نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 30، شماره 1، فروردین – اردیبهشت 1395، ص. 235-222

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 1, Mar.-Apr. 2016, p. 222-235

بررسی مقاومت زمستانه در نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها

احمد نظامی[1*] - مریم جانعلی‌زاده[2] - طیبه خیرخواه[3] - مرتضی گلدانی[4] - کمال حاج محمدنیا [5]

تاریخ دریافت: 1393/04/25
تاریخ پذیرش: 1394/06/23

چکیده

به منظور ارزیابی تحمل به سرمای نعناع فلفلی آزمایشی بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط کنترل شده انجام شد. برای این منظور نمونه‌هایی از استولون و ریزوم گیاه بصورت ماهانه (از آذر 1389 تا فروردین 1390) از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد برداشت شده و پس از انتقال به آزمایشگاه، در فریزر ترموگرادیان در معرض دماهای پایین (از صفر تا 20- درجه سانتی‌گراد با فواصل 4 درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. برای تعیین پایداری غشای پلاسمایی، درصد نشت الکترولیت‌ها اندازه‌گیری شد و سپس دمای 50 درصد کشندگی گیاهان بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el}) محاسبه شد. نتایج نشان داد که با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها از هر دو اندام افزایش یافت، بطوری‌که درصد نشت مواد در دمای 20- درجه سانتی‌گراد 50 درصد بیشتر از تیمار شاهد (دمای صفر درجه سانتی‌گراد) بود. بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون در دمای 20- درجه سانتی‌گراد در ماه فروردین و کمترین آن در همین اندام در دمای 4- درجه سانتی‌گراد و در آذر ماه ثبت شد. گستره LT_{50el} برای استولون‌ها بسته به تاریخ نمونه برداری بین 8/4- تا 14/5- درجه سانتی‌گراد و در ریزوم‌ها بین 8/8- تا 13/9- درجه سانتی‌گراد متغیر بود. بر اساس شاخص‌های درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el}، به نظر می‌رسد که نعناع فلفلی توانایی تحمل به یخزدگی تا دمای 14- درجه سانتی‌گراد را طی ماه‌های سرد سال دارد.

واژه‌های کلیدی: استولون، خوسرمایی، دمای پنجاه درصد کشندگی، ریزوم، یخزدگی

مقدمه

با افزایش درک از کاربردهای مختلف گیاهان دارویی، میزان نیاز و مصرف این گیاهان رو به افزایش است. نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی خانواده‌ی Lamiaceae است (4) که از تلاقی بین دو گونه‌ی *Mentha aquatic* و *Mentha spicata* بدست آمده است (7). از این گیاه و روغن آن برای رفع گرفتگی مجاری تنفسی، درمان دردهای معده، اعصاب و ماهیچه‌ها و نیز یک عامل ضد سرماخوردگی، تهوع و سردرد استفاده می‌شود (8). این گیاه حاوی 1/5 درصد اسانس می‌باشد که به مقدار زیاد در طعم دهنده‌ها و یا افزودنی‌های غذایی، خمیردندان و دیگر محصولات بهداشتی و فرمولاسیون دارویی به کار می‌رود (29).

نعناع فلفلی بومی مناطق معتدله دنیا بویژه اروپا، آمریکای شمالی و شمال آفریقا است، اما امروزه در سراسر دنیا کشت می‌شود (26). در ایران و از جمله خراسان رضوی نیز در سال‌های اخیر تمایل به کشت نعناع فلفلی در بین زارعین افزایش‌یافته است و با توجه به چندساله بودن آن، امکان مواجهه گیاه با سرما در طی فصول پاییز و زمستان زیاد است. با وجود این، هیچ گزارشی در مورد تحمل به سرمای این گیاه وجود ندارد، از این رو اطلاع از میزان تحمل به سرمای آن برای توسعه کشت و موفقیت در تولید این گیاه مفید خواهد بود.

با توجه به مشکلات ارزیابی تحمل به یخزدگی گیاهان در شرایط مزرعه (9)، در برخی مطالعات گیاهان رشد یافته و خوسرما شده در شرایط مزرعه، تحت شرایط کنترل شده در معرض تنش سرما قرارگرفته‌اند (15 و 23) و تحمل به سرمای آن‌ها با استفاده از شاخص‌های مختلفی از جمله نشت الکترولیت‌ها ارزیابی شده است

1، 2، 3، 4 و 5 به ترتیب استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانش آموخته کارشناسی ارشد زراعت، دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: nezami@um.ac.ir

(19). آزمون نشت الکترولیت بر مبنای این اصل استوار است که آسیب به غشاهای سلولی باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها (بویژه یون پتاسیم) از سلول می‌شود، از این رو ثبت مقدار مواد نشت شده می‌تواند تخمینی از آسیب به بافت فراهم کند (17). سالک و همکاران (27) همبستگی بالایی را بین شاخص درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقای زمستانه گیاه یونجه در مزرعه گزارش کردند. اربعوئی و همکاران (2) نیز اظهار داشتند که داده‌های حاصل از آزمون یخزدگی در شرایط کنترل شده همبستگی مناسبی با داده‌های مزرعه‌ای داشته‌اند. میرزایی اصل و همکاران (20) با بررسی تحمل به یخزدگی تعدادی از ارقام گندم دریافتند که در بین صفات مورد بررسی پایداری غشای سیتوپلاسمی، مقدار آب و قند طوقه بیشترین همبستگی را با دمای 50 درصد کشندگی داشتند.

تاکنون از آزمون نشت الکترولیت و LT_{50el}[1] برای ارزیابی و مقایسه میزان تحمل به یخزدگی اندام‌ها، ارقام و گونه‌های تعداد زیادی از گیاهان استفاده شده است. در آزمایش اوگنیا و همکاران (6) بر روی تحمل به یخزدگی نوعی شبدر (*Trifolium hirtum* All.) مشاهده شد که با کاهش دما از 6- به 18- درجه سانتی‌گراد، درصد نشت الکترولیت در برگ‌های جوان هر سه رقم مورد بررسی (Kondinin، Hykon و Overton R18) افزایش یافت. در مجموع برگ‌های جوان هر سه رقم در مقایسه با برگ‌های مسن‌تر، درصد نشت بیشتری داشتند. در آزمایش دیگری تحمل به یخزدگی دو گونه‌ی *Gaura coccinea* و *G. drummondii* از طریق آزمون نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های مختلف گیاه (طوقه، ساقه و ریزوم) مورد بررسی قرار گرفت و در هر دو گونه با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها از کلیه اندام‌ها افزایش یافت و کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب در طوقه و ریزوم مشاهده شد (24). در بررسی ژانگ و همکاران (32) بر روی ارقام پنجه مرغی (*Cynodon dactylon*) نیز با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها در هر دو رقم و در دو شرایط خوسرمایی و عدم خوسرمایی افزایش یافت. اما خوسرمایی درصد نشت الکترولیت در هر دو رقم را کاهش داد. تیمار خوسرمایی، LT_{50el} را برای رقم Riviera حدود 2/2 درجه سانتی‌گراد و برای رقم Princess-77 حدود 1/7 درجه سانتی‌گراد کاهش داد.

