نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۷۷-۲۶۹

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 13, No. 2, Summer. 2015, p. 269-277

ارزیابی تحمل به یخزدگی گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) رشدیافته در مزرعه تحت شرایط آزمایشگاهی با بهره‌گیری از شاخص نشت الکترولیت‌ها

طیبه خیرخواه[۱]- احمد نظامی[۲*]- محمد کافی[۳]- قربانعلی اسدی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۸

چکیده:

به‌منظور ارزیابی تحمل به سرمای گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) رشدیافته در مزرعه تحت شرایط کنترل‌شده، آزمایشی در سال ۹۱-۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با چهار تکرار اجرا شد. عوامل آزمایش شامل شش دما (صفر، ۴-، ۸-، ۱۲-، ۱۶- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد)، هفت زمان برداشت (ماه‌های آبان، آذر، دی، بهمن، اسفند، فروردین و اردیبهشت) و چهار اندام گیاه نعناع فلفلی (شامل برگ، ساقه، استولون و ریزوم) بودند. به این منظور در هر ماه نمونه‌های گیاه نعناع فلفلی پس از رشد و خوسرمایی در شرایط طبیعی از مزرعه برداشت شد و پس از تفکیک اندام‌های موردنظر در معرض دماهای یخزدگی قرار گرفتند. جهت تعیین پایداری غشای سلولی در اندام‌های گیاه، درصد نشت الکترولیت‌ها اندازه‌گیری و دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها براساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) محاسبه شد. نتایج نشان داد که اثر دماهای یخزدگی بر نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار بود و با کاهش دما، نشت الکترولیت‌ها افزایش داشت. اندام‌های استولون و برگ به‌ترتیب کمترین و بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها را دارا بودند. همچنین بیشترین تحمل به سرما در نمونه‌برداری‌های مختلف در هر اندام متفاوت بود، با این وجود در نمونه‌برداری اردیبهشت ماه همه اندام‌ها کمترین میزان تحمل به سرما را داشتند. همچنین اندام برگ بیشترین و اندام استولون کمترین مقدار LT_{50el} را داشتند. در نمونه‌برداری اردیبهشت ماه اندام‌ها بیشترین LT_{50el} را داشتند و حساسیت بیشتری به دماهای یخزدگی از خود نشان دادند. با توجه به همبستگی خوب بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} در این آزمایش ($r = ۰/۹۶^{**}$)، استفاده از این شاخص در ارزیابی خسارت تنش یخزدگی در نعناع فلفلی مفید به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: تنش یخزدگی، خوسرمایی، نشت الکترولیت‌ها، LT_{50el}

مقدمه

خانواده نعناع یکی از بزرگترین تیره‌های گیاهی است که اغلب در مناطق مدیترانه‌ای گسترش یافته است. این خانواده دارای ۲۰۰ جنس و ۴۰۰۰ گونه گیاهی می‌باشد که جنس *Mentha* با ۲۵ تا ۳۰ گونه مهم‌ترین جنس این تیره است (۵). نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) گیاهی متعلق به خانواده *Lamiaceae* است. این گیاه گونه‌ای هیبرید است که از تلاقی دو گونه *Mentha spicata* و *Mentha aquatica* حاصل شده است (۶). از موارد استفاده این گیاه برای بهبود کاهش اشتها، سرماخوردگی، سرفه، تب، تهوع، سردرد، آماس روده بزرگ، ضد اسپاسم، ضد نفخ و سوء هاضمه می‌باشد. همچنین ازجمله خواص دیگر این گیاه اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی، ضد تومور و ضد حساسیتی است. علاوه بر این اسانس نعناع فلفلی با ارزش اقتصادی بالا است که به مقدار زیاد در طعم دهنده‌ها و یا افزودنی‌های غذایی، خمیردندان و دیگر محصولات بهداشتی و فرمولاسیون دارویی به‌کار می‌رود (۲۳).

نعناع فلفلی گیاهی چندساله است که در کشور ما به‌دلیل اسانس و اثرات دارویی خاص آن، جایگاه ویژه‌ای در بین گیاهان دارد و در اکثر نقاط کشور می‌توان آن را کشت کرد (۵). با کشت این گیاه در شرایط محیطی مناسب می‌توان در راستای افزایش کمیت و کیفیت گیاه نعناع فلفلی گام برداشت. یکی از این فاکتورهای محیطی مؤثر در رشد و عملکرد کمی و کیفی این گیاه، دما می‌باشد (۷). در مناطق معتدله‌ای نظیر ایران که گیاهان در معرض انواع تنش‌های زمستانه به‌ویژه تنش یخزدگی قرار می‌گیرند، بررسی سریع و مؤثر تحمل به

۱- دانشجوی سابق ارشد زراعت دانشگاه فردوسی مشهد
۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب استادان و دانشیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: nezami@um.ac.ir)

یخزدگی گیاهان بسیار ضروری و غیرقابل اجتناب می‌باشد. تنش سرما و یخبندان از تنش‌های اثرگذار بر روی عملکرد، است که گاه خسارت ناشی از آن به حدی است که منجر به نابودی کامل محصول می‌شود. در برخی گزارش‌ها مشاهده می‌شود که میزان خسارت سرما و یخبندان بر محصولات کشاورزی کشور بیشتر از خسارت سایر پدیده‌های مخرب جوی و حتی گاهی بیشتر از خسارات آفات و بیماری‌ها است (۱).

