نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۱، شماره ۱ ، بهار ۱۳۹۲، ص. ۱۳۰-۱۲۱

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 11, No. 1, Spring. 2013, p. 121-130

ارزیابی تحمل به یخزدگی سه اکوتیپ زنیان *Trachyspermum ammi* (Linn). Sprague در شرایط کنترل شده

زینت برومند رضازاده[۱]- احمد نظامی[۲*]- سمیه نظامی[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۸/۱۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۱۲/٦

چکیده

زنیان از جمله گیاهان دارویی بومی در خراسان است که در خصوص تحمل به سرمای آن اطلاعات چندانی در دسترس نیست. لذا این آزمایش به منظور بررسی تحمل به یخزدگی این گیاه در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و سه اکوتیپ زنیان (نیشابور، بیرجند و تربت حیدریه) در معرض هشت دمای یخزدگی (صفر (شاهد)، ۱/۵-، ۳-، ۴/۵-، ۶-، ۷/۵-، ۹-، ۱۰/۵- درجه سانتیگراد) قرار گرفتند. گیاهان تا مرحله ۵-۴ برگی در محیط طبیعی رشد یافته و سپس دماهای یخزدگی با استفاده از فریزر ترموگرادیان بر روی آنها اعمال شد. میزان پایداری غشاء سیتوپلاسمی با استفاده از نشت الکترولیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس درجه حرارت کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها براساس نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) تعیین شد. سه هفته بعد از زمان اعمال دماهای یخزدگی و رشد مجدد گیاهان در گلخانه نیز درصد بقاء، تعداد برگ، وزن خشک، دمای کشنده ۵۰ درصد گیاهان بر اساس درصد بقاء (LT_{50su}) و دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک گیاهان ($RDMT_{50}$) تعیین شد. واکنش اکوتیپ‌های زنیان از نظر نشت الکترولیت‌ها بعد از قرار گرفتن در معرض دماهای یخزدگی متفاوت بود و اکوتیپ بیرجند کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشت، ضمن اینکه شیب منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ مذکور ملایم‌تر از دو اکوتیپ دیگر بود. با وجود این از نظر LT_{50el} تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌های زنیان مشاهده نشد. کاهش دما به ۷/۵- درجه سانتیگراد، درصد بقاء دو اکوتیپ نیشابور و تربت حیدریه را به کمتر از ۲۰ درصد کاهش داد، درحالیکه درصد بقاء اکوتیپ بیرجند در این دما حدود ۶۰ درصد بود. به نظر می‌رسد که اکوتیپ بیرجند با کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها، بالاترین درصد بقاء و وزن خشک بوته و نیز کمترین LT_{50su} (۷/۸- درجه سانتیگراد) تحمل به تنش یخزدگی بهتری از دو اکوتیپ دیگر دارد.

واژه‌های کلیدی: درصد بقاء، سرما، نشت الکترولیت‌ها، وزن خشک

مقدمه

زنیان (*Trachyspermum ammi* (Linn). Sprague) یکی از گونه‌های یکساله تیره چتریان[۴] است که در طب سنتی ایران از آن به عنوان انیسون بری و کمون حبشی نیز نام برده شده است. بخش اصلی مورد استفاده این گیاه بذر آن است که حاوی ۶-۴ درصد اسانس بوده و ترکیب اصلی اسانس آن تیمول می‌باشد (۲۳). بذر زنیان دارای طبیعت گرم بوده (۱۰) و استفاده فراوانی در رفع ناراحتی های دستگاه گوارش (۳۶، ۴۴ و ۴۵) دارد. همچنین بذر این گیاه خاصیت ضدعفونی کنندگی قوی داشته و از فعالیت قارچها، باکتری‌ها و ویروس‌ها ممانعت می‌کند (۲۹، ۳۶ و ۳۷). این گیاه در طبیعت به صورت خودرو رشد کرده و اخیراً تلاش‌هایی جهت اهلی سازی آن صورت گرفته است (۲ و ۳).

در سال‌های اخیر مصرف گیاهان دارویی و به تبع آن برداشت های بی‌رویه این گیاهان از طبیعت افزایش یافته و حتی در مواردی برخی از آن‌ها در معرض خطر انقراض قرار گرفته‌اند (۱۲). به همین دلیل محققان در تلاش هستند تا با اهلی سازی و کاشت آن‌ها در شرایط زراعی این خطر را کاهش داده و همچنین منبع گیاهی مناسب و مطمئنی را برای صنایع داروسازی فراهم سازند. از جمله فعالیت‌های ضروری در فرایند اهلی سازی گیاهان دارویی از جمله زنیان، تعیین زمان کاشت مناسب آن‌ها در هر منطقه می‌باشد، زیرا زمان کاشت مطلوب از طریق تأثیر بر سبز شدن و استقرار گیاهان، سبب رشد بهتر آن‌ها در مقایسه با سایر زمان‌های کاشت شده (۵) و بهبود عملکرد می‌شود (۳۱).

۱ و ۲- دانشجوی دکتری و دانشیارگروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: nezamiahmad@yahoo.com)
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

4- Umbelliferae = Apiaceae

اکبری‌نیا (۲) در بررسی تأثیر تاریخ کاشت بر عملکرد گیاهان زنیان (*Trachyspermum ammi*)، رازیانه (*Foeniculum vulgar* L.)، سیاهدانه (*Nigella sativa*)، زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) و انیسون (*Pimpinella anisum* L.) مشاهده کرد که عملکرد زنیان، آنیسون و زوفا در کشت بهاره و عملکرد رازیانه و سیاهدانه در کشت پائیزه بیشتر بوده است. نتایج آزمایش برومند و همکاران (۳) نیز نشان داد که تأخیر در کشت زنیان تا اواخر فروردین سبب کاهش عملکرد شده و کشت در اواسط اردیبهشت به دلیل مواجه شدن با دمای بالا با عدم سبز شدن همراه بود. مرتضی و همکاران (۳۸) نیز با بررسی زمان‌های کاشت گیاه دارویی گل راعی (*Hypericum perforatum*)، بیان داشتند که کاشت پاییزه آن باعث رشد سریع‌تر گیاهان در بهار شد و گیاهان پاییزه نسبت به گیاهان بهاره در مقابل سرماهای دیررس بهاره تحمل‌بهتری داشتند. سهیلی و همکاران (۷) اظهار داشتند که کاشت پاییزه زیره سبز (*Cuminum cuminum*) از این جهت که منجر به افزایش دوره رشد رویشی و بهبود جذب تشعشع فعال فتوسنتزی می‌شود اهمیت بسزایی دارد. در بررسی نظامی و همکاران (۳۹) نیز مشاهده شد که بهبود عملکرد زیره سبز در کاشت پاییزه بسته به اکوتیپ متفاوت بود و اکوتیپ قائن در مقایسه با اکوتیپ خواف در کاشت پاییزه عملکرد بهتری داشت.

