

ارزیابی میزان تحمل به یخزدگی پنیرباد (*Withania coagulans* Dun) تحت شرایط کنترل شده

طیبه زندهدل^۱، ابراهیم گنجی مقدم^{۲*} و مریم تاتاری^۳

۱. دانشجوی دکتری، گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، ایران

۲. دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۳. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۳۰)

چکیده

به منظور بررسی میزان تحمل به یخزدگی گیاه پنیرباد آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و نه تیمار دمایی (صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد و تیمار شاهد ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. صفات مورد مطالعه شامل درصد نشت یونی، پایداری غشای سلولی، محتوای پرولین برگ، کلروفیل فلورسانس، درجه سبزیگی، دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس درصد بقا (LT50su) و دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس نشت الکترولیت (LT50el) بود. نتایج نشان داد اثر تنش یخزدگی بر تمامی صفات مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با افزایش تنش یخزدگی نشت یونی افزایش و پایداری غشای سلولی کاهش نشان دادند. میزان کلروفیل فلورسانس برگ با افزایش تنش کاهش یافت، به طوری که در دماهای پایین تر از ۹- درجه سانتی‌گراد به کمترین مقدار خود رسید. درجه سبزیگی تا ۶- درجه سانتی‌گراد با شیب شدید و در کمتر از آن با شیب ملایم تر کاهش یافت. بیشترین محتوای پرولین مربوط به تیمار ۶- درجه سانتی‌گراد بود که نسبت به تیمار شاهد ۵۳ درصد افزایش یافت. با کاهش دما درصد بقا کاهش یافت، به طوری که در دماهای زیر ۹- درجه سانتی‌گراد به کلی گیاهان از بین رفتند. همچنین LT50su و LT50el به ترتیب در دمای ۱۰/۱۵۳- و ۸/۹۵۸- درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد. در نهایت، یافته‌ها در این تحقیق نشان دادند که گیاه دارویی پنیرباد تنش یخزدگی ۶- درجه سانتی‌گراد را به طور قابل قبولی تحمل می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تنش، درصد بقا، کلروفیل فلورسانس.

Evaluation of freezing stress in withania (*Withania coagulans* Dun) under controlled conditions

Teyyebeh Zendedel¹, Ebrahim Ganji Moghadam^{2*} and Maryam Tatari³

1. Ph.D. Candidate, Department of Agricultural, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Iran

2. Associate Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Khorasan Razavi Agricultural Resources Research and Education Center, Mashhad, Iran

3. Assistant Professor, Department of Agricultural, Shirvan, Branch, Islamic Azad University, Iran

(Received: Jan. 30, 2019- Accepted: May 20, 2019)

ABSTRACT

In order to investigate freezing tolerance in withania under controlled conditions, a completely randomized design was carried out with four replications and nine temperature treatments (0, -3, -6, -9, -12, -15, -18, -21 °C and control treatment 25°C). Studied traits included electrolyte leakage, cell membrane stability, proline content, chlorophyll fluorescence, chlorophyll degree, 50% lethal temperature based on survival (LT50su) and 50% lethal temperature based on electrolyte leakage (LT50el). Results showed that the effect of freezing stress on all traits was significant at a probability of one percent. Electrolyte leakage showed increased and cell membrane stability decreased. The leaf chlorophyll fluorescence decreased with increasing freezing stress, so that it reached its lowest point at temperatures below -9°C. Chlorophyll content index was also affected by the effect of freezing stress, which decreased at a steep slope of 0 to -6°C and lowered to -6 °C with lower slope. The highest content of proline was related to treatment at -6°C, which increased by 53% compared to control treatment. By decreasing the temperature, the survival rate decreased, so that the plants disappeared at temperatures below -9°C. Also, LT50el and LT50su occurred at temperatures of -10.153 and -8.958°C, respectively. Finally, the findings in this study showed that the medicinal plants withania can be tolerate at -6°C.

Keywords: Chlorophyll fluorescence, proline, stress, survival percentage.

* Corresponding author E-mail: eganji@hotmail.com

مقدمه

گیاه دارویی پنیرباد، گیاهی یکساله با نام علمی *Withania coagulans* متعلق به خانواده سیب زمینی (*solanaceae*) و یکی از گونه‌های موجود بلوچستان می‌باشد. در جنس پنیرباد، ۲۳ گونه گیاهی وجود دارد که دو گونه آن شامل *W. somnifera* و *W. coagulans* Negi *et al.*, 2000; Panwar & Tarafdar, 2006). متأسفانه طی سال‌های اخیر به دلیل بهره برداری نامناسب و شرایط سخت اکولوژیکی از قبیل خشکسالی‌های ممتد استان، جمعیت آن از نظر اندازه رو به کاهش بوده و احتمال انقراض آن‌ها وجود دارد (Valizadeh & Valizadeh, 2009).