توانایی گیاهان مختلف در تحمل به دمای پایین بسیار متفاوت است با این وجود برای تضمین بقاء گیاهان در شرایط زمستان وجود مکانیسم‌های سازگارکننده ضروری است و ازجمله مهم‌ترین مکانیسم‌های شناخته شده در این خصوص می‌توان به خوسرمایی اشاره داشت. تکامل این مکانیسم در گیاهان آنها را قادر ساخته تحت تنش یخزدگی زنده بمانند. این مکانیسم توسط محدوده‌ای از دماهای پایین ولی بالای صفر (معمولاً زیر۱۰ درجه سانتی‌گراد) القاء می‌شود و شواهد نشان می‌دهند که سیستم‌های ژنتیکی خاصی آن را کنترل می‌کنند (۱۹). ایجاد خوسرمایی در گیاه از طریق تغییر در ترکیب چربی‌های غشاء پلاسمایی، تجمع ترکیبات محافظت‌کننده نظیر کربوهیدارت‌ها، اسیدهای آمینه یا سایر اسمولیت‌ها و القاء فعالیت ژن‌های جدید سبب افزایش مقاومت گیاه به سرمای زمستانه می‌شود (۱۳). به همین دلیل در اغلب آزمایش‌های انجام شده، خوسرمایی به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار برروی تحمل به یخزدگی گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است. به‌عنوان مثال نایار و همکاران (۲۱) نشان دادند که خوسرمایی سبب بهبود تحمل به یخزدگی گیاهچه‌های نخود شد. از دیگر خسارت‌های تنش سرما و یخزدگی در گیاهان، اختلال در ساختار و کارکرد غشاهای سلولی است که سبب افزایش نشت الکترولیت‌ها و سایر مواد محلول می‌شود (۱۲). مطالعات نشان داده که غشاء پلاسمایی اولین مکانی است که در معرض تنش یخزدگی دچار خسارت می‌شود (۲۲) و این تنش باعث تغییر حالت غشاء از کریستال-مایع به حالت جامد-ژل می‌شود و با این تغییر، فعالیت غشا مختل می‌گردد (۱۶)، به همین دلیل اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی پس از اعمال تنش یخزدگی، به‌عنوان یک روش مناسب برای تخمین میزان خسارت سرما در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است و دمایی که سبب ۵۰ درصد نشت از سلول‌های گیاهی می‌شود به‌عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50el}[1]) پیشنهاد شده است (۹).

باتوجه به چند ساله بودن نعناع فلفلی و استقرار آن در مزرعه طی فصول سرد سال، امکان بروز خسارت ناشی از کاهش سریع دما و تنش یخزدگی محتمل می‌باشد و از طرفی اطلاعات چندانی در مورد تحمل به سرمای این گیاه در دسترس نیست، لذا آزمایش حاضر با هدف بررسی تحمل به سرمای گیاه نعناع فلفلی رشد یافته در مزرعه تحت شرایط کنترل‌شده طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و در طی آن تحمل به یخزدگی گیاه نعناع فلفلی رشدیافته در مزرعه، تحت شرایط کنترل‌شده مورد مطالعه قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل شش دما (صفر، ۴-، ۸-، ۱۲-، ۱۶- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد)، هفت زمان برداشت (دهه دوم هرکدام از ماه‌های آبان، آذر، دی، بهمن، اسفند، فروردین و اردیبهشت) و چهار اندام گیاه نعناع فلفلی (شامل برگ، ساقه، استولون و ریزوم) بودند.

نمونه‌های گیاهی ۲۴ ساعت قبل از اعمال یخزدگی از مزرعه دانشکده کشاورزی برداشت شدند. در مرحله بعد، در آزمایشگاه نمونه‌ها شسته شده و اندام‌های برگ، ساقه، استولون و ریزوم تفکیک شدند و برای هر تیمار دمایی در هر تکرار تعداد ۲۰ عدد برگ و چهار عدد از هرکدام از اندام‌های ساقه، استولون و ریزوم به تفکیک تهیه شد. سپس اندام‌های گیاهی توسط پارچه پنبه‌ای نازک و نسبتاً مرطوب پوشیده و پس از آن به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در شروع آزمایش، پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. این وضعیت شرایط را برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (۲۰). به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهان در هرکدام از دماهای مورد نظر به مدت یک ساعت نگه داشته و سپس برداشت و به اطاقک سرد با دمای ۲±۵ منتقل و در طول شب نگهداری شدند.

برای تعیین پایداری غشاء سیتوپلاسمی از روش اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها استفاده شد. برای این منظور، روز بعد از اعمال تنش یخزدگی، هرکدام از نمونه‌های برگ، ساقه، استولون و ریزوم به ویال حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر انتقال داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه قرار داده شده و سپس نشت اولیه با استفاده از دستگاه EC متر (مدل Jenway) اندازه‌گیری شد (EC_1). به‌منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، ویال‌ها در اتوکلاو (دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار) به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط آزمایشگاه منتقل شده و بعد از ۲۴ ساعت، نشت نهایی (EC_2) اندازه‌گیری شد. سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از فرمول (۱۰۰× EC_1/EC_2) برای هر تیمار محاسبه شد. لازم به ذکر است که قبل از

1- Lethal temperature 50 according to electrolyte leakage percentage (LT_{50el})

اندازه‌گیری درصد نشت الکترولیت‌ها از نمونه‌های گیاهی، میانگین هدایت الکتریکی آب دوبار تقطیر (از شش ویال حاوی آب دو بار تقطیر) تعیین شده و قبل از انجام محاسبات مربوطه، میانگین آنها از هرکدام از نشت الکترولیت‌های اولیه و نهایی کسر شد درجه حرارت کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها (LT_{50}) نیز براساس نشت الکترولیت‌ها و با استفاده از رسم نمودار درصد نشت الکترولیت‌های هر تیمار در مقابل دماهای یخزدگی تعیین گردید (۹).