در مناطق معتدله (از جمله ایران) سرمای زمستان از مهم‌ترین تنش‌های مؤثر بر بقاء، رشد و تولید گیاهان در کاشت پاییزه می‌باشد (۴۱)، که از طریق صدمات شدید به سلولها و بافتهای گیاه، سبب ایجاد خسارتهای جبران ناپذیر و گاهی نابودی آن‌ها می‌شود (۱۱). لذا شناخت اکوتیپ‌های متحمل به سرما نقش مهمی در موفقیت کشت و کار و بهره برداری از آن‌ها در کاشت پاییزه دارد. از سوی دیگر در کشور ما اغلب گیاهان دارویی دارای تنوع نسبتاً مناسبی هستند که به علت تحمل شرایط نامساعد محیطی و سازگار شدن به شرایط محل رویش خود، منابع مهمی برای ارزیابی این گیاهان جهت کشت و کار اصولی می‌باشند (۱).

هنگام قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش سرما، غشاء سلولی خسارت می‌بیند (۱۴ و ۳۵)، و نشت الکترولیت‌ها[1] از سلول افزایش می یابد (۲۰ و ۴۸). اندازه‌گیری این پارامتر به دلیل هزینه و زمان اندک مورد نیاز و کارائی مناسب در ارزیابی تعداد زیادی از نمونه‌ها، به عنوان روشی مطلوب در ارزیابی اثر تنش سرما بر گیاهان مورد استفاده قرار گرفته و گیاهان متحمل‌به سرما غالباً نشت الکترولیت‌های‌کمتری نسبت به گیاهان حساس به سرما داشته‌اند (۱۷، ۲۲، ۳۲، ۴۷). همچنین دمایی که سبب ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها از سلولهای گیاهی می‌شود به عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}[2]) پیشنهاد شده است (۲۱). رضوان بیدختی و همکاران (۶) در بررسی تحمل به یخزدگی سه اکوتیپ گیاه داروئی موسیر (*Alliumm altissimum* Regel.) مشاهده کردند که درصد نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ شیروان بیش از دو اکوتیپ کلات و تندوره بود. همچنین با کاهش دما میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به حداکثر رسید. در مطالعه مذکور اکوتیپ‌های کلات و تندوره با دارا بودن کمترین درصد نشت الکترولیت و LT_{50el} از تحمل به یخزدگی بهتری نسبت به اکوتیپ شیروان برخوردار بودند. در مطالعه پیتش و همکاران (۴۳) نیز تنش یخ زدگی سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در دو گونه گیاه گوارا (*Guara* sp.) شد، به طوریکه در گستره دمایی صفر تا ۱۲- درجه سانتیگراد درصد نشت الکترولیت‌ها در گونه *G. coccinea* تغییرات اندکی داشت، حال آنکه کاهش دما به کمتر از ۶- درجه سانتیگراد منجر به افزایش معنی‌دار درصد نشت الکترولیت‌ها در گونه *G. drummondii* شد. در این بررسی همچنین LT_{50el} در گونه *G. coccinea* کمر از گونه دیگر بود که نشاندهنده تحمل بهتر این گونه به تنش یخزدگی می‌باشد.

بررسی درصد بقاء و رشد مجدد گیاه پس از گذراندن یک دوره بازیافت، نیز از جمله روش‌های مناسب برای ارزیابی تحمل به یخ زدگی در گیاهان ذکر شده است (۳۰ و ۴۳). نتایج مطالعه اثر تنش یخ زدگی بر چند گونه گیاه دارویی هب (*Hebe* sp.) نشان داد که با کاهش دما درصد بقاء گونه‌های مورد مطالعه کاهش یافت، با وجود این کاهش درصد بقاء بسته به گونه متفاوت بود و گونه *H. cupressoides* درصد بقاء بالاتری از گونه *H. albicans* داشت. همچنین گونه‌هایی که هنگام قرار گرفتن در معرض تنش یخزدگی درصد بقاء بالاتری داشتند، از دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50su}[3]) کمتری برخوردار بودند (۴۹). در مطالعه سیاهمرگویی و همکاران (۸) نیز مشخص شد که با کاهش دما به کمتر از ۶- درجه سانتیگراد درصد بقاء گیاهان کاهش یافت. در آزمایش دیگری که تأثیر تنش یخ زدگی بر اکوتیپ‌های گیاه زیره سبز مورد بررسی قرار گرفت، مشخص شد که درصد بقاء گیاهان تا دمای ۶- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفت ولی با کاهش بیشتر دما درصد بقاء کمتر شد، به نحویکه در دمای ۱۵- درجه سانتیگراد هیچ گیاهی زنده نماند. در این مطالعه همچنین دو اکوتیپ قائن و قوچان با LT_{50su} کمتر تحمل به یخزدگی بیشتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها داشتند (۴۰). راشد محصل و همکاران (۴۶) نیز با بررسی تحمل به یخزدگی دو اکوتیپ رازیانه گزارش کردند که اکوتیپ گناباد از درصد بقاء بالاتر و LT_{50su} کمتری

1- Electrolyte leakage

2 -Lethal temperature 50 according to electrolyte leakage percentage

3 -Lethal temperature 50 according to the plant survival percentage

نسبت به اکوتیپ کرمان برخوردار بود. در بررسی ایشان همچنین دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک گیاهان ($RDMT_{50}$[1]) در اکوتیپ گناباد ۱/۶ درجه سانتیگراد کمتر از اکوتیپ کرمان بوده که نشاندهنده رشد مجدد مناسب‌تر اکوتیپ گناباد نسبت به اکوتیپ کرمان پس از اعمال تیمارهای یخزدگی بوده است.