خواص دارویی این گیاه بدلیل حضور گروهی از لاکتون‌های استروئیدی معروف به ویتانولوئیدهای موجود در برگ و ریشه آن می‌باشد. ویتافرین A موجود در گیاه پنیرباد عامل ضدتومور است و دارای خاصیت ضدباکتریایی نیز می‌باشد (Gharemani *et al.*, 2020). داروی این گیاه ویژگی‌های بسیاری دارد که به سیستم عصبی مربوط می‌شود. ریشه‌ها داروهای مهمی را به بار می‌آورند که برای همه‌ی انواع ضایعات پوستی، شرایط فلج، زخم‌ها، در کاهش تشکیل چرک، التهاب و درد روماتیسمی مفصل مفید هستند (Kumari, 2014).

در مناطق معتدله‌ای که گیاهان در معرض انواع تنش‌های زمستانه به ویژه تنش یخ‌زدگی قرار می‌گیرند، بررسی سریع و مؤثر تحمل به یخ‌زدگی گیاهان بسیار ضروری و غیرقابل اجتناب می‌باشد (Amirghasemi, 2003).

تنش انجماد اغلب توزیع بسیاری از گونه‌های گیاهی را محدود می‌کند (Cavender-Bares, 2007). در طول یک دوره از دماهای پایین اما غیرانجماد در یک فرآیندی به نام سازگاری سرما گیاهان می‌توانند توانایی خود را در برابر دماهای یخ‌زدگی افزایش دهند (Maleki *et al.*, 2018). سازگاری به سرما یک فرایند پیچیده با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان، از جمله تغییرات در ترکیب لیپید غشا، افزایش قندهای محلول و آمینو اسید، تولید و تجمع آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تغییرات در میزان هورمون‌ها می‌باشد (Hao *et al.*, 2009).

یکی از راه‌های ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی اندازه‌گیری میزان پرولین می‌باشد. پرولین از جمله ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم است (Nezami *et al.*, 2011) که نقش‌های مختلفی در گیاه ایفا می‌کند مانند تنظیم فشار اسمزی، حفظ یکپارچگی غشا، تعادل بین آنزیم و پروتئین، برقراری نسبت مناسب NADP+/NADPH و پاکسازی رادیکال‌های آزاد (Ashraf & Foolad, 2007). کلروفیل فلورسانس به طور معمول برای ارزیابی واکنش گونه‌های گیاهی به تنش‌هایی مانند یخ‌زدگی، شوری و خشکی استفاده می‌شود. کلروفیل فلورسانس یک شاخص تهییج انرژی در ساختارهای فتوسنتزی برگ و سیستم تشخیص سریع و غیر مخرب برای تعیین مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی است (Percival & Henderson, 2003).

با بررسی اثر تنش سرما بر گیاه دارویی- زینتی بنفشه (*Viola gracilis*) در شرایط کنترل شده با ۱۲ تیمار سرمایی و با کاهش دما تا ۲۲- درجه سانتیگراد نشان دادند با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) افزایش یافت به طوری که در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به حداکثر رسید (Nezami *et al.*, 2011). در بررسی تنش یخ‌زدگی آبی در گیاه *Helianthus tuberosus* L. مشاهده کردند که با افزایش دمای یخ‌زدگی، درصد نشت الکترولیت‌ها نیز به صورت سیگموئیدی افزایش یافت (Umura & Yoshida, 1986). در خصوص نیازهای اکولوژیکی گونه پنیرباد در ایران تحقیقات محدودی انجام شده است. از سوی دیگر، با توجه به اینکه بررسی نیازهای اکولوژیکی گونه *W. coagulans* یکی از راهکارهای اساسی در اهلی کردن و کشت این گونه در سایر نقاط کشور می‌باشد، از این رو ضروری به نظر می‌رسد تا خصوصیات این گونه بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش یافتن آستانه تحمل به سرمای این گیاه دارویی با ارزش است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در شهریور سال ۱۳۹۵ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی انجام شد. در

آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده قرار داده شد، سپس یکسری از نمونه‌ها در دستگاه بن ماری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و پس از این زمان هدایت الکتریکی نمونه‌ها به کمک دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. سری دوم از لوله آزمایش را نیز به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از سرد شدن، هدایت الکتریکی آن‌ها اندازه‌گیری شد و در نهایت از روش Sairam & Srivastava (2001) استفاده شد. کلروفیل فلورسانس و پارامترهای آن توسط دستگاه فلورسانس متر (Opti-Sciences) ساخت امریکا اندازه‌گیری شد. درجه سبزیگی توسط دستگاه کلروفیل متر (SPAD-502) محاسبه گردید. برای این منظور از ۳ برگ کاملاً رشد یافته بر روی گیاه اندازه‌گیری انجام و میانگین آن برای هر تکرار در نظر گرفته شد. جهت تعیین درصد بقاء و بازیافت گیاهان، گلدان‌ها به شاسی سرد (فضای آزاد در اوایل مهر ماه) انتقال یافته و پس از سه هفته درصد بقای گیاهان از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان تعیین شد (Cardona *et al.*, 1997).