این مطالعه با هدف ارزیابی تغییرات تحمل به یخزدگی دو اندام موثر در زادآوری و رشد مجدد (استولون و ریزوم) گیاه نعناع فلفلی طی ماه‌های مختلف سال با استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} در شرایط کنترل شده، اجرا شد.

مواد و روش‌ها

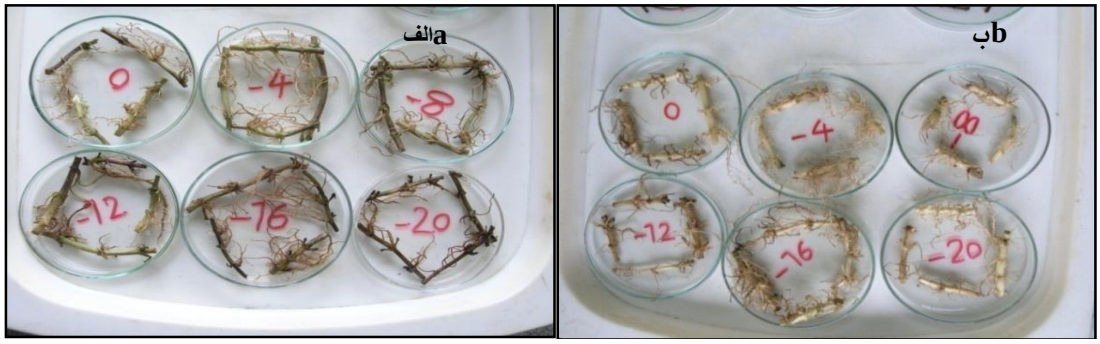
به منظور بررسی تحمل به یخزدگی گیاه نعناع فلفلی رشد یافته در شرایط مزرعه، آزمایشی با چهار تکرار بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سال زراعی 90-1389 در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل آزمایش شامل دو اندام (استولون و ریزوم)، پنج زمان نمونه‌برداری (آذر، دی، بهمن، اسفند و فروردین) و شش دمای پایین (صفر (شاهد)، 4-، 8-، 12-، 16- و 20- درجه سانتی‌گراد) بودند. گیاهان نعناع فلفلی بعد از رشد و خوسرمایی در شرایط طبیعی (مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، واقع در 10 کیلومتری شرق مشهد با عرض جغرافیایی 36 درجه و 16 دقیقه شمالی و طول جغرافیایی 59 درجه و 36 دقیقه شرقی و ارتفاع 985 متری از سطح دریا)، بصورت ماهانه از آذر 1389 تا فروردین 1390 برداشت شده و بعد از انتقال به آزمایشگاه از دو اندام موثر در زادآوری آن‌ها (ریزوم و استولون) نمونه‌هایی با سه گره جدا شد (شکل 1). اندام‌های مذکور بعد از شست و شو در ظروفی پلاستیکی قرار گرفتند. برای حفظ رطوبت نمونه‌ها، با آب مقطر محلول پاشی بر روی نمونه‌ها انجام شده و سپس پارچه تمیزی بر روی آن‌ها قرار گرفت.

برای اعمال دماهای یخزدگی، نمونه‌ها به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در شروع آزمایش 5 درجه سانتی‌گراد بود که پس از قراردادن نمونه‌ها در آن، دما با سرعت 2 درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت تا به دمای مورد نظر رسید. این گرادیان دمایی امکان محاسبه دمای 50 درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها را فراهم می‌کند. برای جلوگیری از پدیده فراسرمایش و ایجاد هستک یخ در گیاهان و اطمینان از اینکه سازوکار مقاومت به سرما از نوع تحمل است و نه اجتناب، در دمای 2- درجه سانتی‌گراد محلول‌پاشی باکتری‌های فعال ایجاد کننده هستک یخ (INAB[2]) بر روی نمونه‌ها به نحوی انجام شد که سطح نمونه‌ها توسط قشری از این محلول پوشانده و خیس شد. همچنین برای ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگه داشته شدند. افزون بر این برای جلوگیری از ذوب شدن سریع یخ، نمونه‌ها بعد از برداشت به اطاقک سردی با دمای 2±5 درجه سانتی‌گراد، منتقل شدند و 24 ساعت در آن شرایط قرار داده شدند.

برای تعیین پایداری غشای سیتوپلاسمی و ارزیابی میزان خسارت یخزدگی، از روش اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها استفاده شد. برای این منظور، روز بعد از اعمال تیمارهای یخزدگی، چهار نمونه از هر اندام در هر تیمار دمایی انتخاب و در داخل لوله‌های حاوی 50 میلی‌لیتر آب دوبار مقطر قرار گرفتند.

1- Lethal temperature for 50% of plants according to the electrolyte leakage percentage.

2- Ice nucleation active bacteria



شکل 1- استولون (الف) و ریزوم (ب) های جدا شده از گیاه نعناع فلفلی و آماده برای بررسی تحمل به یخزدگی
Figure1- Stolon (a) and rhizome (b) separated from peppermint and prepared for evaluating of freeze tolerance

نمونه‌ها به مدت 24 ساعت در دمای اتاق قرار داده شده و سپس نشت اولیه با استفاده از دستگاه رسانایی سنج الکتریکی[1] (مدل Jenway) اندازه‌گیری شد (EC_1). برای اندازه‌گیری میزان نشت کل الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، لوله‌ها به مدت 20 دقیقه در اتوکلاو (با فشار 1/2 بار و دمای 120 درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط آزمایشگاه منتقل شده و بعد از 24 ساعت، نشت نهایی (EC_2) اندازه‌گیری شد. قبل از اندازه گیری درصد نشت الکترولیت‌ها به منظور ایجاد یک محلول یکنواخت لوله‌ها تکان داده داده شدند. درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از معادله (1) محاسبه شد.

$$EL\% = \frac{EC1}{EC2} \times 100 \qquad (1)$$

برای محاسبه دمای 50 درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها، از معادله‌ی (2) استفاده شد (1).

$$ELp = ELi + \{(ELm - ELi)/(1 + e^{-B(T-Tm)})\} \qquad (2)$$

که در معادله‌ی بالا ELp: میزان نشت الکترولیت پیش بینی شده، ELi: حداقل مقدار نشت الکترولیت در دماهای مختلف، ELm: حداکثر مقدار نشت الکترولیت بدست آمده در دماهای مختلف، e: تابع نمایی، B: میزان افزایش شیب منحنی، T: دما و Tm: نقطه عطف منحنی (نقطه میانی بین بخش بالایی و پایینی خط منحنی و نشان دهنده دمایی که باعث خروج 50 درصد الکترولیت‌ها (LT_{50el}) از سلول شده است) می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های درصد نشت الکترولیت‌ها بصورت فاکتوریل سه فاکتور (2×5×6) و داده های LT_{50el} بصورت فاکتوریل دو فاکتور (2×5) با استفاده از نرم افزار MSTAT-C انجام و رسم شکل‌های مربوط به آن‌ها، توسط نرم افزار MS Excel صورت گرفت. برای تعیین LT_{50el} از نرم افزار Slidewrite 7.01 استفاده شد و مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