این آزمایش با هدف بررسی امکان استفاده از نشت الکترولیت‌ها در ارزیابی خسارت تنش یخزدگی، درصد بقا و رشد مجدد سه اکوتیپ زنیان در واکنش به تنش یخزدگی در شرایط کنترل شده اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در پائیز سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بصورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. عوامل آزمایش شامل سه اکوتیپ گیاه زنیان (نیشابور، تربت حیدریه و بیرجند) و هشت دمای صفر (شاهد)، ۱/۵-، ۳-، ۴/۵-، ۶-، ۷/۵-، ۹- و ۱۰/۵- درجه سانتیگراد بودند. بذور در تاریخ ۱۵ آبان ماه در گلدانهایی پلاستیکی با قطر ۱۲ سانتیمتر و حجمی معادل ۷۶۰ سانتیمتر مکعب در خاکی با ترکیب مساوی از خاک، خاکبرگ و ماسه کشت و روی آنها با ماسه پوشانده شد. در مرحله ۳-۲ برگی، بوته‌ها تنک شده و تعداد آنها در هر گلدان به ده عدد کاهش یافت. به منظور القاء خوسرمایی، گیاهان تا مرحله ۵-۴ برگی در محیط طبیعی نگهداری شده و سپس تیمارهای یخ زدگی با استفاده از فریزر ترموگرادیان بر روی آن‌ها اعمال شد. دمای فریزر در شروع آزمایش ۵ درجه سانتیگراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها، با سرعت دو درجه سانتیگراد در ساعت کاهش یافت. برای اطمینان از ایجاد هستک یخ در گیاهان، در دمای ۲/۵- درجه سانتیگراد، محلول حاوی باکتری های فعال هستک یخ (INAB[2]) به نحوی پاشیده شد که سطح گیاهان با قشر نازکی از این محلول پوشانده شد. گیاهان به مدت یک ساعت در هر تیمار دمائی نگهداشته شده و سپس از فریزر خارج و برای کاهش سرعت ذوب یخ در دمای ۲±۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جهت تعیین میزان نشت الکترولیت‌ها، سه بوته از محل طوقه از سطح خاک جدا شده و پس از شستن خاک آنها به ویال‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر منتقل شدند. این نمونه‌ها به مدت شش ساعت روی شیکر قرار گرفته و پس از آن میزان نشت الکترولیت‌ها توسط دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد (EC_1). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، ابتدا ویال های حاوی نمونه‌های گیاهی به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱۵ بار قرار داده شدند و پس از آن مجدداً شش ساعت روی شیکر قرار گرفته و بعد از آن میزان نشت الکترولیت‌ها اندازه‌گیری شد (EC_2). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از رابطه $(EC_1/EC_2)\times 100$ محاسبه گردید. درجه حرارت کشنده ی ۵۰ درصد نمونه‌ها بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها بر اساس روش اندرسون و همکاران (۱۶) و مطابق با معادله یک تعیین گردید (معادله ۱).

$$EL_p = EL_i + \{(El_m-El_i) / (1+e^{-B(T-Tm)})\} \quad (1)$$

در این معادله، EL_p: مقدار نشت الکترولیت پیش‌بینی شده، EL_i و El_m: به ترتیب حداقل و حداکثر مقدار نشت الکترولیت‌ها در دماهای آزمایش، B: سرعت افزایش شیب منحنی، T: دما، T_m: نقطه ی عطف منحنی (نقطه ی میانی بین بخش پائینی و بالائی خط منحنی) و نشاندهنده ی خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از سلول می‌باشد.

جهت تعیین درصد بقاء و رشد مجدد، گلدان‌ها به شاسی سرد منتقل شده و پس از سه هفته درصد بقاء و رشد مجدد آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد بقاء گیاهان از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و با استفاده از معادله دو محاسبه شد:

(۲) [۱۰۰× (تعداد گیاهان قبل از یخزدگی/تعداد گیاهان زنده سه هفته بعد از یخزدگی)]= درصد بقاء گیاهان

جهت تعیین رشد مجدد نیز ابتدا تعداد برگ در گیاهان ثبت شد و سپس نمونه‌ها از محل طوقه قطع شده و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس وزن خشک آنها تعیین شد. دمای کشنده ی ۵۰ درصد گیاهان بر اساس درصد بقاء (LT_{50su}) و دمای کاهنده ی ۵۰ درصد وزن خشک ($RDMT_{50}$) نیز به ترتیب پس از ترسیم نمودارهای درصد بقاء و وزن خشک گیاهان در مقابل دماهای یخزدگی و تعیین نقطه ی میانی هر منحنی مشخص گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MINITAB مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای رسم نمودارها و تعیین LT_{50} از نرم‌افزارهای SigmaPlot و SlideWrite استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نشت الکترولیت‌ها: نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در جدول یک نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها تفاوت معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بین اکوتیپ‌های زنیان مشاهده شد و اکوتیپ بیرجند نسبت به دو اکوتیپ نیشابور و تربت حیدریه درصد نشت الکترولیت‌های کمتری داشت (جدول ۲). بررسی پژوهشگران دیگر نیز حاکی از وجود تفاوت در نشت الکترولیت‌ها بین اکوتیپ‌ها یا رقم‌های مورد بررسی می‌باشد (۱۳و ۱۴).

1-Reduced dry matter temperature 50

2 -Ice Nucleation Active Bacteria

جدول ۱- منابع تغییرات، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء، تعداد برگ و وزن خشک بوته در اکوتیپ‌های زنیان تحت تأثیر یخزدگی در شرایط کنترل شده

منبع تغییر	درجات آزادی	درصد نشت الکترولیت‌ها	درصد بقاء	تعداد برگ	وزن خشک بوته
اکوتیپ	۲	۱۱۱۳/۳**	۵۱۳/۱*	۰/۶^{ns}	۴۸۴/۲**
دما	۷	۵۱۵۰/۸**	۱۴۰۹۰/۵**	۳۵/۵**	۹۱۷/۵**
اکوتیپ × دما	۱۴	۲۱۳/۷**	۳۱۴/۷**	۰/۷^{ns}	۷۴/۰**
خطا	۴۸	۳۳/۹	۱۲۳/۴	۰/۵۱۴	۲۹/۹

جدول ۲- تأثیر اکوتیپ و دمای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء، تعداد برگ و وزن خشک بوته در اکوتیپ‌های زنیان در شرایط کنترل شده

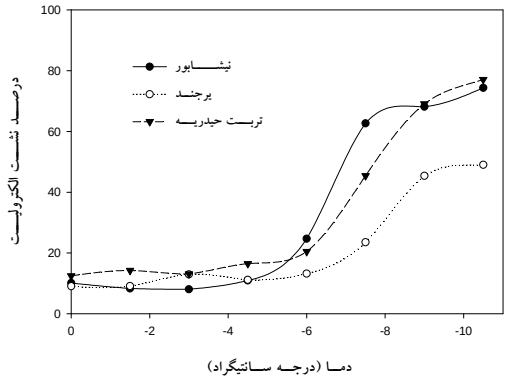
تیمار	درصد نشت الکترولیت‌ها	درصد بقاء	تعداد برگ	وزن خشک بوته (میلی‌گرم)
اکوتیپ				
نیشابور	۳۳/۴ a	۵۱/۴ b	۲/۷ a	۱۴/۸ a
بیرجند	۲۱/۷ b	۵۹/۷ a	۲/۸ a	۱۶/۰ a
تربت حیدریه	۳۳/۵ a	۵۲/۱ b	۲/۵ a	۷/۷ b
دماهای یخزدگی (درجه سانتیگراد)				
۰/۰	۱۰/۵ e	۸۳/۳ a	۴/۴ a	۲۰/۲ a
-۱/۵	۱۰/۵ e	۸۵/۲ a	۴/۳ a	۲۱/۴ a
-۳/۰	۱۱/۴ e	۸۳/۳ a	۴/۱ a	۱۹/۰ a
-۴/۵	۱۲/۹ e	۸۳/۳ a	۴/۰ ab	۱۹/۸ a
-۶/۰	۱۹/۵ d	۷۷/۸ a	۳/۴ b	۲۰/۱ a
-۷/۵	۴۳/۸ c	۲۲/۲ b	۰/۹ c	۲/۰ b
-۹/۰	۶۰/۹ b	۰/۰ c	۰/۰ d	۰/۰ b
-۱۰/۵	۶۶/۸ a	۰/۰ c	۰/۰ d	۰/۰ b