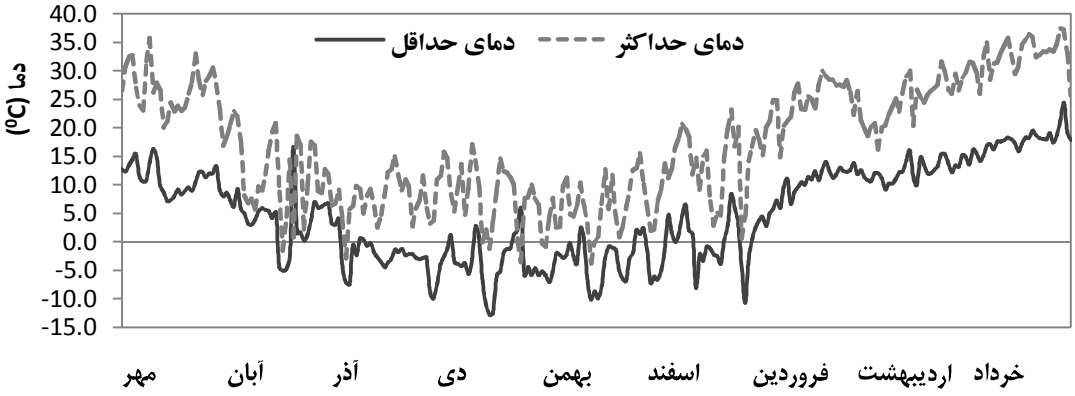
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای MINITAB و MSTAT-C انجام شد و رسم شکل‌های مربوط توسط نرم افزار Excel صورت گرفت. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در شکل ۱ روند تغییرات حداقل و حداکثر دمای روزانه در سال زراعی ۹۱- ۱۳۹۰ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود هوا از اواسط آبان به‌تدریج خنک شده و در طول ماه‌های آذر و دی ماه گیاهان در معرض دماهای خوسرمایی قرار گرفتند. در طبیعت خوسرمایی با کاهش دما در پاییز آغاز می‌شود، در این شرایط مسیرهای متابولیکی خاصی در گیاه با دریافت محرک‌های ویژه‌ای از محیط فعال شده که آن را برای تحمل دماهای پایین آماده‌تر می‌سازد (۱۴). گاستا و همکاران (۱۵) نیز اظهار کردند هنگام قرار گرفتن گیاهان در معرض دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد، در گیاه پدیده خوسرمایی ایجاد می‌شود.

نشت الکترولیت‌ها

درصد نشت الکترولیت‌های نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۱$) تحت تأثیر دماهای یخزدگی و زمان‌های نمونه‌برداری قرار گرفت (جدول ۱). قابل ذکر است که به‌دلیل بروز سرما در مزرعه در ماه‌های بهمن و اسفند، اندام‌های برگ و ساقه گیاه نعناع فلفلی شدیداً خسارت دیده و از بین رفتند و لذا نمونه‌گیری از این اندام‌ها انجام نشد (شکل ۱).



شکل ۱- دماهای حداقل و حداکثر روزانه در دوره رشد گیاه نعناع فلفلی در سال زراعی ۹۱- ۱۳۹۰

جدول۱- منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات مربوط به درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاه نعناع فلفلی پس از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل شده

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		درجه آزادی	میانگین مربعات	
		برگ	ساقه		استولون	ریزوم
دما	۵	۱۳۲۳**	۱۶۳۰۱**	۵	۲۴۸۰۰**	۲۷۷۴۷**
زمان نمونه‌برداری	۴	۱۳۲۳**	۷۵۶۴**	۶	۲۷۱۰**	۷۵۹**
دما × زمان نمونه‌برداری	۲۰	۶۵۵**	۱۰۰۴**	۳۰	۵۷۱**	۳۹۴**
خطا	۹۰	۱۳	۱۲	۱۲۶	۱۳	۱۰

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول۲- اثر دمای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی رشدیافته در مزرعه تحت شرایط کنترل شده

اندام‌های گیاهی	۰	-٤	-۸	-۱۲	-۱٦	-۲۰	LSD (۰/۰۱)
برگ	۲۵/۷ f	۳۸/۴ e	۶۶/۴ d	۷۵/۴ c	۸۴/۴ b	۸۹/۲ a	۳/۰
ساقه	۸/۳۷ f	۱۴/۲ e	۴۰/۳ d	۵۲/۶ c	۶۷/۹ b	۷۹/۵ a	۲/۹
استولون	۱۲/۰ f	۱۶/۲ e	۲۹/۲ d	۵۴/۷ c	۷۵/۵ b	۸۱/۱ a	۲/۵
ریزوم	۱۴/۳ f	۱۸/۲ e	۴۴/۸ d	۶۹/۸ c	۸۱/۷ b	۸۵/۸ a	۲/۲

با کاهش دما به کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های نعناع فلفلی افزایش یافت (جدول ۲)، به‌طوری‌که کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها در تیمار صفر درجه سانتی‌گراد و بیشترین آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۲). نتایج آزمایش رضوان بیدختی و همکاران (۴) بر روی سه اکوتیپ موسیر (*Alliumm altissimum* Regel) نیز نشان داد که با کاهش دما میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت و کمترین و بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها در دمای صفر و ۲۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها با کاهش دما حاکی از آن است که در نتیجه اعمال یخزدگی، انسجام و فعالیت غشاء سلولی مختل شده و در نتیجه آن نشت الکترولیت‌ها از درون سلول‌ها اتفاق افتاده است، لذا اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌ها یا اندام‌های گیاهی تحت تنش سرما، معیار مناسبی برای اندازه‌گیری میزان تحمل گیاهان به تنش سرما ذکر شده است (۱۰). در سایر مطالعات بر روی گیاهان پاسپالم (*Paspalum vaginatum* Swartz) نیز مشاهده شده است که با افزایش شدت سرما درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاهی افزایش می‌یابد (۱۱).

با وجود این که کاهش دما تا ۴- درجه سانتی‌گراد تأثیر چندانی بر نشت الکترولیت‌ها نداشت، اما با کاهش دما به کمتر از دمای مذکور میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت. افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از ساقه و ریزوم در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد تقریباً مشابه و حدود ۳۰ درصد بود، در حالی‌که برگ و استولون در دمای مذکور به‌ترتیب ۴۱ و ۱۷ درصد افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد داشتند (جدول ۲). این وضعیت می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت زیاد برگ به تنش یخزدگی نسبت به سایر اندام‌ها و به‌ویژه استولون‌ها باشد، زیرا در استولون‌ها کاهش دما به ۱۲- درجه سانتی‌گراد سبب افزایش حدود ۴۰ درصدی نشت الکترولیت‌ها نسبت به تیمار شاهد شد، در صورتی‌که این وضعیت برای برگ‌ها در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد و لذا به نظر می‌رسد استولون تحمل به یخزدگی بیشتری نسبت به سایر اندام‌ها از خود نشان داده است. در مطالعه رضوان بیدختی و همکاران (۴) کاهش دما از صفر به ۸- درجه سانتی‌گراد تأثیر معنی‌داری بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های برگ و پیاز موسیر نداشت، در حالی‌که در شرایط مذکور افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از ریشه معنی‌دار بود و لذا ایشان اظهار داشتند که ریشه موسیر نسبت به سایر اندام‌های مورد مطالعه تحمل کمتری نسبت به تنش سرما دارد. سایر محققان نیز اعتقاد دارند که تأثیر تنش سرما بر اختلال فعالیت غشاهای سلولی و به دنبال آن نشت الکترولیت‌ها بسته به تحمل به یخزدگی اندام‌های گیاهی متفاوت است (۱۰ و ۲۴).