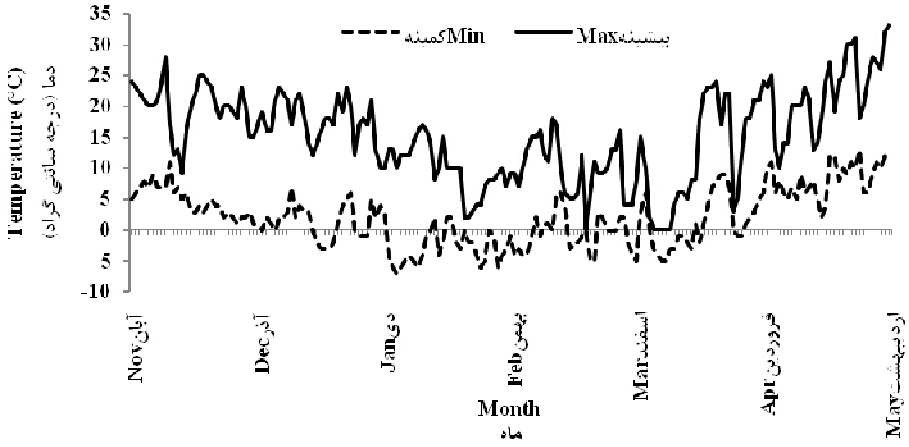
همان‌گونه که در شکل 2 ملاحظه می شود با گذشت زمان از آبان تا آذر دمای هوا به تدریج سرد شده است. در طبیعت کاهش تدریجی دما به همراه روزهای کوتاه در فصل پاییز، شرایط مساعدی را برای خوسرمایی[2] ایجاد می‌کند، زیرا در این شرایط علاوه بر کاهش سرعت رشد در ابتدای فصل کاشت، زمان کافی جهت فعال شدن مکانیزم‌های تحمل به دماهای زیر صفر در گیاهان وجود دارد (21). حداکثر سرما در ماه‌های دی و بهمن بود و از نیمه اسفند دمای هوا مجدداً افزایش یافت.

نتایج تجزیه واریانس (جدول 1) نشان داد که بین اندام‌ها به لحاظ درصد نشت الکترولیت‌ها تفاوت معنی‌داری ($p\leq 0/01$) وجود داشت. بطوری‌که میزان نشت الکترولیت‌ها در استولون بطور میانگین سه درصد کمتر از ریزوم بود (جدول 2). به نظر بسیاری از پژوهشگران درصد نشت الکترولیت‌ها رابطه معکوسی با سلامت و پایداری غشاها دارد و هر چه درصد نشت الکترولیت از گیاهی بیشتر باشد، نشان دهنده‌ی غشای ناپایدار و حساسیت بیشتر به تنش می‌باشد (10). بنابراین بالاتر بودن درصد نشت الکترولیت‌ها در ریزوم، نشان دهنده‌ی حساسیت بیشتر آن به تنش یخزدگی است که احتمالاً خوسرمایی ناکافی این اندام دلیل این امر بوده است.

همان‌طور که قبلاً ذکر شد چون نمونه‌های گیاهی از بوته‌های رشد یافته در مزرعه انتخاب شده بودند، در این حالت به نظر می‌رسد که بدلیل توانایی بافر دمایی خاک[3]، از اثرات دمای القایی جهت خوسرمایی بر ریزوم جلوگیری شده است، در حالیکه استولون در معرض این گونه دماها قرار داشته و از این رو فرآیندهای خوسرمایی بیشتری در این اندام در برابر تنش سرما القا شده است.

1-Electrical conductivity meter

2- Hardening
3- Thermal buffering capacity of the soil



شکل 2- دماهای کمینه و بیشینه پاییز و زمستان 1389 و بهار 1390 در مشهد

Figure 2- Minimum and maximum temperatures of autumn and winter of 2010 and spring of 2011 in Mashhad

در بررسی نظامی و همکاران (23) بر روی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) نیز درصد نشت الکترولیت در اندام‌های مختلف این گیاه متفاوت بود، به نحوی که بیشترین درصد نشت مواد در ریشه و کمترین آن به ترتیب در برگ و طوقه بدست آمد. در این بررسی دمای 50 درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون تقریباً یک درجه سانتی‌گراد کمتر از ریزوم بود که نشان دهنده‌ی تحمل به یخزدگی بیشتر این اندام بود (جدول 2). رضوان بیدختی و همکاران (25) نیز گزارش کردند که در میان اندام‌های مختلف موسیر (*Alliumm altissimum* Regel.)، بیشترین LT_{50el} متعلق به ریشه و کمترین آن به برگ و ریزوم تعلق داشت.

اثر تنش یخزدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها نیز معنی‌دار ($p\leq0/01$) بود (جدول 1). بطوری‌که کاهش دما به کمتر از 4- درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری نشت مواد از بافت‌ها را افزایش داد و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد درصد نشت الکترولیت‌ها تقریباً 50 درصد بیشتر از دمای صفر درجه سانتی‌گراد بود (شکل 3). به نظر می‌رسد اختلال در ساختار غشای سلولی عامل اصلی افزایش نشت الکترولیت‌ها در این آزمایش باشد، زیرا اثرات ناشی از تنش سرما سبب اختلال در ساختار غشا شده و حاصل این تغییرات، کاهش انسجام غشاها و افزایش نشت الکترولیت‌ها از آن‌ها می‌باشد (5). در بررسی نیار و همکاران (22) بر روی اثر تنش سرما بر گیاهچه‌های دو هفته‌ای نخود نیز مشاهده شد که با کاهش دما، نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت.

با وجود اینکه دو اندام به لحاظ درصد نشت الکترولیت‌ها تحت تاثیر دماهای یخزدگی اختلاف معنی‌داری ($p\leq0/01$) با یکدیگر نداشتند (جدول 1) و روند افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از دمای 4- درجه سانتی‌گراد شروع شد، ولی درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای 12- درجه سانتی‌گراد در ریزوم هشت درصد بیشتر از استولون بود (شکل 4). در بررسی رضوان بیدختی و همکاران (25) بر روی گیاه موسیر نیز درصد نشت الکترولیت‌ها از برگ و پیاز بوم ریخت‌های مورد مطالعه با کاهش دما از 8- درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری نداشت، این در حالی بود که با کاهش دما از صفر به 8- درجه سانتی‌گراد در ریشه بوم ریخت‌های شیروان، کلات و تندوره، درصد نشت الکترولیت‌ها بطور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین در اندام ریشه افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها با تغییر دما از صفر درجه سانتی‌گراد به دمای 20- درجه سانتی‌گراد بیشتر از اندام برگ و پیاز بود.