در هر ستون میانگین‌های مربوط به هر عامل که دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

تنش یخزدگی نیز بر درصد نشت الکترولیت‌ها تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱) و با کاهش دما به کمتر از ۴/۵- درجه سانتیگراد نشت الکترولیت‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲). افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها تحت تأثیر کاهش دما نشان‌دهنده ی اختلال در انسجام و فعالیت غشاء سلولی است که سبب خروج مواد درون سلول‌ها می‌شود (۲۱ و ۲۵).

رضوان بیدختی و همکاران (۶) در بررسی اثر تنش یخزدگی بر نشت الکترولیت‌ها در گیاه دارویی موسیر اظهار داشتند که با کاهش دما میزان نشت الکترولیت‌ها نیز افزایش یافت، بطوریکه در دمای ۱۶- درجه سانتیگراد حدود سه برابر بیشتر از دمای صفر درجه سانتیگراد بوده است. در مطالعه حاضر نیز کاهش دما به ۱۰/۵- درجه سانتیگراد سبب افزایش ۶/۵ برابری درصد نشت الکترولیت‌ها نسبت به دمای صفر درجه سانتیگراد شده است (جدول ۲).

در شکل یک تأثیر دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از سه اکوتیپ زنیان نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود تا دمای ۴/۵- درجه سانتیگراد، اختلاف چندانی بین اکوتیپ‌های زنیان از نظر نشت الکترولیت‌ها وجود نداشت، ولی با افزایش شدت تنش یخزدگی، تفاوت بین اکوتیپ‌ها بیشتر شد، به طوریکه در گستره ی دمایی ۶- تا ۹- درجه سانتیگراد منحنی نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ بیرجند از شیب ملایم‌تری نسبت به دو اکوتیپ دیگر برخوردار بود. با وجود این از نظر LT_{50el} تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها مشاهده نشد (جدول ۳). شیب منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها در برابر دماهای یخزدگی به عنوان یکی از شاخص های مناسب ارزیابی تحمل به سرمای گیاه ذکر شده است و شیب آن در گیاهان متحمل به سرما کمتر از گیاهان حساس به سرما است (۲۱). لذا به نظر می‌رسد بر اساس این شاخص، اکوتیپ بیرجند از تحمل به سرمای بالاتری در مقایسه با دو اکوتیپ نیشابور و تربت حیدریه برخوردار باشد. میر و همکاران (۳۳) نیز گزارش کردند که میزان نشت الکترولیت‌ها در ارقام مختلف گیاه *Stenotaphrum secundatum* با کاهش دما تا ۶- درجه سانتیگراد تقریباً ثابت بود ولی پس از آن روند افزایشی پیدا کرد. گودلیفسون و همکاران (۲۴) با بررسی گیاهان علوفه‌ای سردسیری دریافت که در گونه‌های متحمل‌تر به سرما منحنی نشت الکترولیت ها در برابر دماهای یخزدگی از شیب ملایمتری برخوردار بود، درحالیکه در گونه‌های حساستر شیب این منحنی بیشتر بود.



شکل ۱- روند نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های زنیان تحت تأثیر دماهای یخزدگی در شرایط کنترل شده.

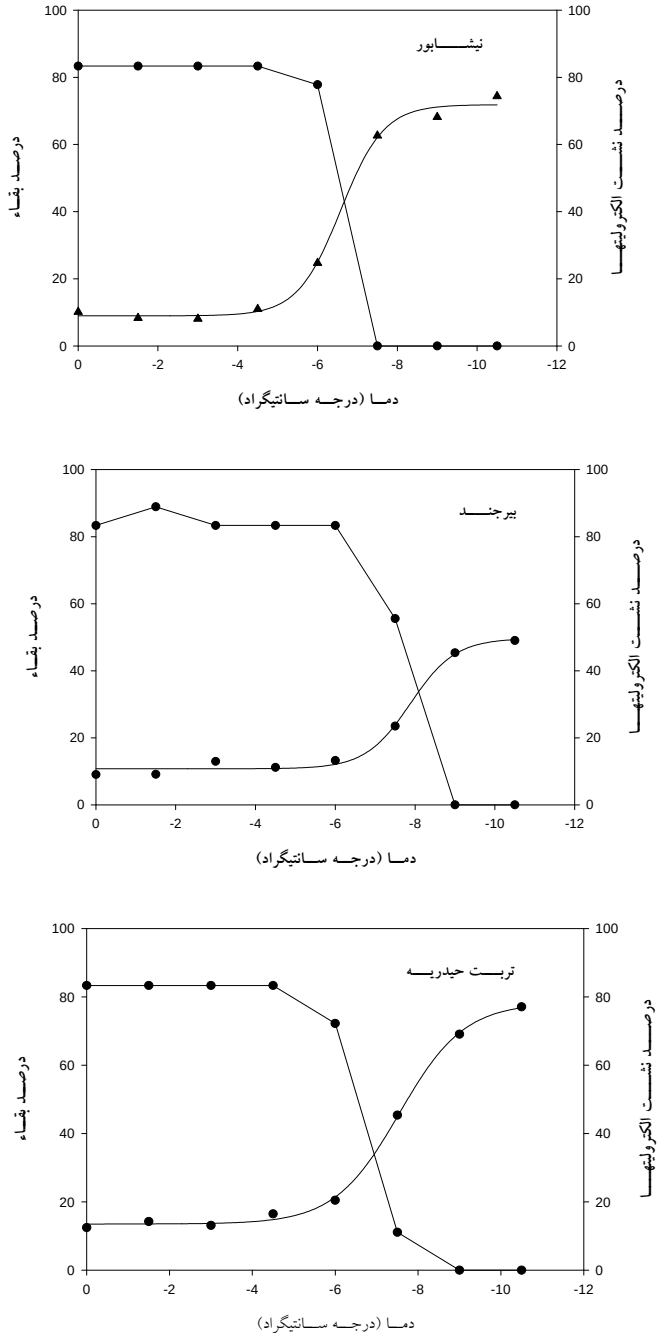
درصد بقاء: اکوتیپ‌های زنیان از نظر درصد بقاء تفاوت معنی داری ($P<۰/۰۱$) داشتند (جدول ۱) و مقدار آن در اکوتیپ بیرجند بیشتر از دو اکوتیپ دیگر بود. هریک و پری (۲۶) نیز در بررسی بقاء زمستانه چند گونه دارویی مشاهده کردند که بین گونه‌های مورد مطالعه از نظر درصد بقاء تفاوت معنی‌داری وجود داشت و درصد بقاء گونه‌های *Phlox paniculata* و *Cerarosrigma plumbaginoides* نسبت به گونه متحمل *Rosmarinus officinalis* به ترتیب ۶۲ و ۵۰ درصد کمتر بود. پیتش و همکاران (۴۳) نیز با ارزیابی تحمل به یخزدگی ژنوتیپ‌های گیاه گوارا بیان کردند که بین ژنوتیپ‌های این گیاه از نظر درصد بقاء تفاوت معنی داری وجود داشت، بطوریکه گیاهان ژنوتیپ مینسوتا تا دمای ۱۲- درجه سانتیگراد زنده ماندند، درصورتیکه گیاهان ژنوتیپ تگزاس در دمای مذکور از بین رفتند. محققان اصلی‌ترین عامل اختلاف ژنوتیپ های یک گونه گیاهی را از نظر درصد بقاء در شرایط تنش یخزدگی، تفاوت در خصوصیات ژنتیکی آنها دانسته و تأکید کرده‌اند که با بهبود تحمل به تنش یخزدگی، درصد بقاء گیاهان نیز افزایش خواهد یافت (۱۹).

