

## اثر تنش یخ‌زدگی بر درصد نشت‌الکترولیت‌ها و بقاء گیاهچه‌های خاکشیر (*Descurainia sophia* L.)

ابراهیم ایزدی‌دربندی<sup>۱</sup> - احمد نظامی<sup>۲\*</sup> - روح‌الله حسن بیگی<sup>۳</sup> - مریم جانعلی‌زاده قزوینی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۳۱

### چکیده

به‌منظور بررسی تحمل گیاه دارویی خاکشیر به تنش یخ‌زدگی آزمایشی در پاییز ۱۳۸۷ به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل آزمایش شامل پنج‌اکوتیپ خاکشیر (اقلید، سبزواری، همدان، تربت‌جام و نیشابور) و ۱۰ دمای یخ‌زدگی (از صفر تا ۱۸- درجه سلسیوس با فواصل ۲ درجه سلسیوس) بود. گیاهان تا مرحله پنج-هفت‌برگی در شرایط آب‌وهوای طبیعی رشد یافته و با سرما خو گرفتند. سپس برای اعمال دماهای یخ‌زدگی به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. میزان پایداری غشاء سیتوپلاسمی با استفاده از آزمون نشت الکترولیت‌ها ارزیابی و سپس دمای کشنده ۵۰ درصدها بر اساس درصد نشت‌الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) تعیین شد. به‌منظور بررسی میزان هم‌بستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها با درصد بقاء، گیاهان باقی‌مانده به‌گلخانه منتقل و پس از ۲۱ روز بازیافت، درصد بقاء و سپس دمای کشنده ۵۰ درصد گیاهان بر اساس درصد بقاء ( $LT_{50su}$ ) محاسبه شد. نتایج نشان داد که بر اساس شاخص‌های  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$ ، اکوتیپ‌های همدان، سبزواری و تربت‌جام تحمل به یخ‌زدگی بیش‌تری نسبت به اکوتیپ‌های نیشابور و اقلید داشتند. بر مبنای شاخص  $LT_{50su}$ ، اکوتیپ همدان پتانسیل تحمل به یخ‌زدگی تا دمای ۱۲- درجه سلسیوس را دارا بود. در این بررسی بین درصد نشت‌الکترولیت‌ها و درصد بقاء رابطه منفی و قوی ( $r = -0.73^{***}$ ) وجود داشت. هم‌چنین بین  $LT_{50su}$  و  $LT_{50el}$  هم‌بستگی مثبت و بالایی ( $r = 0.53^*$ ) دیده شد.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، بازیافت، درصد بقاء، دمای ۵۰ درصد کشندگی

### مقدمه

وکاهش حدت سرخچه، سرخک، آبله و مخملک مفید است (Mirheidar, 1995). خاکشیر در اغلب نقاط ایران به‌صورت گیاهی خودرو یافت شده و در مزارع غلات پاییزه و خانواده شنبو نیز به‌عنوان علف‌هرزی با بانک بذر غنی شناخته شده‌است (Kiani, 2003). عادت‌رشدی پاییزه گیاه و رشدونمو آن در فصول سرد، رویارویی آن را با تنش‌های زمستانه از جمله تنش یخ‌زدگی غیرقابل‌اجتناب می‌سازد. تنش یخ‌زدگی نوعی تنش مرکب است که در نتیجه قرارگرفتن گیاه در معرض دمای پایین و به‌همراه تنش مکانیکی ناشی از تشکیل یخ در بافت‌ها بروز می‌کند (Mirmohamadi Meibodi and Tarkeshe, 2004). بررسی‌ها نشان داده‌است که در طی تنش یخ‌زدگی، انسجام و فعالیت غشاءسلولی مختل شده و در نتیجه آن نشت‌الکترولیت‌ها از درون سلول‌ها اتفاق می‌افتد، لذا اندازه‌گیری میزان نشت‌الکترولیت‌ها از بافت‌ها یا اندام‌های گیاهی تحت تنش سرما، معیار مناسبی برای اندازه‌گیری میزان تحمل به تنش سرما گیاهان ذکر شده‌است (Mirmohamadi Meibodi and Tarkeshe, 2004). (Hajmohammadnia-Ghalibaf et al, 2010). در ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی ارقام چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) با استفاده از

انسان در طول تاریخ وابسته به گیاهان دارویی بوده و در عصر حاضر نیز با وجود پیشرفت‌های وسیع و فراگیر علمی و صنعتی، تمایل انسان برای استفاده از این گیاهان نه‌تنها کاهش نیافته، بلکه در مواردی افزایش نشان می‌دهد (Omid Baigi, 2004). خاکشیر (*Descurainia sophia* L.) گیاهی یک‌ساله یا ۲ساله متعلق به خانواده Brassicaceae است (Shahina, 1994) که برای آن خواص دارویی فراوانی ذکر کرده‌اند. در چین از بذر آن به‌عنوان ملین، تب‌بر و تسکین التهابات پوست از جمله کهیر استفاده می‌شود. در هند نیز از بذر آن برای نرم‌کردن سینه و در درمان برونشیت و دفع کرم معده استفاده می‌کنند. متخصصان طب سنتی ایران معتقدند که خاکشیر برای تقویت معده

۱ و ۲- به ترتیب دانشیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی

دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زراعت دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشگاه فردوسی مشهد

\*- نویسنده مسئول: (Email: nezami@um.ac.ir)

فریون<sup>۳</sup> (*Euphorbia esula* L.) با استفاده از شاخص  $LT_{50su}$  صورت گرفت، مشاهده شد که مقدار  $LT_{50su}$  برای طوقه گیاهان تیمار نشده با کود نیتروژن و علف‌کش‌ها، ۱۹-درجه سیلیسیوس، برای ریشه‌های موجود در عمق ۱۵-۳۰ سانتی‌متری، ۱۶- و برای ریشه‌های برگرفته از عمق ۳۰-۱۵ سانتی‌متری خاک، ۱۳-درجه سیلیسیوس بود. همچنین مقدار  $LT_{50su}$  بعد از ۲ سال تیمار با انجام دو شخم در پاییز و استفاده هم‌زمان از علف‌کش پیکلورام و D-2-4 به صفر درجه سیلیسیوس افزایش یافت. کاربرد کود نیتروژن در پاییز نیز  $LT_{50su}$  را برای ریشه‌های موجود در هر دو عمق افزایش داد، ولی تأثیری در پایین آوردن تحمل به یخ‌زدگی طوقه‌ها نداشت (Lim and Calvin, 1993).

