditions. *Journal of Water and Soil*. 25(2): 380-388. [In Persian with English Summary].
- Li, Y., Xie, X.J., Xuan, J.P., Liu, J.X., 2003. Assessment of cold-tolerance of China's *Zoysia* Spp. *Acta Agrestia Sinica*. 11, 240–245.
- Lindow, S.E., Army, D.C., Upper, C.D., 1982. Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. *Plant Physiology*. 70, 1084-1089.
- Miller, G.L., Dickens, R., 1996. Potassium fertilization related to cold resistance in Bermudagrass. *Crop Science*. 36, 1290-1295.
- Moore, G., Sanford, G., Wiley, T., 2006. *Perennial Pastures for Western Australia*. Bulletin 4690. Perth.
- Moshtaghi, N., Bagheri, A.R., Nezami, A., Moshtaghi, S., 2009. Investigation of betaine spray on freezing tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in controlled conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 7, 647-656. [In Persian with English Summary].
- Murray, G.A., Eser, D., Gusta, L.V., Eteve, G., 1988. Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In: Summerfield R.J., (Ed.) *World crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. p. 831-843.
- Nayyar, H., Bains, T.S., Kumar, S., 2005. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*. 54, 275- 285.
- Nezami, A., Keykha Akhar, F., Javad Mousavi, M., Izadi, E. Nezami, S., Yousef Sani, M. 2012. Effect of freezing stress on viola (*Viola gracilis* L.) plant under laboratory conditions. *Journal of Agroecology*. 3 (4), 430-438. [In Persian with English Summary].
- Nezami, A., Naghedinia, N., 2010 Effects of freezing stress on electrolyte leakage of Safflower genotypes. *Iranian Journal of Field Crop Research*. 7 (1), 891-896.
- Patton, A., Reicher, Z., 2007. Zoysiagrass winter hardiness: zoysiagrass cultivar selection is important because winter injury and freeze are variable. *Great Commission Ministries*, 119–123.

- Pietsch, G. M., Anderson, N. O. Li, P. H., 2009. Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura coccinea* and *G. drummondii*. *Scientia Horticulture*. 120, 418-425.
- Rezwan-Bidokhti, Sh., Nezami, A., Kafi, M., Khazaie, H. R., 2011. Evaluation of Freezing stress effect on quantity of electrolyte leakage in Shallot (*Allium altissimum* Regel.) as a medicinal and industrial plant under controlled conditions. *Journal of Agroecology*. 3 (3), 371-382. [In Persian with English Summary].
- Rife, G.L., Zeinali, H., 2003. Cold tolerance in oilseed rape over varying acclimation durations. *Crop Science*. 43, 96-100.
- Shashikumar, K. Nus, J.L., 1993. Cultivar and winter cover effects on Bermudagrass cold acclimation and crown moisture content. *Crop Science*. 33, 813-817.
- Skinner, R.H., Gustine, D. L., 2002. Freezing tolerance of chicory and narrow-leaf plantain. *Crop Science*. 42, 2038-2043.
- Stewart, A.V., 1996. Plantain (*Plantago lanceolata* L.) A potential pasture species. *Proceeding New Zealand Grassland Association*. 58, 77-86.
- Teutonico, R.A., Palta, J.P., Osborn, T.C., 1993. In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of Rapeseed cultivars. *Crop Science*. 33, 103-107.
- Warrington, I. J., Southward, R. C., 1995. Seasonal frost tolerance of Hebe species and cultivars. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science*. 23, 437-445.
- Xuan J., Liu J., Gao H., Huaguabghu H. and Cheng X. 2009. Evaluation of low-temperature tolerance of Zoysia grass. *Tropical Grasslands*, 43: 118-124.