تفاوت درصد نشت الکترولیت‌ها بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۱) بود (جدول ۱)، به نحوی که نمونه‌های نعناع فلفلی برداشت شده در اردیبهشت و آذر ماه به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان نشت الکترولیت‌ها را داشتند (جدول ۳). همچنین بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ گیاهان نعناع فلفلی در سال۱۳۹۰، را نمونه‌های برداشت شده در آبان ماه داشتند و باوقوع پدیده خوسرمایی در طول پاییز از درصد نشت الکترولیت‌ها کاسته شد. ازسوی دیگر با از سرگیری رشد مجدد گیاهان نعناع فلفلی در ابتدای بهار سال ۱۳۹۱ برگ‌های برداشت شده در اردیبهشت ماه بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشتند. به نظر می‌رسد افزایش دما (شکل ۱) و عدم بروز پدیده خوسرمایی در برگ‌های جدید تولید شده افزایش نشت الکترولیت‌ها را از برگ‌ها به‌دنبال داشته است (جدول ۳). نایار و همکاران (۲۱) نیز اثر تنش سرما را بر گیاهچه‌های ۱۴ روزه نخود (*Cicer arientinum* L.) بررسی نمودند. نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد و خسارت سرما براساس میزان نشت مواد در گیاهچه‌های خوسرما یافته ۱۸/۴درصد و در گیاهچه‌های خوسرما نیافته ۷۹/۷ درصد بود. به نظر می‌رسد تیمار خوسرمایی شدت خسارت ناشی از تنش یخزدگی را بر غشاءهای سلولی کاهش داده و در نتیجه منجر به کاهش میزان نشت مواد درون سلولی شده است. کاردونا و همکاران (۱۱) نیز اثر خوسرمایی و عدم خوسرمایی را بر نشت الکترولیت‌های اندام‌های مختلف اکوتیپ‌های گیاه پاسپالم مورد بررسی قرار داده و دریافتند که تحت تیمارهای دمایی یکسان، خوسرمایی موجب کاهش میزان نشت الکترولیت‌های اندام‌های گیاهی در مقایسه با شرایط عدم خوسرمایی می‌شود.

ساقه‌های برداشت شده در پاییز و اوایل زمستان نیز درصد نشت الکترولیت‌های کمتری نسبت به ساقه‌های برداشت شده در بهار داشتند. کمترین میزان درصد نشت الکترولیت‌های ساقه‌ها، در

نمونه‌برداری‌های آذرماه دیده شد و با سردتر شدن هوا در دی ماه (شکل ۱) و احتمالاً به‌دلیل بیشتر بودن این کاهش دما از آستانه تحمل ساقه، تحمل به سرمای این اندام کمتر شد و میزان نشت الکترولیت‌ها نسبت به ماه قبل افزایش یافت (جدول ۳).

در مورد استولون نیز به نظر می‌رسد بروز پدیده خوسرمایی در آبان ماه منجر به کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها در نمونه‌های برداشت شده در آذر ماه شده است (مشابه با وضعیت نشت الکترولیت‌ها از برگ‌ها)، ولی درصد نشت الکترولیت‌ها از استولون‌ها در برداشت‌های دی و بهمن ماه نسبت به برداشت آذر ماه روندی نسبتاً افزایشی داشت. در بهار سال ۱۳۹۱ نیز درصد نشت الکترولیت‌های استولون‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافت و در اردیبهشت ماه به بیشترین میزان خود رسید که این مقدار حدود دو برابر آن نسبت به آذر ماه بود (جدول ۳). به نظر می‌رسد افزایش دما در بهار و از بین رفتن تطابق سرمایی باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها از استولون‌ها شده است.

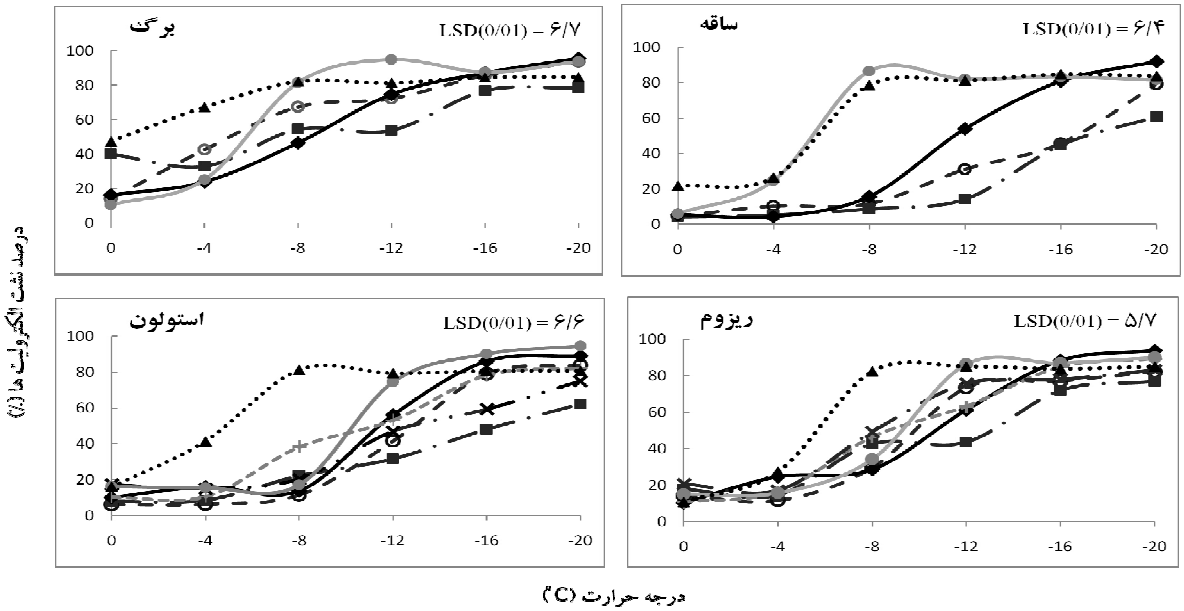
ریزوم‌های برداشت شده در آذر ماه نیز کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشتند و به‌تدریج با گذشت زمان، در نمونه‌برداری‌های بعدی درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت، به‌طوری‌که با گرم شدن هوا در اردیبهشت ماه به بیشترین میزان رسید (جدول ۳). همانطور که پیش از این ذکر شد نمونه‌های مورد مطالعه از گیاهان نعناع فلفلی رشد یافته در مزرعه انتخاب شده بودند، در این حالت به نظر می‌رسد که خاک به‌عنوان نوعی عایق دمایی از اثرات دمای القایی جهت خوسرمایی بر ریزوم‌ها (که زیر خاک قرار داشته‌اند) ممانعت کرده است، در حالی‌که اندام‌های هوایی در معرض این گونه دماها قرار داشته و از این‌رو فرآیندهای خوسرمایی بیشتری در این اندام‌ها در برابر تنش سرما القا شده است. کاردونا و همکاران (۱۱) نیز مشاهده کردند که با کاهش دما نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های مختلف (ریشه، طوقه و برگ) گیاهان پاسپالوم روندی افزایشی داشت و ریشه بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشت. همچنین لانگ و همکاران (۱۷) بیان نمودند که اندام‌های ریشه و ریزوم گیاهان حساسیت بیشتری به تنش یخزدگی دارند.