تجزیه واریانس داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری MSTAT-C انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزارهای Excel 2010 استفاده شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش یخ‌زدگی بر تمامی صفات مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشت (جدول ۱).

درصد نشت یونی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنش یخ‌زدگی، تأثیر معنی‌داری بر درصد نشت یونی داشت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که درصد نشت یونی تحت تأثیر تنش یخ‌زدگی افزایش یافت، بیشترین (۸۶/۲۰ درصد) و کمترین (۱۱/۹۱ درصد) درصد نشت یونی در تیمار دمایی ۱۸- درجه سانتی‌گراد و شاهد مشاهده شد (شکل ۱).

مجموع ۳۶ واحد آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت که برای هر واحد آزمایشی یک گلدان در نظر گرفته شد. گلدان‌های مورد استفاده با حجم یک لیتر با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر تهیه و از بستر کوکوپیت+ پرلایت استفاده شد. بذره‌های مورد استفاده در آزمایش، از رویشگاه‌های طبیعی گیاه پنیرباد در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری و به مشهد منتقل شد. جهت کشت، در هر گلدان ۱۰ عدد بذر کشت شد. عمق کاشت ۱ سانتی‌متر از سطح خاک در نظر گرفته شد که برای تمامی گلدان‌ها یکسان بود. جهت رسیدن به تراکم یکسان در مرحله ۴ برگی گیاه در بین گیاهان موجود در گلدان تعداد سه گیاه قوی نگهداری و باقی‌مانده گیاهان از سطح خاک توسط قیچی حذف شد. گلدان‌ها در محیط کنترل شده گلخانه نگهداری و آبیاری هر چهار روز یک بار انجام شد. کود مورد نیاز گیاه از طریق محلول پاشی کود مایع در بازه زمانی ۱۵ روز یک بار توسط کود مایع NPK تجاری در تمام گلدان‌ها به طور یکنواخت صورت گرفت.

جهت اعمال تنش یخ‌زدگی زمانی که گیاهان در مرحله ۶ برگی بودند، گلدان‌ها از گلخانه به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از اتیکت‌گذاری نمونه‌ها در فریزر ترموگرادین قرار گرفتند. دمای فریزر در شروع آزمایش دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) در نظر گرفته شد. سپس 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 به ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Murray *et al.*, 1988). به منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهان را در هر کدام از دماهای مورد نظر به مدت یک ساعت نگه داشته و سپس از فریزر خارج و اندازه‌گیری‌ها انجام شد.

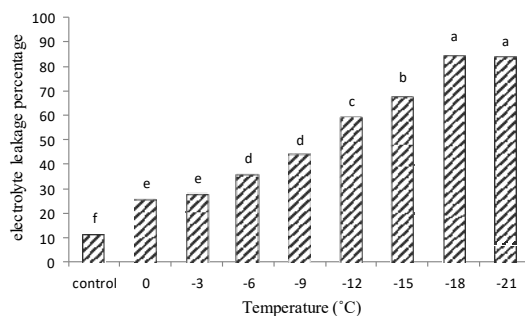
برای استخراج و سنجش پرولین از روش Bates *et al.* (1973) و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین در محلول محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری نشت یونی از روش Barranco *et al.* (2005) و برای اندازه‌گیری میزان پایداری غشای سلولی از هر گلدان دو برگ جوان توسعه یافته انتخاب شد. سپس ۰/۱ گرم برگ را وزن کرده و داخل دو سری لوله‌های

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر تنش یخزدگی بر برخی از صفات فیزیولوژیکی گیاه پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.)
Table 1. Results of variance analysis of the effect of freezing stress on some physicochemical characteristics of *Withania* plant (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.)

Sources of variation	df	Means of squares					
		Electrolyte leakage	Cell membrane stability	Proline content	Chlorophyll fluorescence	Chlorophyll degree	Survival percentage
Freez stress	8	2817.95**	1791.287**	4.93**	0.32**	329.89**	6754.92**
Error	27	15.83	19.12	0.019	0.001	9.51	106.15
C.V (%)	-	8.01	8.71	8.45	13.12	8.99	25.07

***, **, * ns: به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

***, *, ns: Significantly difference at 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر تنش یخزدگی بر درصد نشت یونی برگ پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.)
Figure 1. Mean comparison effect of freezing stress on electrolyte leakage of *Withania* leaf (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.).

پایداری غشای سلولی (۲۸/۸۳ درصد) در تیمار درجه حرارت ۲۱- مشاهده شد. به طور کلی با کاهش درجه حرارت از صفر تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد پایداری غشای سلولی کاهش یافت (شکل ۲).

