

اثر تنش یخ‌زدگی بر نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های شبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

سیده محبوبه میرمیران^۱، احمد نظامی^{۲*}، محمد کافی^۲

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. اعضای هیئت‌علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۸

چکیده

به‌منظور بررسی تحمل به سرما گیاه شبلیله، پژوهشی در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای موردبررسی شامل تاریخ کاشت در چهار سطح (۲۳ شهریور، ۲۳ مهر، ۱۵ اسفند و ۱۵ فروردین)، اکوتیپ در ۱۰ سطح (آذری، اردستان، پابند شمال، پاکوتاه شمال، شیراز، شیروان، مشهد، نیشابور، همدان و هندی) و دمای یخ‌زدگی در هفت سطح (شاهد، صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲- و ۱۵- درجه سانتی‌گراد) بودند. گیاهان در شرایط آب و هوایی طبیعی محیط رشد یافته و به سرما خو گرفتند سپس گیاهان کشت‌شده در شهریور و مهر در اواسط دی‌ماه و گیاهان کشت‌شده در اسفند و فروردین در اواسط اردیبهشت برای اعمال دماهای آزمایش به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. پس از اعمال تنش یخ‌زدگی درصد نشت الکترولیت‌ها و سپس دمای کشته شده ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها تعیین شد. درصد بقای آن‌ها نیز پس از اعمال تنش یخ‌زدگی و پس از چهار هفته رشد در گلخانه ارزیابی شد. هرچند در تمامی تاریخ‌های کاشت نشت الکترولیت‌ها تا دمای ۶- درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت بود و با کاهش بیشتر دما روندی افزایشی داشت، ولی سرعت افزایش نشت در کاشت دهه دوم اسفند بیشتر از سایر تاریخ‌ها بود. به‌طوری‌که در این کاشت با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت‌ها حدود ۷۱ درصد افزایش یافت. با وجود اینکه درصد نشت الکترولیت‌ها در تمامی اکوتیپ‌ها در کاشت دوم پاییزه و بهاره نسبت به کاشت اول کاهش یافت، کمترین و بیشترین کاهش ناشی از تأخیر در کاشت به ترتیب متعلق به اکوتیپ‌های همدان و اردستان بود. در همه اکوتیپ‌ها، گیاهان کاشت دوم در اغلب دماهای مورد مطالعه درصد نشت الکترولیت‌های کمتری نسبت به سایر کاشت‌ها داشتند. از نظر شاخص LT_{50el} نیز تاریخ کاشت دهه دوم مه‌ماه در اکوتیپ‌ها در مقایسه با سایر تاریخ‌های کاشت کمتر بود. به عبارتی کاشت زودتر اکوتیپ‌ها احتمالاً سبب افزایش حساسیت گیاه به سرما شده است. بیشترین کمترین تحمل به یخ‌زدگی از نظر این شاخص به ترتیب متعلق به اکوتیپ‌های نیشابور و آذری بود. بین ۵۰ درصد کشته‌گی بر اساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) و بقا ($r = -0.536^*$) همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد که بیانگر امکان استفاده از این شاخص در ارزیابی خسارت تنش یخ‌زدگی در گیاه شبلیله می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تاریخ کاشت، درصد بقاء، دمای ۵۰ درصد کشته‌گی، هدایت الکتریکی

مقدمه

استفاده از داروهای گیاهی در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و نیاز به مواد مؤثره گیاهان دارویی در صنایع داروسازی و بهداشتی مرتب رو به افزایش است (Najafpor, 1994). شبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی ایران و سایر ملل سابقه مصرف دیرینه داشته و خواص درمانی چشمگیری برای آن ذکر شده است. این گیاه یک‌ساله، علفی و از خانواده لگومینوز است که به‌عنوان یک

استفاده از داروهای گیاهی در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و نیاز به مواد مؤثره گیاهان دارویی در صنایع داروسازی و بهداشتی مرتب رو به افزایش است (Najafpor, 1994). شبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی ایران و سایر ملل سابقه مصرف دیرینه داشته و خواص درمانی چشمگیری برای آن ذکر شده است. این گیاه یک‌ساله، علفی و از خانواده لگومینوز است که به‌عنوان یک

که سبب مرگ ۵۰ درصد آن‌ها می‌شود و به‌عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50su}) شناخته شده است (Xuan et al., 2009). 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 بقاء بسته به گونه متفاوت بود و 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_{50su} کمتری برخوردار بودند. ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2010) نیز نشان دادند که درصد بقای گیاه چچم (*Lolium perenne*) (L.) با کاهش دما کاهش یافت. محققان همبستگی خوبی را بین دماهای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گزارش کرده‌اند.

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 الکترولیتی برگ‌های این گیاه افزایش یافته است (Eugenia et al., 2003). در مطالعه گریس و همکاران (Grace et al., 2009) نیز تنش یخ‌زدگی سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در دو گونه گیاه گوارا (*Guara* sp.) شد، اما این افزایش در گونه *G. drummondii* از ۶- درجه سانتی‌گراد و در گونه *G. coccinea* از دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد آغاز شد که این امر نشان‌دهنده تحمل بهتر گونه *G. coccinea* به تحمل یخ‌زدگی است. یک همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r^2=0.72^{**}$) بین دماهای کشنده بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء برای گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) مشاهده شد (Kheyrikhah, 2015).

در ایران توده‌های متنوع و ارزشمندی از گیاه شنبلیله وجود دارد. با وجود این، اطلاعات منتشرشده چندانی در خصوص تحمل به سرمای این گیاه در دسترس نیست، بنابراین آزمایش حاضر با هدف بررسی تحمل به سرما در تعدادی از اکوتیپ‌های شنبلیله با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها انجام شد.

گیاه دارویی، زراعی، مرتعی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت فراوانی است (Najafpor Navaee, 1994).

