

## بررسی تحمل به یخزدگی در باقلا (*Vicia faba* L.) با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها

علیرضا حسن فرد<sup>۱</sup>، احمد نظامی<sup>۲\*</sup>، محمد کافی<sup>۲</sup> و جعفر نباتی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده

کشاورزی و پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۳. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۹)

### چکیده

کشت پاییزه گیاهان سرمادوست منجر به بهبود عملکرد آن‌ها می‌شود، با وجود این در زمینه تحمل به سرمای توده‌های باقلای بومی برای کشت پاییزه اطلاعات اندکی در دسترس است. به این منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار در شرایط کنترل شده در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد و در آن گیاهچه‌های دو توده باقلا (بروجرد و نیشابور) در مرحله چهار تا شش برگی، در معرض دماهای یخزدگی (۰، -۴، -۸، -۱۲، -۱۶، -۲۰، -۲۴) درجه سلسیوس) قرار داده شدند. با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها در هر دو اندام برگ، ساقه و بافت مریستم زاتاک افزایش یافت، اما در برگ و بافت مریستم کاهش دما تا ۱۲- درجه سلسیوس تأثیر چندانی بر میزان نشت الکترولیت‌ها نداشت و با کاهش بیشتر دما، درصد آن افزایش یافت و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به بیشینه رسید. در هر دو توده بروجرد و نیشابور بالاترین  $LT_{50el}$  را اندام ساقه (به ترتیب ۱۲/۹- و ۱۲/۱- درجه سلسیوس) داشت، در صورتی که دمای کشنده بر پایه ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ توده‌های بروجرد و نیشابور به ترتیب ۱۶/۷- و ۱۵/۶- درجه سلسیوس و در بافت مریستم آن‌ها به ترتیب ۱۶/۰- و ۱۶/۸- درجه سلسیوس بود. بین درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه باقلا با درصد بقاء همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد، دو اندام برگ و ساقه توده نیشابور، در  $LT_{50su}$  همسان با توده بروجرد (۱۳/۶- درجه سلسیوس) درصد نشت الکترولیت‌های بیشتری داشتند، در حالی که در شرایط یادشده در توده بروجرد، درصد نشت الکترولیت‌ها از بافت مریستم بیشتر بود. نتایج کلی این آزمایش نشان داد، دو توده باقلا بروجرد و نیشابور توانایی تحمل به دماهای یخزدگی تا ۱۲- درجه سلسیوس را در شرایط کنترل شده دارند.

واژه‌های کلیدی: بقاء، خوسرمایی، دمای ۵۰ درصد کشندگی گیاهان، ساقه، مریستم.

## Evaluation of freezing tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.) using electrolytes leakage index

Alireza Hasanfard<sup>1</sup>, Ahmad Nezami<sup>2\*</sup>, Mohammad Kafi<sup>2</sup>, Jafar Nabati<sup>3</sup>

1. M.Sc. student agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, 2. Professor in Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, 3. Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad.  
(Received: May 16, 2017- Accepted: July 10, 2017)

### ABSTRACT

Autumn planting leads to improve the yield of cool season crops, however there is little information about the cold tolerance in Iranian faba bean landraces for autumn planting. For this purpose a study was conducted as factorial, based on completely randomized design with four replications under controlled conditions and two faba bean landraces (Boroujerd and Neyshabour) exposed to freezing temperatures (0, -4, -8, -12, -16, -20, -24°C) in the fall and winter of 2015 at Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad. Results showed that decreasing temperature leads to the increasing EL% in all organs, however decreasing temperature hadn't significant effect on EL% up to -12°C in leaf and meristem and EL% increased with reducing the temperature to reached to the maximum in -20°C. While in stem EL% increasing was started from -8°C and reached to the maximum in -16°C. In both of Boroujerd and Neyshabour landraces, stem had the highest  $LT_{50el}$  (-12.9 and -12.1, respectively), while it was -16.7 and -15.6°C in leaf and -16.0 and -16.8°C in meristem of two mention landraces, respectively. Although there was negative and significant correlation between the EL% of faba bean organs with  $SU\%$ , but leaf and stem in Neyshabour landrace in similar  $LT_{50su}$  with Boroujerd landrace (-13.6°C) had more EL%, while it was further in the meristem of Boroujerd landrace. Two faba bean landraces showed ability to tolerate freezing temperatures up to -12°C in controlled conditions.

**Keywords:** Cold acclimation, lethal temperature 50% of plants, meristem, stem, survival.

1. Lethal temperature 50% of plants according to the electrolytes leakage percentage  
2. Lethal temperature 50% of plants according to the survival percentage

\* Corresponding author E-mail: nezami@um.ac.ir

### مقدمه

باقلا (*Vicia faba L.*) یکی از حبوبات بسیار قدیمی است که به خاطر مقادیر پروتئین به نسبت مناسب آن به عنوان یکی از گیاهان مهم شناخته می‌شود (Majnonhosseini, 2008). دانه بالغ این گیاه شامل حدود ۴۵ درصد نشاسته و حدود ۳۰ درصد پروتئین است که مورد مصرف انسان و دام قرار می‌گیرد (Ali *et al.*, 2016). به طور معمول پروتئین حبوبات نزدیک به دو برابر میزان پروتئین موجود در غلاتی مانند گندم است (FAO, 2016). افزون بر این پروتئین حبوبات و غلات مکمل هم بوده و در مجموع می‌توانند مقادیر کافی از همه اسیدهای آمینه ضروری را فراهم کنند (McDermott & Wyatt, 2017). به طوری که حبوبات در کشورهای در حال توسعه برای بیشتر مردم به عنوان منبع اصلی پروتئین شناخته می‌شود (FAO, 2016). باقلا موجب تثبیت نیتروژن<sup>۱</sup> و به دنبال آن افزایش حاصل خیزی خاک می‌شود (Fan *et al.*, 2006). گزارش شده است کشت مخلوط<sup>۲</sup> باقلا با غلاتی مانند ذرت (*Zea mays L.*) موجب مهار (کنترل) مؤثر علف‌های هرز مزرعه ذرت می‌شود که افزون بر کاهش هزینه مربوط به علف‌کش‌ها، در بهبود مسائل زیست-محیطی و تولید محصولات سالم کشاورزی نیز مؤثر است (Hamzei & Ghamari-rahim, 2016).

سطح زیرکشت باقلا در ایران حدود ۳۰ هزار هکتار با میانگین عملکرد ۵ تن باقلا سبز در هکتار است که در نقاط مختلف به ویژه نواحی شمالی (استان گلستان) و جنوب و جنوب غربی (استان خوزستان) کشور به عنوان محصول عمده کشت و کار می‌شود (Majnonhosseini, 2008). به طور عمده باقلا در مناطق معتدل سرد، به عنوان یک محصول بهاره کشت می‌شود، این در حالی است که انواع زمستانه آن قابلیت و ظرفیت عملکرد بالاتری دارد، اما به دلیل ناکافی بودن تحمل گیاه به سرمای زمستان در نژادگان (ژنوتیپ)های زمستانه معرفی شده، به صورت بهاره کشت می‌شود (Arbaoui *et al.*, 2008). همچنین

کاشت این گیاه به صورت پاییزه در مناطق مرتفع با خطر کاهش عملکرد حتی در رقم‌های متحمل به یخبندان روبه‌رو است (Parsa & Bagheri, 2008).

