Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 50, No 2, Summer 2019 (23 - 34)
DOI: 10.22059/ijfcs.2018.240077.654371

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۸ (ص۳۴- ۲۳)

بررسی تحمل به یخزدگی چند گونه شبدر (*Trifolium spp* L.) در شرایط کنترل‌شده

اقلیما حضرتی[۱]، احمد نظامی[۲*]، حمید رضا خزاعی[۳] و مهدی پارسا[۴]
۱، ۲، ۳ و۴، به ترتیب، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادان و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۳)

چکیده

به‌منظور ارزیابی تحمل به یخزدگی چند گونه شبدر (*Trifolium spp* L.) آزمایشی در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. عوامل آزمایش شامل دو تاریخ کاشت (۲۸ شهریور و ۲۷ مهر)، چهار گونه شبدر قرمز *T. pratense*، سفید *T. repense*، ایرانی *T. resupinatum* (گونه‌های پاییزه) و شبدر لاکی *T. incarnatum* (گونه بهاره) و هشت دمای یخزدگی (صفر (شاهد)، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- درجه سانتی‌گراد) بود. درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ و طوقه اندازه‌گیری و بر اساس آن دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه‌ها برای برگ ($LT_{50el(L)}$) و طوقه ($LT_{50el(C)}$) تعیین شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ معنی‌دار بود، به‌طوری که در گونه‌های پاییزه در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور درصد نشت الکترولیت‌ها کمتر از تاریخ کاشت ۲۷ مهر بود، اما در گونه بهاره، گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر نسبت به تاریخ کاشت ۲۸ شهریور درصد نشت الکترولیت کمتری داشتند. در شبدرهای قرمز و ایرانی کاهش دما تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد و در شبدر سفید و لاکی کاهش دما به کمتر از ۱۵- درجه سانتی‌گراد، سبب افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه شد. کمترین $LT_{50el(L)}$ در تاریخ ۲۸ شهریور، در گونه‌های قرمز و ایرانی و بیشترین آن در گونه لاکی مشاهده شد، درحالی‌که در تاریخ کاشت ۲۷ مهر، کمترین مقدار آن در گونه‌های ایرانی و لاکی و بیشترین آن در گونه قرمز بود. همچنین در دماهای پایین‌تر از ۹- درجه سانتی‌گراد، با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها، میزان ماده خشک به‌شدت کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: **تاریخ کاشت، خوسرمایی، طوقه و نشت الکترولیت‌ها.**

Evaluation of freezing tolerance of some clover species (*Trifolium* spp.) in controlled conditions

Eghlima Hazrati[1], Ahmad Nezami[2*], Hamidreza Khazaie[3] and Mahdi Parsa[4]
1, 2, 3 and 4, Former Msc student in agronomy, Professors and Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University o Mashhad

(Received: September 3, 2017 - Accepted June 24, 2018)

ABSTRACT

In order to evaluate freezing tolerance of some clover species as well as planting date and acclimation period effects on plant tolerance, an experiment was conducted in 2012-13 in Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad in completely Randomized Design with factorial arrangement and four replications. Experimental factors included two planting dates (late September and late October), four clover species (red clover *T. pratense*, white clover *T. repense*, Persian clover *T. resupinatum* (autumn species) and crimson clover *T. incarnatum* (spring spieces) and eight freezing temperatures (0 (control), -3, -6, -9, -12, -15, -18, -21ºC). Electrolyte leakage percentage of leaf and crown was measured and used to determine lethal temperature for 50% of plants ($LT_{50el(l)}$ and $LT_{50el(c)}$ for leaf and crown, respectively). Results indicated that interaction of planting dates, species and freezing temperatures on electrolyte leakage of leaf was significant in a way that a lower mean of this parameter was observed in autumn species in first planting date compared to the second planting date but the reverse was found in spring species. Decreasing temperature to less than -12 and -15 ˚C resulted in an increase in electrolyte leakage of crown in red and Persian clovers, and white and crimson clovers, respectively). The least $LT_{50el(l)}$ in first planting date was found in red and Persian species and the highest in crimson species while in the second planting date, the lowest mean was observed in Persian and crimson and the highest in red species. Also, plant dry weight decreased as freezing temperature dropped to -9 ˚C.

Keywords: Acclimation, electrolyte leakage, planting date.

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

مقدمه

گیاهان علوفه‌ای به‌ویژه لگوم‌ها جایگاه ویژه‌ای در تولید پروتئین مورد نیاز دام و انسان داشته و نیز نقش بسیار ارزنده‌ای در حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک ایفا می‌کنند (Abbasi, 2008; Henkeby *et al*., 2006). شبدرها (*Trifolium* spp.) با داشتن حدود ۳۰۰ گونه، از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای به‌شمار می‌روند. در ایران، شبدر بعد از یونجه، مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دولپه است که با سطح زیر کشتی حدود ۷۰ هزار هکتار، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Zamanian & Asadi, 2004). توانایی رشد شبدرها در دماهای پایین نسبتاً خوب بوده و معمولاً به‌صورت پاییزه رشد می‌یابند، لذا برخورد بخشی از دوره رشد آنها با زمستان‌های سرد اجتناب‌ناپذیر است (Henkeby *et al*., 2006).