در گیاهان دارای عادت رشد پاییزه یا بهاره، تولید و ثبات عملکرد در کشت پاییزه نسبت به کشت بهاره بیشتر است. تأخیر در کاشت بهاره، از یک طرف باعث کوتاه شدن طول دوره رشد گیاه می‌شود و در نتیجه در مجموع گیاه ماده خشک کمتری تولید می‌کند از سوی دیگر، با تأخیر در کاشت مراحل نمو حساس از جمله گلدهی با گرما روبرو می‌شود. این امر سبب عدم باروری کامل گل‌ها و در نتیجه کاهش تعداد گل و دانه در هر بوته و در نهایت کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Seghatoleslami and ahmadibonakdar, 2010; Maletic and Jevdjovic, 2007). معمولاً گیاهان کشت پاییزه و زمستانه، توانایی استفاده بهتر و مؤثرتر از نزولات جوی زمستانه را دارند و با طولانی‌تر شدن دوره رشد رویشی آن‌ها، جذب تشعشع فعال فتوسنتزی در آن‌ها افزایش می‌یابد، که این امر سبب افزایش تولید زیست‌توده و در نهایت افزایش عملکرد گیاه می‌شود (Nezami and Bagheri, 2005).

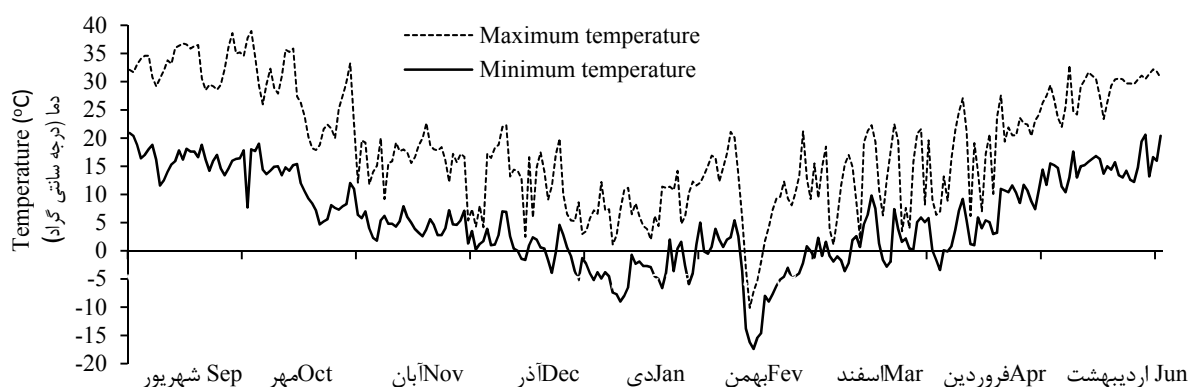
با وجود این در کاشت پاییزه رشد و پراکنش گیاهان تحت تأثیر انواع تنش‌های زنده و غیرزنده از جمله دمای پایین قرار می‌گیرد. دما، عامل محیطی مهمی است که از فصلی به فصل دیگر تغییر می‌کند و دستخوش نوسانات غیرقابل پیش‌بینی و زودگذر روزانه است. هرچند یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های گیاهان به دما، توانایی آن‌ها در افزایش تحمل به تنش سرما در اثر گذراندن دوره‌ای از دمای پایین، قبل از وقوع یخبندان‌های زمستان است (Browse and Xin, 2001) و لذا در طی پاییز و ابتدای زمستان، کاهش تدریجی دمای محیط سبب القاء فرآیند خوسرمایی^۱ گیاه می‌شود که برای مقاومت در برابر سرما و یخبندان ضروری است (Coventry et al., 2003). با وجود این، تنش یخ‌زدگی از جمله مهم‌ترین تنش‌های زمستانه است و در اغلب آزمایش‌ها محققان تحمل به یخ‌زدگی را به‌عنوان یک شاخص مناسب برای تحمل به انواع تنش‌های زمستان مورد تأکید قرار داده‌اند (Gostin, 2009). محاسبه درصد بقاء گیاه پس از قرار گرفتن آن در معرض دماهای سرما نیز به‌عنوان یکی از شاخص‌های مقاومت به سرما معرفی شده است. مرسوم‌ترین شاخص برای ارزیابی تحمل به سرما در گیاهان، دمایی است

^۱. Cold Acclimation

مواد و روش‌ها

شده در داخل پتری دیش و در دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی جوانه‌دار شدند. سپس ۱۰ عدد بذر جوانه‌زده در عمق یک سانتی‌متری گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۱ سانتی‌متر (حاوی ۲۵ درصد شن و ۷۵ درصد خاک مزرعه) کشت شد. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار انجام شد. به‌منظور ایجاد خو سرمایی، گیاهان در شرایط طبیعی رشد کرده و جهت محافظت گیاهان از قرار گرفتن در معرض سرمای شدید در دوره سبز شدن، نمونه‌ها از دمای صفر و پایین‌تر و در مرحله گیاهچه‌ای از دماهای کمتر از ۳- درجه سانتی‌گراد و از طریق قرار دادن در شاسی سرد محافظت شدند.

این پژوهش در سال ۹۳-۱۳۹۲ به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل چهار تاریخ کاشت (دهه سوم شهریور، دهه سوم مهر، دهه دوم اسفند و دهه دوم فروردین)، ۱۰ اکوتیپ شنبلیله (آذری، اردستان، پابند شمال، پاکوتاه شمال، شیراز، شیروان، نیشابور، مشهد، همدان و هندی) و هفت تیمار دمایی (شاهد (عدم یخ‌زدگی با دمای +۵ درجه سانتی‌گراد)، صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲- و ۱۵- درجه سانتی‌گراد) بودند. به‌منظور اطمینان از جوانه‌زنی یکنواخت بذر، ابتدا بذرهای ضدعفونی



شکل ۱. تغییرات دماهای حداقل و حداکثر روزانه طی پاییز و زمستان ۱۳۹۲ و بهار ۱۳۹۳.

Fig. 1. Variation of daily minimum and maximum temperature during autumn, winter and spring of 2013-2014.