کاهش آماس سلولی و افزایش نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی به دنبال بروز تنش یخزدگی، نقش غشای سلولی را در حفاظت گیاه از خسارت تنش سرما به خوبی نشان داده است و در همین خصوص قوی‌ترین تئوری شده در مورد اثر تنش یخزدگی، تئوری خسارت غشای سلولی می‌باشد (Nezami *et al.*, 2007). مطالعات Li *et al.* (2008) نتایج بررسی حاضر را تایید می‌نماید.

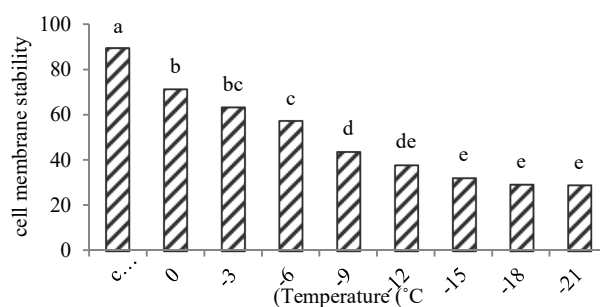
محتوای پرولین برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای مختلف تنش یخزدگی، اثر معنی‌داری بر محتوای پرولین برگ داشت (جدول ۱). بیشترین محتوای پرولین برگ (۳/۴۹ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار ۶- درجه سانتی‌گراد که نسبت به شاهد (۱/۶۲ میکرومول بر گرم وزن تر) ۵۳ درصد افزایش نشان داد. در این بین کمترین میزان پرولین برگ (۰/۴۱ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۳).

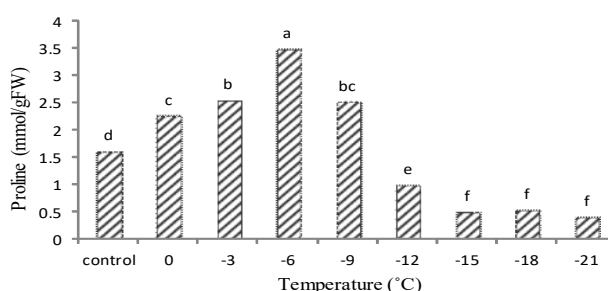
محققان اظهار داشتند که اختلال در ساختار و فعالیت غشاهای سلولی در اثر تنش سرما، سبب نشت الکترولیت‌ها از سلول شده است (Hana & Bischofa, 2004). غشاهای سلولی یکی از اهداف بیشتر آسیب‌های گیاهی هستند و به طور کلی پذیرفته شده است که حفظ صحیح و پایداری آنها در شرایط تنش جزء اصلی تحمل تنش در گیاهان است. میزان آسیب غشای سلولی ناشی از تنش زیستی، به راحتی با اندازه‌گیری نشت الکترولیتی سلول برآورد می‌شود. اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها یکی از روش‌هایی است که اغلب برای ارزیابی مقاومت گیاه در پاسخ به خشکسالی و دمای پایین استفاده می‌شود (Davik *et al.*, 2013). نتایج مشابه توسط Maleki *et al.* (2018)، Borumand Reza Zadeh *et al.* (2014)، Kheir khah *et al.* (2014) و Khorsandiet *al.* (2013) بر روی گیاهان دارویی آویشن، زنیان، نعنای فلفلی و سیاهدانه گزارش شده است.

پایداری غشای سلولی

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین پایداری غشای سلولی (۸۸/۹۸ درصد) در تیمار شاهد و کمترین



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر تنش یخ‌زدگی بر پایداری غشای سلولی برگ پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).
Figure 2. Mean comparison effect of freezing stress on cell membrane stability of *Withania* leaf (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر تنش یخ‌زدگی بر محتوی پرولین برگ پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).
Figure 3. Mean comparison effect of freezing stress on proline content of *Withania* leaf (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).

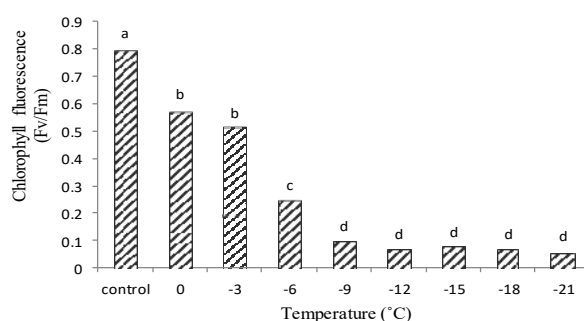
تنش یخ‌زدگی قرار گرفت (جدول ۱). به طور کلی با کاهش درجه حرارت یخ‌زدگی تا -۶ درجه سانتی‌گراد میزان کلروفیل فلورسانس کاهش یافت و از تیمار دمایی -۹ تا -۲۱ درجه سانتی‌گراد این میزان ثابت و از لحاظ آماری اختلافی مشاهده نشد (شکل ۴).