در شرایط کشت پاییزه، گیاهان اغلب در معرض انواع تنش‌های زمستانه (یخزدگی، سرمازدگی، غرقاب، پوشش برف و چرخه‌های ذوب- یخ) قرار می‌گیرند. در این بین، تنش یخزدگی ازجمله مهم‌ترین تنش‌ها است که با تحمیل خسارت شدید به سلول‌ها و بافت‌های گیاهی، می‌تواند موجب نابودی گیاه گردد (Nezami & Boroumand Rezazadeh, 2011.). قرار گرفتن گیاه در معرض دماهای پایین و قبل از مواجهه با دماهای تنش‌زا، می‌تواند با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک، سبب بهبود تحمل به تنش در گیاه شود (Thomashow, 2001). غشاء پلاسمایی به‌عنوان مهم‌ترین جایگاه آسیب‌های ناشی از یخزدگی شناخته شده و لذا تحمل به یخزدگی در غشاء که همراه سازگار شدن گیاه به سرما رخ می‌دهد، مستلزم وقوع تغییرات در ترکیب لیپیدهای غشاء است که طی این تغییرات مقدار لیپیدهای غیراشباع بر لیپیدهای اشباع فزونی می‌گیرد. ازاین‌رو حفظ انسجام غشاء پلاسمایی، عامل اصلی بقاء گیاه در شرایط تنش یخزدگی است (Steponkus *et al*., 1993). بر اساس مطالعات انجام-گرفته، بین درصد نشت الکترولیت‌ها و تحمل گیاهان به تنش یخزدگی همبستگی مشاهده شده و پژوهشگران اظهار داشته‌اند که آزمون نشت الکترولیت‌ها، معیار قابل‌قبولی برای ارزیابی تحمل به تنش سرما در گونه‌های مختلف است (Baeka & Skinner, 2003). انتظار می‌رود، کمتر بودن درصد نشت الکترولیت، نشان‌دهنده تحمل به سرمای مناسب‌تر در گیاهان باشد. نتایج پژوهش انجام‌شده در خصوص تحمل به سرمای یونجه، حاکی از همبستگی مثبت بین درجه تحمل به سرمای این گیاه بر اساس روش هدایت الکتریکی با درصد بقای زمستانه در مزرعه بود (Sulk *et al*., 1991). (Eugenia *et al*., 2003) بیان کردند که آزمون نشت الکترولیت‌ها، یک روش کاربردی و آسان جهت به‌گزینی ژرم‌پلاسم‌های مقاوم به یخزدگی در گیاه شبدر می‌باشد. ایشان در آزمایشی برگ‌های جوان ارقام شبدر را در دماهای مختلف یخزدگی قرار داده و بیان کردند با کاهش دما به ۱۸- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت ارقام شبدر حدود ۵/۷ برابر نسبت به دمای ۶- درجه سانتی‌گراد افزایش داشت. همچنین Arbaoui *et al*. (2008) در آزمایشی روی ماشک (*Vicia villosa* L.) بیان کردند که با افزایش نشت الکترولیت‌ها، تحمل به سرما کاهش می‌یابد. Nayyar *et al*. (2005) نیز اثر تنش سرما را بر گیاهچه‌های نخود با استفاده از آزمون نشت الکترولیت بررسی نموده و اظهار داشتند که با کاهش دما، نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد. بر این اساس، دمایی که سبب ۵۰ درصد نشت الکترولیت‌ها از بافت-های گیاهی (دمای ۵۰ درصد کشندگی) می‌شود، به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی میزان تحمل به سرما پیشنهاد شده است (Prasil *et al*., 2007; Nezami *et al*., 2010b) و مقادیر کمتر دمای ۵۰ درصد کشندگی، نشان‌دهنده تحمل به سرمای بیشتر می‌باشد. هدف از این پژوهش، ارزیابی تحمل به یخزدگی چند رقم پائیزه و بهاره شبدر با استفاده از آزمون نشت الکترولیت‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل آزمایش شامل دو تاریخ کاشت (۲۸ شهریور و ۲۷

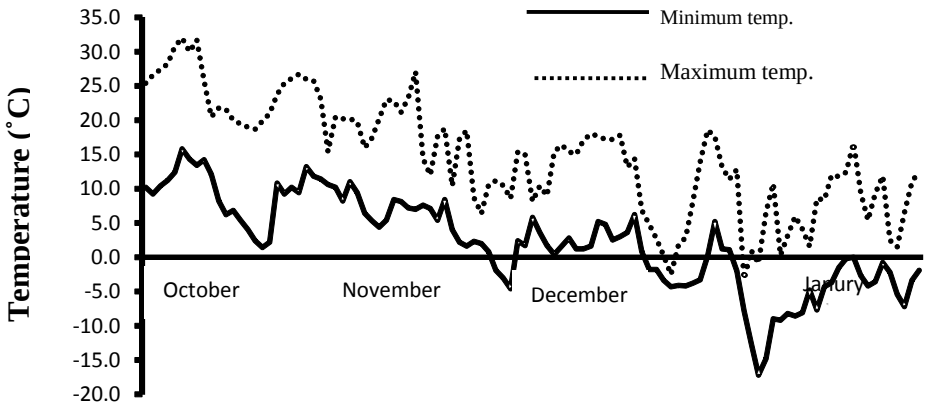
مهر)، چهار گونه شبدر (شبدر قرمز، شبدر سفید، شبدر ایرانی و شبدر لاکی) و هشت تیمار دمایی (دماهای صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- درجه سانتی‌گراد) بودند. با توجه به اینکه شبدر در دمای پایین، قادر به رشد بوده و با توجه به شرایط دمایی مشهد که احتمال وقوع دماهایی پایین حتی تا ۲۱- درجه سانتی‌گراد وجود دارد، این تیمارهای دمایی انتخاب گردید. مشخصات گونه‌های شبدر مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات شبدرهای مورد بررسی

Table 1- Characteristics of the studied clovers

Species	Planting Season	Growth Type
Red clover (*Trifolium pratense*)	Autumn	Rosette
White clover (*Trifolium repense*)	Autumn	Rosette
Persian clover (*Trifolium resupinatum*)	Autumn-Rarely spring	Rosette
Crimson clover (*Trifolium incarnatum*)	Spring-Rarely autumn	Erect

جهت کشت، ابتدا تعداد ۳۰-۲۰ بذر در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر حاوی نسبت‌های مساوی از خاک، ماسه و خاک‌برگ، کشت و دو هفته بعد از استقرار به ۱۵ بوته در هر گلدان تقلیل داده شد. گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور به‌مدت چهار ماه و گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهرماه به‌مدت سه ماه در شرایط آب و هوایی طبیعی رشد یافته و با سرما خو گرفتند. به‌منظور حفظ مواد آزمایشی، گلدان‌ها در شب‌هایی با دمای کمتر از ۴- درجه سانتی‌گراد، در شاسی سرد (بدون گرمایش) قرار داده شدند. آبیاری گیاهان در مواقع مورد نیاز انجام شد. مراقبت‌های لازم شامل کنترل آفات و امراض انجام شد. دماهای حداقل و حداکثر روزانه در طی دوره آزمایش در سال ۱۳۹۱ در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- دماهای حداقل و حداکثر روزانه در طی دوره آزمایش در سال ۱۳۹۱