محققان هم‌بستگی خوبی را بین دماهای ۵۰ درصد کسندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گزارش کرده‌اند (Kheirkhah, 2013; Janalizadeh, 2012; and Nezami et al., 2013). نشان داد که هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری ( $r^2=0.72^{**}$ ) بین دماهای کسندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء برای گیاه نعناع‌قلقلی (*Mentha piperita* L.) وجود دارد. در مطالعه‌ای دیگر نیز مشاهده شد که دمای کسندگی بر اساس نشت الکترولیت و رشد مجدد در گلخانه برای ارقام 'Tifway' و 'Tifdwarf' پنجه‌مرغی بسیار به هم نزدیک است (Li et al., 2003). در آزمایش Khorsandi, 2013 بر روی گیاه دارویی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) نیز اکتیپ فردوس بر اساس هر دو شاخص ( $LT_{50su}$  و  $LT_{50el}$ ) پایین‌ترین رتبه را داشت و حساس‌ترین اکتیپ مورد مطالعه بود، اما اکتیپ سبزواری ضمن داشتن رتبه‌ی بالاتر از نظر این شاخص‌ها محتمل‌ترین اکتیپ به سرمای دیررس بهار شناخته شد.

علی‌رغم خواص دارویی متعدد خاکشیر و مناسب بودن شرایط اقلیمی کشور برای اهلی‌سازی چنین گیاهی تاکنون تحقیقات اندکی پیرامون اثر تنش‌های محیطی از جمله یخ‌زدگی بر رشد، نمو و عملکرد آن انجام شده است. تحقیق حاضر با هدف ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی تعدادی از اکتیپ‌های خاکشیر با استفاده از شاخص‌های  $LT_{50su}$  و  $LT_{50el}$  در شرایط کنترل شده انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در پاییز سال ۱۳۸۷ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. عوامل آزمایش شامل پنج اکتیپ خاکشیر (اقلید، سبزواری، همدان، تربت‌جام و نیشابور) و ۱۰ سطح دمای یخ‌زدگی (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۸-درجه

از شاخص نشت الکترولیت‌ها دریافتند که با کاهش دما به کم‌تر از ۴-درجه سیلیسیوس، در اکثر ارقام، درصد نشت الکترولیت‌ها روندی افزایشی پیدا کرده است. در حالی که در ارقامی نظیر لاتیتا و IC این افزایش در دمای کم‌تر از ۷-درجه سیلیسیوس روی داد. در بررسی آن‌ها بیش‌ترین دمای ۵۰ درصد کسندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) متعلق به رقم ۷۲۳۳ (رقم حساس) و کم‌ترین آن به ارقام IC و افشاری (ارقام متحمل) تعلق داشت. در بررسی (Zhang et al., 2008) بر روی ارقام پنجه‌مرغی (*Cynodon dactylon* L.) نیز رقم 'Patriot' بعد از ۲۱ روز خوسرمایی، متوسط  $LT_{50el}$  کم‌تری نسبت به ارقام 'Tifway' و 'Princess' داشت. در مطالعه دیگری بر روی تحمل به یخ‌زدگی چندگونه علف‌چمنی نیز مشخص شد که تأثیر دماهای یخ‌زدگی بر نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های برگ نسبت به طوقه بیش‌تر است، به طوری که حداکثر میزان نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های برگ در دمای ۱۶/۵-درجه سیلیسیوس اتفاق افتاد. در حالی که حداکثر نشت از سلول‌های طوقه در دمای ۱۸-درجه سیلیسیوس، بود (Nezami et al., 2010). در بررسی مذکور بر اساس  $LT_{50el}$  برگ، علف‌چمنی برموداگراس (پنجه‌مرغی) و محلات حساس‌ترین و علف‌های چمنی استارلت و اکوتیپ یارند متحمل‌ترین چمن‌های مورد مطالعه بودند.

از آنجایی که تنش یخ‌زدگی منجر به کاهش درصد بقاء (Rashed Mohassel et al., 2009) می‌شود، لذا تعیین دمای که منجر به کاهش ۵۰ درصدی در بقاء ( $LT_{50su}$ ) گیاهان می‌گردد، شاخص مناسب دیگری برای به‌گزینی انواع متحمل ذکر شده است (Xuan et al., 2009). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی ارقام از زویسیاگراس (*Zoysia spp.*) در تمام زمان‌های نمونه‌برداری (از اکتبر تا ژانویه) انجام شد، مشاهده شد که رقم 'Meyer' نسبت به 'Cavalier' از  $LT_{50}$  بقای پایین‌تری برخوردار بود (Zhang et al., 2009). در آزمایش Nezami et al., 2012 تحمل به یخ‌زدگی شش اکتیپ زیره‌سبز (*Cuminum cyminum* L.) در شرایط کنترل شده مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس این شاخص، اکتیپ‌های قوچان و قاین به ترتیب با  $LT_{50su}$  معادل ۱۱/۸- و ۱۰/۸- درجه سیلیسیوس متحمل‌ترین و اکتیپ‌های تربت‌حیدریه و راجستان با دمای معادل ۹/۳-درجه سیلیسیوس حساس‌ترین اکتیپ‌ها نسبت به تنش یخ‌زدگی شناخته شدند.

در آزمایشی دیگر که به منظور بررسی اثرات شخم (عمق ریشه)، کود نیتروژن و علف‌کش‌ها در کاهش زمستان‌گذرانی علف‌هرز

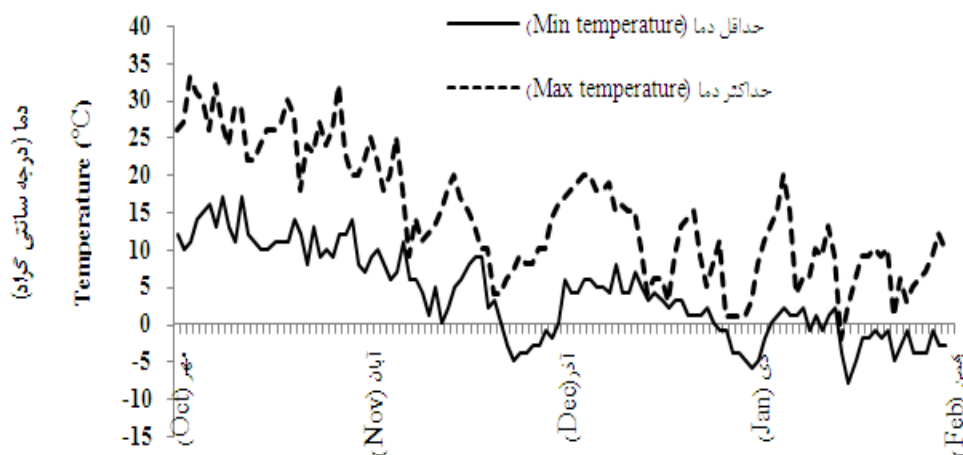
1- Lethal temperature 50% of plants according to the electrolyte leakage percentage

2- Lethal temperature 50% of plants according to the Survival percentage

3- Leafy spurge

مرحله پنج الی هفت‌برگی در شرایط آب‌وهوای طبیعی رشدیافتند و پس از گذراندن دوره خوسرمایی برای اعمال دماهای یخ‌زدگی، به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند.