سرما، در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد، اسپری باکتری‌های (جنس *Pseudomonas* و *Erwinia*) ایجادکننده هستک یخ (INAB) بر روی گیاهان انجام شد. نمونه‌های گیاهی در هر دمای آزمایشی به مدت یک ساعت باقی‌مانده و پس از اعمال دمای یخ‌زدگی از فریزر خارج شده و سپس به اتاقک سرما با دمای 2 ± 5 درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در آنجا نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها، بعد از خروج نمونه‌ها از اتاقک سرد (روز بعد از اعمال تنش یخ‌زدگی) از هر گلدان سه بوته برداشت شده و به ویال حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس با استفاده از دستگاه EC

برای اعمال دماهای یخ‌زدگی، گیاهان کاشت‌های شهریور و مهر در اواسط دی‌ماه (زمانی که گیاهان دو کاشت مذکور به ترتیب در مرحله ۷ برگی و ۵ برگی بودند) و هم‌زمان با بروز سرماهای شدید در منطقه (بر اساس داده‌های بلندمدت هواشناسی، در شرایط آب و هوایی مشهد بروز سرماهای شدید در دی و بهمن‌ماه اتفاق می‌افتد) و گیاهان کشت‌شده در اسفند و فروردین (گیاهان دو کاشت ذکرشده به ترتیب در مرحله ۳ برگی و برگ‌لپه‌ای بودند) در اواسط اردیبهشت به فریزر ترموگرادبان منتقل شدند. دمای فریزر در شروع آزمایش پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس از گذاشتن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. به‌منظور ایجاد هستک یخ در گیاه و اجتناب از بروز پدیده فرا

¹ Ice Nucleation Active Bacteria

افزایش یافت، اما شدت افزایش بسته به تاریخ کاشت متفاوت بود. هرچند در تمامی تاریخ‌های کاشت نشت الکترولیت‌ها تا دمای ۶- درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت بود و با کاهش بیشتر دما روندی افزایشی داشت، اما این افزایش در گیاهان کاشت سوم نسبت به سایر تاریخ‌ها بیشتر بود. به طوری که در این کاشت با کاهش دما از صفر درجه سانتی‌گراد به ۱۵- درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت‌ها حدود ۷۱ درصد افزایش یافت (شکل ۲). کمترین افزایش نشت الکترولیت‌ها نیز در گیاهان کاشت دوم (مهرماه) مشاهده شد (در حدود ۵۸ درصد). گیاهانی که در زمان اعمال تنش یخ‌زدگی در مراحل پیشرفته رشد رویشی بوده‌اند، تحمل به سرمای کمتری نسبت به گیاهانی داشته‌اند که در مراحل ابتدایی‌تر رشد رویشی قرار داشتند. براندساتر و همکاران (Brandsater et al., 2000) و تاپا و همکاران (Thapa et al., 2008) در بررسی تحمل به یخ‌زدگی *Medicago truncatula* و یوگینا و همکاران (Eugenia et al., 2003) در تحمل به یخ‌زدگی ارقام نوعی شبدر (*Trifolium hirtum*) مشاهده کردند که زمانی که گیاهان قبل از تنش یخ‌زدگی از مرحله رشدی بالاتری برخوردار باشند، علیرغم این که مدت بیشتری را تحت شرایط طبیعی و در نتیجه خوسرمایی قرار داشته‌اند ولی از نشت بالاتر و بقای کمتری برخوردار بوده‌اند؛ به عبارت دیگر رشد بیشتر گیاهان در تاریخ‌های کاشت زودتر عاملی برای بالا بودن LT_{50} و حساسیت بیشتر گیاهان به تنش یخ‌زدگی محسوب می‌شود. جونتالیا و رابرت (Junttila and Robberecht, 1993) نیز بیان کردند که تحمل به یخ‌زدگی در گیاه زینتی *Silen acaulis* بسته به مرحله رشدی گیاه متفاوت بوده است و لذا تاریخ کاشت به علت تأثیر بر شرایط خوسرمایی و به دنبال آن تأثیر بر رشد و نمو گیاه، ممکن است مقاومت به یخ‌زدگی را حتی در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما تحت تأثیر قرار دهد. از آنجایی که در زمان اعمال تنش یخ‌زدگی، گیاهان کشت شهریور (مرحله هفت برگی) در مقایسه با کاشت مهر (مرحله پنج‌برگی) و کشت اسفند (مرحله سه برگی) در مقایسه با کاشت فروردین (دارای برگ‌های لپه‌ای) از مرحله رشدی بالاتری برخوردار بودند، این رشد بیشتر گیاهان در بالاتر بودن LT_{50} و حساسیت بیشتر این گیاهان به تنش یخ‌زدگی مؤثر بود؛ به عبارت دیگر گیاهانی که در زمان وقوع سرما در مراحل پیشرفته رشد

متر (مدل Jenway) نشت الکترولیت‌ها اندازه‌گیری شد (EC_1). به منظور اندازه‌گیری کل نشت الکترولیت‌ها پس از مرگ سلول‌ها، نمونه‌ها در اتوکلاو با فشار ۱ بار و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت مجدداً در شرایط آزمایشگاه قرار گرفته و هدایت الکتریکی نمونه‌ها دوباره ثبت شد (EC_2) و با استفاده از معادله ۱، درصد نشت الکترولیت‌ها (EL) تعیین شد.

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

برای محاسبه دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el})، از معادله (۲) استفاده شد (Anderson, 1988).

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

در این معادله ELP : مقدار نشت الکترولیت پیش‌بینی‌شده، EL_m و EL_i : به ترتیب حداقل و حداکثر مقدار نشت الکترولیت‌ها در دماهای آزمایش، B : سرعت افزایش شیب منحنی، T : دما، T_m نقطه‌ی عطف منحنی (نقطه میانی بین بخش پائینی و بالائی خط منحنی) و نشان‌دهنده خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از سلول است. همچنین روز بعد از اعمال تنش یخ‌زدگی گلدان‌ها به گلخانه منتقل شده و سه هفته بعد از آن درصد بقاء گیاهان از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و از طریق معادله (۳) محاسبه گردید.

$$SU\% = \frac{A}{B} \times 100 \quad [3]$$

که در آن A ، B و $SU\%$ به ترتیب تعداد بوته بعد و قبل از یخ‌زدگی و درصد بقاء است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 17 انجام گردید و رسم شکل‌های مربوطه نیز توسط نرم‌افزار EXCEL و SLIDE WRITE صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