Fig. 1- Daily minimum and maximum temperatures during experimental period in 2011

قبل از اعمال دماهای آزمایش، گلدان‌ها آبیاری شده و سپس گیاهان هر دو تاریخ کاشت به‌طور هم‌زمان و در تاریخ ۲۸ دی ماه به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. در این حالت گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر به‌ترتیب در مرحله رشدی ۸-۱۰ برگی و ۴-۵ برگی قرار داشتند. دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس از قراردادن نمونه‌ها، با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. این وضعیت شرایط را برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Murray *et al*., 1988). به‌منظور جلوگیری از

پدیده فراسرمایی و ایجاد هستک یخ در گیاهان، در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد، اسپری INAB[1] بر روی نمونه‌ها به نحوی انجام گرفت که سطح گیاهان به‌صورت قشری از این محلول پوشانده شد (Lindow *et al.*, 1982). به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهان در هر تیمار دمایی (صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸- و ۲۱- درجه سانتی‌گراد) به‌مدت یک ساعت نگه‌داشته و سپس برای جلوگیری از ذوب‌شدن سریع یخ، به اتاقک سرد با دمای ۲±۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در آنجا نگهداری شدند. جهت تعیین پایداری غشاء سیتوپلاسمی، از روش اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها استفاده شد. برای این منظور، روز بعد از اعمال دماهای یخزدگی، از هر تیمار دمایی ۲۰ برگ جوان کاملاً توسعه‌یافته و پنج عدد طوقه انتخاب و به‌ترتیب به فالکون‌های حاوی ۷۰ و ۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر منتقل شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه قرار داده شده و سپس هدایت الکتریکی هر نمونه با دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد (EC_1). به‌منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، فالکون‌های حاوی نمونه‌های گیاهی در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شده و مجدداً پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در آزمایشگاه، هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت شد (EC_2). درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (Teutonica *et al.* 1993). لازم به ذکر است که قبل از اندازه‌گیری درصد نشت الکترولیت‌ها، از نمونه‌های گیاهی، میانگین هدایت الکتریکی آب دوبار تقطیر (از ۱۰ ویال حاوی آب دوبار تقطیر) تعیین و قبل از انجام محاسبات مربوطه، میانگین آنها از نشت الکترولیت‌های اولیه و نهایی کم شد.

معادله ۱

$$EL = (EC_1/EC_2)\times 100$$

در این معادله EL، EC_1 و EC_2 به‌ترتیب نشان‌دهنده درصد نشت الکترولیت‌ها، نشت الکترولیت اولیه و نشت الکترولیت نهایی می‌باشند.

به‌منظور محاسبه دمای ۵۰ درصد کشندگی، بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}[2])، از معادله (۲) استفاده شد (Anderson *et al.*, 1988).

معادله ۲

$$ELP = ELi + \{(ELm - ELi)/(1 + e^{-B(T-Tm)})\}$$

که در آن ELP: میزان نشت الکترولیت پیش‌بینی‌شده، Eli: حداقل مقدار نشت الکترولیت در دماهای مختلف، Elm: حداکثر مقدار نشت الکترولیت به‌دست‌آمده در دماهای مختلف، e: پایه لگاریتم طبیعی (۲/۷۱)، B: میزان افزایش شیب منحنی که بین ۰/۲ تا ۰/۵ متغیر است، T: دما و Tm: نقطه عطف منحنی که عبارت است از نقطه میانی بین بخش بالایی و پایینی خط منحنی و نشان‌دهنده خروج ۵۰ درصد الکترولیت‌ها از سلول می‌باشد.

برای تعیین وزن خشک گیاهان،گلدان‌ها به گلخانه انتقال یافتند و پس از چهار هفته وزن خشک آنها (پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد) تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و SLIDE WRITE انجام و شکل‌ها توسط نرم‌افزارهای SLIDE WRITE و Excel ترسیم شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. جهت بررسی اختلاف بین درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه و برگ از آزمون T جفت‌شده استفاده گردید.

نتایج و بحث

نشت الکترولیت‌های برگ

نتایج تجزیه واریانس درصد نشت الکترولیت‌ها در تیمارهای مختلف در جدول ۲ آورده شده است. درصد نشت الکترولیت‌ها در تاریخ‌های کاشت، بسته به نوع گونه متفاوت بود. باوجود این‌که با تأخیر در کاشت،

1- Ice Nucleation Active Bacteria

2-Lethal Temperature 50 According To The Electrolyte Leakage Percentage

درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ هر چهار گونه شبدر افزایش یافت؛ ولی کمترین افزایش درصد نشت در شبدر لاکی (۱/۹ درصد) و بیشترین آن در شبدر سفید و قرمز (۷/۷ درصد) مشاهده شد (شکل ۲). درصد نشت الکترولیت‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل تاریخ کاشت و دما قرار گرفت (جدول ۲). هرچند که کاهش دما تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد تأثیر چندانی بر درصد نشت الکترولیت‌ها نداشت؛ اما در دماهای پایین‌تر، میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت و میزان افزایش برای گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهرماه بیش از تاریخ کاشت ۲۸ شهریورماه (به‌ترتیب حدود ۴۶ و ۵۲ درصد) بود (شکل ۳).