سرما به عنوان یکی از عامل‌های محیطی مهم همواره رشد گیاهان را محدود و تولید محصول آن‌ها را با خطر روبه‌رو می‌سازد (Yadav, 2010). تنش سرما با توقف رشد، فروپاشی غشای پلاسمایی<sup>۵</sup>، پسابش<sup>۶</sup>، نشت املاح<sup>۷</sup>، اختلال در تعادل متابولیت‌ها<sup>۸</sup> و همچنین اختلال در فرایند سوخت‌وساز، گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Yadav, 2010). در دماهای پایین اندام‌هایی مانند کلروپلاست به شدت تحت تأثیر قرار گرفته و در نهایت موجب اختلال در فرایند نورساختی (فتوسنتزی) گیاه می‌شود (Kratsch & Wise, 2000). آسیب‌های ناشی از سرما به جهت تأثیر نامطلوب کمی و کیفی در محصولات زراعی همواره مورد توجه قرار دارد. دمای پایین در مراحل گیاهچه-ای و زایشی موجب استقرار کند و تولید دانه اندک شده و در نهایت باعث عملکرد پایین محصول می‌شود (Sanghera *et al.*, 2011)، به طوری که حتی اگر همه جنبه‌های مدیریتی نیز در تولید محصول مورد توجه قرار گیرد، ممکن است یک شب دمای یخزدگی منجر به از دست رفتن کل محصول کشاورزی شود (FAO, 2005).

هرچند با مقایسه کارکرد و نمو مجموعه همسانی از نژادگان‌ها در محیط‌های مزرعه‌ای متنوع می‌توان اطلاعات سودمندی در زمینه دامنه واکنش گیاهان به محیط و سازگاری آن‌ها به دست آورد (Kafi *et al.*, 2003)، اما برخلاف برخی از تنش‌های محیطی مانند خشکی، اعمال تیمارهای دمایی دلخواه در محیط مزرعه امکان‌پذیر نیست و نیازمند روش‌های آزمایشگاهی معتبر از جمله اعمال تنش سرما در شرایط کنترل شده است (Xuan *et al.*, 2009).

غشای یاخته‌ای در تنش یخزدگی به عنوان نخستین مکان برای آسیب به شمار می‌آید (Uemura *et al.*,

5. Plasma membrane disintegration  
6. Dehydration  
7. Solute leakage  
8. Metabolite imbalance

1. Nitrogen fixation  
2. Intercropping

اندام بنه تحمل بیشتری به تنش داشت (Nezami *et al.*, 2016).

در بررسی تحمل به یخزدگی گیاه علف تال (آرابیدوپسیس *Arabidopsis thaliana*) مشاهده شد، میزان  $LT_{50el}$  برگ در تیمارهای خوسرما<sup>۱۰</sup> شده و خوسرما نشده به ترتیب برابر ۹/۵- و ۵- درجه سلسیوس بود (Thalhammer *et al.*, 2014).

خوسرمایی با افزایش اسیدهای چرب غیراشباع در غشای لیپیدی و افزایش محتوای محلول‌هایی مانند پرولین در ارتباط است (Link *et al.*, 2010). لذا خوسرمایی در گیاهان پیش از رویارویی با تنش یخ-زدگی می‌تواند عامل مهمی در کاهش آسیب‌رسانی و حفظ بقاء<sup>۱۱</sup> گیاهان پس از تنش یخزدگی باشد.

بقاء گیاهان پس از تنش یخزدگی می‌تواند به‌عنوان یکی از روش‌های مهم در بررسی تحمل گیاهان به تنش یخزدگی باشد. پس از اینکه گیاهان در شرایط کنترل‌شده در معرض دماهای یخزدگی قرار گرفتند درصد بقاء گیاهان تعیین می‌شود (Mousavi *et al.*, 2011). نتایج به‌دست‌آمده از آزمایشی روی تحمل به سرما در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) نشان داد، بقاء گیاهان با کاهش دما از ۶- به ۱۲- درجه سلسیوس به میزان ۸۳ درصد کاهش یافت (Rife & Zeinali., 2003).

این آزمایش باهدف بررسی تحمل به یخزدگی اندام‌های دو توده بومی باقلا با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء در شرایط کنترل‌شده انجام شد.

### مواد و روش‌ها

آزمایش در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. عامل‌های آزمایش شامل دو توده باقلا (بروجرد و نیشابور)، دو اندام گیاه (برگ، ساقه) و بافت مریستم انتهایی و هفت دما (۰ به‌عنوان

2006) بنابراین برای ارزیابی شدت آسیب سرما از برآورد آسیب واردشده به غشای یاخته‌ای توسط بررسی نشت الکترولیت‌ها استفاده می‌شود (Armoniene *et al.*, 2013). گزارش‌ها گویای آن است که اعمال تیمار سرما در گیاهان منجر به افزایش نشت الکترولیت‌ها می‌شود (Kim *et al.*, 2002). در این بررسی‌ها پس از اعمال تیمار یخزدگی درصد نشت الکترولیت‌ها بررسی شده و دمای ۵۰ درصد کسندگی بر پایه آن ( $LT_{50el}$ ) تعیین می‌شود (Xuan *et al.*, 2009). نتایج آزمایشی روی نخود (*Cicer arietinum*) نشان داد، تأثیر دمای یخزدگی و رقم بر میزان آسیب به غشای یاخته‌ای معنی‌دار بود، به‌طوری‌که با کاهش دما میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت (Venaei *et al.*, 2011). Hajmohammadnia-ghalibaf *et al.* (2010) با بررسی تحمل به سرما از طریق شاخص نشت الکترولیت‌ها در رقم‌های چغندرقد (*Beta vulgaris* L.) دریافتند، افزایش نشت الکترولیت‌ها از دمای ۴- درجه سلسیوس آغاز شده و در اغلب رقم‌های در دمای حدود ۹/۵- درجه سلسیوس به بیشینه رسید. بررسی تحمل به یخزدگی در سه رقم شبدر (*Trifolium hitum* All.) نیز نشان داد، با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش داشت (Eugenia *et al.*, 2003). بررسی واکنش اندام‌های گیاهی به تنش سرما می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب برای بررسی‌های به‌گزینی گیاهان برای تحمل به تنش یادشده استفاده شود (Longo *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). به‌طوری‌که در بررسی واکنش گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L) Moench) به تنش سرما مشاهده شد، کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ این گیاه به ترتیب در دماهای ۲۳ (دمای شاهد) و ۴- درجه سلسیوس رخ داد (Asadi-Sanam *et al.*, 2015). در همین راستا بررسی تأثیر تنش یخزدگی در زعفران (*Crocus sativus* L.) نشان داد، اندام برگ به علت آسیب‌پذیری بیشتر غشای یاخته‌ای و در نتیجه خروج الکترولیت‌های بیشتر به دماهای یخزدگی حساس‌تر بوده، درحالی‌که