جدول۳- اثر زمان نمونه‌برداری بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های نعناع فلفلی پس از اعمال دماهای یخزدگی در شرایط کنترل شده

اندام‌های گیاهی	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	فروردین	اردیبهشت	LSD (۰/۰۱)
برگ	۶۲/۶ c	۵۶/۱ d	۵۷/۴ d	_	_	۶۵/۶ b	۷۴/۶ a	۲/۷
ساقه	۳۰/۴ c	۲۳/۰ d	۴۲/۱ b	_	_	۶۰/۸ a	۶۲/۷ a	۲/۶
استولون	۳۸/۱ d	۳۰/۱ e	۴۵/۲ c	۴۵/۵ c	۳۹/۰ d	۵۱/۳ b	۶۳/۲ a	۲/۷
ریزوم	۴۸/۱ e	۴۴/۷ f	۵۱/۲ d	۵۱/۹ cd	۵۴/۱ bc	۵۴/۷ b	۶۲/۵ a	۲/۴

اثر متقابل زمان‌های نمونه‌برداری و دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی نیز معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۱$) بود (جدول۱) و با وجود اینکه در اغلب ماه‌های نمونه‌برداری کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای صفر و ۲۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، ولی روند افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاهی تحت تأثیر دماهای آزمایش همچنین دمایی که در آن اندام‌های گیاهی حداکثر درصد نشت الکترولیت‌ها را داشتند، با توجه به زمان برداشت نمونه‌های گیاهی متفاوت بود (شکل ۲). در ماه‌های آبان و اردیبهشت کاهش دما بلافاصله پس از صفر درجه سانتی‌گراد سبب افزایش شدید شیب درصد نشت الکترولیت‌ها در برگ گیاهان شد، در صورتی‌که در نمونه‌های برداشت شده در ماه فروردین افزایش شیب درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۴- درجه سانتی‌گراد شروع شد و با شدت سرما افزایش یافت. شیب زیاد منحنی در آبان و اردیبهشت ماه احتمالاً به‌دلیل عدم خوسرمایی گیاه و حساسیت اندام برگ به سرما در این زمان‌ها می‌باشد (شکل ۲). شیب منحنی نشت الکترولیت‌ها به‌عنوان یکی از مهمترین نشانه‌های خسارت ناشی از تنش سرما در گیاهان مطرح می‌باشد و مشاهده شده است که منحنی نشت الکترولیت‌ها در گیاهان خوسرما شده شیب کمتر و در گونه‌های خوسرما نشده شیب تندتری دارد (۱۱). بنابراین شیب بیشتر در منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها، احتمالاً نشان‌دهنده تحمل کمتر گیاه یا اندام نسبت به شرایط یخزدگی است.

حداکثر درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ‌های برداشت شده در فروردین و اردیبهشت ماه در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، در حالی‌که این حالت در برگ‌های برداشت شده در پاییز و زمستان، در دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد به وقوع پیوست (شکل ۲). وضعیت مذکور احتمالاً نشان‌دهنده تحمل به سرمای بهتر برگ‌ها در پاییز و زمستان نسبت به بهار می‌باشد. کاردونا و همکاران (۱۱) نیز در بررسی تحمل به یخزدگی پاسپالم نشان دادند که با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های برگ و طوقه افزایش یافت، به‌طوری‌که حداکثر نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های طوقه (حدود ۹۰درصد) در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد، و حداکثر نشت الکترولیت‌های برگ (حدود ۱۰۰ درصد) بسته به اکوتیپ‌ها مورد بررسی بین ۴- تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. بر این اساس آنها اظهار داشتند که طوقه نسبت به برگ از تحمل بیشتری نسبت به تنش سرما برخوردار است.



شکل۲- اثر دماهای یخ زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی در طی زمان‌های نمونه‌برداری آبان ( )، آذر ( )، دی ( )، بهمن ( )، اسفند ( )، فروردین ( ) و اردیبهشت ( ) .