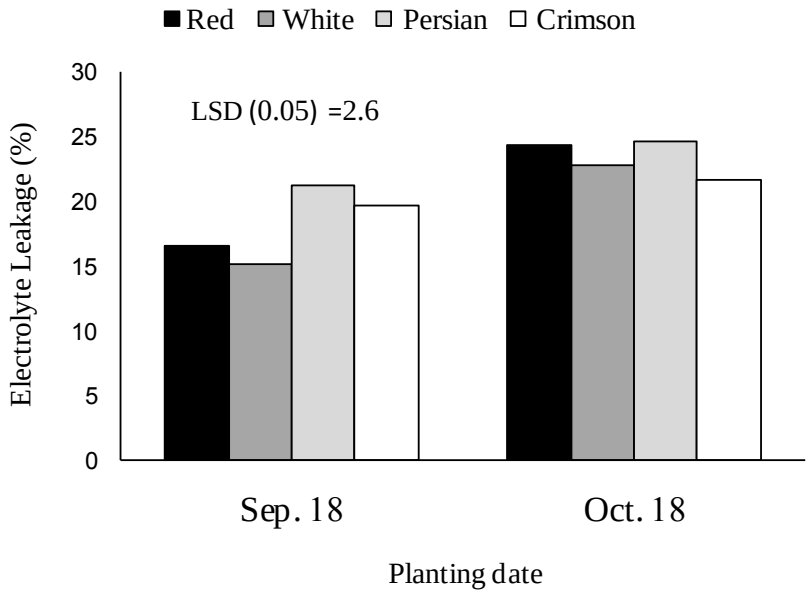
جدول ۲- منبع تغییرات، درجه آزادی و میانگین مربعات (MS) درصد نشت الکترولیت‌های برگ و طوقه گونه‌های شبدر پس از اعمال تنش یخزدگی در شرایط کنترل شده

Table 2-Source of variations, degrees of freedom and mean squares of electrolyte leakage of leaf and crown in clover species after freezing stress in controlled conditions

S.O.V.	df	Leaf	Crown
Planting Date	1	799*	2136*
Species	3	63.6*	57.6ns
Planting Date× Species	3	64.8*	6.8*
Temperature	7	3862*	3635*
Planting Date× Temp.	7	29.1*	158*
Species× Temp.	21	25.6*	70.9*
Planting Date× Species× Temp.	21	36.3*	21.5ns
Error	128	12.8	28.4
CV (%)		14.0	12.7

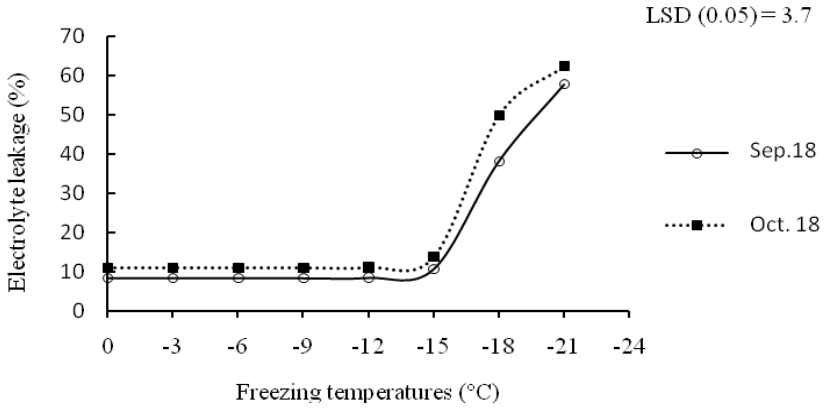
ns و * به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

ns and *: non-significant and significant at 5% level of probability, respectively.



شکل ۲- اثر متقابل تاریخ کاشت و گونه بر درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ گیاه شبدر ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر

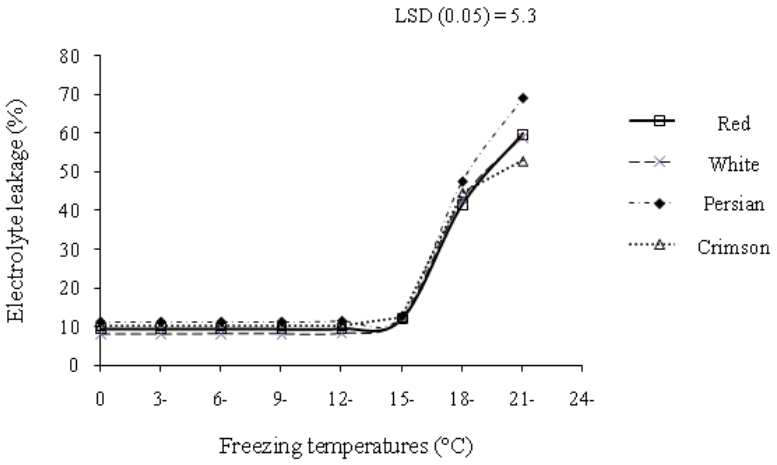
Fig. 2- Cross effects of planting date and species on electrolyte leakage of clover leaves 18 Sep and 18 Oct



شکل ۳. اثر متقابل تاریخ کاشت و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ گیاه شبدر پس از اعمال تنش یخزدگی در شرایط کنترل شده

Fig 3- Cross effects of planting date and freezing temperatures on electrolyte leakage of clover leaves after freezing stress in controlled conditions

در هر چهار گونه شبدر با کاهش دما تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت الکترولیت‌ها تقریباً ثابت بود؛ ولی با کاهش دما به ۲۱- درجه سانتی‌گراد، افزایش نشت الکترولیت‌ها در هرکدام از گونه‌های شبدر قرمز، سفید، ایرانی و لاکی متفاوت و به‌ترتیب ۴۸، ۴۷، ۶۱ و ۴۱ درصد بیش از دمای شاهد بود (شکل ۴). Eugenia *et al.* (2003) در آزمایشی برگ‌های جوان ارقام مختلف شبدر را در دماهای یخزدگی قرار داده، سپس با محاسبه درصد نشت الکترولیت‌ها، بیان کردند که تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد نشت در بین دماهای مختلف، ارقام شبدر و اثر متقابل دما و رقم وجود داشت. در آزمایش ایشان تا دمای ۱۴- درجه سانتی-گراد، تغییر چندانی در نشت الکترولیتها ایجاد نشد ولی کاهش بیشتر دما تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد سبب افزایش چشمگیر نشت الکترولیتها گردید.