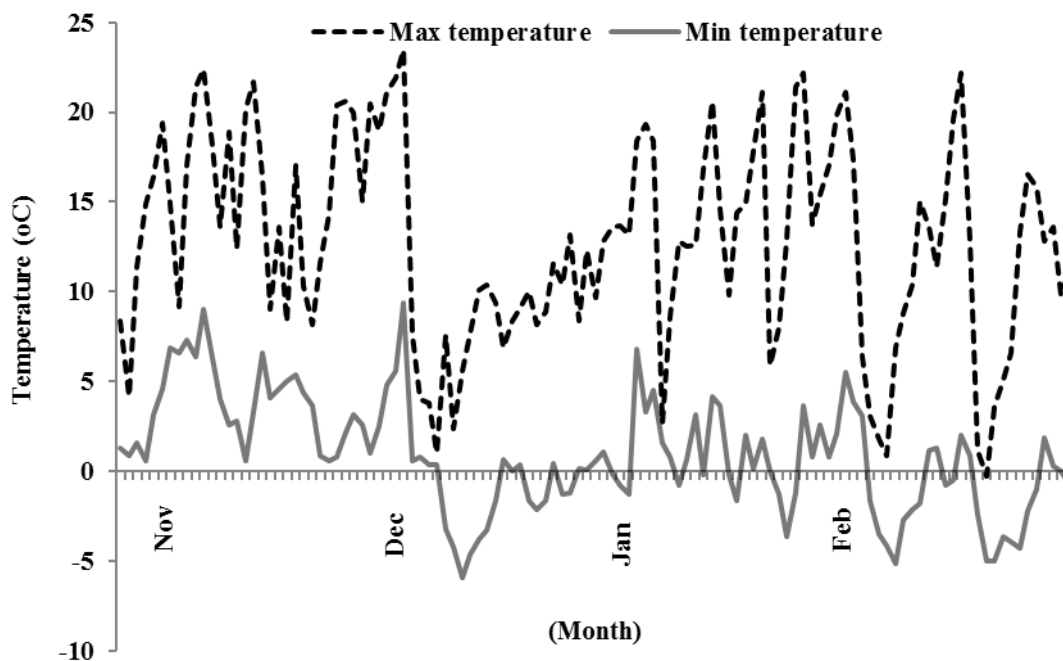
10 . Cold acclimation

11 . Survival (SU)

9 . Electrolyte leakage (EL)

گیاهان تا مرحله چهار تا شش برگی در شرایط محیط طبیعی رشد کرده و در معرض دماهای خوسرمایی قرار گرفتند (شکل ۱). گلدان‌ها ۲۴ ساعت پیش از اعمال یخزدگی آبیاری شده و سپس در نیمه دوم بهمن ماه به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند.

شاهد، ۴-، ۸-، ۱۲-، ۱۶-، ۲۰- و ۲۴- درجه سلسیوس) بودند. کشت بذرها در عمق ۳ سانتی‌متری در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۲ سانتی‌متر حاوی خاک مزرعه، خاک‌برگ و ماسه (به نسبت ۱:۱:۱) در نیمه دوم آبان ماه انجام شد. هر تکرار شامل یک گلدان و در هر گلدان شش بوته نگهداری شد.



شکل ۱. دماهای کمینه و بیشینه پاییز و زمستان ۱۳۹۴ در مشهد.

Figure 1. Minimum and maximum temperatures in autumn and winter 2015 in Mashhad

از دماهای مورد نظر به مدت یک ساعت نگهداری و آنگاه از فریزر خارج و بی‌درنگ به منظور جلوگیری از ذوب سریع یخ به اتاقک رشد با دمای  $5 \pm 2$  درجه سلسیوس منتقل و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس روز بعد از اعمال یخزدگی، گلدان‌ها به گلخانه منتقل و اقدام به تعیین میزان آسیب وارده به غشای یاخته‌ای با آزمون نشت الکترولیت‌ها شد. برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از هر گلدان یک بوته جدا کرده و از هر کدام از قسمت‌های برگ کامل توسعه‌یافته جوان (دارای دو برگچه)، ساقه و بافت مریستم انتهایی به‌طور جداگانه یک عدد درون ویال‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیرشده قرار داده شد. سپس ویال‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفته و در مرحله بعد میزان

دمای فریزر در آغاز آزمایش ۵ درجه سلسیوس بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها دما با سرعت ۲ درجه سلسیوس در ساعت کاهش داده شد. برای جلوگیری از پدیده فراسرمایی<sup>۱۲</sup> و ایجاد هستک یخ<sup>۱۳</sup> در گیاهچه‌ها (Lindow *et al.*, 1982) و همچنین کسب اطمینان از مقاومت گیاهچه‌ها به دماهای یخزدگی از نوع تحمل<sup>۱۴</sup> (نه از نوع اجتناب<sup>۱۵</sup>)، در دمای  $-2/5$  درجه سلسیوس روی گیاهچه‌ها محلول باکتری‌های فعال ایجادکننده هستک یخ<sup>۱۶</sup> به‌طوری‌که قشر نازکی روی برگ‌ها قرار گیرد، پاشیده شد. گیاهان در هر یک

12. Super cooling

13. Ice nuclei

14. Tolerance

15. Avoidance

16. Ice Nucleation Active Bacteria (INAB)

پیش از تیمار یخ‌زدگی است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به درصد نشت الکترولیت‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل با سه عامل (۲×۳×۷) و داده‌های مربوط به  $LT_{50el}$  به صورت فاکتوریل با دو عامل (۲×۳)، با استفاده از نرم‌افزارهای Minitab 17 و Excel انجام گرفت. برای تعیین  $LT_{50el}$  از نرم‌افزار V7.01 SlideWrite استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

اثر متقابل دما و نوع اندام گیاه بر درصد نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). هرچند با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها از هر سه اندام گیاهی افزایش داشت، ولی درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها و دمای آغازین آن بسته به اندام گیاهی متفاوت بود (شکل ۲)، به طوری که در برگ و بافت مریستم تا دمای ۱۲- درجه سلسیوس افزایش چندانی در درصد نشت الکترولیت‌ها مشاهده نشد و با کاهش بیشتر دما درصد آن افزایش داشت و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به بیشترین میزان رسید. در صورتی که در ۸- درجه سلسیوس آغاز شد و در دمای ۱۶- درجه سلسیوس به بیشترین میزان رسید. درصد نشت الکترولیت‌ها از مریستم در گستره دمایی ۰ تا ۱۲- درجه سلسیوس بیشتر از آن نسبت به برگ بود، در صورتی که با کاهش بیشتر دما این وضعیت برعکس شد.