در ساقه‌های برداشت شده در آذر ماه افزایش شیب درصد نشت الکترولیت‌ها با کاهش دما از ۱۲- درجه سانتی‌گراد شروع شد، در صورتی‌که در نمونه‌های برداشت شده در آبان و دی ماه کاهش دما بعد از ۸- درجه سانتی‌گراد باعث افزایش شیب درصد نشت الکترولیت‌ها شد. در نمونه‌برداری‌های بهار افزایش شیب درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۴- درجه سانتی‌گراد شروع شد و در این دو ماه بیشترین درصد نشت الکترولیت‌های ساقه‌ها در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، این در حالی است که در برداشت‌های پاییز و زمستان بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید (شکل ۲). بر این اساس احتمالاً ساقه‌های گیاه نعناع فلفلی در آذر ماه دارای بیشترین تحمل به سرما بوده و در آبان و دی ماه تحمل به سرمای آنها نسبت به نمونه‌های برداشت شده در آذر ماه کاهش یافته است، با وجود این نمونه‌های ساقه برداشت شده در بهار کمترین میزان تحمل به سرما را از نظر این شاخص داشته‌اند. با توجه به شکل یک به نظر می‌رسد در آبان ماه این اندام سرمای لازم برای خوسرمایی را کسب نکرده و در دی ماه میزان سرما بیشتر از توان این اندام بوده در حالی‌که در آذر ماه شرایط برای خوسرمایی این اندام مناسب بوده است.

افزایش شیب خط نشت الکترولیت‌ها در اندام استولون نیز در برداشت اردیبهشت ماه بلافاصله بعد از دمای صفر درجه سانتی‌گراد شروع شد، درحالی‌که در سایر ماه‌ها این افزایش شیب از دمای ۸- درجه سانتی‌گراد حادث شد. بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها از استولون در ماه‌های فروردین و اردیبهشت به‌ترتیب در دماهای ۱۲- و ۸- درجه سانتی‌گراد صورت گرفت، در صورتی‌که در سایر زمان‌های نمونه‌برداری بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد (شکل ۲). این وضعیت نشان‌دهنده تحمل نسبتاً بیشتر استولون به سرما در پاییز و زمستان نسبت به بهار باشد.

در اندام ریزوم نیز افزایش شیب خط درصد نشت الکترولیت‌ها در نمونه‌برداری دی ماه بعد از ۸- درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و در بقیه زمان‌های نمونه‌برداری از دمای ۴- درجه سانتی‌گراد افزایش شیب خط مشاهده شد (شکل ۲). همچنین این اندام در اردیبهشت ماه نسبت به سایر زمان‌های نمونه‌برداری در دمای بالاتری (دمای ۸- درجه سانتی‌گراد) به بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها رسید. به نظر می‌رسد اندام ریزوم در دی ماه بیشترین و اردیبهشت ماه کمترین میزان تحمل به سرما را داشته است.

به‌طور کلی بیشترین میزان تحمل به سرما در نمونه‌برداری‌های مختلف در هر اندام متفاوت بود، با این وجود در نمونه‌برداری اردیبهشت ماه همه اندام‌ها کمترین میزان تحمل به سرما را داشتند.

دمای ۵۰ درصد کشندگی براساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el})

دمایی که در آن ۵۰ درصد الکترولیت‌ها به خارج از سلول نشت می‌کنند، به‌عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی براساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) پیشنهاد شده است (۱۵). در این بررسی از نظر این شاخص نیز بین اندام‌های نعناع فلفلی تفاوت معنی‌داری

($p\leq$۰/۰۱) وجود داشت (جدول ۴). در تمام موارد مقدار LT_{50el} اندام‌های گیاهی در نمونه‌برداری‌های انجام شده در پاییز و زمستان کمتر از آن نسبت به ماه‌های ابتدای بهار بود. به نظر می‌رسد که اندام‌های گیاهان نعناع فلفلی در پاییز و زمستان در طبیعت با کاهش دما خوسرمایی پیدا کردند و در بهار با افزایش دما و از بین رفتن شرایط خوسرمایی تحمل به سرما در آنها کاهش یافته است. در اغلب نمونه‌برداری‌ها اندام برگ بالاترین (حساس‌ترین اندام به دماهای یخزدگی) و اندام استولون نیز پایین‌ترین (متحمل‌ترین اندام به دماهای یخزدگی) مقدار LT_{50el} را نسبت به سایر اندام‌ها داشتند (جدول ۴).

در اندام برگ، کمترین LT_{50el} را نمونه‌های برداشت شده در آذر و دی ماه داشتند که احتمالاً وقوع پدیده خوسرمایی باعث کاهش میزان LT_{50el} در آنها شده است. از سوی دیگر در بهار با گرم شدن هوا و شروع رشد مجدد گیاهان نعناع فلفلی، برگ‌های برداشت شده در اردیبهشت ماه بالاترین LT_{50el} را داشتند (جدول ۴)، که این موضوع را می‌توان به‌دلیل حساسیت شدید اندام برگ به سرما در اردیبهشت ماه دانست.

کمترین LT_{50el} ساقه‌ها، در نمونه‌برداری‌های آبان و آذرماه دیده شد. به نظر می‌رسد که پدیده خوسرمایی در ساقه‌ها زودتر از اندام‌های دیگر به‌وقوع پیوسته است و با سردتر شدن هوا در دی ماه و احتمالاً به‌دلیل عدم تحمل دماهای سردتر در این ماه میزان LT_{50el} ساقه نسبت به ماه قبل افزایش یافت و در بهار نیز با افزایش دما و از بین رفتن خوسرمایی ساقه‌ها به سرما حساس شده و نمونه‌های برداشت شده در فروردین LT_{50el} بیشتری از خود نشان دادند (جدول ۴).

LT_{50el} استولون‌ها نیز در برداشت پاییز و زمستان غالباً کمتر از مقدار آنها در بهار بود، به‌طوری‌که در بهار LT_{50el} استولون‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافت و در اردیبهشت ماه به بیشترین میزان خود رسید (جدول ۴). به نظر می‌رسد که افزایش دما در بهار و از بین رفتن تطابق سرمایی باعث افزایش LT_{50el} در استولون‌ها شده است.

در مورد ریزوم در آذر ماه کمترین میزان LT_{50el} مشاهده شد و بعد از آن به‌تدریج در نمونه‌برداری‌های بعدی میزان LT_{50el} افزایش یافت (جدول ۴). به نظر می‌رسد پدیده خوسرمایی در این اندام با شدت کمتری اتفاق افتاده است که شاید به‌دلیل زیر خاک بودن ریزوم و درک نکردن دماهای لازم برای خوسرمایی باشد، احتمالاً به همین دلیل است که نوسان در مقادیر صفت مذکور در این اندام نسبت به سایر اندام‌ها کمتر بوده است. همچنین LT_{50el} ریزوم در بهار با افزایش دما افزایش یافت و در اردیبهشت ماه به بیشترین میزان رسید (جدول ۴).