تأثیر دماهای یخزدگی بر درصد بقاء زنیان معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) بود (جدول ۱)، و با کاهش دما به کمتر از ۶- درجه سانتیگراد درصد بقاء گیاهان شدیداً کاهش یافت (جدول ۲)، به‌طوریکه در دمای ۷/۵- درجه سانتیگراد، درصد بقاء گیاهان ۶۰ درصد کمتر از دمای صفر درجه سانتیگراد بود. در بررسی پری و هریک (۴۲) نیز مشاهده شد که گیاهان اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) تا دمای ۸- درجه سانتیگراد کاملاً زنده ماندند، اما در دماهای پایین‌تر به کلی از بین رفتند. در مطالعه‌ای که با هدف به‌گزینی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش یخزدگی گیاه داوودی انجام گرفت نیز مشاهده شد که با کاهش دما، درصد بقاء نیز کاهش یافت بطوریکه درصد بقاء در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد ۵۰ درصد کمتر از تیمار شاهد (صفر درجه سانتیگراد) بود (۳۰).

در بررسی اثر متقابل اکوتیپ و دماهای یخزدگی بر درصد بقاء زنیان مشاهده شد که دو اکوتیپ تربت حیدریه و نیشابور تا دمای ۴- درجه سانتیگراد درصد بقاء خوبی داشته و پس از آن با افزایش شدت تنش یخزدگی درصد بقاء آن‌ها کاهش یافت، در صورتیکه گیاهان اکوتیپ بیرجند تا دمای ۶- درجه سانتیگراد درصد بقاء مناسبی داشته و پس از آن درصد بقاء آن کاهش یافته است (شکل ۲). کاهش دما به ۷/۵- درجه سانتیگراد، درصد بقاء گیاهان اکوتیپ بیرجند را نسبت به دمای ۴- درجه سانتیگراد ۳۳ درصد کاهش داد، درصورتیکه این کاهش برای گیاهان اکوتیپ‌های تربت حیدریه و نیشابور به ترتیب ۸۷ و ۷۳ درصد بود. در بررسی نظامی و همکاران (۴۰) نیز مشاهده شد که درصد بقاء اکوتیپ‌های زیره سبز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دماهای یخزدگی قرار گرفت و هرچند که با کاهش دما درصد بقاء همه اکوتیپ‌های زیره سبز کم شد، ولی در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد درصد بقاء دو اکوتیپ قوچان و قائن به ترتیب ۸۷ و ۸۳ درصد بیشتر از اکوتیپ سبزوار بود.

در مطالعه حاضر بین اکوتیپ های زنیان از نظر مقدار LT_{50su} تفاوت معنی داری مشاهده نشد و کمترین مقدار آن را اکوتیپ بیرجند داشت (جدول ۳). هر چند راشد محصل و همکاران (۴۶) در بررسی اثر تنش یخزدگی بر روی اکوتیپ‌های رازیانه مشاهده کردند که این اکوتیپ‌ها از لحاظ LT_{50su} با هم اختلاف معنی‌داری دارند. وارینگتون و ساوسوارد (۴۹) نیز بیان کردند که بین گونه‌های گیاه هب اختلاف معنی‌داری از نظر LT_{50su} وجود داشت و گونه‌های متحمل‌تر درصد بقاء بالاتر و LT_{50su} کمتری نسبت به سایر گونه‌ها داشتند.

در این مطالعه بین درصد بقاء گیاهان و درصد نشت الکترولیت همبستگی منفی و معنی‌داری ($r= -۰/۹۲^{**}$) وجود داشت که نشان می‌دهد با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از گیاهان درصد بقاء آن‌ها کاهش یافته است.



شکل ۲- منحنی درصد بقاء و درصد نشت الکترولیت‌ها از اکوتیپ‌های زنیان تحت تأثیر دماهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده.

با وجود این تأثیر درصد نشت الکترولیت‌ها بر درصد بقاء گیاهان بسته به اکوتیپ متفاوت بود و افزایش ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها منجر به مرگ ۵۰ درصدی گیاهان نشد، به‌طوریکه در اکوتیپ نیشابور مرگ ۵۰ درصد گیاهان زمانی حادث شد که ۳۸ درصد الکترولیت‌ها از سلول‌های گیاه نشت کردند (شکل ۲)، درحالیکه در اکوتیپ تربت حیدریه و بیرجند زمانی ۵۰ درصد گیاهان از بین رفتند که درصد نشت الکترولیت‌ها حدوداً ۲۵ درصد بوده است. در بررسی کاردونا و همکاران (۲۱) بر روی سه اکوتیپ گیاه پاسپالوم نیز مشاهده شد مرگ ۵۰

درصدی گیاهان مطابق با نشت ۵۰ درصد الکترولیت‌ها نبوده است. در مطالعه ایشان مرگ ۵۰ درصدی گیاهان اکوتیپ PI299042 زمانی حادث شد که ۳۱ درصد نشت الکترولیت‌ها را داشتند، درصورتیکه در اکوتیپ آدلاید[1] مرگ ۵۰ درصدی گیاهان در ۲۸ درصد نشت الکترولیت‌ها واقع شده است. در مطالعه حاضر مرگ کامل گیاهان اکوتیپ بیرجند زمانی اتفاق افتاد که حدود ۴۵ درصد الکترولیت‌ها در دمای ۹- درجه سانتیگراد نشت کردند، درصورتیکه در اکوتیپ‌های نیشابور و تربت حیدریه به ترتیب نشت حدوداً ۶۰ و ۷۰ درصدی الکترولیت‌ها در دماهای ۷/۵- و ۹- درجه سانتیگراد مرگ کامل گیاهان را به دنبال داشته است.