در بررسی اثر متقابل دما و اندام در گیاه موسیر (*Allium altissimum* Regel.) درصد نشت الکترولیت‌ها با کاهش دما از ۰ به ۸- درجه سلسیوس در ریشه به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری که با کاهش دما به ۲۰- درجه سلسیوس افزایش نشت الکترولیت‌ها در ریشه نسبت به برگ و پیاز بیشتر بود؛ بنابراین در آزمایش یادشده حساسیت ریشه به دماهای یخ‌زدگی بیشتر از دیگر اندام‌های مورد بررسی گزارش شد (Rezvan-bidokhti et al., 2011). نتایج

نشت الکترولیت‌ها با استفاده از دستگاه رسانایی‌سنج الکتریکی<sup>۱۷</sup> (مدل Jenway) اندازه‌گیری و به عنوان  $EC_1$  ثبت شد. به منظور تعیین میزان کل نشت الکترولیت‌ها در نتیجه مرگ یاخته، ویال‌ها به اتوکلاو با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر انتقال داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفته و دوباره هدایت الکتریکی آن‌ها تحت عنوان  $EC_2$  اندازه‌گیری و ثبت شد. در ادامه درصد نشت الکترولیت‌ها (EL%) با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

$$\text{رابطه (۱)} \quad \{EL\% = EC_1/EC_2 \times 100\}$$

دمای ۵۰ درصد کشندگی گیاهان بر پایه درصد نشت الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) از روش اندرسون (Anderson et al., 1988) و پس از ترسیم نمودار درصد نشت الکترولیت‌ها در مقابل دماهای یخ‌زدگی تعیین شد (رابطه ۲).

رابطه (۲)

$$Elp = Eli + \{(Elm - Eli) / (1 + e^{-B(T-Tm)})\}$$

در این رابطه  $Elp$ : میزان نشت الکترولیت‌های پیش‌بینی‌شده،  $e$ : تابع نمایی،  $Eli$ : کمترین میزان نشت الکترولیت‌ها در دماهای مختلف،  $Elm$ : بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها در دماهای مختلف،  $B$ : میزان افزایش شیب منحنی که بین ۰/۲ تا ۰/۵ متغیر است،  $T$ : دما و  $Tm$ : نقطه عطف منحنی به عنوان نقطه میانی بین بخش بالایی و پایینی خط منحنی و نشان‌دهنده دمایی که باعث خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) از یاخته شده، است.

درصد بقاء گیاهان نیز از رابطه (۳) محاسبه شد.

$$\text{رابطه (۳)} \quad \{SU\% = (A/B) \times 100\}$$

در این رابطه  $SU\%$ : درصد بقاء،  $A$ : شمار گیاهان زنده ۲۱ روز پس از تیمار یخ‌زدگی،  $B$ : شمار گیاهان

سلسیوس دما درصد نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های طوقه و نیساک به ترتیب ۱/۵ و ۴/۴ درصد در گونه *G. coccinea* و ۲/۱ و ۰/۳ درصد در گونه *G. drummondii* افزایش داشت. به‌طور کلی در آزمایش یادشده کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب متعلق به اندام‌های طوقه و نیساک بود (Pietsch et al., 2009).

آزمایشی روی تحمل به یخزدگی دو گونه *Gaura coccinea* و *G. drummondii* با استفاده از ارزیابی شاخص نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های ساقه، طوقه و نیساک (ریزوم) نشان داد، با کاهش دما در هر دو گونه درصد نشت الکترولیت‌ها از همه اندام‌های یادشده افزایش یافت. به این صورت که در گستره دمایی ۶- تا ۱۵- درجه سلسیوس به ازای کاهش هر درجه

جدول ۱. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها و دمای ۵۰ درصد کشندگی بر پایه درصد نشت الکترولیت‌ها ( $LT_{50el}$ ) در دو توده باقلا تحت تأثیر تنش یخزدگی.

Table 1. Sources of variation, degree of freedom and mean of squares for  $EL\%$  and  $LT_{50el}$  in two faba bean landraces under freezing stress.

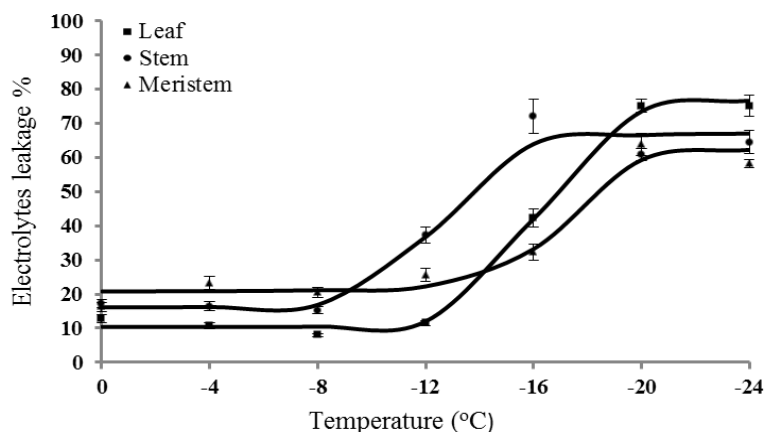
Sources of variation	Degree of freedom	EL%	Degree of freedom	$LT_{50el}$
Landrace	1	28.90 <sup>ns</sup>	1	0.63 <sup>ns</sup>
Temperature	6	13459.30 <sup>**</sup>	-	-
Landrace × Temperature	6	172.30 <sup>**</sup>	-	-
Organ	2	804.10 <sup>**</sup>	2	38.36 <sup>**</sup>
Landrace × Organ	2	75.50 <sup>*</sup>	2	2.04 <sup>*</sup>
Temperature × Organ	12	937.70 <sup>**</sup>	-	-
Landrace × Temperature × Organ	12	130.10 <sup>**</sup>	-	-
Error	126	23.10	18	0.45
Total	167		23	

<sup>ns</sup>, <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری.

<sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup> and <sup>ns</sup>: are significant at 1 and 5% probability levels and non significant, respectively.

درصد نشت الکترولیت‌ها در ساقه و برگ به ترتیب حدود ۳۵/۰ و ۳۱/۰ درصد بود، درحالی‌که در همین محدوده دمایی بافت مریستم تنها ۷ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها داشت (شکل ۲).

در گستره دمایی ۸- تا ۱۲- درجه سلسیوس افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از ساقه حدود ۲۲/۰ درصد و بیش از دو اندام دیگر بود. از سوی دیگر در گستره دمایی ۱۲- تا ۱۶- درجه سلسیوس افزایش



شکل ۲. تأثیر تنش یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه باقلا.

Figure 2. Effect of freezing stress on  $EL\%$  from faba bean organs.