اثر زمان‌های نمونه برداری بر درصد نشت الکترولیت‌ها به طور معنی‌داری متفاوت بود (جدول 1). بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه فروردین و کمترین آن در ماه دی اتفاق افتاد و بین نمونه‌های برداشت شده در ماه‌های آذر، دی و بهمن تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل 5). درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه دی نسبت به فروردین 22/7 درصد کمتر بود. کمتر بودن درصد نشت الکترولیت در ماه دی، نشان دهنده‌ی مقاوم تر شدن گیاهان در این ماه بدلیل انجام عمل خوسرمایی است.

و افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از ماه اسفند به بعد، نشان دهنده‌ی از بین رفتن خوسرمایی[1] و کاهش تحمل گیاهان به تنش یخزدگی است. یک نقش کلیدی خوسرمایی یا تطابق به سرما، پایدار کردن غشاها در برابر خسارت ناشی از تنش یخزدگی است (28). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که افزایش دما منجر به از دست رفتن خوسرمایی و کاهش سطح تحمل به یخزدگی گیاهان می‌شود (12). در گیاهان غیرخوابی که دچار از بین رفتن خوسرمایی می‌شوند،

1- De-acclimation

دماهای بالا می‌توانند از سرگیری رشد آن‌ها را تقویت بخشد (13). از سرگیری رشد و از بین رفتن خوسرمایی، در ارتباط با آبگیری بافت‌ها و سلول‌هاست. اگر دوباره هوا سرد شود، این مقدار آب بالا ممکن است منجر به خسارت مکانیکی ناشی از یخ‌زدگی خارج سلولی شود (3).

جدول 1- منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها و دمای 50 درصد کشندگی گیاهان براساس درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی قرار گرفته در معرض دماهای یخ زدگی در طی زمان‌های مختلف نمونه برداری.

Table 1- Sources of variation, degree of freedom and mean of squares for electrolyte leakage (EL%) and LT_{50el} from peppermint organs subjected to freezing temperature during different sampling times.

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	درصد نشت الکترولیت‌ها Electrolytes leakage %	درجه آزادی Degree of freedom	دمای 50 درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها (LT_{50el})
اندام Organ	1	520.941**	1	83.363*
دما Temperature	5	20553.314**	-	-
اندام × دما Organ × Temperature	5	74.035ns	-	-
زمان نمونه برداری Sampling time	4	4499.078**	4	44.386**
اندام × زمان نمونه برداری Organ × Sampling time	4	410.396**	4	4.190*
دما × زمان نمونه برداری Temperature× Sampling time	20	1212.055**	-	-
اندام × دما × زمان نمونه برداری Organ×Temperature×Sampling time	20	96.526**	-	-
خطا Error	180	43.519	30	1.462
کل Total	239		39	

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال 1و 5 درصد و عدم معنی‌داری.

**, * and ns are significant at 1 and 5 % probability level and non significant respectively

جدول 2- میانگین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el}در اندام‌های نعناع فلفلی قرار گرفته در معرض تنش یخ‌زدگی.

Table 2- Mean of electrolytes leakage % (EL) and LT_{50el} from peppermint organs exposed to freezing stress.

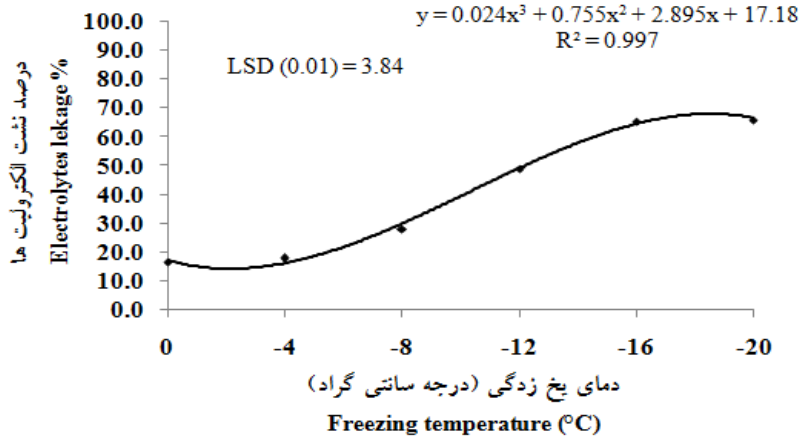
اندام Organ	درصد نشت الکترولیت‌ها electrolytes leakage%	دمای 50% کشنگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها LT_{50el} (°C)
استولون Stolon	39 b	-12.0 b
ریزوم Rhizome	42 a	-11.1 a

*میانگین‌هایی با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌داری به ترتیب در سطوح احتمال 1 و 5 درصد بر اساس آزمون LSD هستند.

* Means which have different letters in each column have significant difference at 1 and 5% probability level respectively according to the LSD test

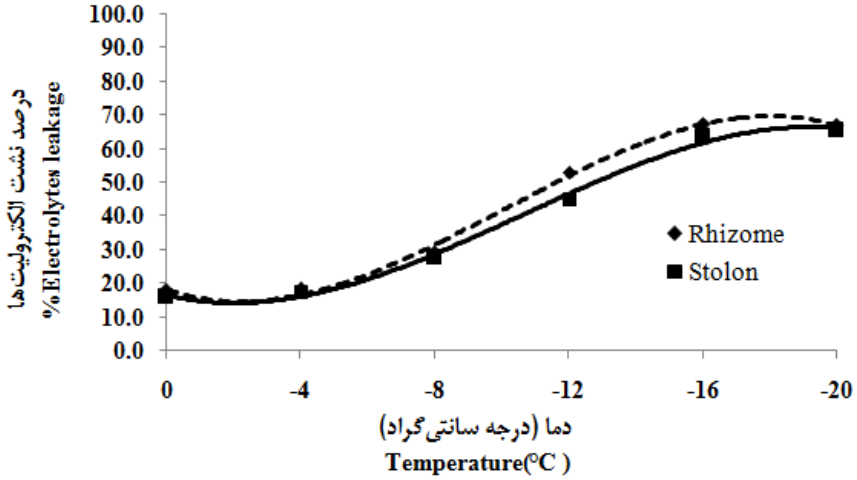
در آزمایش اوگنیا و همکاران (6) بر روی تحمل به یخ‌زدگی نوعی شبدر (*Trifolium hirtum* All.) نیز با گذشت زمان از فوریه (بهمن) تا می (اردیبهشت)، درصد نشت الکترولیت‌ها در کلیه ی ارقام مورد بررسی (سه رقم شبدر هیرتوم به همراه رقم Dixie از شبدر کریمسون (*Trifolium incarnatum* L.) و پنج لاین اصلاحی از شبدر هیرتوم) افزایش داشت. در مطالعه بر روی تمشک قرمز (*Rubus idaeus* L.) نیز آزمایش‌های یخ‌زدگی ماهانه، تغییرات فصلی را در پاسخ نشتی ساقه[1] این گیاه نشان داد.