رشد مجدد گیاهان: از نظر تعداد برگ در پایان دوره ی بازیافت تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ های زنیان مشاهده نشد (جدول ۱)، اما تأثیر دماهای یخزدگی بر این صفت معنی‌دار بود. هرچند که با کاهش دما تا ۴/۵- درجه سانتیگراد تفاوت چندانی از نظر تعداد برگ مشاهده نشد ولی دماهای کمتر سبب کاهش معنی‌دار آن شدند، به طوریکه تعداد برگ در دمای ۶- و ۷/۵- درجه سانتیگراد به ترتیب ۲۳ و ۸۰ درصد کمتر از تعداد برگ در دمای صفر درجه سانتیگراد بود. جواد موسوی و همکاران (۴) نیز گزارش کردند که کاهش دماهای یخزدگی سبب کاهش تعداد برگ گیاه مینای چمنی (*Bellis perennis*) شد، بطوریکه تعداد برگ در دمای ۱۶- درجه سانتیگراد نسبت به دمای صفر درجه سانتیگراد حدود ۷۵ درصد کاهش داشت.

اکوتیپ‌های گیاه زنیان از نظر وزن خشک در پایان دوره ی بازیافت تفاوت معنی‌داری ($P<0/01$) با یکدیگر داشتند (جدول ۱) و وزن خشک دو اکوتیپ بیرجند و نیشابور به ترتیب ۵۲ و ۴۸ درصد بیشتر از اکوتیپ تربت حیدریه بود (جدول ۲). آنیکچیاریکو و همکاران (۱۸) نیز در مطالعه اثر تنش یخزدگی بر روی جمعیت‌های شبدر سفید بیان کردند که این جمعیت‌ها از نظر وزن خشک در پایان دوره بازیافت آن تفاوت معنی‌داری داشته و وزن خشک گیاهان در جمعیت های Aberherald و Grassland Huia به ترتیب ۴۱ و ۴۰ درصد کمتر از جمعیت TRI074 بود. ایشان علت اختلاف در وزن خشک جمعیت‌های مختلف گونه شبدر سفید را تفاوت در شرایط سازگار شدن هر جمعیت در محل رویش خود دانستند که علاوه بر بروز تنوع در برخی صفات مورفولوژیک، سبب تفاوت در تحمل به تنش یخزدگی نیز شده است. نظامی و همکاران (۳۹) نیز در بررسی تحمل به یخ زدگی اکوتیپ‌های زیره سبز تفاوت معنی‌داری را از لحاظ وزن خشک گیاهان در پایان دوره ی بازیافت مشاهده کردند، بطوریکه وزن خشک دو اکوتیپ خواف و تربت نسبت به رقم قائن به ترتیب ۴۴ و ۶۰ درصد کمتر بود.

در گستره ی دمائی صفر تا ۶- درجه سانتیگراد وزن خشک بوته تحت تأثیر دماهای یخزدگی قرار نگرفت، ولی کاهش دما به ۷/۵- درجه سانتیگراد سبب کاهش ۹۰ درصدی آن شد (جدول ۲). ایلس و آگنیو (۲۷) نیز در بررسی تحمل به یخزدگی گیاه دارویی (*Heuchera sanguinea* Engelm.) بیان کردند که دماهای یخزدگی تأثیر معنی داری بر وزن خشک این گیاه در پایان دوره ی بازیافت داشته و مقدار آن در دمای ۱۰- درجه سانتیگراد حدودا ۴۰ درصد کمتر از تیمار شاهد (صفر درجه سانتیگراد) بود. عزیزی و همکاران (۹) کاهش وزن خشک گیاهان در دوره ی بازیافت را ناشی از اثر خسارت یخزدگی بر گیاه و کاهش توانایی رشد مجدد اندام های هوایی آن دانسته‌اند.

اثر دماهای یخزدگی بر وزن خشک اکوتیپ‌های زنیان در جدول ۴ ارائه شده است. همانگونه که پیش از این ذکر شد در گستره ی دمایی صفر تا ۶- درجه سانتیگراد که هر سه اکوتیپ بقاء نسبتاً مناسبی داشتند (شکل ۲)، تفاوت معنی داری از نظر وزن خشک بوته مشاهده نمی‌شود، ولی کاهش دما به ۷/۵- درجه سانتیگراد به ترتیب سبب کاهش ۸۰ و ۸۲ درصدی وزن خشک در اکوتیپ بیرجند و تربت حیدریه شد، درصورتیکه در دمای مذکور گیاهان اکوتیپ نیشابور کاملاً از بین رفته بودند. با وجود این در دمای ۷/۵- درجه سانتیگراد وزن خشک گیاهان اکوتیپ بیرجند حدود ۲/۷ برابر وزن خشک گیاهان اکوتیپ تربت حیدریه بود. نتایج بررسی راشد محصل و همکاران (۴۶) بر روی اثر تنش یخزدگی بر اکوتیپ‌های رازیانه نشان داد که در دمای ۹- درجه سانتیگراد وزن خشک گیاهان اکوتیپ گناباد و اکوتیپ کرمان به ترتیب ۴۷ و ۸۰ درصد کمتر از تیمار شاهد (صفر درجه سانتیگراد) بوده است. از نظر دمای کاهنده ی ۵۰ درصد وزن خشک تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌های مورد بررسی وجود نداشت، اما به لحاظ کمّی مقدار آن در اکوتیپ بیرجند نسبت به دو اکوتیپ دیگر اندکی کمتر بود (جدول ۳).