این واقعیت بدین معناست که دمای -۶ درجه سانتی‌گراد، آسیب قابل توجهی به ساختارهای فتوسنتتیک گیاهان وارد کرده و کاهش بیشتر دما در بازه دمایی -۹ تا -۲۱ درجه سانتی‌گراد نقشی در تخریب بیشتر این ساختارها نداشته است. Oliveira & Penuelas (2000) نشان دادند که در گیاهان نواحی مدیترانه، در شرایط زمستان، با تخریب کمپلکس‌های فتوسیستم II فرآیند بازدارندگی نوری رخ داده و مقدار این بازدارندگی در روزهای سردتر افزایش یافته که همین امر باعث کاهش شاخص Fv/Fm می‌شود. نتایج مشابه توسط Behandari et al. (2018) و Dashti et al. (2016) در گیاه دارویی فلفل قرمز و نوروک گزارش شده است.

تحقیقات نشان داده است که دمای پایین باعث القای تغییرات زیادی در ترکیبات سلولی مانند تغییر در ترکیبات پروتئینی، پرولین و کربوهیدرات‌ها می‌شود. تجمع پرولین که به علت کاهش تبدیل پرولین به پروتئین که ناشی از تخریب پروتئین سینتتاز است منجر به افزایش پرولین می‌شود که در نتیجه باعث کاهش رشد می‌شود (Ashraf & Foolad, 2007). افزایش میزان پرولین در دمای -۶ درجه سانتی‌گراد نشان دهنده مقاومت گیاه پنیرباد در برابر خسارت اکسیداتیو و رادیکال آزاد می‌باشد. گزارشات متعددی نیز مبنی بر تغییر محتوای پرولین بعد از تطابق به سرما توسط Nathalie, (2006) Chen et al. (2018), Maleki et al. (2009) و Hanim & Christian (2008), Asghari et al. (2009) و Nesrin & (2009) بر روی گیاه آویشن، گیاهان جنگلی همیشه سبز، گیاهان آلپ و انار ارایه شده است.

کلروفیل فلورسانس

کلروفیل فلورسانس به طور معنی‌داری تحت تأثیر



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر تنش یخزدگی بر میزان کلروفیل فلورسانس برگ پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).

Figure 4. Mean comparison effect of freezing stress on chlorophyll fluorescence of *Withania* leaf (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).

کاهش یافت در این بین اختلاف آماری بین شاهد و تیمار صفر مشاهده نشد (شکل ۶).

کامبود آب مهم ترین تنشی است که سلول‌های یخ زده از آن رنج می‌برند (Wisniewski *et al.*, 2003). به طور کلی با کاهش درجه حرارت درصد بقا کاهش یافت. با وجود دستیابی این نتایج، نکته قابل ذکر این است که در گیاه پنیرباد رشد مجدد گیاه پس از تنش یخزدگی از ناحیه ساقه آغاز می‌شود و ساقه و میزان مقاومت آن به تنش سرما نقش بسزایی در بقای گیاه دارد. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام ساقه به عنوان شاخصی از تحمل این گیاه به یخزدگی اعتبار بیشتری داشته باشد. مطالعات Maleki *et al.* (2018)، Rezvan Beydokhti *et al.* (2011)، Kheir (2014) و Rashed Mohasel *et al.* (2009) نتایج بررسی حاضر را تایید می‌نماید.

دمای ۵۰ درصد کشندگی براساس نشت الکترولیت‌ها (LT50el)

میزان دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها (eLT50) از طریق رسم نمودار درصد نشت الکترولیت‌ها در مقابل دماهای یخ زدگی تعیین شد که این میزان ۱۰/۱۵۳- درجه سانتی‌گراد محاسبه گردید (شکل ۷).

در این پژوهش با وجود اینکه دمای ۱۰/۱- درجه سانتی‌گراد سبب خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌های برگ شد اما ۵۰ درصد تلفات گیاه پنیرباد در دمای پایین‌تر (۸/۹- درجه سانتی‌گراد) رخ داد. این موضوع نشان‌دهنده سودمندی و امکان جایگزینی هر یک از این شاخص‌ها در ارزیابی تحمل به یخزدگی گیاه پنیرباد است.

Ibrahim & Bafeel (2008) اعلام نمودند

اندازه‌گیری پارامتر Fv/Fm در شرایط تاریکی یک روش سریع برای نشان دادن میزان حساسیت به سرما در اغلب گیاهان است و در حالت انطباق با تاریکی پارامتر Fv/Fm نشان دهنده حداکثر کارایی کوانتوم فتوسنتز II بوده و شاخص مهمی برای عملکرد فتوسنتزی گیاه می‌باشد.

درجه سبزیگی

تنش یخزدگی، تأثیر معنی‌داری بر درجه سبزیگی داشت (جدول ۱). با کاهش درجه حرارت میزان درجه سبزیگی کاهش یافت. بیشترین (SPAD ۵۰/۶۲) و کمترین درجه سبزیگی (SPAD ۲۱/۰۰) در تیمار شاهد و تیمار دمایی ۲۱- مشاهده شد. در این بین تیمار دمایی صفر با شاهد اختلاف آماری نداشت (شکل ۵).