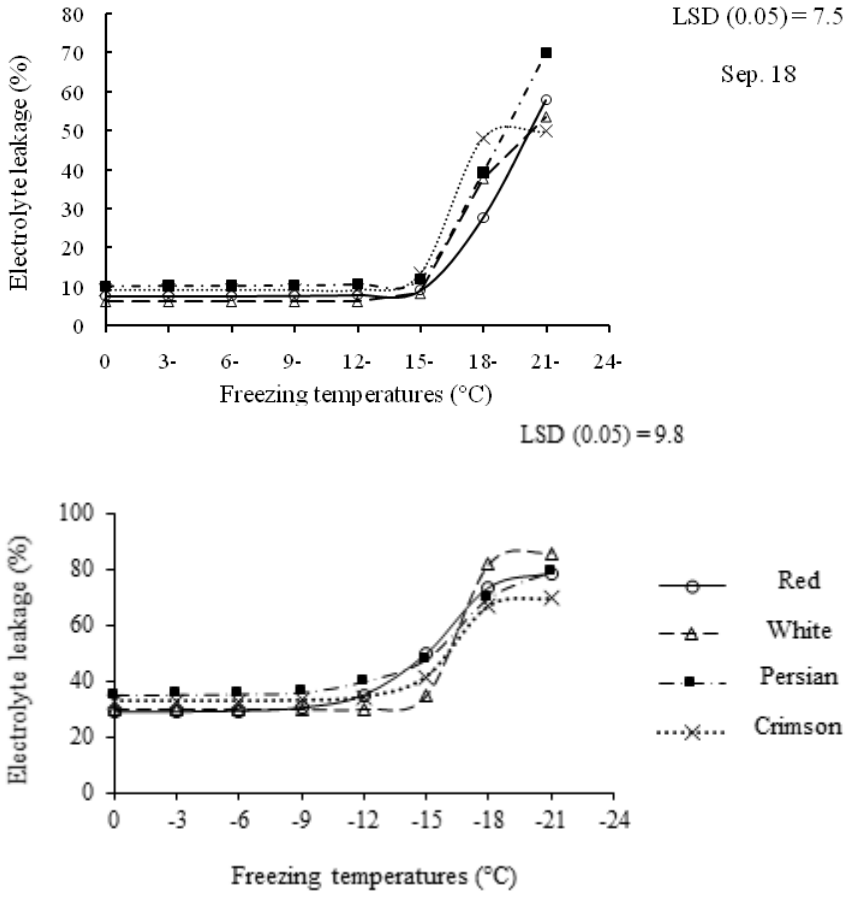
شکل ۴- اثر متقابل گونه و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌های برگ در گونه‌های شبدر پس از اعمال دماهای یخ-زدگی در شرایط کنترل‌شده

Fig 4- Cross effects of species and freezing temperatures on electrolyte leakage of clover leaves after freezing stress in controlled conditions

اثر متقابل تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها نشان داد که با تأخیر در

کاشت، درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ در هر چهار گونه شبدر با کاهش دما تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت بوده و در دماهای کمتر روندی افزایشی داشت؛ به‌طوری‌که با کاهش دما از صفر به ۲۱- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت الکترولیت از برگ در شبدر قرمز در کاشت ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر به ترتیب حدود ۴۹ و ۵۸ درصد افزایش داشت. این افزایش برای شبدر سفید در کاشت ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر به‌ترتیب حدود ۳۸ و ۵۶ درصد بود، اما برای گونه ایرانی تفاوت درصد نشت الکترولیت در دمای صفر و ۲۱- درجه سانتی-گراد در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور ۶۴ درصد و در تاریخ کاشت ۲۷ مهر ۵۸ درصد بود. همچنین شبدر لاکی از این نظر به‌ترتیب در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر دارای تفاوت ۳۶ و ۴۷ درصد بود (شکل ۵).

شیب منحنی درصد نشت الکترولیت از برگ، در گونه‌های (پاییزه) قرمز، سفید و ایرانی در کاشت اواخر شهریور بیشتر از این شیب در کاشت اواخر مهر بود، اما در شبدر (بهاره) لاکی شیب منحنی در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور بیش از تاریخ کاشت ۲۷ مهر بود. Cardona *et al.* (1997) نیز بیان داشتند که شیب بیشتر منحنی نشت الکترولیت‌ها، بیانگر خسارت شدیدتر تنش سرما می‌باشد. در آزمایش ایشان، شیب منحنی نشت الکترولیت‌ها در شرایط خوسرمایی کمتر از شرایط عدم خوسرمایی بود. لذا به‌نظر می‌رسد در آزمایش حاضر، گونه‌های پاییزه در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور از تحمل به سرمای بهتری نسبت به تاریخ کاشت ۲۷ مهر برخوردار بود و گونه بهاره در تاریخ کاشت ۲۷ مهر تحمل به سرمای بالاتری نسبت به تاریخ کاشت ۲۸ شهریور داشت.



شکل ۵. اثر متقابل تاریخ کاشت، گونه و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاه شبدر در شرایط کنترل‌شده

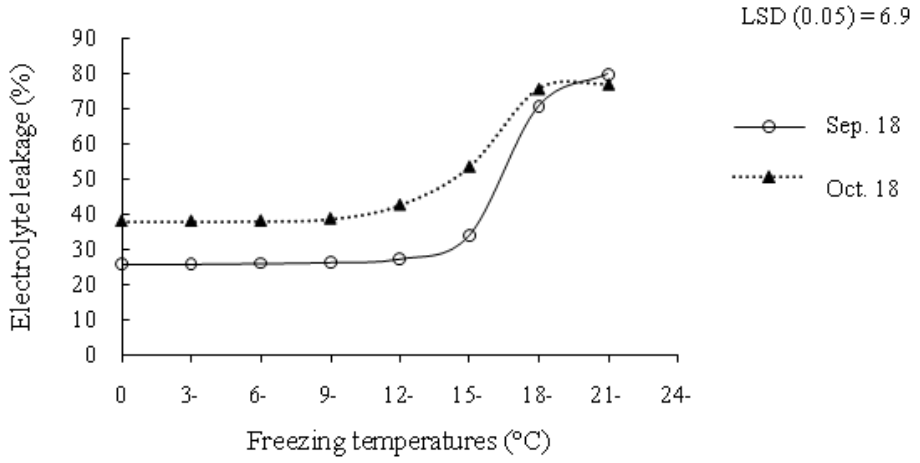
Fig 5- Cross effects of planting date, species and freezing temperatures on electrolyte leakage in clover in controlled conditions