نتایج آزمایش نشان داد که اکوتیپ‌های زنیان از نظر تحمل به یخ زدگی با یکدیگر متفاوت بودند و اکوتیپ بیرجند درصد نشت الکترولیت‌های کمتری نسبت به دو اکوتیپ نیشابور و تربت حیدریه داشت. در اکوتیپ بیرجند همچنین، منحنی نشت الکترولیت‌ها از شیب ملایمتری نسبت به دو اکوتیپ دیگر برخوردار بود که این امر نشاندهنده ی تحمل به یخزدگی بهتر اکوتیپ مذکور نسبت به دو اکوتیپ دیگر می‌باشد. همچنین گیاهان اکوتیپ بیرجند در دمای ۷/۵- درجه سانتیگراد بیش از ۵۵ درصد بقاء داشتند، در حالیکه در دو اکوتیپ نیشابور و تربت حیدریه کاهش دما به ۷/۵- درجه سانتیگراد به ترتیب سبب مرگ کامل و مرگ ۸۵ درصدی گیاهان زنیان شد. با توجه به همبستگی بالای درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء و نیز مقادیر نسبتاً مشابه LT_{50el} و LT_{50su} به نظر می‌رسد بتوان از این شاخص برای ارزیابی مراحل ابتدایی خسارت تنش یخزدگی در این گیاه استفاده کرد.

هرچند اکوتیپ‌های زنیان مورد مطالعه از نظر تحمل به یخزدگی

1- Adalayd

در شرایط کنترل شده دارای تنوع بودند، ولی با توجه به اینکه در اغلب مناطق استان خراسان در زمستان دما به کمتر از ۱۰- درجه سانتیگراد می‌رسد، انجام مطالعات بیشتر بر روی تحمل به سرمای این گیاه مفید خواهد بود.

جدول ۳- درجه حرارت کشنده ۵۰ درصد گیاهان بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el})، درصد بقاء (LT_{50su}) و دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک ($RMDT_{50}$) اکوتیپ‌های زنیان

اکوتیپ	$LT50_{el}$	LT_{50su}	$RMDT_{50}$
نیشابور	-۶/۶	-۶/۷	-۶/۵
بیرجند	-۶/۴	-۷/۸	-۶/۸
تربت حیدریه	-۶/۸	-۶/۹	-۶/۵
LSD(۰/۰۵)	۰/۵	۱/۰	۰/۸

جدول ٤- اثر دماهای یخزدگی بر وزن خشک بوته (میلی‌گرم) اکوتیپ‌های گیاه زنیان در پایان دوره بازیافت

درجه حرارت (درجه سانتیگراد)	اکوتیپ		
	نیشابور	بیرجند	تربت حیدریه
۰/۰	۲۹/۷	۲۱/۹	۹/۱
-۱/۵	۲۲/۵	۲۹/۵	۱۲/۳
-۳/۰	۲۴/۱	۲۰/۴	۱۴/۷
-۴/۵	۲۲/۱	۲۴/۵	۱۲/۹
-۶/۰	۲۰/۲	۲۹/۳	۱۰/۷
-۷/۵	۰/۰	۴/۵	۱/۷
-۹/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
-۱۰/۵	۰/۰	۰/۰	۰/۰
LSD (۰/۰۵) = ۹/۰			

منابع

۱- احمدی، م. و م. ج. بحرانی. ۱۳۸۸. تأثیر مقادیر مختلف نیتروژن بر عملکرد و اجزاء عملکرد و میزان روغن دانه ی ارقام کنجد در منطقه بوشهر. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴۸: ۱۲۳-۱۳۱.

۲- اکبری نیا، ا. ۱۳۸۰. بررسی تأثیر تاریخ کاشت بر عملکرد و خصوصیات رشد چند گیاه داروئی در دو شرایط آبیاری و بدون آبیاری. خلاصه مقالات همایش ملی گیاهان داروئی ایران. موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

۳- برومند رضازاده، ز.، پ. رضوانی مقدم، و م. ح. راشد محصل. ۱۳۸۸. اثر تاریخ کاشت و تراکم گیاهی بر خصوصیات مورفولوژیک و درصد اسانس گیاه داروئی زنیان (*Trachyspermum ammi* (Linn). Sprague). مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۴: ۱۷۲-۱۶۱.

۴- جواد موسوی، م.، س. نظامی، ا. ایزدی دربندی، ا. نظامی، م. یوسف ثانی، و ف. کیخا آخر. ۱۳۹۰. مطالعه اثرات تنش یخ زدگی بر گیاه مینای چمنی (*Bellis perennis*) در شرایط کنترل شده. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۵: ۳۸۸-۳۸۰.

۵- خواجه پور، م. ۱۳۷۸. اصول و مبانی زراعت. مرکز دانشگاهی جهاد دانشگاهی. اصفهان.

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

۷- سهیلی، ر.، ا. نظامی، ح. ر. خزاعی، و م. نصیری محلاتی. ۱۳۸۹. بررسی اثر تاریخ‌های کاشت بر عملکرد و اجزاء عملکرد چهار توده بومی زیره سبز (*Cuminum cyminum*). مجله پژوهش‌های زراعی ایران ۸: ۷۷۲-۷۸۳.

۸- سیاهمرگویی، ا.، گ. عزیزی، ا. نظامی، و م. جهانی کندری. ۱۳۹۰. بررسی تحمل به یخزدگی اکوتیپ‌های رازیانه رشد یافته در مزرعه، تحت شرایط کنترل شده. نشریه علوم باغبانی ۲۵: ۶۴-۷۲.

۹- عزیزی، ه.، ا. نظامی، م. نصیری محلاتی، و ح. ر. خزاعی. ۱۳۸۶. ارزیابی تحمل به یخزدگی ارقام گندم تحت شرایط کنترل شده. مجله