برای تحمل به دماهای یخزدگی (در گستره ۸- تا ۱۶- درجه سلسیوس) نشان دادند. آغاز افزایش درصد نشت

نتایج این بخش از آزمایش نشان داد، اندام برگ و بافت مریستم باقلا توانایی بیشتری را نسبت به ساقه

درجه سلسیوس ناچیز بود (شکل ۳) و درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۱۲- درجه سلسیوس افزایش داشت. به طوری که با کاهش دما از ۱۲- به ۱۶- درجه سلسیوس درصد نشت الکترولیت‌ها حدود ۰/۲۶ درصد افزایش یافت (به طور میانگین به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما ۶/۵ درصد افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها). با وجود این افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در گستره دمایی ۱۶- تا ۲۰- درجه سلسیوس با شیب تندتری ادامه یافت، به گونه‌ای که افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در گستره یادشده حدود ۹/۸ درصد به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما بود. برگ توده بروجرد در دمای ۲۴- درجه سلسیوس به بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها (حدود ۰/۸۲ درصد) رسید که البته تفاوت معنی‌داری با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نداشت. تغییرپذیری‌های درصد نشت الکترولیت‌ها در ساقه توده بروجرد از دمای ۰ تا ۸- درجه سلسیوس اندک بود، ولی در دمای ۱۲- درجه سلسیوس، نسبت به دمای شاهد ۰/۱۵ درصد افزایش داشت و در دمای ۱۶- درجه سلسیوس به بیشترین میزان رسید (شکل ۳). شیب تند افزایش نشت الکترولیت‌ها از ساقه در محدوده دمایی ۸- تا ۱۶- درجه سلسیوس نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این اندام به دماهای یخ‌زدگی نسبت به برگ است. از سوی دیگر هرچند تغییرپذیری‌های درصد نشت الکترولیت‌ها از بافت مریستم توده بروجرد در گستره دمایی ۰ تا ۱۲- درجه سلسیوس همسان تغییرپذیری‌های آن در برگ بود، ولی افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از بافت مریستم در گستره دمایی ۱۲- تا ۱۶- درجه سلسیوس بسیار اندک بود (برخلاف اندام برگ). با وجود این از دمای ۱۶- درجه سلسیوس درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس با افزایش ۸/۴ درصدی نشت الکترولیت‌ها به ازای هر درجه سلسیوس، به حداکثر رسید (شکل ۳).

با وجود اینکه روند تغییرپذیری‌های درصد نشت الکترولیت‌ها تحت تأثیر کاهش دما از اندام‌های توده نیشابور تا حدودی همانند توده بروجرد بود، ولی اندام‌های دو توده باقلا از نظر درصد افزایش نشت

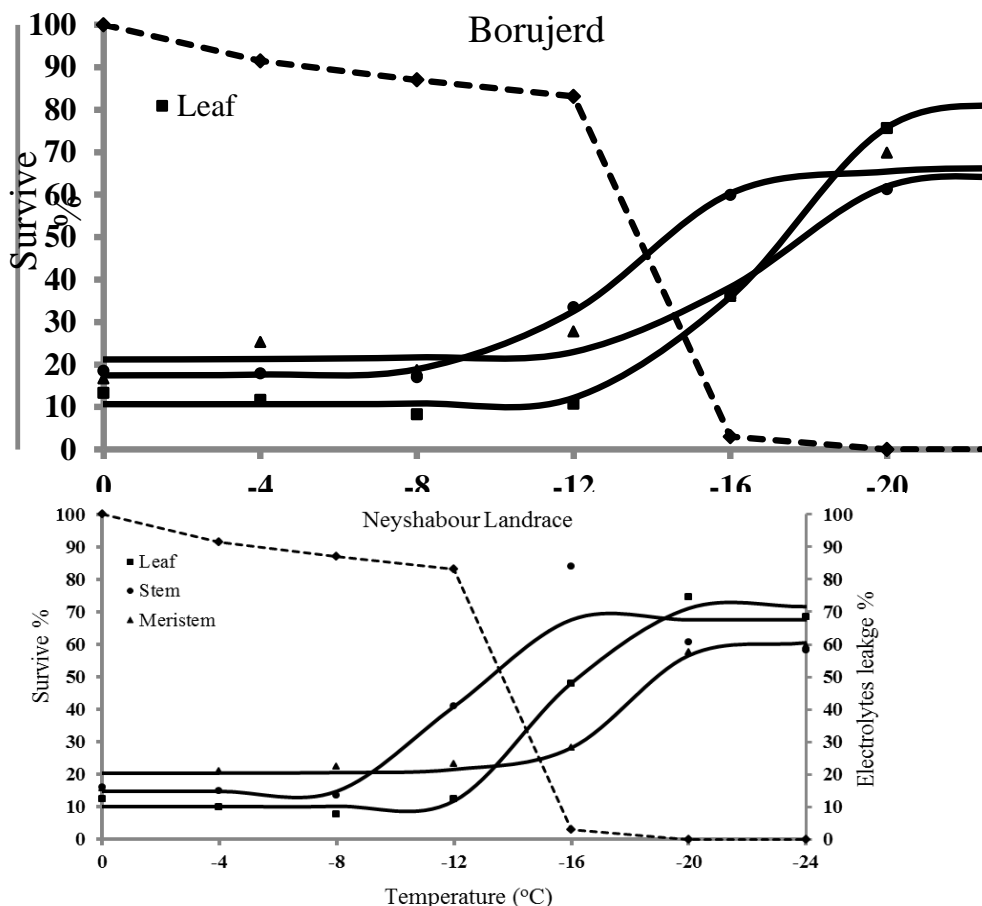
الکترولیت‌ها از دمای بالاتر (۸- درجه سلسیوس) و افزایش شدید آن در گستره دمایی ۸- تا ۱۲- درجه سلسیوس در ساقه نسبت به دو اندام دیگر (برگ و مریستم) به احتمال نشان از آسیب بیشتر به غشاء در نتیجه ناپایداری مناسب غشای سیتوپلاسمی و حساسیت بالای این اندام به تنش سرما است. به نظر می‌رسد که برگچه‌های درشت و فراوان در برگ‌های گیاه باقلا، پوششی در اطراف ساقه ایجاد می‌کنند که می‌توانند به عنوان عایق عمل کرده و موجب درک نامناسب دماهای خوسرمایی در ساقه گیاه شوند. از سوی دیگر درصد نشت الکترولیت‌های کمتر در برگ و مریستم ممکن است به علت خوسرمایی مناسب این اندام‌ها نسبت به ساقه باشد. این مشاهده‌ها با گزارش دیگر محققان در زمینه تأثیر خوسرمایی بر افزایش تحمل اندام‌های گیاهی به تنش یخ‌زدگی و به دنبال آن کاهش نشت الکترولیت‌ها همخوانی دارد (Zhang et al., 2006). نتایج بررسی تحمل به سرما در گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) نشان داد، تحت تأثیر تنش یخ‌زدگی، بیشترین و کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب در ریشه و اندام‌های برگ و طوقه مشاهده شد (Nezami et al., 2010). در آزمایش یادشده نمونه‌های گیاهی قرارگرفته در معرض تنش یخ‌زدگی از گیاهان رشد یافته در مزرعه انتخاب شده بودند، بنابراین احتمال دارد خاک (به دلیل توانایی بافر دمایی<sup>۱۸</sup>) به عنوان عایق عمل کرده و موجب کاهش خوسرمایی مناسب در ریشه شده باشد. در کنار این موضوع، به نظر می‌رسد ساخت و حضور عامل‌های کرایوپروتکتانت<sup>۱۹</sup> در بهبود تحمل به تنش سرما (Calzadilla et al., 2016) در برگ‌ها و بافت مریستم تأثیر داشته باشند، در صورتی که کمبود این ترکیب‌ها در ساقه سبب افزایش حساسیت این اندام به تنش سرما نسبت به دو اندام دیگر شده است. اثر متقابل توده، دما و اندام بر درصد نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). تغییرپذیری‌های درصد نشت الکترولیت‌ها در برگ توده بروجرد از دمای ۰ تا ۱۲-