سیلیسیوس) بودند. پس از جمع‌آوری بذور اکوتیپ‌های خاکشیر از مناطق اقلیمی موردنظر، به کشت آن‌ها در گلدان‌هایی پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتی‌متر اقدام شد. به‌منظور القاء خوسرمایی در نتیجه کاهش دما و فتوپریود رایج در پاییز (شکل ۱)، گیاهان از زمان کاشت تا



شکل ۱- شرایط آب و هوایی پاییز و زمستان ۱۳۸۷ در مشهد  
Figure 1- The weather conditions of autumn and winter of 2008- 9 in Mashhad

ویال‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه به اتوکلاو با دمای ۱۱۰ درجه سیلیسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر منتقل شدند و پس از آن مجدداً به‌مدت شش‌ساعت بر روی شیکر قرار گرفته و سپس هدایت‌الکتریکی نهایی آن‌ها اندازه‌گیری شد (EL<sub>2</sub>). درصد نشت‌الکترولیت‌ها با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد. درجه‌حرارت کشنده ۵۰ درصد گیاهان بر اساس درصد نشت‌الکترولیت‌ها (LT<sub>50ei</sub>) نیز با استفاده از رسم نمودار سیگموئیدی داده‌های درصد نشت‌الکترولیت هر اکوتیپ در مقابل دماهای یخ‌زدگی و با استفاده از معادله (۲) تعیین شد (Anderson, 1988).

$$ELp = ELi + [(ELm - ELi) / (1 + e^{-B(T-Tm)})] \quad (1)$$

$$ELp = ELi + [(ELm - ELi) / (1 + e^{-B(T-Tm)})] \quad (2)$$

در معادله فوق ELp: میزان نشت‌الکترولیت پیش‌بینی‌شده؛ ELi: حداقل درصد نشت‌الکترولیت در دماهای مختلف؛ ELm: حداکثر درصد نشت‌الکترولیت به‌دست‌آمده در دماهای مختلف؛ e: تابع نمایی؛ B: میزان افزایش شیب منحنی؛ T: مقدار مطلق دما و Tm: نقطه عطف منحنی؛ نقطه میانی بین بخش بالایی و پایینی خط منحنی که نشان‌دهنده دمایی است که باعث خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها (LT<sub>50ei</sub>) از سلول شده‌است، می‌باشند.

جهت تعیین بقاء گیاهان پس از تنش یخ‌زدگی، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند. سه‌هفته پس از انتقال گیاهان، درصد بقاء آن‌ها از طریق معادله (۳) مشخص و با رسم داده‌های درصد بقاء هر اکوتیپ

دمای فریزر در شروع آزمایش پنج‌درجه سیلیسیوس بود و پس از قراردادن نمونه‌ها در فریزر، دما با سرعت ۲ درجه سیلیسیوس در ساعت کاهش یافت تا به‌دمای موردنظر رسید. هم‌چنین به‌منظور جلوگیری از فراسرد شدن گیاهان و ایجاد هستک یخ در گیاهچه‌ها، در دمای ۲- درجه سیلیسیوس محلول حاوی باکتری‌های فعال مولد هستک یخ (INAB) بر روی گیاهان اسپری‌شد به‌نحوی که سطح گیاهان را قشر نازکی از محلول مذکور پوشاند. به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهان در هر تیمار دمایی به‌مدت یک‌ساعت نگاه‌داشته شده، سپس از فریزر خارج شدند. در مرحله بعد برای کاهش سرعت ذوب یخ، گیاهان به‌دمای پنج‌درجه سیلیسیوس منتقل و در طول شب در آنجا نگاه‌داری شدند.

برای اندازه‌گیری میزان نشت‌الکترولیت‌ها در هر تیمار دمایی، روز بعد از اعمال تنش یخ‌زدگی، بخش هوایی چهار بوته خاکشیر داخل ویال‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب ۲ بار تقطیرشده قرار گرفته و به‌مدت شش‌ساعت در روی شیکر تکان داده شدند. پس از آن، هدایت‌الکتریکی اولیه با استفاده از دستگاه EC متر<sup>۲</sup> اندازه‌گیری شد (EL<sub>1</sub>). به‌منظور تعیین میزان کل نشت‌الکترولیت‌ها در اثر مرگ گیاه،

1- Ice Nucleation Active Bacteria  
2- Electrical Conductivity-meter

در مقابل دماهای یخ‌زدگی،  $LT_{50su}$  تعیین شد.

(۳)

= درصد بقاء

/ (تعداد گیاهان زنده سه هفته پس از تیمار یخ‌زدگی) /  
 [  $\times 100$  ] (تعداد گیاهان قبل از تیمار یخ‌زدگی)  
 تجزیه و تحلیل آماری داده‌های درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء به صورت فاکتوریل و داده‌های  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  به صورت One-Way ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. برای تعیین هم‌بستگی میان صفات مذکور از نرم‌افزار MINITAB 15 استفاده شد. همچنین تعیین  $LT_{50el}$  با استفاده از نرم‌افزار Slidewrite صورت گرفت. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel و مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک‌درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

### درصد نشت الکترولیت‌ها و $LT_{50el}$

تنش یخ‌زدگی تأثیر معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) بر درصد نشت الکترولیت‌ها داشت (جدول ۱). بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، خروج الکترولیت‌ها از سلول‌های اندام‌های هوایی خاکشیر تا دمای ۸- درجه سیلسیوس تقریباً مشابه تیمار شاهد (صفر درجه سیلسیوس) بود، اما با کاهش بیش‌تر دما، به‌طور معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) افزایش یافت (جدول ۲). بیش‌ترین میزان نشت الکترولیت‌ها در دمای ۱۲- درجه سیلسیوس و کم‌ترین آن در دمای ۲- درجه سیلسیوس مشاهده شد (جدول ۲). به‌نظر می‌رسد اختلال در ساختار غشای سلولی عامل اصلی افزایش نشت الکترولیت‌ها در این آزمایش باشد، زیرا اثرات ناشی از تنش یخ‌زدگی سبب اختلال در ساختار و از بین رفتن تمامیت غشاء

شده و حاصل این تغییرات، کاهش انسجام غشاها و افزایش نشت الکترولیت از آن‌ها می‌باشد (Campos, 2003). *Eugenia et al.*, 2003 در آزمایشی ارقام شبدر (*Trifolium spp.*) را در معرض دماهای یخ‌زدگی قرار دادند و بیان کردند که تفاوت معنی‌داری از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها در بین دماهای آزمایش وجود دارد. در آزمایش آن‌ها افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۶- درجه سیلسیوس شروع شد و با کاهش دما تا ۱۴- درجه سیلسیوس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بر اساس نتایج آزمایش Izadi-Darbandi *et al.*, 2012 بر روی ژنوتیپ‌های یولاف وحشی (*Avena L. ludoviciana*)، کاهش دما منجر به افزایش خروج الکترولیت‌ها شد و کم‌ترین و بیش‌ترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب در دماهای ۳- و ۱۸- درجه سیلسیوس مشاهده شد.