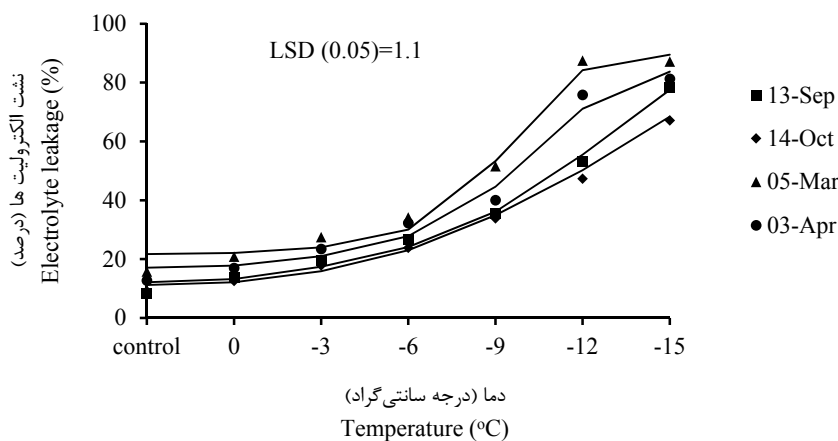
نتایج و بحث

درصد نشت الکترولیت‌ها تحت تأثیر اثر متقابل تاریخ کاشت و دما قرار گرفت. به طوری که هرچند با کاهش دما درصد نشت

¹. Lethal Temperature 50 According to the Electrolyte Leakage percentage

یکی از عوامل کنترل‌کننده میزان خسارت یخ‌زدگی است و بنابراین به نظر می‌رسد که می‌توان با تغییر تاریخ کاشت از خسارت تنش سرما به میزان قابل‌توجهی جلوگیری کرد.

رویشی بوده‌اند، تحمل به سرمای کمتری نسبت به گیاهانی داشته‌اند که در مراحل ابتدایی‌تر رشد رویشی بوده‌اند. لذا تاریخ کاشت و به‌تبع آن اندازه بوته در زمان شروع سرما



شکل ۲. اثر متقابل تاریخ کاشت × دمای یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌های شنبلیله پس از اعمال تنش یخ‌زدگی تحت شرایط کنترل‌شده

Fig. 2. Effect of sowing date × freezing temperature on %EL from fenugreek plant after freezing in controlled conditions.

کمترین میزان این افزایش نیز در اکوتیپ پابلند شمال (حدود هشت درصد) مشاهده شد.

در بررسی نظامی و همکاران (Nezami et al., 2010) روی دو اکوتیپ رازیانه (خراسان و کرمان) نیز مشاهده شد که درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ اکوتیپ خراسان در کاشت اول بیشتر از کاشت دوم بود، درحالی‌که در اکوتیپ کرمان درصد نشت الکترولیت‌ها در کاشت دوم افزایش یافت. پذیره (Pazireh, 2014) نیز با بررسی درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های سیر (*Allium sativum* L.) مشاهده کرد که اثر تاریخ کاشت بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های سیر به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) متفاوت بود. باوجوداینکه درصد نشت الکترولیت‌ها در هر چهار اکوتیپ سیر در کاشت دوم (مهرماه) نسبت به کاشت اول (شهریورماه) کاهش یافت، ولی بیشترین کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ خواف ۱۱/۳ درصد مشاهده شد، درصورتی‌که در اکوتیپ تربت‌حیدریه این کاهش به ۱/۱ درصد رسید.

تاریخ کاشت اثر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر میانگین درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های شنبلیله داشت. درصد نشت الکترولیت‌ها در تمامی اکوتیپ‌ها در کاشت دوم آن‌ها کمتر از سایر کاشت‌ها بود (جدول ۱)، باوجوداین با تأخیر در کاشت از ۲۳ شهریور به ۲۳ مهرماه درصد نشت الکترولیت‌های اکوتیپ اردستان حدود هشت درصد کاهش یافت، درصورتی‌که در اکوتیپ‌های آذری، شیروان، مشهد و همدان این کاهش کمتر از دو درصد بود. همچنین تأخیر در کاشت از ۱۵ اسفند به ۱۵ فروردین‌ماه سبب کاهش حدود ۱۵ درصدی در نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های آذری و اردستان شد و کمترین کاهش نیز در اکوتیپ همدان مشاهده شد. به‌طورکلی در اکثر اکوتیپ‌ها با تأخیر در کاشت از ۲۳ شهریور به ۱۵ اسفند درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت. ولی بعدازآن در کاشت ۱۵ فروردین درصد نشت کاهش یافت. بیشترین میزان نشت ناشی از تأخیر در کاشت از ۲۳ شهریور به ۱۵ اسفند به ترتیب متعلق به اکوتیپ‌های آذری (حدود ۲۲ درصد) و اکوتیپ اردستان (حدود ۱۷ درصد) بود و