با کاهش درجه حرارت میزان درجه سبزیگی کاهش یافت همان‌طور که فتوسنتز تحت تنش سرما کاهش می‌یابد، احیا شدن بیش از حد زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی منجر به تشکیل ROS شده که ممکن است آسیب اکسیداتیو ایجاد کند. Modhan *et al.* (2000) بیان کردند که پایداری کلروفیل، شاخصی از مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی است.

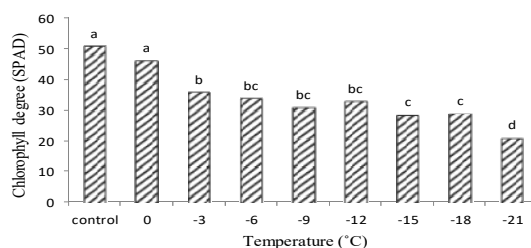
درصد بقا

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای مختلف تنش یخزدگی، اثر معنی‌داری بر درصد بقا داشت (جدول ۱). بیشترین درصد بقا (۱۰۰ درصد) در شاهد و کمترین درصد بقا (۰ درصد) در تیمارهای کمتر از ۱۲- مشاهده شد. با کاهش درجه حرارت درصد بقا

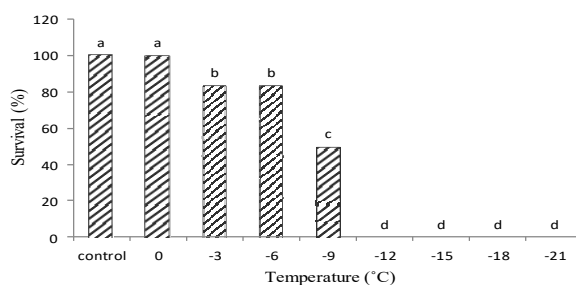
استفاده شده است (Eugenia et al., 2003). در بررسی حاضر نیز به دلیل محدودیت در تعداد گیاه، جهت اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها فقط از برگ‌ها استفاده شد.

دمای ۵۰ درصد کشندگی براساس درصد بقا (LT50su)
میزان دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها براساس درصد بقا (LT50su) از طریق رسم نمودار درصد بقا در مقابل دماهای یخ زدگی تعیین شد که این میزان ۸/۹۵- درجه سانتی‌گراد محاسبه گردید (شکل ۸). با وجود دستیابی این نتایج نکته قابل ذکر این است که در گیاه پنبیرباد رشد مجدد گیاه پس از تنش یخ‌زدگی از ناحیه ساقه آغاز می‌شود و ساقه و میزان مقاومت آن به تنش سرما نقش بسزایی در بقای گیاه دارد. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام ساقه به عنوان شاخصی از تحمل این گیاه به یخ‌زدگی اعتبار بیشتری داشته باشد. مطالعات (1997) Cardona et al.، Beydokhti et al. (2011)، (2014) Kheir khah et al. و Nezhami et al. (2011) بر روی گیاهان پاسپالوم، موسیر، نعناع و رازیانه نتایج بررسی حاضر را تایید می‌نماید.

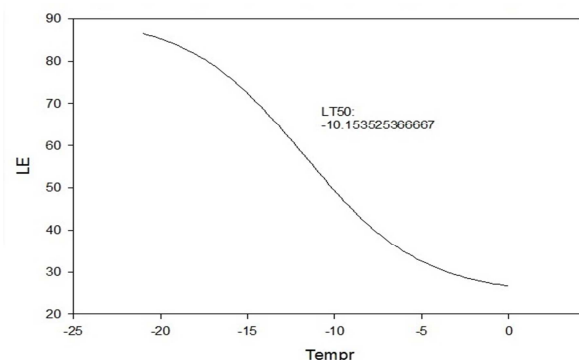
در مطالعه حاضر نیز جهت ارزیابی میزان نشت الکترولیت‌ها از برگ گیاهان استفاده شد و بقای گیاهان پس از سه هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله و با وجود اینکه نشت ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از سلول‌های برگ گیاهان مورد بررسی در دمای ۱۵/۲- درجه سانتی‌گراد حادث شده است ولی مرگ ۵۰ درصد گیاهان از دمای ۱۷- درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاده است و لذا به نظر می‌رسد که در استفاده از شاخص LT50el می‌بایست به چند نکته توجه داشت. اول اینکه نشت ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی غیر مؤثر در بقای گیاه (مثلا برگ‌ها در مقایسه با ساقه گیاه) الزاما به معنی ۵۰ درصد مرگ گیاهان نمی‌باشد و دوم اینکه جهت استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها احتمالا استفاده از بافت‌های گیاهی مؤثر در بقای گیاه و یا استفاده از کل گیاه در تعیین میزان نشت مؤثر تر خواهد بود. البته مورد اخیر در خصوص گیاهچه‌ها و خصوصا در مواردی که بذر و یا نمونه گیاهی به اندازه کافی در دسترس باشد، قابل استفاده است و گرنه در غیر این صورت استفاده از برگ‌های گیاهان غیر قابل اجتناب خواهد بود. به همین دلیل در بررسی محققان دیگر نیز مشاهده می‌شود که جهت اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از برگ گیاهان