18. Thermal buffering capacity of the soil

19. Cryoprotectant agents (CPAs)

درجهٔ سلسیوس کاهش دما، در صورتی که این افزایش در شرایط همسان در تودهٔ بروجرد حدود ۰/۴۳ درصد بود (۵/۴ درصد به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما).

الکترولیت‌ها با یکدیگر تفاوت داشتند (شکل ۳). به‌گونه‌ای که در ساقهٔ تودهٔ نیشابور با کاهش دما از -۸- به -۱۶- درجهٔ سلسیوس، نشت الکترولیت‌ها حدود ۰/۷۰ درصد افزایش داشت (۸/۸ درصد به ازای هر



شکل ۳. منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها (منحنی برازش داده شده) از برگ، ساقه و مریستم و منحنی درصد بقا (خطوط منقطع) در دو تودهٔ باقلا در شرایط تنش یخزدگی. میزان LSD در سطح احتمال ۵ درصد برای درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقا به ترتیب ۶/۷۳ و ۵/۱۳ است.

Figure 3. EL% curve (fitted curve) from leaf, stem and meristem and SU% curve (dash lines) in two faba bean landraces under freezing stress. LSD value at 5% probability level for EL% and SU% is 6.73 and 5.13, respectively.

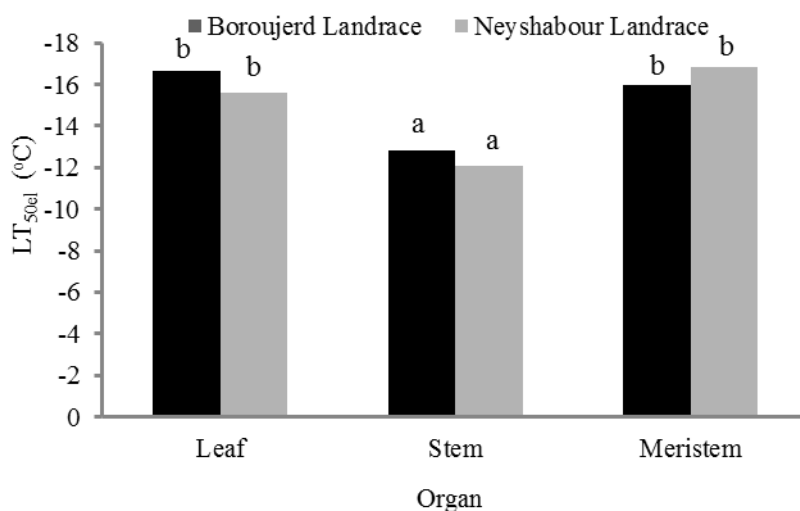
ترتیب ۲/۱ و ۸/۴ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها به ازای هر درجهٔ سلسیوس). نتایج بررسی رضوان‌بیدختی و همکاران (Rezvan-bidokhti *et al.*, 2011) نشان داد، کاهش دما موجب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از همهٔ اندام‌های هر سه بوم‌جور (اکوتیپ) موسیر - شد. به این صورت که افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در ریشه، پیاز و برگ ابوم‌جور شیروان از دمای ۰ تا

همچنین افزایش نشت الکترولیت‌ها از مریستم تودهٔ نیشابور در گسترهٔ دمایی -۱۲ تا -۱۶ و -۱۶ تا -۲۰- درجهٔ سلسیوس به ترتیب حدود ۰/۵ و ۰/۲۹ درصد بود (به ترتیب ۱/۲ و ۷/۴ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها به ازای هر درجهٔ سلسیوس)، در صورتی که تودهٔ بروجرد در شرایط همسان به ترتیب حدود ۰/۸ و ۰/۳۴ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها داشت (به



$LT_{50el}$  (معنی دار (جدول ۱) بود. بالاترین  $LT_{50el}$  در هر دو توده بروجرد و نیشابور را اندام ساقه (به ترتیب ۱۲/۹- و ۱۲/۱- درجه سلسیوس) داشت، در صورتی که ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ توده‌های بروجرد و نیشابور به ترتیب در دماهای ۱۶/۷- و ۱۵/۶- درجه سلسیوس و در بافت مریستم آن‌ها به ترتیب در دماهای ۰/۱۶- و ۱۶/۸- درجه سلسیوس رخ داد (شکل ۴). در بررسی تحمل به تنش سرما روی علف چمنی گزارش شد  $LT_{50el}$  در اندام‌های برگ و طوقه گیاهان مورد بررسی تفاوت معنی داری داشتند. به این صورت که از نظر اندام برگ، علف چمنی برموداگراس و محلات حساس‌ترین و رقم (واریتة) استارت و ابوم‌جور یارند متحمل‌ترین علف‌های چمنی نسبت به تنش سرما بودند. همچنین طوقه ابوم‌جور محلات بیشترین  $LT_{50el}$  و ابوم‌جور یارند، استارت و برموداگراس کمترین  $LT_{50el}$  را داشتند (Nezami *et al.*, 2010).

۲۰- درجه سلسیوس به ترتیب ۰/۶۶، ۰/۴۱ و ۰/۴۹ درصد، در ابوم‌جور کلات ۰/۵۳، ۰/۴۴ و ۰/۴۳ درصد، در ابوم‌جور تندوره ۰/۴۲، ۰/۴۳ و ۰/۳۷ درصد گزارش شد. به بیانی دیگر به ازای کاهش هر درجه سلسیوس دما، در اندام‌های ریشه و برگ ابوم‌جور شیروان به ترتیب نشت الکترولیت‌ها به میزان ۳/۳ و ۲/۵ درصد افزایش یافت که در مقایسه با افزایش نشت الکترولیت‌ها در دیگر ابوم‌جورها بیشتر بوده و نشان-دهنده حساسیت بالای این دو اندام به دماهای یخ-زدگی در ابوم‌جور شیروان است. وضعیت نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های پیاز برعکس بوده و به ازای کاهش هر درجه سلسیوس دما در دو ابوم‌جور کلات و تندوره به میزان همسان ۲/۲ درصد افزایش یافت که آسیب‌پذیری بیشتر اندام پیاز در این دو ابوم‌جور را نشان می‌دهد. اثر متقابل توده و اندام بر دمای ۵۰ درصد کشندگی بر پایه درصد نشت الکترولیت‌ها



شکل ۴- دمای ۵۰ درصد کشندگی گیاه بر پایه درصد نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های دو توده باقلا.