1- Cane



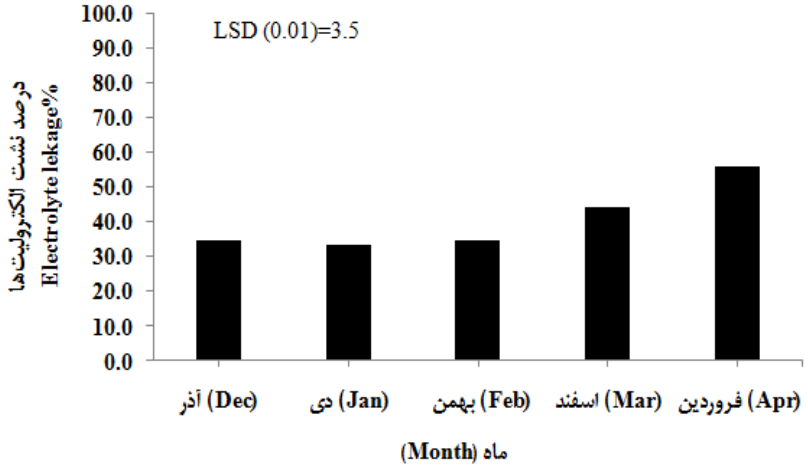
شکل 3- اثر تنش یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاه نعناع فلفلی

Figure 3- Effect of freezing stress on electrolytes leakage percentage of peppermint



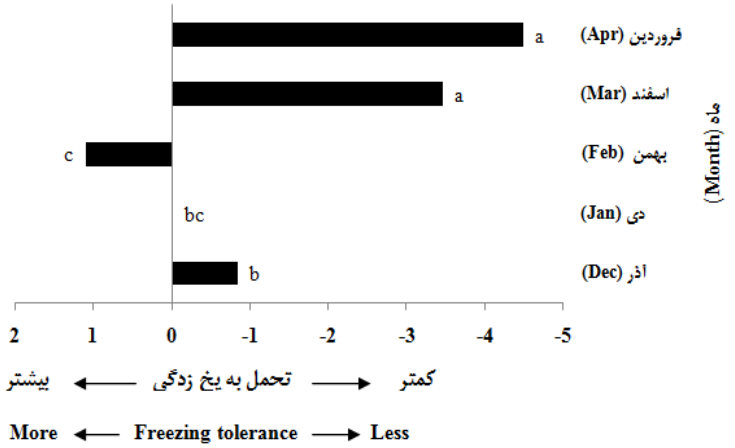
شکل 4- اثر تنش یخ‌زدگی بر درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی

Figure 4- Effect of freezing stress on electrolytes leakage percentage from peppermint organs



شکل 5- اثر زمان نمونه برداری بر درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاه نعناع فلفلی

Figure 5- Effect of sampling time on electrolyte leakage % in peppermint



شکل 6- تحمل به یخزدگی گیاه نعناع فلفلی بر اساس شاخص LT_{50el} طی زمان‌های مختلف نمونه‌برداری. زمان‌هایی با یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری با ماه دی در سطح احتمال 1 درصد ندارند

Figure 6- Freezing tolerance of peppermint according to the LT_{50el} during different sampling times. Times with a common letter haven't significant difference at 1% probability level with January month

بطوری‌که بعد از اولین نمونه‌برداری در اکتبر (مهر)، یک کاهش در مقدار حداکثری نشت الکترولیت‌ها و همزمان یک صاف شدگی[1] در منحنی دما-پاسخ نشتی مشاهده شد. همچنین در آوریل (فروردین) نشت الکترولیت القا شده در اثر تنش یخزدگی کمترین مقدار را دارا بود (18).

از آنجایی که کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه دی اتفاق افتاد. از این رو دمای 50 درصد کشندگی در این ماه (13/1- درجه سانتی‌گراد) با بقیه ماه ها مقایسه شد. همان‌گونه در شکل 6 مشاهده می‌شود تنها LT_{50el} نمونه‌ها در ماه‌های اسفند و فروردین دارای اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های این ماه هستند و تحمل به یخزدگی نعناع فلفلی در ماه‌های آذر و بهمن مشابه به دی ماه بود (شکل 6). همچنین LT_{50el} در ماه بهمن نسبت به دی تقریباً یک درجه سانتی‌گراد کمتر بود بعبارت دیگر، هر دو اندام به طور میانگین در این ماه بدلیل خوسرمایی یک درجه سانتی‌گراد تحمل به یخزدگی بیشتری نشان دادند (شکل 6).

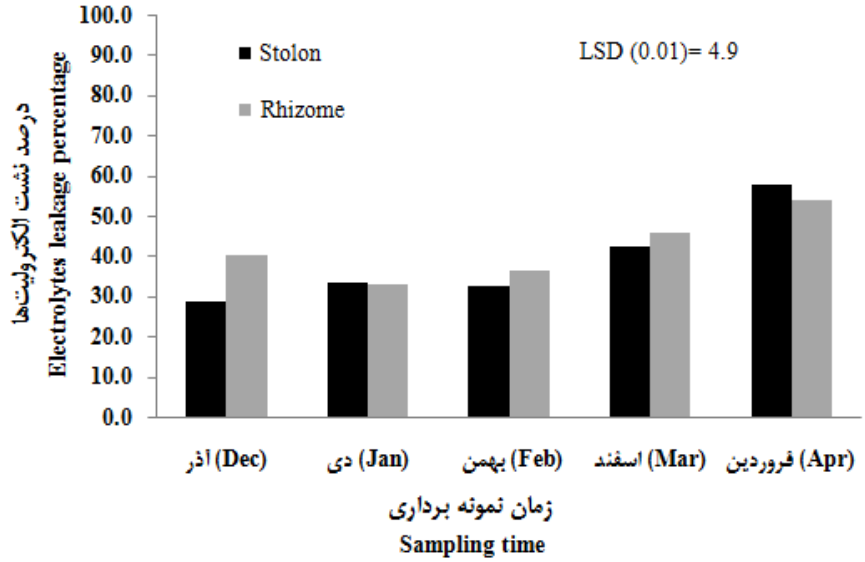
برهم کنش اندام و زمان نمونه‌برداری بر درصد نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار ($p\leq0/01$) بود (جدول 1). خروج الکترولیت‌ها از استولون در ماه های آذر و دی نسبت به ماه فروردین به ترتیب و تقریباً 24 و 29 درصد کمتر بود. ریزوم نیز در ماه‌های دی و فروردین به ترتیب کمترین و بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها را داشت (شکل 7). دامنه‌ی درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون بین 28/6 و 57/8 درصد و برای ریزوم بین 32/9 و 54/1 درصد متغیر بود. ریزوم‌ها در ماه دی و استولون‌ها در ماه آذر کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها را نشان دادند (شکل 7). هر چند تفاوت بین درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون‌ها بین ماه‌های آذر، دی و بهمن معنی‌دار نبود. وونگشیری و همکاران (30) نیز با بررسی اثر تنش یخزدگی بر روی نوعی لیمو (*Ocimum citriodourum*) دریافتند که با گذشت زمان میزان نشت الکترولیت‌ها در برگ‌های پیر و جوانی که در معرض دماهای پایین قرار گرفته بودند افزایش یافت و این مسئله در برگ‌های پیر سریع‌تر اتفاق افتاد.