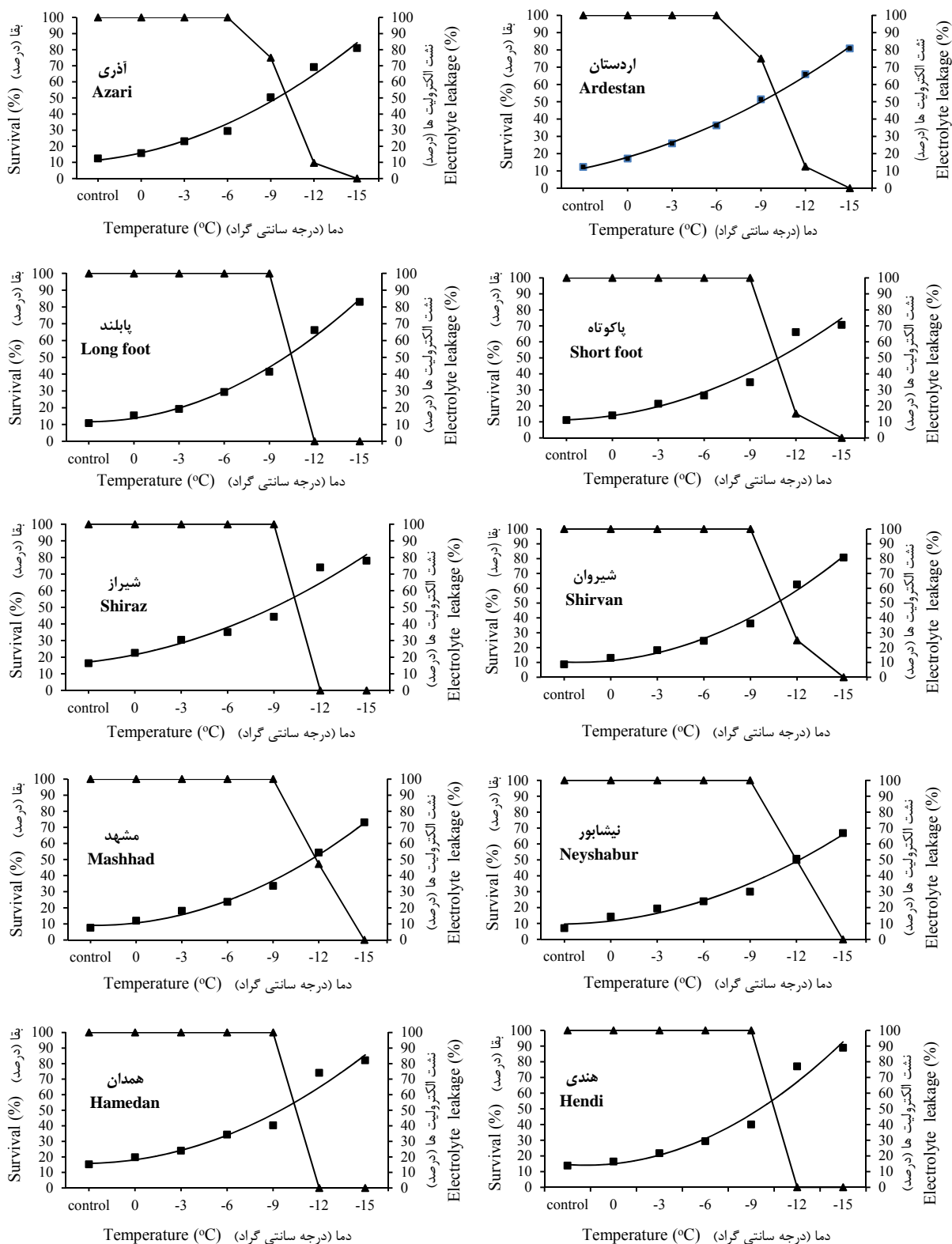
جدول ۱. اثر متقابل تاریخ کاشت × اکوتیپ بر درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاه شنبلیله پس از اعمال تنش یخ‌زدگی تحت شرایط کنترل شده.
Table 1. Effect of sowing date × ecotype on %EL from fenugreek plant after freezing in controlled conditions.

Ecotype	اکوتیپ	تاریخ کاشت			
		13 September ۲۳ شهریور	14 October ۲۳ مهر	5 March ۱۵ اسفند	3 April ۱۵ فروردین
Azari	آذری	33.2	31.1	55.5	41.1
Ardestan	اردستان	38.9	30.9	55.7	40.0
Long foot	پابلند شمال	37.8	30.8	44.7	38.7
Short foot	پاکوتاه شمال	32.5	30.4	40.2	36.7
Shiraz	شیراز	37.7	33.0	49.3	52.2
Shirvan	شیروان	32.0	30.9	40.4	36.3
Mashhad	مشهد	27.2	26.4	39.2	34.2
Neyshabur	نیشابور	24.8	22.8	39.7	33.9
Hamedan	همدان	33.3	32.7	49.5	50.1
Hendi	هندی	39.7	33.9	49.7	40.9
LSD (0.05)	1.32				

یافت، اما کاهش درصد بقاء برای اکوتیپ‌های اردستان و آذری از دمای ۶- درجه سانتی‌گراد آغاز شد. با کاهش دما به ۱۲- درجه سانتی‌گراد چهار اکوتیپ (پابلند شمال، شیراز، همدان و هندی) کاملاً از بین رفتند، اما اکوتیپ‌های نیشابور و مشهد به ترتیب با ۵۰ و ۴۷/۲ درصد از بالاترین بقاء نسبت به سایر اکوتیپ‌ها در این دما برخوردار بودند، با وجود این کاهش دما به ۱۵- درجه سانتی‌گراد تمام اکوتیپ‌ها را از بین برد (شکل ۳). در دو اکوتیپ اردستان و آذری با کاهش دما از ۶- به ۹- درجه سانتی‌گراد حدود ۲۵ درصد گیاهان از بین رفتند، در حالی که در سایر اکوتیپ‌ها چنین وضعیتی مشاهده نشد. در آزمایش ژوان و همکاران (Xuan et al., 2009) بر روی نمونه‌های زویسیاگراس نیز انواع متحمل (Z137 (J-37) و Z136 (J-36) تا دمای ۱۴- درجه سانتی‌گراد را تحمل کردند در حالی که درصد بقاء نمونه‌های دیگر در این دما، صفر بود. در اغلب اکوتیپ‌های مورد استفاده در این مطالعه، ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها منجر به مرگ ۵۰ درصد نشد و تنها در اکوتیپ نیشابور نشت الکترولیت‌ها به میزان ۵۰ درصد مرگ ۵۰ درصدی گیاهان را به دنبال داشت. در سایر اکوتیپ‌ها مرگ ۵۰ درصدی گیاهان در نشت‌های بالاتر از ۵۰ درصد اتفاق افتاد، به‌عنوان مثال در اکوتیپ هندی ۵۷/۶ درصد نشت الکترولیت‌ها سبب مرگ ۵۰ درصدی گیاهان و در اکوتیپ آذری نشت ۸۱ درصد الکترولیت‌ها سبب مرگ ۱۰۰

درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های شنبلیله، تحت تأثیر دماهای یخ‌زدگی معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بود. اگرچه با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها در تمام اکوتیپ‌ها افزایش یافت، اما این افزایش در اکوتیپ هندی شدیدتر از سایر اکوتیپ‌ها بود، در این اکوتیپ با کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت الکترولیت‌ها ۷۲/۵ درصد افزایش داشت در صورتی که در اکوتیپ نیشابور این افزایش ۵۲/۵ درصد بود (شکل ۳). در مطالعه یوگینا و همکاران (Eugenia et al., 2003) نیز هرچند کاهش دما سبب افزایش نشت الکترولیت‌ها در ارقام نوعی شبدر (*Trifolium hirtum*) شد، ولی در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت سه رقم بیشتر از رقم Overton R18 بود. در مطالعه تحمل به یخ‌زدگی ارقام جو (*Hordeum vulgare*) نیز مشاهده شد که درصد نشت الکترولیت‌ها از ارقام کارون، کویر، ماکویی، لخت و والفجر با کاهش دما تا دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای شاهد تحت تأثیر قرار نگرفت، ولی در رقم ریحان کاهش دما از ۸- درجه سانتی‌گراد به ۱۲- درجه سانتی‌گراد سبب افزایش شدید درصد نشت الکترولیت‌ها شد (Nezami et al., 2010).