Figure 4.  $LT_{50el}$  in organs of two faba bean landraces.

این تغییر دما موجب افزایش نشت الکترولیت‌ها به میزان ۰/۱۵ درصد شد، در صورتی که بقاء در این وضعیت ۰/۱۷ درصد (معادل ۱/۴ درصد به ازای هر درجه سلسیوس) کاهش یافت. از سوی دیگر با کاهش شدیدتر دما و همزمان با تغییرپذیری‌های شدید درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء نیز به شدت کاهش داشت، به طوری که در دمای ۱۶- درجه سلسیوس

بین درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه باقلا با درصد بقاء همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). با وجود این بررسی رابطه بین درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های توده بروجرد و درصد بقاء نشان داد با کاهش دما از ۰ به ۱۲- درجه سلسیوس روند تغییرپذیری‌های نشت الکترولیت‌ها از برگ و بافت مریستم غیر معنی‌دار بود و تنها در ساقه

بافت مریستم به ازای هر درجه سلسیوس به ترتیب ۶/۵، ۶/۶ و ۲/۱ درصد بود. دمای کشنده ۵۰ درصد گیاهان بر پایه درصد بقاء ( $LT_{50su}$ ) در توده بروجرد حدود ۱۳/۶- درجه سلسیوس بود، درحالی که در این دما به ترتیب حدود ۰/۱۹، ۰/۴۵ و ۰/۳۰ درصد ترکیب‌های یاخته‌ای از اندام‌های برگ، ساقه و مریستم نشت کردند.

نشت الکترولیت‌ها از برگ، ساقه و مریستم نسبت به دمای ۱۲- درجه سلسیوس به ترتیب حدود ۰/۲۶، ۰/۲۶ و ۸۰ درصد افزایش داشت، در صورتی که کاهش بقاء در شرایط همسان ۸۰ درصد بود. به عبارت دیگر از دمای ۱۲- تا ۱۶- درجه سلسیوس به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما، بقاء ۲۰ درصد کاهش یافت، در صورتی که افزایش نشت الکترولیت‌ها از برگ، ساقه و

جدول ۲. ضریب‌های همبستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های دو توده باقلا (بروجرد و نیشابور) با درصد بقاء.

Table 2. Correlation coefficients between electrolyte leakage % from organs of two faba bean landraces (Boroujerd and Neyshabour) with their survive %.

Neyshabour			Boroujerd		
Meristem	Stem	Leaf	Meristem	Stem	Leaf
-0.83**	-0.89**	-0.95**	-0.83**	-0.94**	-0.88**

\*\* : significant in 1% level.

\*\* : معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

این دما آسیب کمتری دیدند و نسبت به ساقه تحمل بیشتری نشان دادند. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تحمل به سرما در گیاه پاسپالوم (*Paspalum vaginatum* Swartz) نشان داد، کاهش دما موجب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های مورد بررسی (ریشه، طوقه و برگ) می‌شود که در نهایت با کاهش درصد بقاء در این گیاه همراه بود (*Cardona et al.*, 1997).

در توده نیشابور نیز با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه افزایش و درصد بقاء کاهش داشت (شکل ۳). به صورتی که کاهش دما از ۰ به ۱۲- درجه سلسیوس سبب کاهش ۰/۱۷ درصدی بقاء شد. از دمای ۱۲- تا ۱۶- درجه سلسیوس افزایش نشت الکترولیت‌ها در دو اندام برگ و ساقه با شیب بسیار تندتری نسبت به توده بروجرد ادامه یافت. به طوری که در دمای ۱۶- درجه سلسیوس نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های برگ و ساقه به ترتیب حدود ۰/۳۶ و ۰/۴۳ درصد نسبت به دمای ۱۲- درجه سلسیوس افزایش داشت. در این توده نیز کاهش دما از ۱۲- به ۱۶- درجه سلسیوس سبب کاهش ۸۰ درصدی بقاء گیاهان شد. به عبارت دیگر به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما در این محدوده، نشت الکترولیت‌ها از دو اندام برگ و ساقه به ترتیب به میزان ۸/۹ و ۱۰/۸ درصد افزایش و درصد بقاء ۲۰ درصد کاهش داشت. در توده نیشابور بیشترین نشت الکترولیت‌ها در دمایی که ۵۰ درصد گیاهان بقاء داشتند (دمای ۱۳/۶- درجه سلسیوس) مربوط به اندام ساقه بود، به طوری که ساقه ۰/۶۲ درصد نشت الکترولیت‌ها داشت (و بیشترین حساسیت را به تنش سرما نشان داد)، در صورتی که اندام‌های برگ و مریستم به ترتیب با ۰/۲۶ و ۰/۲۳ درصد نشت الکترولیت‌ها در

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد، تنش یخزدگی موجب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاه باقلا شد. درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای ۱۲- درجه سلسیوس با شیب تندتری افزایش یافت. اندام ساقه بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها و بالاترین  $LT_{50el}$  را داشت. با توجه به تأثیر کمتر دماهای یخزدگی بر میزان نشت الکترولیت‌ها از یاخته‌های برگ و مریستم به نظر می‌رسد تحمل به دماهای یخزدگی در اندام‌های یادشده نسبت به ساقه (به علت خوسرمایی مناسب) بیشتر بود. به‌طور کلی درصد بقاء در این گیاه با درصد نشت الکترولیت‌ها همبستگی منفی داشته و با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها، بقاء کاهش یافت. دو اندام برگ و ساقه توده نیشابور، در  $LT_{50su}$  همسان با توده

بروجرد، مریستم درصد نشت الکترولیت‌های بیشتری داشت. در این آزمایش دو توده مورد بررسی به خوبی قابلیت تحمل به دماهای یخ‌زدگی تا ۱۲- درجه سلسیوس در شرایط کنترل‌شده را نشان دادند.