نشت الکترولیت‌های طوقه

اثر متقابل دما و تاریخ کاشت بر درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه معنی‌دار بود (جدول ۲). با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور تا دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت بود و در دماهای کمتر افزایش یافت، اما در تاریخ کاشت ۲۷ مهر، درصد نشت الکترولیت‌ها تا دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد ثابت بود و در دمای کمتر از دمای مذکور افزایش نشان داد، به‌طوری که افزایش درصد نشت الکترولیت از طوقه با کاهش دما از صفر به ۲۱- درجه سانتی‌گراد، در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور و ۲۷ مهر به‌ترتیب حدود ۵۲ و ۳۳ درصد بود (شکل ۶).

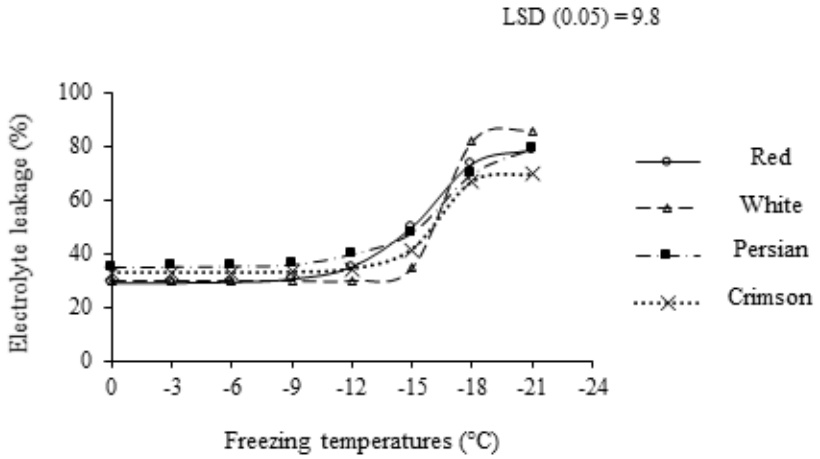
بررسی Nezami *et al.* (2010b) در خصوص اثر تنش یخزدگی بر نشت الکترولیت‌ها در برگ، ریشه و طوقه چند گونه علف چمنی در دو تاریخ کاشت (۱۶ مهر و ۷ آبان) نشان داد که با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها در برگ و طوقه در تاریخ کاشت دوم، کمتر از تاریخ کاشت اول بود که دلیل این تناقض می‌تواند ناشی از اختلاف در مکانیسم‌های خوسرمایی گونه‌های مختلف باشد. در این آزمایش به‌نظر می‌رسد طول بیشتر دوره خوسرمایی در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور سبب گردید که با کاهش دما به کمتر از ۱۵- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت افزایش یابد؛ درحالی‌که در گیاهان کاشت ۲۷ مهر، افزایش درصد نشت، در دماهای کمتر از ۱۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

اثر متقابل دما و گونه‌های شبدر بر درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه معنی‌دار بود. در شبدرهای قرمز و ایرانی کاهش دما تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد اثر چندانی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های طوقه نداشت و دماهای کمتر سبب افزایش آن شد. به‌طوری که درصد نشت الکترولیت‌ها در دو گونه مذکور در دمای ۲۱- نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۳۶ و ۴۰ درصد بیشتر بود؛ اما در شبدر سفید و لاکی، افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه در دماهای کمتر از ۱۵- درجه سانتی‌گراد رخ داد (شکل ۷)، به‌نحوی‌که در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۲۹ و ۵۴ درصد افزایش داشت. آزمایش Nezami *et al.* (2010b) بر روی تحمل به تنش سرما در شش نوع علف چمنی نشان داد که شیب و بیشترین نشت الکترولیت‌ها از سلول‌های برگ (حدود ۹۰ درصد در دمای ۱۶/۵- درجه سانتی‌گراد) بیش از سلول‌های طوقه (معادل ۷۶/۲ درصد در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد) بود. ایشان اظهار داشتند که شیب زیاد در منحنی درصد نشت الکترولیت‌ها، احتمالاً نشان‌دهنده تحمل کمتر گیاه نسبت به تنش یخزدگی است.



شکل ۶- اثر متقابل تاریخ کاشت و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌های طوقه گیاه شبدر در شرایط کنترل‌شده

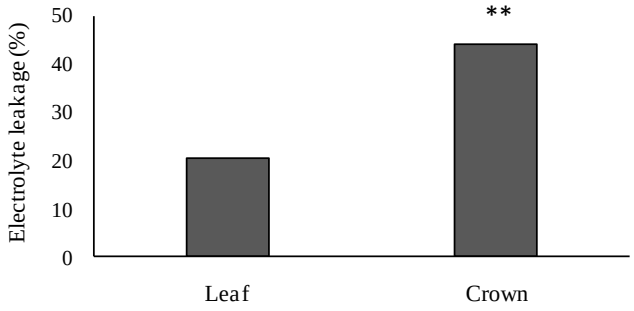
Fig 6- Cross effects of planting date and freezing temperatures on electrolyte leakage of crown in clover in controlled conditions



شکل ۷- اثر متقابل گونه و دماهای یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌های طوقه در گیاه شبدر تحت شرایط کنترل‌شده

Fig 7- Cross effects of species and freezing temperatures on electrolyte leakage of crown in clover in controlled conditions

در این آزمایش درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه (۴۵ درصد) به‌طور معنی‌داری بیش از درصد نشت از برگ (۲۰ درصد) بود (شکل ۸). Cardona *et al.* (1997) با بررسی نمودارهای برازش شده حاصل از نشت الکترولیت‌ها در سه اکوتیپ گیاه پاسپالوم، روند تغییرات درصد نشت مواد را با کاهش دما در برگ‌ها، طوقه و ریشه به‌صورت سیگموئیدی گزارش کرده و شیب منحنی نشت الکترولیت‌ها را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین نشانه‌های خسارت ناشی از تنش سرما در گیاه پیشنهاد و خاطرنشان کردند که نمودار نشت الکترولیت‌ها در گونه‌های سازگار با تنش سرما از شیب کمتری برخوردار بوده و در مقابل در گونه‌های حساس به تنش سرما، این شیب تندتر است. طوقه گیاه شبدر، دارای نشت مواد بیشتری در دمای مشابه نسبت به برگ بود؛ ولی به‌نظر می رسد که با توجه به کمتر بودن شیب منحنی نشت الکترولیت‌ها از طوقه نسبت به برگ در شرایط کاهش دما، طوقه از تحمل بهتری نسبت به برگ برخوردار باشد.