اثر متقابل اکوتیپ و دما بر درصد نشت الکترولیت گیاهان نیز معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) بود (جدول ۱)، با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها در تمام اکوتیپ‌ها افزایش یافت، اما این افزایش برای اکوتیپ نیشابور از دماهای بالاتری (۸- درجه سیلسیوس) شروع شد، در حالی که در سایر اکوتیپ‌ها، این روند از دماهای پایین‌تری (۱۰- درجه سیلسیوس) نسبت به تیمار شاهد (صفر درجه سیلسیوس) مشاهده گردید (شکل ۲). مقایسه میانگین صفت مذکور نیز نشان داد که کم‌ترین درصد نشت الکترولیت‌ها متعلق به اکوتیپ نیشابور در دمای ۲- درجه سیلسیوس و بیش‌ترین درصد نشت الکترولیت متعلق به اکوتیپ تربت‌جام در دمای ۱۲- درجه سیلسیوس بود (شکل ۲). شیب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ‌های نیشابور، تربت‌جام و اقلید نسبت به اکوتیپ‌های همدان و سبزوار در فاصله دماهای ۸- تا ۱۰- درجه سیلسیوس بسیار تندتر بود (شکل ۲).

جدول ۱- منبع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء گیاه خاکشیر پس از اعمال دماهای یخ‌زدگی  
 Table 1- Sources of variation, degree of freedom and mean of squares of electrolytes leakage percentage and survival in Flixweed after applying freezing temperatures

منبع تغییر	درجه آزادی	درصد نشت الکترولیت‌ها	درصد بقاء
Sources of variation	Degree of freedom	Electrolyte leakage percentage	Survival percentage
اکوتیپ	4	357.885**	280.521 *
Ecotype			
دما	9	3142.265**	29825.067**
Temperature			
اکوتیپ × دما	36	238.101**	253.432 **
Ecotype × temperature			
خطا	100	33.562	88.521
Error			
کل	146		
Total			

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک‌درصد

\* And \*\* are significant in 5% and 1 % probability levels respectively

جدول ۲- اثر تنش یخ‌زدگی بر درصد نشت‌الکترولیت‌ها و درصد بقاء خاکشیر

Table 2- Effect of freezing stress on electrolyte leakage and survival percentage in Flixweed

دمای یخ‌زدگی (°C)	درصد نشت‌الکترولیت‌ها	درصد بقاء
Freezing temperature (°C)	electrolyte leakage percentage	survival percentage
0	33.1	98.7
-2	27.9	95.0
-4	34.8	98.8
-6	34.9	95.1
-8	32.3	91.1
-10	44.0	73.6
-12	69.0	32.3
-14	57.8	1.3
-16	62.1	0.0
-18	51.8	0.0
LSD (0.01)	5.5	9.0

در هر ستون میانگین‌هایی که اختلاف آن‌ها بیش‌تر از LSD است دارای تفاوت آماری معنی‌داری هستند

In ach column means which, their differences are more than LSD value had significant statistic difference

(*Zoysia spp.*) بر اساس شاخص  $LT_{50el}$  متفاوت است، به طوری که گونه *Z. japonica*، تحمل به یخ‌زدگی بیش‌تری نسبت به سایر گونه‌ها داشت و مقدار  $LT_{50el}$  آن، پنج‌درجه سیلسیوس کم‌تر از گونه *Z. macrostachya* بود.