به‌طور کلی در بهار میزان LT_{50el} نسبت به پاییز و زمستان در همه اندام‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافت و لذا به نظر می‌رسد اندام‌های گیاه نعناع فلفلی در بهار حساسیت زیادی به سرما دارند و تحمل اندام‌های هوایی آن به سرماهای شدید، خیلی زیاد نیست. در این خصوص برگ‌ها حساس‌ترین اندام‌ها بودند، زیرا در فروردین ماه قادر به تحمل دمای کمتر از ۸- درجه سانتی‌گراد نبودند و در اردیبهشت ماه نیز تنها توانستند تا حدود ۲- درجه سانتی‌گراد را تحمل کنند. همچنین استولون نسبت به سایر اندام‌ها در فروردین ماه تحمل به سرمای بیشتری نشان دادند، به‌طوری‌که قادر به تحمل دماهای یخزدگی تا ۱۱/۵- درجه سانتی‌گراد بودند. با وجود این افزایش دما در بهار باعث از بین رفتن اثرات خوسرمایی در این اندام شده و لذا در اردیبهشت ماه به سرما حساس شده و حداکثر قادر به تحمل دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بوده است (جدول ۴). کاردونا و همکاران (۱۱) نیز مشاهده کردند خوسرمایی موجب کاهش LT_{50el} در ارقام مختلف در مقایسه با شرایط عدم خوسرمایی می‌شود.

در بررسی رضوان بیدختی و همکاران (۴) نیز از نظر این شاخص در بین اندام‌های اکوتیپ‌های موسیر تفاوت معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۱) وجود داشت. به‌طوری‌که اکوتیپ‌های تندوره و کلات (متحمل‌ترین اکوتیپ‌ها به دماهای یخزدگی) و اکوتیپ شیروان بیشترین مقدار LT_{50el} (حساس‌ترین اکوتیپ به دماهای یخزدگی) را داشتند. در اندام‌های مختلف نیز اندام ریشه بیشترین میزان LT_{50el} را داشت و حساسیت بیشتری نسبت به دو اندام برگ و پیاز از خود نشان داد. همچنین در مطالعه ژوان و همکاران (۲۵) بر روی تحمل به یخزدگی ۵۴ گونه زوسیاگراس (*Zoysia* spp.) با استفاده از آزمون نشت الکترولیت‌ها در اندام برگ و ارزیابی درصد بقاء در دو اندام استولون و ریزوم مشاهده شد که گونه‌های زوسیاگراس از نظر دمای ۵۰ درصد کشندگی براساس نشت الکترولیت‌ها از برگ تفاوت داشتند و مقدار LT_{50el} در آنها از ۱/۹- تا ۱۰/۴- درجه سانتی‌گراد متغیر بود، به‌طوری‌که کمترین و بیشترین مقدار آن به‌ترتیب در گونه‌های *Z. macrostachia* و *Z. japonica* مشاهده شد.

جدول ٤- دمای ۵۰ درصد کشندگی براساس درصد نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های نعناع فلفلی در ماه‌های مختلف

	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	فروردین	اردیبهشت	LSD (۰/۰۱)
برگ	-۵/۳ a	-۹/۱ a	-۸/۵ a	-	-	-۵/۷ a	-۱/۶ a	۰/۹
ساقه	-۱۶/۲ d	-۱۶/۸ c	-۱۱/۷ c	-	-	-۴/۹ a	-۶/۰ c	۱/۹
استولون	-۱۲/۶ c	-۱۶/۶ c	-۱۱/۷ c	-۱۰/۸	-۱۳/۳	-۱۱/۵ c	-۴/۳ b	۱/۱
ریزوم	-۹/۴ b	-۱۱/۸ b	-۱۰/۷ b	-۹/۲	-۸/۵	-۸/۶ b	-۵/۲ bc	۰/۹
LSD (۰/۰۱)	۱/۲	۱/۱	۰/۹	۱/۰	۱/۸	۱/۲	-۱/۶	

در ایـن بررسـی نیـز همبسـتگی مثبـت و بسـیار معنـی‌داری ($r = ۰/۹۶^{**}$) بین LT_{50el} با درصد نشت الکترولیت‌هـا مشـاهده شـد. به‌عبارت دیگر با افزایش درصد نشت الکترولیـت‌هـا، LT_{50el} افـزایش یافته است. ایزدی دربندی و همکاران (۲) نیز با بررسی روی اکوتیپ-های یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) نتایج مشابهی را گزارش کردند. برخی محققان نیز اظهار داشته‌اند که همبستگی نسبتاً مناسـب بین میزان نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} نشان‌دهنده کارایی این روش در ارزیابی تحمل به سرما در گیاهان می‌باشد (۳).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه روند تحمل به سرمای اندام‌های گیاه نعنـاع فلفلـی رشد یافته در شرایط مزرعه در ماه‌هـای مختلـف مـورد بررسـی قـرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که با کاهش دمای یخزدگی، درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی در همه ماه‌های مورد بررسی به‌طور معنی‌داری افزایش یافـت و بـین انـدام‌هـا از ایـن نظـر تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در فصل پاییز و زمستان بـا توجـه بـه این که اندام‌های نعناع فلفلـی در معـرض دماهـای خوسـرمایی قـرار داشتند، فرآیندهای خوسرمایی در ایـن انـدام‌هـا القـاء شـده و نشـت الکترولیت کمتری نشان دادند. بـه‌طـوری‌کـه کمتـرین میـزان نشـت الکترولیت مربوط به آذر ماه بود که نشـان‌دهنـده خوسـرمایی بیشـتر اندام‌ها در این ماه می‌باشد. مقدار بیشتر درصد نشت الکترولیت اندام‌ها در فصل بهار اتفاق افتاد که به‌دلیل گرم شـدن هـوا و کـاهش اثـرات خوسرمایی بوده است. در نتیجه گیاه به سرما حساس شـده و در برابـر تنش یخزدگی تحمل کمتری نشـان داده اسـت. بـا توجـه بـه نتـایج به‌دست آمده به نظر می‌رسـدکه ریـزوم توانـایی خوسـرمایی کمتـری نسبت به سایر اندام‌ها دارد که احتمالاً به‌دلیـل زیـر خـاک بـودن بـه میزان کمتری قادر به دریافت دماهای خوسرمایی می‌باشد.