شکل ۸- اثر تنش یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از طوقه و برگ شبدر

**: معنی‌دار ($P\leq0.01$) بر اساس آزمون T جفت‌شده

Fig. 8- Effect of freezing stress on electrolyte leakage of leaf and crown in clover

**: significant ($p\leq0.01$) according to paired T test

دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها

از نظر دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها از برگ گیاهان، در بین گونه‌ها و دو تاریخ کاشت مورد بررسی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما اثر متقابل گونه و تاریخ کاشت بر $LT_{50el(l)}$ معنی‌دار بود (جدول ۳)، به‌طوری که در تاریخ کاشت ۲۸ شهریور، دو گونه شبدر قرمز و ایرانی دارای کمترین

$LT_{50el(l)}$ بودند و گونه لاکی بیشترین مقدار را داشت؛ اما در کاشت ۲۷ مهر دو گونه شبدر ایرانی و لاکی از $LT_{50el(l)}$ پایین‌تری برخوردار بودند و شبدر قرمز $LT_{50el(l)}$ بالاتری داشت. این در حالی بود که شبدر سفید در هر دو تاریخ کاشت از نظر شاخص مذکور تقریباً مشابه بود (شکل ۹).

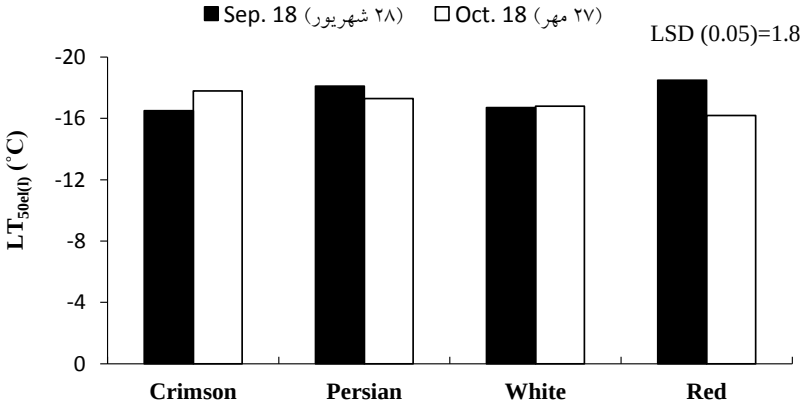
جدول ۳- منابع تغییرات، درجه آزادی و میانگین مربعات $LT_{50el(l)}$و$LT_{50el(c)}$گیاه شبدر پس از اعمال تنش یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 2-Source of variations, degrees of freedom and mean squares of electrolyte leakage of $LT_{50el(l)}$ and $LT_{50el(c)}$ in clover species after freezing stress in controlled conditions

S.O.V.	df	$LT_{50el(l)}$	$LT_{50el(c)}$
Planting date	1	0.4ns	15.0*
Species	3	1.1ns	2.2ns
Plang date×Species	3	3.7*	2.1ns
Error	16	1.1	2.7
Total	23		

ns و * به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

ns and *: non-significant and significant at 5% level of probability, respectively.



شکل ۹- دمای ۵۰ درصد کشندگی ($LT_{50el(l)}$) بر اساس درصد نشت الکترولیت‌های برگ در گونه‌های شبدر در دو تاریخ کاشت متفاوت

Fig. 9- Lethal temperature 50 ($LT_{50(el)}$) based on electrolyte leakage of leaf in clover species in two different planting dates

تاریخ کاشت اثر معنی‌داری بر LT50el(c) داشت (جدول ۳) و گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر از LT50el(c) بالاتری نسبت به تاریخ کاشت ۲۸ شهریور برخوردار بود (جدول ۴)، اما در بین گونه‌ها از این لحاظ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در این بررسی همبستگی مثبت و معنی‌داری (r=۰/۸۱*) بین نشت الکترولیت‌ها از برگ و طوقه مشاهده شد. نظامی و همکاران (Nezami *et al.*, 2010b) نیز همبستگی (r=۰/۸۳*) بالایی بین نشت الکترولیت‌ها از برگ و طوقه علف‌های چمنی گزارش دادند؛ بنابراین با توجه به اینکه نمونه‌گیری از برگ برخلاف طوقه به‌صورت غیر تخریبی می‌باشد، به‌نظر می‌رسد در آزمون تحمل به یخزدگی، بر اساس نشت الکترولیت‌های شبدر، احتمالاً بتوان به‌تنهایی از برگ استفاده کرد.

جدول ۴- دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ و طوقه گیاه شبدر پس از اعمال تنش یخزدگی تحت شرایط کنترل‌شده در تاریخ‌های مختلف کاشت و گونه‌های مورد بررسی

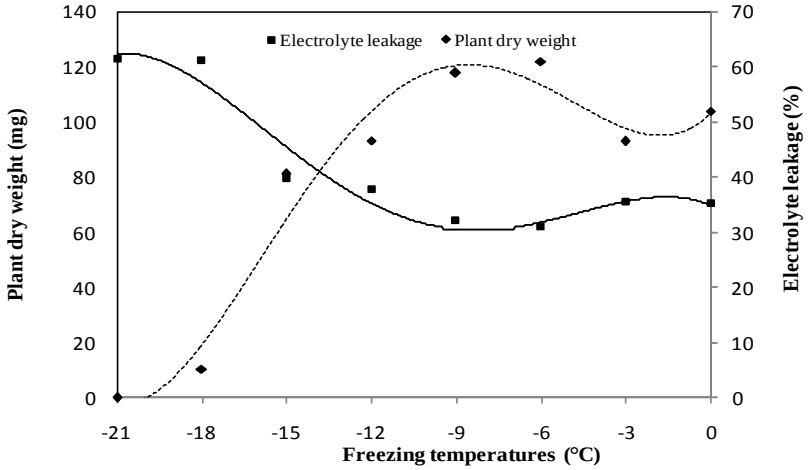
Table 4- Lethal temperature 50 according to the electrolyte leakage percentage of leaf and crown in clover after freezing stress in controlled conditions in different planting dates and studied species