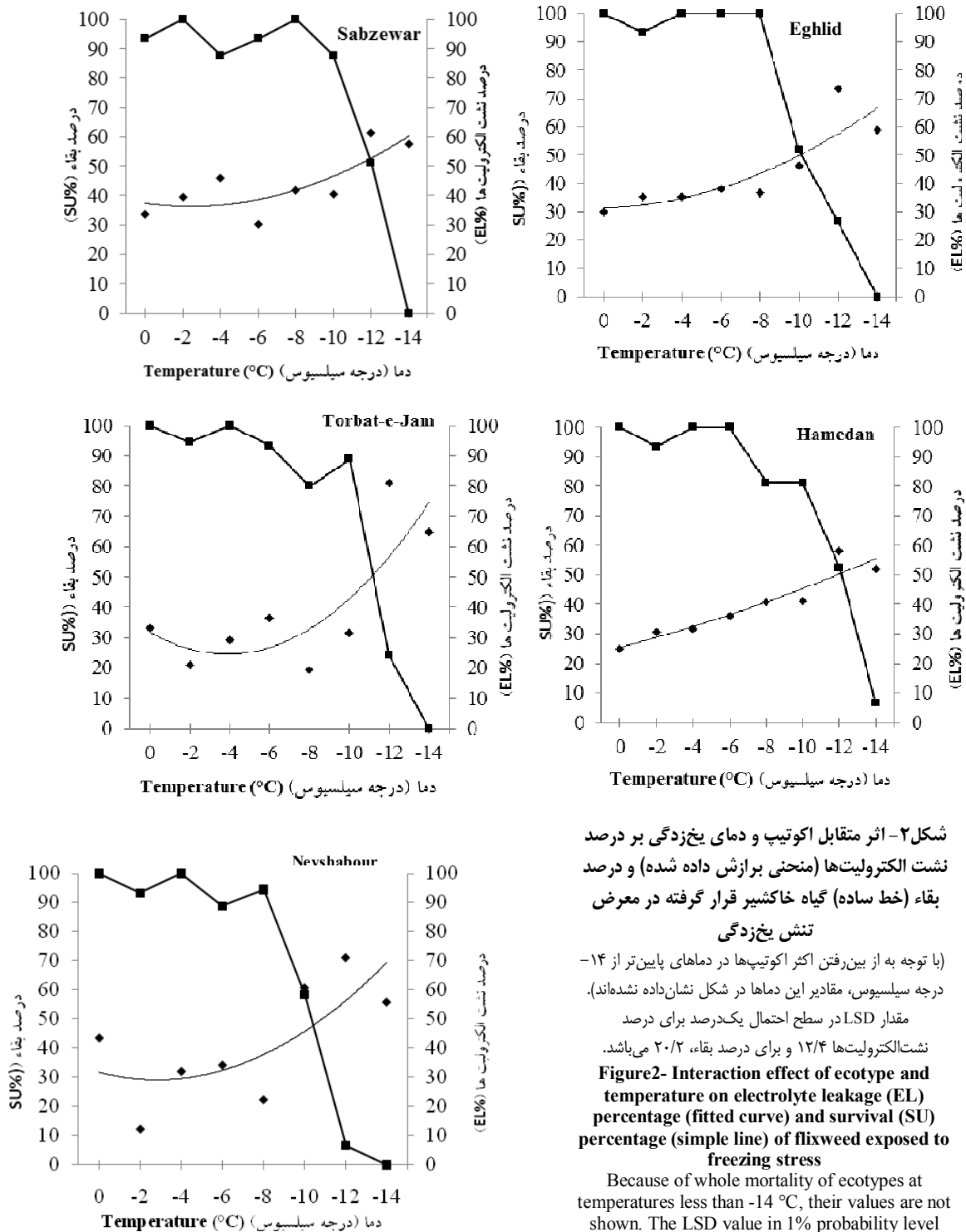
#### درصد بقاء

اثر دما و اثر متقابل اکوتیپ و دمای یخ‌زدگی بر درصد بقاء نیز معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) بود (جدول ۱). در اکوتیپ‌های اقلید و نیشابور کاهش درصد بقاء از دماهای بالاتری (۸-درجه سیلسیوس) نسبت به اکوتیپ‌های همدان، سبزوار و تربت‌جام (۱۰-درجه سیلسیوس) شروع شد. در دمای ۱۴-درجه سیلسیوس نیز تنها اکوتیپ همدان (تقریباً ۷ درصد) بقاء داشت، بقیه اکوتیپ‌ها از بین رفته بودند (شکل ۲). Pietsch *et al.*, 2009 نیز با ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های گیاه گوارا (*Guara sp.*) بیان کردند که گیاهان ژنوتیپ مینه‌سوتا تا دمای ۱۲-درجه سیلسیوس زنده ماندند، اما گیاهان ژنوتیپ تگزاس در دمای مذکور از بین رفتند. در بررسی Moshtaghi *et al.*, 2009 بر روی نخود نیز مشاهده شد که درصد بقای ژنوتیپ متحمل به سرما (MCC426) تا دمای ۹-درجه سیلسیوس چندان تحت‌تأثیر قرار نگرفته‌است. درصد بقای ژنوتیپ متحمل در این دما ۸۸ درصد و ۱/۴ برابر نمونه حساس (MCC505) بود.

مطالعات نشان داده‌است که تداوم انسجام غشاء پلاسمایی از جمله عوامل مهم در بقای گیاهان تحت‌شرایط تنش یخ‌زدگی است و هرگونه اختلال در ساختار غشاء سبب بروز خسارت و حتی مرگ آن می‌شود و گونه‌های گیاهی بر اساس خصوصیات رشدی و ژنتیکی پاسخ‌های متفاوتی به تنش سرما دارند (Sulk *et al.*, 1991).

محققان شیب منحنی نشت‌الکترولیت‌ها را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین نشانه‌های خسارت ناشی از تنش سرما در گیاهان پیشنهاد و بیان کرده‌اند که نمودار نشت‌الکترولیت‌ها در گونه‌های متحمل به تنش سرما از شیب کم‌تری برخوردار است، در مقابل در گونه‌های حساس به تنش سرما، این شیب تندتر است (Boroumand Rezazadeh *et al.*, 1997 and Cardona *et al.*, 2013). در بررسی Campos, 2003 بر روی اثر دماهای پایین بر پنج‌ژنوتیپ قهوه (*Coffea sp.*) نیز با کاهش تدریجی دما، نشت‌الکترولیت (میزان هدایت‌الکتریکی) در ژنوتیپ *C. dewevrei* به‌شدت افزایش داشت (۱۷۰ درصد) درحالی‌که در ژنوتیپ‌های دیگر این افزایش کم‌تر بود. Zhang *et al.*, 2008 نیز در بررسی تحمل به یخ‌زدگی ارقام پنجه‌مرغی دریافتند که رقم 'Patriot' در مقایسه با رقم 'Princess' در دمای ۴-، ۸- و ۱۰-درجه سیلسیوس، نشت نسبتاً کم‌تری داشت و رقم 'Riviera' نسبت به رقم 'Princess' در دمای ۶- و ۸-درجه سیلسیوس نشت‌الکترولیت کم‌تری نشان داد.

اکوتیپ‌های خاکشیر موردبررسی از نظر  $LT_{50el}$  نیز تفاوت معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) با یکدیگر داشتند. به طوری که بیش‌ترین  $LT_{50el}$  (بیشترین حساسیت) در اکوتیپ نیشابور مشاهده شد و اکوتیپ‌های دیگر اختلاف معنی‌داری به‌لحاظ این شاخص با یکدیگر نداشتند (شکل ۳). در گزارشی بر روی گیاه دارویی موسیر (*Allium altissimum* Regel) نیز از نظر این شاخص بین اکوتیپ‌ها، تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که اکوتیپ‌های تندوره و کلات (متحمل‌ترین اکوتیپ‌ها به دماهای یخ‌زدگی) کم‌ترین و اکوتیپ شیروان (حساس‌ترین اکوتیپ به دماهای یخ‌زدگی) بیش‌ترین مقدار  $LT_{50el}$  را داشتند (Rezwan-Bidokhti *et al.*, 2011). Li *et al.*, 2003 نیز دریافتند که تحمل به یخ‌زدگی نمونه‌های زویسیاگراس

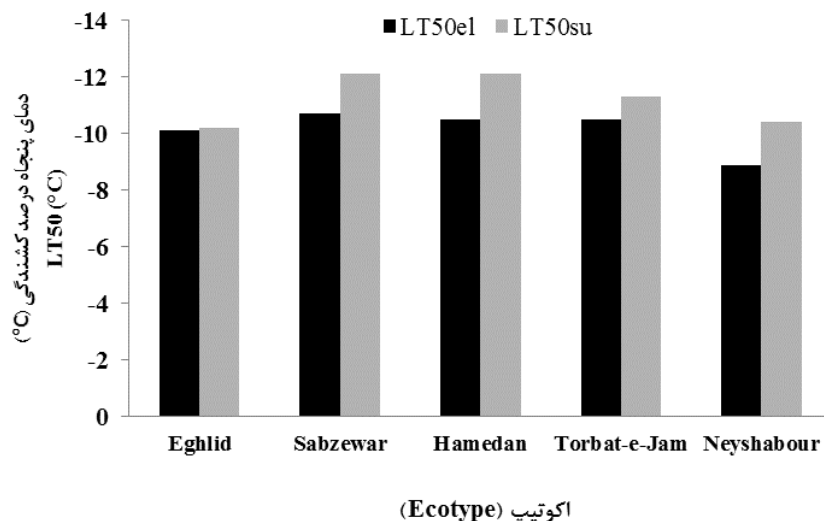


شکل ۲- اثر متقابل اکوتیپ و دمای یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها (منحنی برازش داده شده) و درصد بقاء (خط ساده) گیاه خاکشیر قرار گرفته در معرض تنش یخ‌زدگی

(با توجه به از بین رفتن اکثر اکوتیپ‌ها در دماهای پایین‌تر از -۱۴ درجه سلسیوس، مقادیر این دماها در شکل نشان داده نشده‌اند). مقدار LSD در سطح احتمال یک‌درصد برای درصد نشت الکترولیت‌ها ۱۲/۴ و برای درصد بقاء ۲۰/۲ می‌باشد.