اثر متقابل اکوتیپ و دما بر بقای گیاه شنبلیله نیز معنی‌دار بود. به‌طوری‌که در اغلب اکوتیپ‌ها با کاهش دما از ۹- درجه سانتی‌گراد، درصد بقاء گیاهان به‌طور معنی‌داری کاهش



شکل ۳. اثر متقابل اکوتیپ × دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها (منحنی برازش داده‌شده) پس از اعمال یخ‌زدگی و درصد بقاء گیاه شنبليله پس از یک ماه بازیافت در شرایط گلخانه. مقدار LSD در سطح احتمال ۱ درصد برای درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء به ترتیب ۱/۷۵ و ۱/۰۴ است.

Fig. 3. Effect of ecotype × temperature on electrolyte leakage % (fitted curve) after applying freezing stress and survival % fenugreek plant after one month recovery in greenhouse conditions. LSD value for electrolyte leakage % and survival % is 1.75 and 1.04 respectively.

شهریور به اسفند افزایش چهاردرجه‌ای LT_{50el} را به دنبال داشت، در صورتی که در اکوتیپ‌های پاکوتاه، شیراز، شیروان و نیشابور این تأخیر تأثیری بر LT_{50el} نداشت و در اکوتیپ‌های اردستان، پابند، مشهد و هندی منجر به افزایش دودرجه‌ای LT_{50el} شد. در دو اکوتیپ آذری و اردستان با تأخیر در کاشت از ۱۵ اسفند به ۱۵ فروردین LT_{50el} حدود دو درجه کاهش داشت در صورتی که در سایر اکوتیپ‌ها چنین وضعیتی مشاهده نشد. به‌طور کلی تأخیر در کاشت‌های پاییزه و بهاره از طریق تأثیر بر مرحله رشدی گیاه، سبب پایین‌تر بودن LT_{50el} و مقاومت بیشتر اکوتیپ‌ها به تنش یخ‌زدگی می‌شود. در این آزمایش رابطه منفی و معنی‌داری ($r = -0.536^*$) بین ۵۰ درصد کسندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) و درصد بقاء مشاهده شد (شکل ۵). به عبارتی با کاهش دمای ۵۰ درصد کسندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها از درصد بقاء گیاهان کاسته شد.