در زمان‌های مختلف نمونه برداری نیز با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت. افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه آذر، بهمن، اسفند و فروردین از دماهای بالاتری (8- درجه سانتی‌گراد) شروع شد. در حالی‌که روند زیاد شدن نشت مواد در ماه دی از دماهای پایین تری آغاز گردید (جدول 3). بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه فروردین و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد و کمترین درصد نشت در ماه اسفند و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول 3).

در بررسی اثر متقابل اندام و زمان بر روی تحمل به سرمای نعناع فلفلی که با استفاده از شاخص LT_{50el} انجام شد، ضمن مشاهده معنی‌داری این اثر (جدول 1) مشاهده گردید که با گذشت زمان از آذر ابتدا تحمل اندام‌ها به تنش یخزدگی بیشتر شد، بطوریکه در ماه بهمن کمترین LT_{50el} در هر دو اندام بدست آمد.

اما با گرم تر شدن هوا (از بهمن ماه به بعد)، سطح تحمل به یخزدگی افت کرد و در ماه فروردین بیشترین دمای 50 درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها در هر دو اندام مشاهده شد. در این بررسی دامنه‌ی LT_{50el} برای استولون بین 8/4- تا 14/5- و در ریزوم بین 8/8- تا 13/9- درجه سانتی‌گراد متغیر بود (شکل 8).

1-Flattening



شکل 7- میانگین درصد نشت الکترولیت‌ها از اندام‌های گیاه نعناع فلفلی طی زمان‌های مختلف نمونه برداری.

Figure7- The mean of electrolytes leakage percentage from peppermint organs during different sampling times.

جدول 3- اثر متقابل تنش یخزدگی و زمان نمونه برداری بر درصد نشت الکترولیت‌ها در گیاه نعناع فلفلی.

Table 3- Interaction effect of freezing stress and sampling time on electrolytes leakage % in peppermint.

زمان نمونه برداری Sampling time	دمای یخزدگی (درجه سانتی‌گراد) Freezing temperature (°C)					
	0	-4	-8	-12	-16	-20
آذر Dec	13.8	13.8	24.3	35.5	56.5	63.2
دی Jan	24.4	26.3	24.0	30.1	58.3	36.4
بهمن Feb	15.8	18.7	22.9	30.4	51.3	68.7
اسفند Mar	12.8	17.2	28.3	62.7	72.2	71.8
فروردین Apr	16.4	13.4	41.4	86.0	88.5	89.9
LSD (0.01)=6.8						

*میانگین‌هایی که اختلاف آن‌ها بیشتر از LSD است دارای تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر هستند

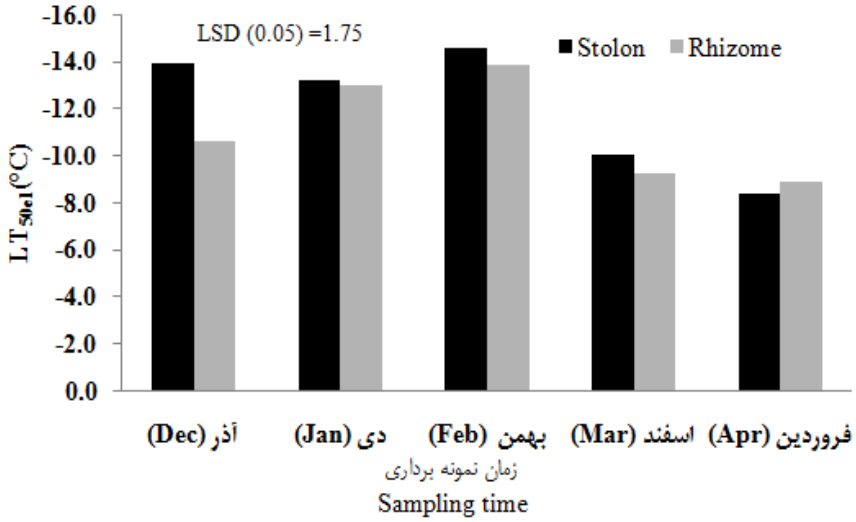
*means that their difference are more than LSD have significant difference

به نظر می‌رسد که با گذر زمان ابتدا بدلیل انجام خوسرمایی تحمل به یخزدگی افزایش یافته است و در ماه‌های اسفند و فروردین با گرم شدن تدریجی هوا خوسرمایی از بین رفته و متعاقب آن تحمل به یخزدگی کاهش یافته است.

تحمل به یخزدگی به مفهوم توانایی گیاهان به تحمل تشکیل یخ در فضاهای بین سلولی است بدون اینکه آسیب قابل توجهی به غشاها یا سایر اجزای سلولی وارد شود. این امر حاصل روابط فیزیولوژیکی، شیمیایی، فیزیکی و تغییرات در ساختار سلولی گیاه است که در مراحل رشدی مناسب و تحت شرایط محیطی مطلوب اتفاق می‌افتد، این فرآیند به خوسرمایی معروف است (14). به طور کلی واکنش گیاهان به تنش دماهای پایین را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد: نخستین مرحله که تطابق[1] یا پیش خوسرمایی[2] نامیده می‌شود، در دماهای پایین اما بالای صفر درجه سانتی‌گراد اتفاق می افتد. مرحله دوم سخت شدگی (خوسرمایی) نامیده می‌شود که در دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد (نظیر آنچه در ماه‌های آذر، دی و یا بهمن دیده می‌شود) اتفاق می‌افتد که سقف تحمل به یخزدگی در طی این مرحله بدست می‌آید. مرحله سوم بازیافت و رشد مجدد گیاه بعد از زمستان است که منجر به از بین رفتن خوسرمایی در آن‌ها می‌شود (16). در طی دوره از بین رفتن خوسرمایی، تغییرات معکوس در چربی غشای گیاهان در مقایسه با خوسرمایی پاییزه مشاهده شده است.

1- Acclimation
2- Pre-hardening

تغییر در وضعیت غشاهای سلولی طی از بین رفتن خوسرمایی، توانایی گیاهان را برای بقاء کاهش می‌دهد (31).



شکل 8- دمای 50 درصد کشندگی گیاه بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های نعناع فلفلی طی زمان‌های نمونه برداری مختلف.