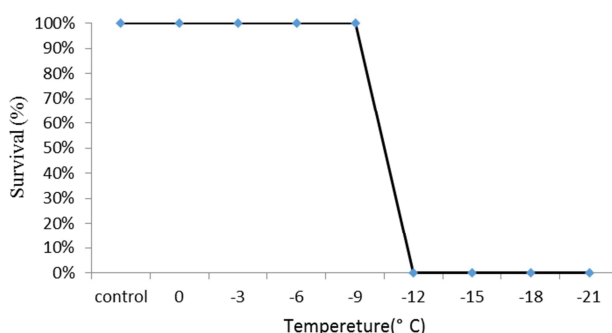
شکل ۵. مقایسه میانگین اثر تنش یخ‌زدگی بر درجه سبزیگی پنبیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).
Figure 5. . Mean comparison effect of freezing stress on chlorophyll degree of *Withania* (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر تنش یخ‌زدگی بر درصد بقا پنبیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).
Figure 6. Mean comparison effect of freezing stress on survival rate of *Withania* (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).



شکل ۷. دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها براساس نشت الکترولیت‌های پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).
Figure 7. Lethal temperature for 50% of samples based on electrolytes leakage of *Withania coagulans* (Stocks) Dun).



شکل ۸. دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها براساس بقا پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun).
Figure 8. Lethal temperature for 50% of samples based on survival percentage of *Withania coagulans* (Stocks) Dun).

به طور شدیدی افزایش یافت، در صورتی که درصد بقاء در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد به طور جدی تحت تأثیر قرار نگرفت و دماهای کمتر از آن باعث افزایش تلفات گیاهی شد. با وجود تحمل نسبی گیاه به دماهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده، تحقیقات بیشتر در خصوص ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی این گیاه در شرایط طبیعی و تعیین همبستگی صفات مورد مطالعه در مزرعه در مقایسه با شرایط کنترل شده ضروریست.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی تنش یخ‌زدگی سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها و محتوای پرولین در سطح برگ شد و همچنین باعث کاهش پایداری غشای سلولی، درصد بقاء، کلروفیل فلورسانس و درجه سبزیگی در گیاه پنیرباد شد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که گیاه پنیرباد توانایی تحمل به تنش یخ‌زدگی تا ۶- درجه سانتی‌گراد را به خوبی دارا می‌باشد. درصد نشت الکترولیت‌ها از دماهای کمتر از ۹- درجه سانتی‌گراد

REFERENCES

1. Amirghasemi, T. (2003). *Frosting of plants (frost, injuries, prevention)* (1th ed.). Ayndangan House. (In Farsi).
2. Asghari, B., Rehman, A. & Matthias, W. (2009). Altitudinal variation in the content of protein, proline, sugar and ABA in the Alpine herbs from Hunza Valley, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4), 1593-1602.
3. Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.