منابع

۱- امیر قاسمی، ت. ۱۳۸۱. سرما زدگی گیاهان (یخبندان، صدمات، پیشگیری). نشر آیندگان. ۱۲۳ صفحه.

۲- ایزدی دربندی، ا.، ا. نظامی، ع. عباسیان، و م. حیدری. ۱۳۹۱. بررسی تحمل به یخزدگی یولاف وحشی با استفاده از آزمون نشت الکترولیـت‌هـا. نشریه تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۵ (۱): ۹۴-۸۱.

۳- بیرامی زاده، ا.، ی. ارشد، ب. یزدی صمدی، و م. ر. قنادها. ۱۳۸۱. بررسی ژنتیک پایداری غشای سیتوپلاسمی در گندم. چکیده مقالات سومین همایش کاهش ضایعات ناشی از سرما و یخزدگی گیاهان زراعی کشور ۶۸-۶۵.

۴- رضوان بیدختی، ش.، ا. نظامی، م. کافی، و ح. ر. خزاعی. ۱۳۹۰. بررسی اثر تنش یخزدگی بر میزان نشت الکترولیت‌ها در گیاه دارویی و صـنعتی موسیر تحت شرایط کنترل شده. نشریه بوم شناسی کشاورزی ۳ (۳): ۳۸۲-۳۷۱.

۵- زرگری، ع. ۱۳۷۶. گیاهان دارویی. جلد چهارم، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران.

۶- قهرمان، ا. ۱۳۷۳. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی)، جلد اول، مرکز نشر دانشگاهی. ۳۷۳ صفحه.

۷- مهرآفرین، ع.، ح. ع. نقدی بادی، م. پورهادی، ا. هادوی، ن. قوامی، و ز. کدخدا. ۱۳۹۰. پاسخ فیتوشـیمیایی و زراعـی نعنـاع فلفلـی بـه کـاربرد کودهای زیستی و کود اوره. فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۱۰ (۴): ۱۱۸-۱۰۷.

۸- میرمحمدی میبدی، ع. و س. ترکش اصفهانی. ۱۳۸۳. جنبه های فیزیولوژیک و به نژادی تـنش‌هـای سـرما و یـخزدگـی در گیاهـان زراعـی. انتشارات گلبن. ۲۲۳ صفحه.

۹- نظامی، ا.، ا. برزویی، م. جهانی، م. عزیزی، و ع. شریف. ۱۳۸۶. نشت الکترولیـت‌هـا بـه عنـوان شاخصـی از خسـارت یـخزدگـی کلـزا. نشـریه پژوهش‌های زراعی ایران ۵ (۱): ۱۷۵-۱۶۷.

۱۰- نظامی، ا.، ج. نباتی، ا. برزویی، ع. کمندی، ع. معصومی، و م. صالحی. ۱۳۸۹. ارزیابی تحمل به یخ زدگی ارقام جو در مرحله گیاهچـه ای تحـت شرایط کنترل شده. نشریه تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۳ (۱): ۲۲-۹.

11- Cardona, C. A., R. R. Duncan, and O. Lindstrom. 1997. Low temperature tolerance assessment in paspalm. Journal of Crop Science 37: 1283-1291.

12- Concellon, A., M. C. Anon, and A. R. Chaves. 2007. Effect of low temperature storage on physical and physiological characteristics of eggplant fruit (*Solanum melongena* L.). Journal of Food Science and Technology 40: 389-396.

13- Dai, X., Y. Xu, Q. Ma, W. Xu, T. Wang, Y. Xue, and K. Chong. 2007. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis. Journal of Plant Physiology 143:1739-1751.

14- 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. Journal of Crop Science 41:443-451.
15- Gusta, L. V., D. B. Fowler, and N. J. Tyler. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop implications, Vol. 2, Li P. H. & Sakai A. (Eds.) Academic Press, New York: pp. 23-40.
16- Hana, B., and J. C. Bischofa. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Journal of Cryobiology 48: 8-21.
17- Lang, D. L., P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegher. 1981. Physiological Plant Ecology. In: Larcher, W. and Bauer, H. (ed). Ecological significant of resistance to low temperature. 13rd edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: pp. 406-407.
18- Lindow, S. E., D. C. Arny, and C. D. Upper. 1982. Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. Journal of Plant Physiology 70: 1084-1089.
19- Mahfoozi, S., A. E. Limin, P. M. Hayes, P. Hucl, and D. B. Fowler. 2000. Influence of photoperiod response on the expression of cold hardiness in wheat and barley.Canadian Journal of Plant Science 80: 721-724.
20- Murray, G. A., D. Eser, L. V. Gusta, and G. Eteve. 1988. Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. p.831-843. In the R.J. Summerfield (Ed.) World crops: cool season food legumes. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
21- Nayyar, H., T. S. Bains, and S. Kumar. 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.
22- Uemura, M., Y. Tominaga, C. Nakagawara, S. Shigematsu, A. Minami, and Y. Kawamura. 2006. Responses of plasma membrane to low temperature. Physiologia Plantarum 126: 81-89.
23- Verma, R. S., L. Rahman, R. K. Verma, A. Chauhan, A. K. Yadav, and A. Singh. 2010. Essential oil composition of Menthol mint (*Mentha arvensis* L.) and Peppermint (*Mentha piperita* L.) cultivars at different stages of plant growth from Kumaon Region of Western Himalaya. Journal of Medicinal and Aromatic Plants 1: 13-18.
24- Waner, L. A., and O. Junttila. 1999. Cold-induced freezing tolerance in Arobidopsis. Journal of Plant Physiology 120: 391-399.
25- Xuan, J., J. Xiuliu, H. Gao, H. Uaguabghu, and X. Cheng. 2009. Evaluation of low-temperature tolerance of Zoysia grass. Tropical Grasslands 43: 118-124.