پژوهشهای زراعی ایران ۱: ۱۲۰-۱۰۹.
۱۰- عماد، م. ۱۳۷۸. شناسائی گیاهان داروئی صنعتی مرتعی و جنگلی و موارد مصرف آنها (جلد اول). انتشارات توسعه روستائی.
۱۱- میرمحمدی میبدی، ع. و س. اصفهانی. ۱۳۷۹. جنبه‌های فیزیولوژی و بهنژادی تنشهای سرما و یخزدگی گیاهان زراعی. انتشارات گلبن.
۱۲- نجفی، ف.، ع.ر. کوچکی، پ. رضوانی مقدم، و م. راستگو. ۱۳۸۸. مطالعه داروسازی مردمی گونه پونه‌سای بینالودی *Nepeta binaludensis* Jamzad، گونه‌ای نادر و در حال انقراض از ایران. فصلنامه گیاهان دارویی ۸: ۲۹-۳۵.
۱۳- نظامی، ا.، ا. برزوئی، م. جهانی کندری، م. عزیزی و ع. شریف. ۱۳۸۶. نشت الکترولیت ها به عنوان شاخصی از خسارت یخزدگی در کلزا. مجله پژوهشهای زراعی ایران ۵: ۱۷۵-۱۶۷.
۱۴- نظامی، ا.، ع. باقری، س. نجیب‌نیا، و ه. عزیزی. ۱۳۸۹. عکس‌العمل ژنوتیپهای نخود به تنش یخزدگی در شرایط آزمایشگاهی. نشریه پژوهشهای زراعی ایران ۸: ۲۳۵-۲۴۳.
۱۵- نظامی، ا.، ف. کیخا آخر، م. جواد موسوی، ا. ایزدی دربندی، س. نظامی، و م. یوسف ثانی. ۱۳۹۰. اثر تنش یخزدگی بر گیاه بنفشه (*Viola gracilis* L.) تحت شرایط آزمایشگاهی. نشریه بوم شناسی کشاورزی ۳: ۴۳۸-۴۳۰.
16- Anderson, J. A., P. Michael, and C. M. Taliaferro. 1988. Cold hardiness of Midiron and Tifgreen. Hort. Sci. 23: 748-750.
17- Anderson, N. O., and E. Gesick. 2004. Phenotypic markers for selection of winter hardy garden chrysanthemums (*Dendranthema grandiflora* Tzvelv). Sci. Hort. 101: 153–167.
18- Annicchiarico, P., R. P. Collins, F. Fornasier, and I. Rhodes. 2001. Variation in cold tolerance and spring growth among Italian white clover populations. Euphytica, 122: 407–416.
19- Annicchiarico, P., and A. Iannucci. 2007. Winter survival of pea, faba bean and white lupin cultivars in contrasting Italian locations and sowing times, and implications for selection. J. Agri. Sci. 145: 611–622.
20- Baek, K. H., and D. Z. Skinner. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. Plant Sci. 165: 1221-1227.
21- Cardona, C. A., R. R. Duncan, and O. Lindstrom. 1997. Low temperature tolerance assessment in paspalum. Crop Sci. 37: 1283-1291.
22- Eugenia, M., S. Nunes, and S. G. Ray. 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. Crop Sci. 43: 1349–1357.
23- Gersbach, P. V., and N. Reddy. 2002. Non-invasive localization of thymol accumulation in *Carum copticum* (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging. Ann. Bot. 90: 253-257.
24- Gudleifsson, B. E., C. J. Andrews, and H. Bjornsson. 1986. Cold hardiness and ice tolerance of pasture grasses grown and tested in controlled environments. Can. J. Plant Sci. 66: 601-608.
25- Hana, B., and J. C. Bischofa. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryo. Bio. 48: 8-21.
26- Herrick, T. A., and L. P. Perry. 1995. Controlled freezing of twenty-three container-grown herbaceous perennials. J. Environ. Hort. 13 (4): 190-193.
27- Iles, J. K., and N. H. Agnew. 1993. Determining cold hardiness of *Heuchera sanguinea* Engelm. 'Chatterbox' using dormant crowns. Hort. Sci. 28 (11): 1087–1088.
28- Kafi, M., M. H. Rashed Mohassel A. Koochaki, and M. Nassiri. 2006. Cumin (*Cuminum cyminum*) production and processing. Science publishers, USA. 168p.
29- Kapoor, L. D. 2001. Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC Press LLC.
30- Kim, D. C., and N. O. Anderson. 2006. Comparative analysis of laboratory freezing methods to establish cold tolerance of detached rhizomes and intact crowns in garden chrysanthemums (*Dendranthema- grandiflora* Tzvelv.). Sci. Hort. 109: 345–352.
31- Link, W., C. Balko, and F. L. Stoddard. 2008. Winter hardiness in faba bean: physiology and breeding. Field Crop Res, 115: 287-296.
32- Lyons, J. M., and J. K. Raison. 1990. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. Plant Physiol. 45:386-389.
33- Maier, F. P., N. S. Lang, and J. D. Fry. 1994. Evaluation of an electrolyte leakage technique to predict St.
34- augustine grass freezing tolerance. Hort. Sci. 29: 316–318.
35- Mckersie, B. D., and Y. Y. Leshem. 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
36- Meena, M. R., and V. Sethi. 1994. Antimicrobial activity of essential oils from spices. J. Food. Sci. Tech. Mysore, 31: 68-70.
37- Minakshi, D. E., A. K. De, A. B. Banerjee, and M. De. 1999. Screening of spices for antimicrobial activity. J. Spi. and Aroma. Crops, 8: 135-144.

38- Morteza, E. G. A., S. A. Akbari, M. Modares Sanavi, and H. Aliabadi Farahani. 2009. Effects of sowing date and planting density on quantity and quality features in valerian (*Valeriana officinalis* L.). J. Eco. Natural Environ. 1 201-205.
39- Nezami, A., E. Eyshi Rezaei, Z. Khorasani, S. Khorramdel, and M. Bannayan. 2011. Evaluation of the impacts of fall sowing dates on different ecotypes of cumin (*Cuminum cyminum*, *Apiaceae* L.) productivity in northeast of Iran. Notulae Sci. Bio. 3: 123-128.
40- Nezami, A., S. Sanjani, M. Ziaee, M. R. Soleimani, M. Nassiri-Mahallati, and M. Bannayan. 2012. Evaluation of freezing tolerance of cumin (*Cuminum cyminum* L.) under controlled conditions. Agri. Sti. Pract. 1-2: 75-84.
41- Nilsen, E. T., and D. M. Orcutt. 1996. Physiology of Plants under Stress (Abiotic Factors). John Willey and Sons. New York 683 pp.
42- Perry, L. P., and T. Herrick. 1996. Freezing date and duration effects on regrowth of three species of container-grown herbaceous perennials. J. Environ. Hort. 14: 214-216.
43- Pietsch, G. M., N. O. Anderson, and P. H. Li. 2009. Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura coccinea* and *G. drummondii*. Sci. Hort. 120: 418–425.
44- Platel, K., and K. Srinivasan, 2001.Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats. Nut. Res. 21**:** 1309-1314**.**
45- Pruthi, J. S. 2000. Minor Spices and Condiment Crop Management. Icar, New Delhi.
46- Rashed Mohassel, M. H., A. Nezami, A. R. Bagheri, K. Hajmohammadnia, and M. Bannayan. 2009. Evaluation of Freezing tolerance of two fennel *(Foeniculum vulgar* L.) ecotypes under controlled conditions. J. Herb, Species & Med. Plants, 15:131–140.
47- Shashikumar, K., and J. L. Nus. 1993. Cultivar and winter cover effects on bermudagrass cold acclimation and crown moisture content. Crop Sci. 33: 813-817.
48- Thomashow, M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. Plant Physio, 118: 1-8.
49- Warrington, I. J., and R. C. Southward. 1995. Seasonal frost tolerance of *Hebe* species and cultivars. New Z.J. Crop Hort. Sci. 23: 437-445.