4. Barranco, D., Ruiz, N. & Gomez-del-Campo, M. (2005). Frost tolerance of eight olive cultivars. *Horticultural Science*, 40, 558-560.
5. Bates, L. S., Walden, R. P. & Teave, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-208.
6. Behandari, S. R., YongHyeon, K. & JunGu, L., (2018). Detection of temperature stress using chlorophyll fluorescence parameters and stress-related chlorophyll and proline content in paprika (*Capsicum annum L.*) seedlings. *Horticultural Science and Technology*, 36 (5), 619-629.
7. Borumand Reza Zadeh, Z., Nezami, A. & Nezami, S. (2014). Evaluation of Freezing Tolerance of Three Ajowan (*Trachyspermum ammi L.* Sprague) Ecotypes in Controlled Conditions. *Iranian Journal of field crops*, 11(1), 121-130. (In Farsi).
8. Cardona, C. A., Duncan, R R. & Lindstorm, O. (1997). Low temperature tolerance assessment in paspalum. *Crop Science*, 37, 1283-1291.
9. Cavender-Bares, J. (2007). Chilling and freezing stress in live oaks (*Quercus* section Virentes): intraand interspecific variation in PS II sensitivity corresponds to latitude of origin. *Photosynthesis Research*, 94 (2-3), 437-453.
10. Chen, Y., Zhang, M., Chen, T. Zhang, Y. & L, A. n. (2006). The aelationship between seasonal changes in Anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of sabina. *South African Journal of Botany*, 72 (2), 272-279.
11. Dashti, M., Kafi, M., Tavakoli, H., Mirza, M. & Nezami, A. (2016). Effects of freezing stress on Morpho-physiological indices and chlorophyll fluorescence of *Salvia leriifolia* Benth. in seedling stage. *Journal of Plant research. Iranian Journal of Biology*, 28(5), 962-973. (In Farsi).
12. Davik, J., Koehler, G., From, B., Torp, T., Rohloff, J., Eidem, P., Wilson, R. C., Sønsteby, A., Randall, S. K. & Alsheikh, M. (2013). Dehydrin, alcohol dehydrogenase, and central metabolite levels are associated with cold tolerance in diploid strawberry (*Fragaria spp.*). *Planta*, 237(1), 265-277.
13. Eugenia, M., Nunes, S. & Ray Smith, G. (2003). Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in Rose Clover. *Crop Science*, 43, 1349-1357.
14. Ghahremani, A., Ganji moghaddam, E., Tatari, M. & Khosroyar, S. (2020). Effect of type and concentration of growth regulators on the proliferation and marcotting of *Withania coagulans* medical plant. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 51(2), 287-294. (In Farsi).
15. Hana, B. & Bischofa, J. C. (2004). Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobio*, 48, 8-21.
16. Hanim, H. & Nesrin, Y. (2009). Does climate change have an effect on proline accumulation in pomegranate (*Punica granatum L.*) fruits. *Scientific Research and Essay*, 4(12), 1543-1546.
17. Hao, W., Arora R., Yadav, A. K. & Joshee N. (2009). Freezing tolerance and cold acclimation in guava (*Psidium guajava L.*). *HortScience*, 44(5), 1258-1266.
18. Ibrahim, M. M. & Bafeel, S. O. (2008). Photosynthetic efficiency and pigment contents in alfalfa seedling subjected to dark and chilling condition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(3), 306-310.
19. Kheir khah, T., Nezami, A., Kafi, M. & Asadi, GH. (2014). Evaluation of cold tolerance in field grown mentha (*Mentha piperita L.*) under laboratory conditions by electrolyte leakage test. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 13(2), 269-277. (In Farsi).
20. Khorsandi, t., Nezami. A., Kafi. M. & Goldani, M. (2013). Effects of spring late frost on black seed (*Nigella sativa L.*) under controlled conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12, 665-676. (In Farsi).
21. Li, H., Qiang, S. & Qian, Y. (2008). Physiological response of different croftonweed (*Eupatorium adenophorum*) populations to low temperature. *Weed Science*, 56, 196-202.
22. Maleki, H., Zakizade, H., Hamidoghli, Y., Biglui, M. & Chamani, E. (2018). Ornamental potential and freezing tolerance of six *Thymus* spp. species as ground-covering plants in the landscape. *Zemdirbyste-Agriculture*, 105, 79-88.
23. Modhan, M. M., Narayanan, S. L. & Ibrahim, S. M. (2000). Chlorophyll stability indexes (CSI): its impacts on salt tolerance in rice. *International Rice Research. Notes*, 25(2), 38-40.
24. Murray, G. A., Eser, D., Gusta, L. V. & Eteve, G. (1988). Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In: Summerfield R.J., (Ed), *World crops: Cool Season Food Legumes*. (pp. 831-843.) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
25. Nathalie, V. & Christian, H. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35, 753-759.
26. Negi, M. S., Singh, A. & Lakshmikumaran, M. (2000). Genetic variation and relationship among and within *Withania* species as revealed by AFLP markers. *Genome*, 43(6), 975-980.
27. Nezami, A., Haj Mohamadniya Ghali Baf, K. & Kamandi, A. (2011). Evaluation of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) To freezing tolerance under controlled conditions. *Environmental Stresses in Crap Sciences*, 3(2), 177-187. (In Farsi).

28. Oliveira, G. & Penuelas, J. (2000). Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica*, 21, 97-107.
29. Panwar, J. & Tarafdar, J. C. (2006). Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments*, 65(3), 337-350.
30. Percival, G. & Henderson, A. (2003). An assessment of the freezing tolerance of urban trees using chlorophyll fluorescence. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 254-260.
31. Rashed Mohasel, M. H., Nezami, A., Bagheri, A., Hajmohammadnia, K. & Bannayan, M. (2009). Evaluation of freezing tolerance of two fennel (*Foeniculum vulgare* L.) ecotypes under controlled conditions. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 15, 131-140.
32. Rezvan Beydokhti, S., Nezami, A., Kafi, M. & Khazaei, R. (2011). Effects of freezing stress on electrolyte leakage of persian shallot (*Allium altissimum* Regel.) under controlled conditions. *Agroecology*, 3(3), 371-382. (In Farsi)
33. Sairam, R.K. & Srivastava, G.C. (2001). Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. *Journal Agronomy and Crop Science*, 186, 63-70.
34. Valizadeh, J. & Valizadeh, M. (2009). *In vitro* callus induction and plant regeneration from *Withania coagulans*: a valuable medicinal plant. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(2), 1415-1419.
35. Wisniewski, M., Carole, B. & Gusta, L.V. (2003). An overview of cold hardiness in woody plants: seeing the forest through the trees. *Horticultural Science*, 38, 952-959.