Figure 2- Interaction effect of ecotype and temperature on electrolyte leakage (EL) percentage (fitted curve) and survival (SU) percentage (simple line) of flaxweed exposed to freezing stress

Because of whole mortality of ecotypes at temperatures less than -14 °C, their values are not shown. The LSD value in 1% probability level for EL% and SU% was 12.4 and 20.2 respectively.



شکل ۳- درجه حرارت پنجاه درصد کشندگی بر اساس درصد نشت‌الکترولیت‌ها (LSD= ۱/۱) و درصد بقاء، (LSD= ۱/۲) اکوتیپ‌های خاکشیر قرار گرفته در معرض تنش یخ‌زدگی

Figure 3- Lethal temperature 50 % according to the electrolyte leakage (LSD=1.1) and survival percentage (LSD=1.2) of Flixweed ecotypes exposed to freezing stress

روی گیاه دارویی هب (*Hebe sp.*) Nezami *et al*, 2010 بر روی ارقام چغندرقد نیز مشاهده شد.

دامنه دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت‌الکترولیت‌ها در این آزمایش بین ۸/۹- تا ۱۰/۷- درجه سلسیوس متغیر بود. در حالی که مقدار  $LT_{50su}$  بسته به اکوتیپ بین ۱۰/۲- تا ۱۲/۱- درجه سلسیوس نوسان داشت. این نتایج نشان می‌دهد که در تمام اکوتیپ‌ها (به‌استثنای اکوتیپ اقلید)، دمایی که سبب ۵۰ درصد کشندگی براساس درصد بقاء شده‌است، لزوماً برابر با دمایی که سبب خروج ۵۰ درصدی الکترولیت‌ها از سلول شده، نبوده‌است و غشاء در طی دوران باز یافت در اکثر اکوتیپ‌ها حتی در اکوتیپ نیشابور (اکوتیپ حساس به‌لحاظ  $LT_{50el}$ ) ترمیم شده‌است (شکل ۳). در اکوتیپ نیشابور دمای ۹- درجه سلسیوس منجر به خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها شد، ولی مرگ‌میر ۵۰ درصدی گیاهان در دمای پایین‌تری (۱۰/۵- درجه سلسیوس) اتفاق افتاد. در اکوتیپ‌های سبزوار، تربت‌جام و همدان نیز اختلاف ۱/۵ درجه سلسیوسی بین  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  دیده‌شد (شکل ۳). با این‌وجود، در این بررسی هم‌بستگی مثبت و نسبتاً بالایی بین  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  ( $r=0/53^{**}$ ) وجود داشت (جدول ۳). این موضوع حاکی از این‌است که با کاهش  $LT_{50el}$ ،  $LT_{50su}$  نیز کاهش یافته‌است. این نتایج مشابه با یافته‌های Nezami *et al*, 2013 بر روی بررسی تحمل به یخ‌زدگی ارقام چغندرقد پاییزه بود. هم‌چنین در این آزمایش هم‌بستگی منفی و بالایی بین درصد نشت‌الکترولیت‌ها و درصد بقاء ( $r=-0/72^{***}$ ) دیده شد (جدول ۳). به‌عبارتی با افزایش درصد نشت‌الکترولیت‌ها، درصد بقاء گیاهان کاهش یافت. چنین نتایجی

بر این‌اساس می‌توان اظهار نمود که ارقام مقاوم از طریق حفظ تمامیت غشای خود و لذا نشت کم‌تر الکترولیت‌ها، پس از رفع تنش یخ‌زدگی قادر به زنده‌مانی و بقاء بیش‌تری هستند. لذا به‌نظر می‌رسد، اکوتیپ همدان به‌دلیل داشتن غشای پایدارتر نسبت به اکوتیپ‌های دیگر از بقای بالاتری در دماهای پایین برخوردار بوده‌است. در بررسی Boroumand Rezazadeh *et al.*, 2013 بر روی گیاه دارویی زینان (*Trachyspermum ammi* (Linn). Sprague) نیز درصد بقاء اکوتیپ بیرجند در دماهای پایین بیش‌تر از دو اکوتیپ تربت‌حیدریه و نیشابور بود. در بررسی ایشان اکوتیپ بیرجند شیب نشت‌الکترولیت کم‌تری هم نسبت به دو اکوتیپ دیگر داشت.

در این آزمایش، بین اکوتیپ‌ها به‌لحاظ  $LT_{50su}$  هم اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0/01$ ) مشاهده شد و تحمل به یخ‌زدگی اکوتیپ‌های همدان و سبزوار به‌لحاظ این شاخص تقریباً ۲ درجه سلسیوس بیش‌تر از اکوتیپ‌های اقلید و نیشابور بود (شکل ۳). در بررسی Nezami *et al.*, 2013 بر روی ارقام پاییزه چغندرقد نیز حداقل و حداکثر  $LT_{50su}$  به‌ترتیب به‌میزان ۱۶/۹- و ۱۵/۲- درجه سلسیوس و در ارقام Monotunno و SBS11 به‌دست‌آمد. نتایج بررسی Dionne *et al.*, 2001 بر روی چمن یک‌ساله (*Poa annua* L.) تفاوت معنی‌داری از لحاظ  $LT_{50su}$  بین اکوتیپ‌های این گیاه نشان داد.

در این بررسی هم‌بستگی منفی و بالایی ( $r=-0/67^{**}$ ) بین درصد بقاء و  $LT_{50su}$  مشاهده شد (جدول ۳). این موضوع نشان می‌دهد که اکوتیپ‌هایی با درصد بقاء بیش‌تر از  $LT_{50su}$  منفی و پایین‌تری برخوردار بوده‌اند. چنین نتایجی توسط Warrington *et al*, 1995 بر

سیلیسیوس آغاز شد. افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها برای اکوتیپ نیشابور از دمای ۸-درجه سیلیسیوس شروع شد، سایر اکوتیپ‌ها از دمای پایین‌تری پایداری غشای خود را از دست دادند. هم‌چنین در اکوتیپ‌های اقلید و نیشابور کاهش درصد بقاء از دماهای بالاتری (۸-درجه سیلیسیوس) نسبت به اکوتیپ‌های همدان، سبزوار و تربت‌جام شروع شد. بر اساس شاخص‌های  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  اکوتیپ‌های همدان، سبزوار و تربت‌جام نسبت به اکوتیپ‌های نیشابور و اقلید تحمل به یخ‌زدگی بیش‌تری داشتند.

### سپاسگزاری

بودجه این تحقیق از محل اعتبارات قطب علمی گیاهان زراعی ویژه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده‌است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌گردد.

توسط Boroumand Rezazadeh *et al.*, 2013 بر روی گیاه دارویی زنیان و Javad Mousavi *et al.*, 2011 بر روی گیاه زینتی مینای‌چمنی (*Bellis perennis*) نیز گزارش شد.