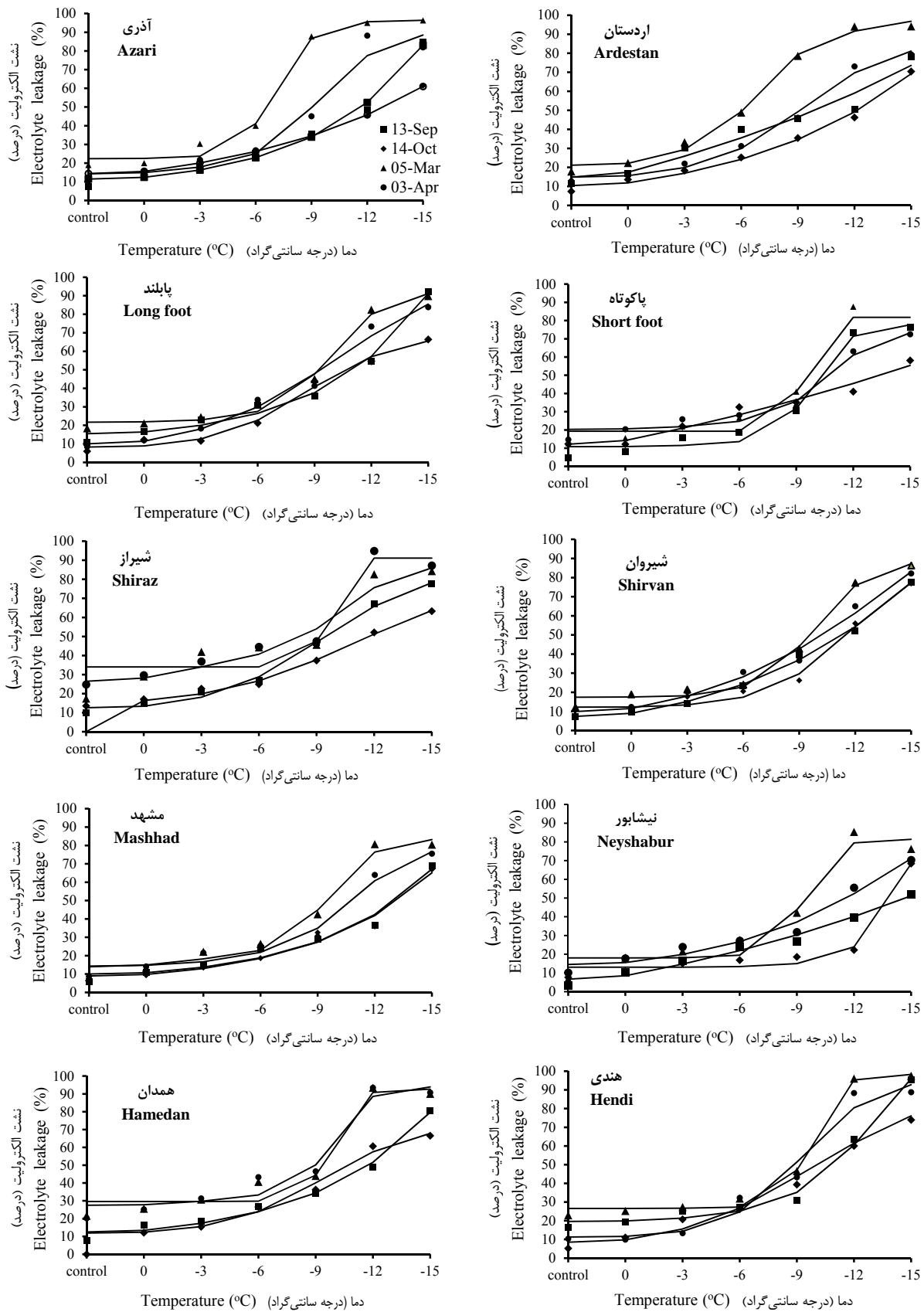
نتیجه‌گیری

در کاشت شهریورماه تنها اکوتیپ‌های نیشابور و مشهد قادر به تحمل دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد بودند و سایر اکوتیپ‌ها از بین رفتند. در کاشت مهرماه اکوتیپ‌های نیشابور، مشهد، شیروان و پاکوتاه شمال در دمای مذکور دارای بالاترین درصد بقا (به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۶۱ درصد نسبت به شاهد) بودند و از LT_{50el} پایین‌تری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها برخوردار بودند (جدول ۲). در کاشت‌های اسفند و فروردین نیز کاهش دما به ۱۲- درجه سانتی‌گراد منجر به از بین رفتن گیاهان تمام اکوتیپ‌ها شد به‌طور کلی در این مطالعه در تمامی اکوتیپ‌ها کاهش دما منجر به افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها شد. از طرفی این افزایش درصد نشت در تاریخ کاشت دهه دوم اسفند بیشتر از سایر تاریخ‌های کاشت بود. در میان اکوتیپ‌های مورد مطالعه نیز، دو اکوتیپ نیشابور و آذری به ترتیب از بیشترین و کمترین تحمل به یخ‌زدگی از نظر میزان نشت و LT_{50el} برخوردار بودند؛ بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به اینکه تأخیر در کاشت‌های پاییزه و بهاره با تأثیر بر مرحله رشدی گیاه سبب افزایش تحمل به یخ‌زدگی در گیاهان می‌شود، تاریخ کاشت مهرماه زمان مناسبی جهت کاشت اکوتیپ‌های نیشابور، مشهد، شیروان و پاکوتاه شمال باشد که در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها از درصد نشت پایین‌تر و LT_{50el} مناسب‌تری برخوردارند.

درصد گیاهان شد. در صورتی که در اکوتیپ شیراز ۶۲ درصد نشت الکترولیت‌ها سبب مرگ ۵۰ درصد گیاهان شد. جواد موسوی و همکاران (Javadmousavi et al., 2011) نیز در بررسی تحمل به یخ‌زدگی گیاه زینتی مینا چمنی (*Bellis perennis*) بیان کردند که با وجود آنکه بین درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء رابطه منفی وجود دارد، اما نشت نیمی از الکترولیت‌ها سبب کاهش ۵۰ درصدی بقاء نشده، بلکه ۷۸ درصد نشت الکترولیت‌ها منجر به مرگ نیمی از گیاهان شده است. در بررسی کاردونا و همکاران (Cardona et al., 1997) بر روی اکوتیپ‌های پاسپالوم، نشت به میزان ۳۲ درصد سبب مرگ ۵۰ درصدی گیاهان شد.

اثر متقابل تاریخ کاشت، اکوتیپ و دماهای یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بود. درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های شنبلیله در هر تاریخ کاشت با کاهش دما افزایش یافت، با وجود این، این کاهش در اکوتیپ‌های نیشابور، مشهد، شیروان و پاکوتاه شمال از دمای ۹- درجه سانتی‌گراد آغاز شد در حالی که در سایر اکوتیپ‌ها این روند افزایشی از دمای ۶- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۴). در اکوتیپ‌های آذری، اردستان، پاکوتاه، مشهد، نیشابور و هندی، گیاهان کاشت سوم درصد نشت الکترولیت‌های بیشتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها داشتند، هرچند که در همین اکوتیپ‌ها نیز شیب افزایش نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های آذری و اردستان از ۳- درجه سانتی‌گراد آغاز شد در صورتی که در اکوتیپ‌های پاکوتاه و نیشابور این شیب از دمای ۶- درجه سانتی‌گراد شروع شد. در همه اکوتیپ‌ها، گیاهان کاشت دوم در اغلب دماهای مورد مطالعه درصد نشت الکترولیت‌های کمتری نسبت به سایر کاشت‌ها داشتند. با وجود این در کاشت مذکور درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ نیشابور با کاهش دما به کمتر از ۹- درجه سانتی‌گراد شدت یافت، در صورتی که در اکوتیپ پابند و شیراز افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۳- درجه سانتی‌گراد آغاز شد.

اثر متقابل تاریخ کاشت و اکوتیپ بر LT_{50el} معنی‌دار ($p \leq 0.05$) بود. تأخیر در کاشت پاییزه (از شهریور به مهرماه) بیشترین تأثیر را در مقادیر LT_{50el} داشت، به طوری که در دو اکوتیپ اردستان و نیشابور این تأخیر سبب کاهش معنی‌دار مقدار LT_{50el} شد. در حالی که در پنج اکوتیپ آذری، پابند، پاکوتاه، همدان و هندی این تأخیر در کاشت منجر به افزایش LT_{50el} شد (جدول ۲). در اکوتیپ آذری تأخیر در کاشت از



شکل ۴. اثر متقابل تاریخ کاشت × اکوتیپ × دماهای یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاه شنبلیله پس از اعمال تنش یخ‌زدگی تحت شرایط کنترل‌شده. مقدار حداقل تفاوت معنی‌دار ۴/۸۱ است.

Fig. 4. Effect of sowing date × ecotype × freezing temperature on EL percentage from fenugreek plant after freezing in controlled conditions. LSD value is 4.81.

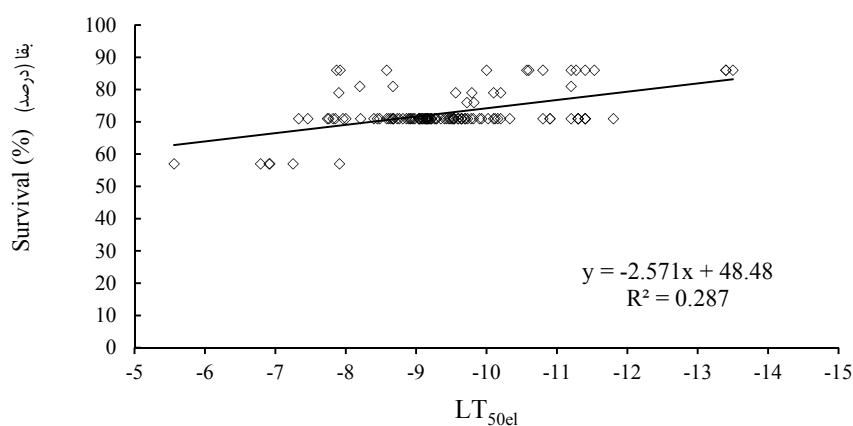
سپاسگزاری

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

جدول ۲. اثر متقابل تاریخ کاشت × اکتیپ بر دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکتروولت‌ها در گیاه شنبلیله پس از اعمال تنش یخ‌زدگی تحت شرایط کنترل شده