Figure 8- Lethal temperature for 50% of plant according to the electrolyte leakage% in peppermint organs during different sampling time

در این آزمایش برهم کنش اندام، دما و زمان نمونه برداری بر درصد نشت الکترولیت‌ها نیز معنی‌دار ($p\leq0/01$) بود (جدول 1) و کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون و به ترتیب در دماهای 4- و صفر درجه سانتی‌گراد در ماه آذر و بیشترین آن متعلق به همین اندام و به ترتیب در دماهای 20- و 16- درجه سانتی‌گراد در فروردین ماه مشاهده شد (جدول 4). در دمای 20- درجه سانتی‌گراد، حداقل درصد نشت الکترولیت‌ها از استولون در ماه دی و حداکثر آن در فروردین ماه اتفاق افتاد، بطوری‌که درصد نشت مواد در این ماه نسبت به دی ماه 55/5 درصد بیشتر بود. در ریزوم نیز حداقل درصد نشت الکترولیت‌ها متعلق به دمای صفر درجه سانتی‌گراد در ماه بهمن و حداکثر نشت مواد در دمای 20- درجه سانتی‌گراد در فروردین ماه مشاهده شد. همچنین در ریزوم در دمای 20- درجه سانتی‌گراد، تفاوت میان حداقل و حداکثر نشت مواد که به ترتیب در ماه‌های دی و فروردین اتفاق افتاد، 51/5 درصد بود (جدول 4). در استولون روند افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه های دی و بهمن از دمای 16- درجه سانتی گراد و در ماه‌های آذر و اسفند از دمای 12- درجه سانتی‌گراد شروع شد، در حالیکه در فروردین ماه افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها از دماهای بالاتری (8- درجه سانتی‌گراد) آغاز شده بود (جدول 4).

در ریزوم نیز در ماه های آذر و بهمن، دمای کمتر از 12- درجه سانتی‌گراد سبب افزایش معنی‌دار در درصد نشت الکترولیت‌ها نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد شد. اما در ماه‌های دی و اسفند به ترتیب از دمای پایین تر از 16- و 8- درجه سانتی‌گراد شیب تندی در خروج الکترولیت‌ها از این اندام مشاهده شد. این داده ها نشان می‌دهد که در هر دو اندام به دلیل خوسرمایی خروج الکترولیت ها در دی ماه از دماهای کمتری شروع شده است. در ریزوم حداکثر یا بیشینه‌ی درصد نشت الکترولیت‌ها در ماه فروردین کمتر از استولون بود. همچنین ریزوم در این ماه از دمای 12- درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری را در درصد نشت الکترولیت‌ها نسبت به تیمار شاهد نشان داد.

شکل‌های 7، 8 و 9 نشان می‌دهند که هر زمان درصد نشت الکترولیت‌ها کمتر بوده است LT_{50el} نیز کاهش یافته است. بعنوان مثال، در استولون پایین ترین درصد نشت الکترولیت در ماه‌های آذر، دی و بهمن اتفاق افتاد و پایین‌ترین LT_{50el} نیز در همین ماه‌ها مشاهده شد. به‌طور مشابه در ریزوم نیز حداقل نشت الکترولیت در ماه‌های دی و بهمن و کمترین LT_{50el} نیز در همین زمان‌ها ثبت شد.

در بررسی همبستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} ژنوتیپ‌های یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* L.) نیز مشاهده شد که با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای 50 درصد کشندگی نیز کاهش یافته است (11). در بررسی حاضر، ضریب تبیین (R^2) بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT_{50el} در استولون نسبت به ریزوم بالاتر بود (شکل 9). بعبارتی، در حالیکه 82 درصد تغییرات LT_{50el} استولون به درصد نشت الکترولیت‌های آن مربوط بود، در ریزوم تنها 62 درصد نوسان در میزان این شاخص مرتبط با درصد نشت الکترولیت‌ها از آن بود.

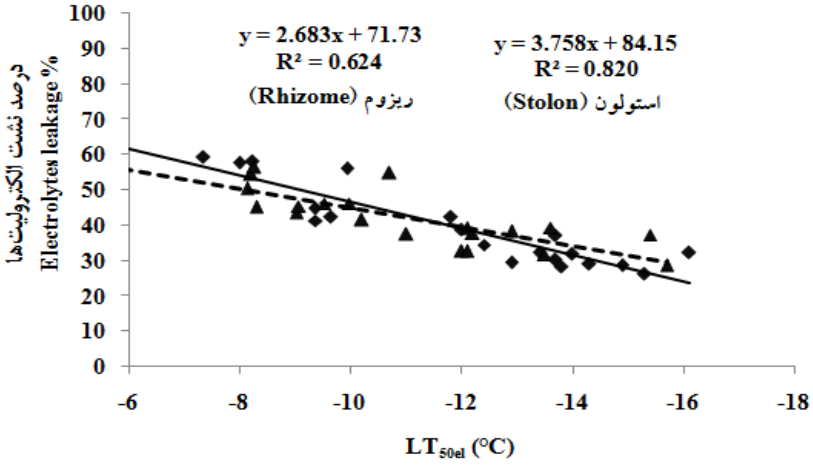
جدول 4- درصد نشت الکترولیت‌ها در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری از دو اندام استولون و ریزوم نعناع فلفلی قرار گرفته در معرض دماهای یخ‌زدگی

Table 4- Electrolytes leakage % at different sampling times from two organs of peppermint (stolon and rhizome) which exposed to freezing temperatures

اندام Organ	زمان نمونه برداری Sampling time	دمای یخ‌زدگی (درجه سانتی‌گراد) Freezing temperature (°C)					
		0	-4	-8	-12	-16	-20
استولون Stolon	آذر (Dec)	9.7	9.3	18.6	23.5	48.3	62.1
	دی (Jan)	24.7	29.4	21.3	28.0	60.3	37.6
	بهمن (Feb)	19.1	16.6	23.2	25.6	47.5	63.7
	اسفند (Mar)	12.7	19.3	23.3	61.8	69.0	69.7
	فروردین (Apr)	12.5	12.7	50.9	85.6	91.8	93.1
ریزوم Rhizome	آذر (Dec)	18.0	18.3	30.1	47.4	64.7	64.3
	دی (Jan)	24.1	23.1	26.7	32.2	56.3	35.2
	بهمن (Feb)	12.4	20.9	22.7	35.2	55.0	73.6
	اسفند (Mar)	12.9	15.2	33.4	63. 7	75.3	73.9
	فروردین (Apr)	20.4	14.1	31.9	86.4	85.3	86.7
LSD (0.01)=12.14							

*میانگین‌هایی که اختلاف آن‌ها بیشتر از LSD است دارای تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر هستند.

*means that their difference are more than LSD have significant difference.