در این مطالعه هم‌بستگی منفی و بالایی ( $r = -0.55^{**}$ ) بین  $LT_{50el}$  و درصد بقاء نیز وجود داشت (جدول ۳) که نشان می‌دهد با کاهش  $LT_{50el}$ ، درصد بقاء گیاهان زیاد شده‌است. این نتایج مشابه یافته‌های Janalizadeh, 2012 بر روی گیاه دارویی بارهنگ سر نیزه‌ای (*Plantago lanceolata* L.) بود.

### نتیجه‌گیری

در مجموع تنش یخ‌زدگی سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها و کاهش درصد بقاء گیاه خاکشیر شد. درصد نشت الکترولیت‌ها از دماهای کم‌تر از ۸-درجه سیلیسیوس به‌طور شدیدی افزایش داشت. کاهش معنی‌دار درصد بقاء گیاهان نیز از دماهای کم‌تر از ۸-درجه

جدول ۳- ضرایب هم‌بستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء،  $LT_{50el}$  و  $LT_{50su}$  در اکوتیپ‌های خاکشیر قرار گرفته در معرض تنش یخ‌زدگی

Table 3- Correlation coefficients between electrolyte leakage, survival percentage,  $LT_{50el}$  and  $LT_{50su}$  in Flixweed ecotypes exposed to freezing stress

Trait صفت	1	2	3	4
۱-درصد نشت الکترولیت‌ها 1-Electrolytes leakage %	1			
۲-درصد بقاء 2-Survival %	-0.72 <sup>***</sup>	1		
3- $LT_{50el}$	-0.29 <sup>ns</sup>	-0.55 <sup>*</sup>	1	
4- $LT_{50su}$	0.13 <sup>ns</sup>	-0.67 <sup>**</sup>	0.53 <sup>*</sup>	1

<sup>ns</sup>, \*, \*\*, and \*\*\*: Non significant and Significant at 5, 1 and 0.1 % probability levels respectively

### References

- Anderson, J. A., P. Michael, and C. M. Taliaferro. 1988. Cold hardiness of Midiron and Tifgreen. Horticultural Science 23:748-750.
- Boroumand Rezazadeh, Z., A. Nezami, and S. Nezami. 2013. Evaluation of freezing stress tolerance in three Ecotypes of Ajowan (*Trachyspermum ammi* (Linn). Sprague) under controlled conditions. Iranian Journal of Field Crops Research 11(1): 121-130. (In Persian with English Abstract).
- Campos P.S., V. Quartin, J. C. Ramalho, and M. A. Nunes. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. plants. Journal of Plant Physiology 160: 283-292.
- Cardona, C. A., R. R. Duncan, and O. Lindstrom. 1997. Low temperature tolerance assessment in Paspalum. Crop Science 37: 1283-1291.
- Dionne, J., Y. Castonguay, P. Nadeau, and Y. Desjardins. 2001. Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual Bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. Crop Science 41:443-451.
- Eugenia, M., S. Nunes, and G. Ray Smith. 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. Crop Science 43: 1349-1357.
- Hajmohammadnia- Ghalibaf K., A. Nezami, and A. Kamandi. 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 Crop Research 8(3): 465-472. (In Persian with English Abstract).
- Izadi- Darbandi, E., A. Nezami, A. Abbasian, and M. Heidari. 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. 22-24. (In Persian with English Abstract).
9. Janalizadeh, M. 2012. Evaluation of cold tolerance in Lancelot plantain (*Plantago lanceolata* L.) ecotypes under controlled conditions. MSc Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian with English Abstract)
  10. Javad Mousavi, M., S. Nezami, E. Izadi-Darbandi, A. Nezami, M. Yousef Sani, and F. Keykha Akhar. 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 Abstract).
  11. Kheirkhah, T. 2013. Evaluation of field grown Mentha (*Mentha piperita* L.) to Cold tolerance under laboratory conditions. MSc Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian with English Abstract).
  12. Khorsandi, T. 2013. Evaluation of late spring cold tolerance in Black cumin (*Nigella sativa* L.) ecotypes under controlled conditions. MSc Thesis, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian with English Abstract).
  13. Kiani, K. 2003. Advantages and disadvantages of medicinal plants. Zarghalam Publications.
  14. Li, Y., X. J. Xie, J. P. Xuan, and J. X. Liu. 2003. Assessment of cold-tolerance of China's *Zoysia Spp.* *Acta Agrestia Sinica* 11: 240-245.
  15. Lim, R. G. and Calvin, G. M. 1993. Fall cultivation and fertilization to reduce winter hardiness of leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Weed Science*, 41:441-446.
  16. Miller, G. L., and R. Dickens. 1996. Potassium fertilization related to cold resistance in bermudagrass. *Crop Science* 36:1290-1295.
  17. Mirheidar, H. 1995. Plant introductions, usage of plants in prevention and treatment of diseases'. Islamic Culture Publication Office, Vol: 3, P: 173-175. (In Persian).
  18. Mirmohamadi Meibodi, A. and S. Tarkeshe Esfahani. 2004. Aspects of physiology and breeding for cold and freezing in crops. Golbon Publication, Isfahan, Iran 223 pp. (In Persian).
  19. Moshtaghi, N., A. R. Bagheri, A. Nezami, and S. Moshtaghi. 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 Abstract).
  20. Nezami, A., K. Hajmohammadnia Ghalibaf, and A. Kamandi. 2010. Evaluation of freezing tolerance in sugar beet (*Beta vulgaris*) cultivars under controlled condition. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences* 8(3): 465-472. (In Persian with English Abstract).
  21. Nezami, A., H. R. Khazaie, M. Dashti, H. R. Mehrabadi, E. Eishi Rezaie, and M. Ahmadi. 2013. Evaluation of Morpho-physiological indices in autumn Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars under freezing stress at seedling stage. *Journal of Sugar beet* 29(1): 15-31. (In Persian with English Abstract).
  22. Nezami, A., J. Rezaei, and B. Alizadeh 2010. Evaluation of cold stress tolerance in several species of grasses by electrolyte leakage test. *Journal of water and soil* 24: 1019-1026. (In Persian with English Abstract).
  23. Nezami, A., S. Sanjani, M. Ziaee, M. Bannayan aval, M. R. Soleimani, and M. Nasiri- Mahalati. 2012. Evaluation of freezing tolerance of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) under controlled conditions. *Agricultura-Știință și practică* 1(2): 75-84.
  24. Omid Baigi, R. 2004. Production and processing of medicinal plants. Beh Nashr Company, Astan Ghods Razavi Publication. 149 (3) P: 397. (In Persian).
  25. Pietsch, G., M. Anderson, and P. H. Li. 2009. Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura coccinea* and *G. drummondii*. *Scientia Horticulture* 120: 418-425.
  26. Rashed Mohassel, M.H., A. Nezami, A. Bagheri, K. Hajmohammadnia Ghalibaf, and M. Bannayan Aval. 2009. Evaluation of freezing tolerance of two fennel (*Foeniculum vulgare* L.) ecotypes under controlled conditions. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 15:131-140.
  27. Rezwan-Bidokhti, S., A. Nezami, M. Kafi, and H. R. Khazaie. 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. *Iranian Journal of Agroecology* 3(3): 371-382. (In Persian with English Abstract).
  28. Shahina, A.G. 1994. Hand book of Arabian medicinal plants. CRC. Press, p.265.
  29. Sulk R.M., K. A. Albrecht, and S. H. Duke. 1991. Leakage of intra cellular substances as an indicator of freezing injury in alfalfa. *Crop Science* 31: 430-435.
  30. Warrington I. J. and R. C. Southward. 1995. Seasonal frost tolerance of Hebe species and cultivars. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science* 23: 437-445.
  31. Xuan J., J. Liu, H. Gao, H. Huaguabghu, and X. Cheng. 2009. Evaluation of low-temperature tolerance of *Zoysia* grass. *Tropical Grasslands* 43: 118-124.
  32. Zhang Q., J. Fry, C. Rajashekar, D. Bremer, and M. Engelke. 2009. Membrane polar lipid changes in *Zoysiagrass* rhizomes and their potential role in freezing tolerance. *Journal of American Society in Horticultural science* 134(3): 322-328.
  33. Zhang, X., K. Wang, and E. H. Ervin. 2008. Bermudagrass freezing tolerance associated with abscisic acid metabolism and dehydrin expression during cold acclimation. *Journal of American Society in Horticultural Science* 133(4): 542-550.