Table 2. Effect of sowing date × ecotype on LT_{50el} of fenugreek plant after freezing in controlled conditions

Treatment	تیمار	Sowing date			
Ecotype	اکتیپ	13 September ۲۳ شهریور	14 October ۲۳ مهر	5 March ۱۵ اسفند	3 April ۱۵ فروردین
Azari	آذری	-11.0	-9.77	-6.98	-8.99
Ardestan	اردستان	-8.48	-9.95	-6.79	-8.54
Long foot	پابلند	-11.2	-8.37	-9.51	-8.75
Short foot	پاکوتاه	-9.41	-8.25	-9.10	-9.91
Shiraz	شیراز	-8.52	-9.15	-8.14	-9.16
Shirvan	شیروان	-10.0	-10.5	-9.44	-9.40
Mashhad	مشهد	-11.1	-11.1	-8.72	-9.80
Neyshabur	نیشابور	-8.12	-13.4	-8.98	-9.66
Hamedan	همدان	-10.8	-8.79	-9.36	-8.97
Hendi	هندی	-11.5	-8.57	-9.55	-8.79
LSD (0.05)	0.8				



شکل ۵. رابطه بین درصد بقا با ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکتروولت‌ها (LT_{50el}) در اکتیپ‌های شنبلیله
Fig. 5. Relationship between survival with LT_{50el} in fenugreek ecotypes.

منابع

- Anderson, J. A., Michael, P., Taliaferro, C. M., 1988. Cold hardiness of Midiron and Tifgreen. *Horticultural Science*. 23, 748-750.
- Arvin, M.J., Donnelly, D.J., 2008. Screening potato cultivars and wild species to abiotic stresses using an electrolyte leakage bioassay. *Journal of Agriculture Science Technology*. 10, 33-42.
- Brandsæter, L.O., Smeby, T., Tronsmo, A.M., Netland, J., 2000. Winter annual legumes for use as cover crops in row crops in northern regions: II. Frost resistance study. *Crop Science*. 40, 175-181.
- Browse, J., Xin, Z., 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Physiology and metabolism*. 4, 241-246.
- Coventry, D.R., Reeves, T.G., Brooke, H.D., Cann, K., 2003. Influence of genotype, sowing date, and seeding rate on wheat development and yield. *Australian Journal. Exp. Agriculture*. 33, 751-757.
- Eugenia, M., Nunes, S., Ray Smith, G., 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Science*. 43, 1349-1357.
- Gostin, J.N., 2009. Structural modification induce air pollution in *Plantago lanceolata* leaves. *Tom. XVI/1. 1*, 61- 65.
- Grace, M.P., Anderson, N.O., Li, P.H., 2009. Cold tolerance and short day acclimation perennial *Guara coccinea* and *G. drummondii*. *Scientica Horticulture*. 120, 418-425.
- 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].
- Johnson, R.C., Dajue, L., Bradley, V.L., 2006. Autumn growth and its relationship to winter survival in diverse safflower germplasm. *Canadian Journal of Plant Science*. 86, 701-732.
- Junttila, O., Robberecht, R., 1993. The influence of season and phenology on freezing tolerance in *Silen acaulis* L., a subarctic and arctic cushion plant of circumpolar distribution. *Annals of Botany*. 71, 423-426.
- Kheyrkhal, T., Nezami, A., Kafi, M., Asadi, G.A., 2015. Evaluation of field grown mentha (*Mentha piperita* L.) to cold tolerance under laboratory conditions with electrolyte leakage. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 13(2), 269-277. [In Persian with English Summary].
- Maletic, R., Jevdjovic, R., 2007. Sowing date- the factor of yield and quality of fenugreek seed (*Trigonella foenum gracum* L.). *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*. 52(1), 1-8.
- Najafpor Navaee M., 1994. Issues on fenugreek. *Research Institute of Forests and Rangelands Publication, No: 127*. Pp: 18. [In Persian].
- Nezami, A., Bagheri, A.R., 2005. Responsiveness of cold tolerant chickpea characteristics in fall and spring planting: II. Yield and yield components. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 3(1), 156-170. [In Persian with English Summary].
- Nezami, A., Azizi, K., Siyahmarghoie, A., Mohammadabadi, A.A., 2010. Evaluation of freezing tolerance in Fennel (*Foeniculum vulgare*) *Iranian Journal of Field Crops Research*. 8, 587-593. [In Persian with English Summary].
- Nezami, A., Nabati, J., Borzooei, A., Kamandi, A., Masomi, A., Salehi, M., 2010. Evaluation of freezing tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars at seedling stage under controlled conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences (ESCS)*. 3(1), 9-22. [In Persian with English Summary].
- Pazireh, S., 2014. Evaluation of tolerance freezing traits and recovery of four garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes under semi-controlled conditions. MSc thesis, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. [In Persian with English Summary].
- Seghatoleslami, M.J., Ahmadi Bonakdar, Kh., 2010. Effects of density and Sowing Date on yield and yield components in Fenugreek. *Journal of Medicinal Plants*. 26(2), 265-274. [In Persian with English Summary].
- Skinner D. Z., Garland-Campbell K., A., 2008. The relationship of LT₅₀ to prolonged freezing survival in winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science*. 88, 885-889.
- Thapa, B., Arora, R. Knapp, A., Brummer, E. C., 2008. Applying freezing test to quantify cold acclimation in *Medicago truncatula*. *Journal*

- of the American Society of Horticultural Science. 133 (5), 684–691.
- Xuan, J., Liu, J., Gao, H., Huaguabghu, H., Cheng, X., 2009. Evaluation of low-temperature tolerance of Zoysia grass. Tropical Grasslands. 43, 118–124.
- Zhang, Ch. Fei., Arora, SH., David, R., 2010. Ice recrystallization inhibition proteins of rygrass enhance freezing tolerance. Planta. 132, 155-164.