Treatment	$LT_{50el(l)}$	$LT_{50el(c)}$
Planting date		
Sep. 18	-17.2	-16.3
Oct. 18	-16.9	-14.7
LSD (0.05)	ns	2.3
Species		
Red	-17.5	-15.0
White	-16.6	-16.2
Persian	-17.3	-15.9
Crimson	-16.7	-15.1
LSD (0.05)	ns	ns

۲۸ شهریور و ۲۷ مهر ns: غیر معنی‌دار

ns: non-significant 18 Sep and 18 Oct

میزان ماده خشک تولیدی سه هفته پس از تنش یخزدگی در مقابل میزان نشت الکترولیت‌ها در شکل ۱۰ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، به موازات افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در دماهای پایین‌تر از ۹- درجه سانتی‌گراد، مقدار ماده خشک نیز به‌شدت کاهش یافت. برازش منحنی نشت الکترولیت در مقابل وزن خشک اندام هوایی نشان داد که در دمای حدود ۱۴- درجه سانتی‌گراد، این دو منحنی همدیگر را قطع می‌کنند. به این مفهوم که با کاهش دما از ۱۴- درجه سانتی‌گراد به بعد، میزان نشت الکترولیت‌ها به‌اندازه‌ای افزایش می‌یابد که گیاه قادر به جلوگیری از کاهش شدید تولید ماده خشک نمی‌باشد.



شکل ۱۰- اثر دما بر درصد نشت الکترولیت‌ها و وزن خشک اندام هوایی گونه‌های شبدر پس از پایان دوره بازیافت

Fig.10- Effect of freezing temperatures on electrolyte leakage percentage and plant dry weight at the end of the recovery period in clover species

نتیجه‌گیری کلی

تنش یخزدگی باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها و آسیب به اندام‌های گیاه شبدر شد، بااین‌وجود بسته به دماهای یخزدگی و گونه، صفات مورد بررسی به‌طور

متفاوتی تحت تأثیر قرار گرفتند. نتایج حاصل از داده‌های درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} از دو اندام برگ و طوقه نشان داد که در گونه‌های پاییزه (قرمز، سفید و ایرانی)، گیاهان تاریخ کاشت ۲۸ شهریور تحمل به سرمای بالاتری نسبت به گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر داشتند، اما در گونه بهاره (لاکی) گیاهان تاریخ کاشت ۲۷ مهر نسبت به کاشت ۲۸ شهریور تحمل به سرمای بهتری داشتند و نیز برگ گیاه شبدر تحمل به سرمای بالاتری نسبت به طوقه نشان داد. همچنین در دماهای پایین‌تر از ۹- درجه سانتی‌گراد، با افزایش درصد نشت الکترولیتها، میزان ماده خشک به‌شدت کاهش یافت.

REFERENCES

1. Abbasi, M. R. (2008). Genetic diversity of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) gene pools in National Plant Gene Bank of Iran. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 16 (1): 37-49. (In Farsi)
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.) winterhardiness and development of screening methods. *Field Crops Research. 106, 60–67.*
4. Baeka, K. H. & Skinner, D. Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science, 165: 1221-1227.*
5. Cardona, C. A., Duncan, R. R. & Lindstrom, O. (1997). Low temperature tolerance assessment in paspalum. *Crop Science. 37: 1283-1291*.
6. Eugenia, M., Nunes, S. and Smith. G. R. (2003). Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. *Crop Science, 43: 1349-1357.*
7. Henkeby, M., Antolin, M. C. & Sanchez-Diaz, M. (2006). Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Exprimrntal Botany, 55: 305-314.*
8. 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.
9. Murray, G.A., Eser, D. Gusta, L.V. & Eteve, G. (1988). Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. p. 831-843. In the R.J. Summerf00...00Mnield (Ed.) World crops: cool season food legumes. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
10. Nayyar, H., T. S. Bains & Kumar, S. (2005). Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*, 54: 275-285.
11. Nezami, A. & Boroumand Rezazadeh, Z. (2011). Evaluation of freezing tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes under controlled conditions. *Journal of Agroecology*, 3(1), 65-71. (In Farsi)
12. Nezami, A., Hajmohammadnia Ghalibaf, K. & Kamandi, A. (2010a). Evaluation of freezing tolerance of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars under controlled conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 3(2): 177-187. (In Farsi)
13. Nezami, A., Rezaei, J. & Alizadeh, B. (2010b). Evaluation of cold stress tolerance in several species of grasses by electrolyte leakage test. *Journal of Water and Soil*, 24 (5): 1019-1026. (In Farsi)
14. Prasil, L. T., Prasilova. P. & Marik. P. (2007). Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crop Research*, 102: 1-8.
15. Steponkus, P. L., Uemura, M. & Webb, M. S. (1993). A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: P. L. Steponkus (Ed), *Advances n Low-Temperature Biology*. London, JAI Press. Vol 2.
16. Sulk, R. M., Albrecht, K. A. & Duke, S. H. (1991). Leakage of intracellular substances as an indicator of freezing injury in alfalfa. *Crop Science. 31: 430-435.*
17. Teutonica, R. A., Palta, J. P. & Osborn, T. C. (1993). In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cultivars. *Crop Science, 33:103-107.*
18. Thomashow, M. F. (2001). So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!; *Plant Physiology, 125: 89–93.*
19. Zamanian, M. & Asadi, H. (2004). Effects of seed rate, planting date and planting method on morphological traits and forage yield of Persian clover. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 7(3): 241-251. (In Farsi)