## The Effect of Freezing Stress on Percentage of Electrolytes Leakage and Survival of Flixweed (*Descurainia sophia* L.) Seedlings

E. Izadi-Darbandi<sup>1</sup> - A. Nezami<sup>2\*</sup> - R. Hassanbeigy<sup>3</sup> - M. Janalizadeh Ghazvini<sup>4</sup>

Received: 25-10-2014

Accepted: 22-08-2015

### Introduction

Flixweed (*Descurainia sophia* L.) is a medicinal plant from Brassicaceae family which also known as a weed for winter cereals and oil seed rape. Low temperatures are one of the most important abiotic stresses that threat Flixweed growth and productivity. Therefore it is important to recognize the freeze tolerance of Flixweed for successful planting and utilization in cold regions such as Mashhad in Khorasan Razavi Province (Iran's north. east). Among many laboratory methods which have been developed to estimate and to evaluate plants response or their tolerance to freezing temperatures, electrolyte leakage (EL) test is widely used. This test is based on this principle that damage to the cell membranes results in enhanced leakage of solutes into the apoplastic water, hence recording the amount of leakage after stress treatments provides an estimation of tissue injury. Indeed continuing integration of plasma membrane is one important factor for survival of plants under freezing stress and any disturbance in membrane structure can lead to damage and death. So determination of LT<sub>50</sub> point or critical temperature for electrolytes leakage and survival of plant is the most reliable, quantitative and simple methods for evaluating the cold tolerance of plants. The aim of this trial was to determine the LT<sub>50</sub> according to the EL and SU% for Flixweed ecotypes.

### Materials and Methods

In order to evaluate freeze tolerance in Flixweed, a factorial experiment based on completely randomized design with three replications was carried out in college of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Experimental factors included five ecotypes of Flixweed (Eghlid, Sabzewar, Hamedan, Torbat-e-Jam and Neyshabour) and 10 freezing temperature levels (0, -2, -4, -6, -8, -10, -12, -14, -16 and -18°C). Flixweed seeds were cultivated in pots in autumn of 2008 and were grown until 5-7 leaf stage under natural weather conditions for acclimation. Then to apply freezing temperatures, they were transferred to a thermo gradient freezer. The initial temperature of programmable freezer was 5°C; but gradually decreased in a rate of 2°C.h<sup>-1</sup> until reached to desired temperatures. When the temperature reached to -2°C, the plants were sprayed with the Ice Nucleation Active Bacteria (INAB) to help the formation of ice nucleus in them. As well this spraying was conducted to prevent from super-cooling of samples and to ensure that mechanism of freeze resistance is tolerance not avoidance as well. After reaching a desired freezing temperature happened, the samples were removed from the freezer and then were thawed slowly during 24 hours in a refrigerator at 5±1°C. Cytoplasmic membrane stability was evaluated by electrolyte leakage (EL) test, afterward lethal temperature was calculated for 50% of plants according to the electrolyte leakage % (LT<sub>50el</sub>). In order to evaluate correlation between EL% with survival percentage (SU%), remained plants were transferred to greenhouse and after 21 days recovery, SU% and then lethal temperature was determined for 50% of plants according to the SU% (LT<sub>50su</sub>). Analysis of variance performed by MSTAT-C software and correlation between data carried out by MINITAB 16 program. LT<sub>50el</sub> was determined by Slide write software. Mean separation was conducted by least significant difference (LSD) test at 1% probability level.

### Results and Discussion

Results showed that the reduction of temperature to less than -8°C, led to increment of electrolyte leakage % and decline of survival %. Interaction effect of ecotype and temperature on electrolyte leakage and survival percentage was significant at 1% probability level. Enhancement of electrolyte leakage % for Neyshabour ecotype started from -8°C, while the others were affected from lower temperatures. In addition in Eghlid and

1 & 2- Prof. and Associate Prof. Respectively, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

3- MSc Graduated Student of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad

4- Ph.D Student of Crop Physiology, Ferdowsi University of Mashhad

(\* - Corresponding Author Email: nezami@um.ac.ir)

Neyshabour ecotypes, decline of survival % begun from higher temperatures (-8 °C) compared with the other ecotypes (-10 °C). Cold hardiness is often reported as  $LT_{50el}$ , means the temperature at which 50% of the electrolytes leaked from the cells.  $LT_{50el}$  often is simply equaled to 50% sample mortality or  $LT_{50su}$ . According to the  $LT_{50el}$  and  $LT_{50su}$  indices, Hamedan, Sabzewar and Torbat-e-Jam ecotypes had better freeze tolerance than Neyshabour and Eghlid ecotypes and according to the  $LT_{50su}$ , Hamedan ecotype had potential to freezing tolerance up to -12°C.

### Conclusions

In this survey, there was strong and negative correlation between EL% and SU% ( $r = -0.72^{***}$ ). Furthermore, there was high and positive correlation between  $LT_{50el}$  and  $LT_{50su}$  ( $r = 0.53^*$ ). These results indicate efficiency and alternative likelihood of each index in assessment of Flixweed freeze tolerance. Regarding to more rapid rate of EL method compared to SU evaluation, it seems better to utilize of this index.

**Keywords:** Ecotype,  $LT_{50}$ , Recovery, Survival percentage