بروجرد (برابر ۱۳/۶- درجه سلسیوس) درصد نشت الکترولیت‌های بیشتر و حساسیت بالاتری نسبت به تنش یخ‌زدگی داشتند، درحالی‌که در اندام مریستم برعکس وضعیت یادشده مشاهده شد و در توده

## REFERENCES

1. Ali, M. B., Welna, G., Sallam, A., Martsch, R., Balko, CH., Gebser, B., Sass, O. & Link, W. (2016). Association analyses to genetically improve drought and freezing tolerance of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop Science*, 56, 1036-1048.
2. Anderson, J. A., Michael, P. & Taliaferro, C. M. (1988). Cold hardiness of midiron and tifgreen. *Horticultural Science*, 23, 748-750.
3. Arbaoui, M., Balko, C. & Link, W. (2008). Study of faba bean (*Vicia faba* L.) winter-hardiness and development of screening methods. *Field Crops Research*, 106, 60-67.
4. Armoniene, R., Liatukas, Z. & Brazauskas, G. (2013). Evaluation of freezing tolerance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under controlled conditions and in the field. *Zemdirbyste-Agriculture*, 100, 417-424.
5. Asadi-Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., Sefidkon, F. & Nematzadeh, GH.A. (2015). The physiological and biochemical responses of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L) Moench) to low temperature stress. *Journal of Plant Process and Function*, 4, 11-28. (in Farsi)
6. Calzadilla, P. I., Maiale, S. J., Ruiz, O. A. & Escaray, F. J. (2016). Transcriptome response mediated by cold stress in *Lotus japonicus*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-16.
7. Cardona, C. A., Duncan, R. R. & Lindstrom, O. (1997). Low temperature tolerance assessment in paspalum. *Crop Science*, 37, 1283-1291.
8. Eugenia, M., Nunes, S. & Ray Smith, G. 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Science*, 43, 1349-1357.
9. Fan, F., Zhang, F., Song, Y., Sun, J., Bao, X., Guo, T. & Li, L. (2006). Nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) interacting with a non-legume in two contrasting intercropping systems. *Plant and Soil*, 283, 275-286.
10. FAO. (2005). Frost protection: fundamentals, practice, and economics. [www.FAO.com](http://www.FAO.com).
11. FAO. (2016). Nutritional Benefits of Pulses. [www.FAO.com](http://www.FAO.com).
12. Hajmohammadnia- Ghalibaf, K., Nezami, A. & Kamandi, A.(2010). Study the possibility of using the electrolyte leakage index for evaluation of cold tolerance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8, 465-472. (in Farsi)
13. Hamzei, J. & Ghamari-rahim, N. (2016). Evaluation of economic Faba bean (*Vicia faba* L.) intercropping with maize (*Zea mays* L.) based on relative total value and reduce weeds growth. *Journal of Crop Production and Processing*, 6, 97-108. (in Farsi)
14. Kafi, M., Kamkar, B. & Mahdavi-Damghani., A. M. (2003). Crop responses to environment. *Ferdowsi University Press*. 297p.
15. Kim, T. E., Kim, S. K., Han, T. J., Lee, J. S. & Chang, S. C. (2002). ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 115, 370-376.
16. Kratsch, H. A. & Wise, R. R. (2000). The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*, 23, 337-350.
17. Lindow, S. E., Arny, D. C. & Upper, C. D. (1982). Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiology*, 70, 1084-1089.
18. Link, W., Balko, C. & Stoddard, F. L. (2010). Winter hardiness in faba bean: Physiology and breeding. *Field Crops Research*, 115, 287-296.
19. Longo, V., Valizadeh-Kamran, R., Michaletti, A., Toorchi, M., Zolla, L. & Rinalducci, S. (2017). Proteomic and physiological response of spring barley leaves to cold stress. *International Journal of Plant Biology and Research*, 5, 1061.
20. Majnonhosseini, N. (2008). Grain legume production. *Tehran Jahad Daneshgahi Publications*. 294p.
21. McDermott, J. & Wyatt, A. J. (2017). The role of pulses in sustainable and healthy food systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1392, 30-42.
22. Mousavi, M. J., Nezami, S., Izadi Darbandi, E., Nezami, A., Yousefsani, M. & Keykha Akhar, F. (2011). Evaluation of freezing tolerance of english daisy (*Bellis perennis*) under controlled conditions. *Journal of Water and Soil*, 25, 380-388. (in Farsi)

23. Nezami, A., Azizi, G., Siahmarghooee, A. & Mohamadabadi, A. A. (2010). Effects of freezing stress on electrolytes leakage of fennel (*Foeniculum vulgare*). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8, 587-593. (in Farsi)
24. Nezami, A., Rezaei, J. & Alizadeh, B. (2010). Evaluation of cold stress tolerance in several species of grasses by electrolytes leakage test. *Journal of Water and Soil*, 24, 1019-1026. (in Farsi)
25. Nezami, A., Rezvan-Bidokhti, SH. & Sanjani, S. (2016). The response of saffron (*Crocus sativus* L.) to freezing stress in controlled conditions. *Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences*, 9, 75-86. (in Farsi)
26. Parsa, M. & Bagheri, A. R. (2008). Pulses. *Mashhad Jihad Daneshgahi Publications*. 522p.
27. Pietsch, G. M., Anderson, N. O. & Li, P. H. (2009). Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura coccinea* and *G. drummondii*. *Scientia Horticulture*, 120, 418-425.
28. Rife, C.L. & Zeinali, H. (2003). Cold tolerance in oilseed rape over varying acclimation durations. *Crop Science*, 43, 96-100.
29. Rezvan-bidokhti, Sh., Nezami, A., kafi, M. & khazaei, H.R. (2011). The effect of freezing stress on electrolytes leakage in industrial and Medicinal plant shallot (*Allium altissimum* Regel.) under controlled conditions. *Journal of Agroecology*, 3, 371-382. (in Farsi)
30. Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W. & Singh, N. B. (2011). Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Current Genomics*, 12, 30-43.
31. Thalhammer, A., Hinch, D.K. & Zuther, E. (2014). Measuring freezing tolerance: electrolyte leakage and chlorophyll fluorescence assays. *Plant Cold Acclimation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1166, 15-24.
32. Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, CH., Shigematsu, S., Minami, A. & Kawamura, Y. (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126, 81-89.
33. Venaei, S., Siosemarde, A. & Heydari, Gh. R. (2011). The effects of cold stress in germination stage and seedling on the activity antioxidant enzymes and some Physiological traits in pea (*Cicer arietinum*). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 9, 514-524. (in Farsi)
34. Xuan, J., Liu, J., Gao, H., Hu, H. & Cheng, X. (2009). Evaluation of low-temperature tolerance of *Zoysia* grass. *Tropical Grasslands*, 43, 118-124.
35. Yadav, S.K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy Sustainable Development*, 30, 515-527.
36. Zhang, X., Ervin, E. H. & Labranche, A. J. (2006). Metabolic defense responses of seeded bermudagrass during acclimation to freezing stress. *Crop Science*, 46, 2598-2605.
37. Zhang, X., Teixeira da Silva, J. A., Niu, M., Li, M., He, Ch., Zhao, J., Zeng, S., Duan, J. & Ma, G. (2017). Physiological and transcriptomic analyses reveal a response mechanism to cold stress in *Santalum album* L. leaves. *Scientific Reports*, 7, 42165.