شکل 9- رابطه بین درصد نشت الکترولیت‌ها و دمای 50 درصد کشندگی گیاه بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون (خط منقطع) و ریزوم (خط ساده)های گیاه نعناع فلفلی قرار گرفته در معرض تنش یخ‌زدگی (هر نقطه میانگین شش داده می‌باشد)

Figure 9- Relationship between electrolytes leakage % and lethal temperature for 50% of plant according to the electrolytes leakage in stolon (dash line) and rhizome (simple line) of peppermint exposed to freezing stress (each point is mean of 6 data)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها در استولون در دمای 4- درجه سانتی‌گراد در ماه آذر و بیشترین آن در فروردین ماه و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد. در ریزوم نیز کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها متعلق به دمای صفر درجه سانتی‌گراد در ماه بهمن و حداکثر نشت مواد در دمای 20- درجه سانتی‌گراد در فروردین ماه رخ داد. کمترین LT_{50el} (بیشترین تحمل به یخ‌زدگی) برای هر دو اندام در ماه بهمن بدست آمد. بر اساس شاخص LT_{50el}، نعناع فلفلی در ماه‌های سرد سال توانایی تحمل به

یخزدگی را تا دمای 14- درجه سانتی‌گراد دارد.

منابع

1- Anderson J.A., Michael P., and Taliaferro C.M. 1988. Cold hardiness of Midiron and Tifgreen. Horticultural Science, 23:748-750.
2- Arbaoui M., Balko C., and Link W. 2008. Study of faba bean (*Vicia faba* L.) winter hardiness and development of screening methods. Field Crops Research, 106: 60–67.
3- Ashworth E.N. 1992. Formation and spread of ice in plant tissues. Horticultural Review, 13: 215–255.
4- Bupesh G., Amutha C., Nandagopal S., Ganeshumar A., Sureshkumar P., and Murali K.S. 2007. Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (Peppermint) from leaf extracts – a medicinal plant. Acta Agriculturae Slovenica, 89 (1): 73 – 79.
5- Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., and Nunes M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. Journal of Plant physiology, 160: 283-292.
6- Eugenia M., Nunes S., and Ray Smith G. 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. Crop Science, 43: 1349–1357.
7- Foster S. 1996. Peppermint: *Mentha piperita*. American Botanical Council - Botanical Series, 306:3–8.
8- Gardiner P. 2000. Peppermint *(Mentha piperta)*. Longwood Herbal Task Force; Available at: http://www.longwoodherbal.org/ peppermint/peppermint.pdf
9- Gusta L.V., O'Connor B.J., Gao Y.P., and Jana S. 2000. A re-evaluation of controlled freeze-tests and controlled environment hardening conditions to estimate the winter survival potential of hardy winter wheats. Canadian Journal of Plant Science, 80: 241-246.
10- Han B., and Bischof J.C. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryobiology, 48:8-21.
11- Izadi- Darbandi E., Nezami A., Abbasian A., and Heidari M., 2012. Evaluation of freezing stress tolerance in Wild Oat (*Avena ludoviciana* L.) by electrolytes leakage test. Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences, 5 (1): 81-94. (in Persian with English abstract)
12- Kalberer S.R., Wisniewski M., and Arora R. 2006. Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. Plant Science, 171: 3-16.
13- Leinonen I., Repo T., and Ha¨nninen H. 1997. Changing environmental effects on frost hardiness of Scots pine during dehardening. Annual of Botany, 79: 133–138.
14- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol 1, Chilling, freezing and high temperature stresses. 2nd ed. Academic Press, New York.
15- Li R., Qu R., Brunean A.H., and Livingston D.P. 2010. Selection for freezing tolerance in St. Augustine grass through somaclonal variation and germplasm evaluation. Plant Breeding, 129: 417-421.
16- Li W., Wang R., Li M., Li L., Wang C., Welti, R., and Wang X. 2008. Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry, 283: 461–468.
17- Linden L. 2002. Measuring cold hardiness in woody plants. Academic dissertation. University of Helsinki Finland.
18- Linden L., Palonen P., and Linden M. 2000. Relating freeze-induced electrolyte leakage measurements to lethal temperature in red raspberry. Journal of American Society Horticultural Science, 125(4):429–435.
19- McNabb K., and Takahashi E. 2000. Freeze damage to loblolly pine seedlings as indicated by conductivity measurements and out planting survival. Auburn University Southern Forest Nursery Management Cooperative. Research Report 00-4.
20- Mirzai-Asl A., Yazdi-Samadi B. Zali A. and Sadeghian-Motahhar Y. 2002. Measuring cold resistance in wheat by laboratory tests. Iranian Journal of Sciences and Technology in Agriculture and Natural Resources, 6:177-186. (in Persian with English abstract)
21- Moshiri F., Bagheri A., and Safarnejad A. 2006. The effect of cold acclimation on freezing tolerance of three chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Iranian Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 12:153-160. (in Persian with English abstract)
22- Nayyar H., Bains T.S., and Kumar S. 2005. Chilling stressed chickpea seedling: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany, 54:275-285.
23- Nezami A., Azizi G., Siahmarghooee A., and Mohamadabadi A. A. 2010. Effects of freezing stress on electrolyte leakage of fennel (*Foeniculum vulgare*). Iranian Journal of Field Crops Research, 8: 587-593. (in Persian with English abstract)
24- Pietsch G.M., Anderson N.O., and Li P.H., 2009. Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura*

coccinea and *G. drummondii*. Scientica Horticulture, 120: 418–425.
25- Rezwan-Bidokhti Sh., Nezami A., Kafi M., and Khazaie H.R. 2011. Evaluation of freezing stress effect on quantity of electrolyte leakage in Shallot (*Alliumm altissimum* Regel.) as a medicinal and industrial plant under controlled conditions. Iranian Journal of Agroecology, 3 (3), 371-382. (in Persian with English abstract)
26- Singh R., Shushni A.M., and Belkheir A. 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry, 1: 1 - 5.
27- Sulc R.M., Albrecht K.A., Palta J.P. and Duke S.H., 1991. Leakage of intercellular substance from alfalfa roots at various subfreezing temperatures. Crop Science, 331:1575-1578.
28- Uemura M., and Steponkus P.L. 1997. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. Plant Physiology, 114: 1493-1500.
29- Valmorbida J., and Boaro C.S.F. 2007. Growth and development of *Mentha piperita* L. in nutrient solution as affected by rates of potassium. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50 (3): 379 - 84.
30- Wongsheree T., Ketsa S., and van Doorn W.G. 2008. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum×citriodourum*) leaves. Postharvest Biology and Technology, 51:91-96.
31- Yoshida S. 1986. Reverse changes in plasma membrane properties upon de-acclimation of mulberry trees (*Morus bombysis* Koidz). Plant Cell Physiology, 27: 83–89.
32- Zhang X., Ervin E.H., and Labranche A.J. 2006. Metabolic defense responses of seeded bermudagrass during acclimation to freezing stress. Crop Science, 46:2598–2605.

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 1, Mar.-Apr. 2016, p. 222-235

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 30، شماره 1، فروردین –اردیبهشت 1395، ص. 235-222

Evaluation of Winter Hardiness in Peppermint (*Mentha piperita* L.) by Electrolyte Leakage Indicator

A. Nezami[1*] - M. Janalizadeh[2] – T. Kheirkhah[3] – M. Goldani[4] – K. Hajmohammadnia[5]

Received: 16-07-2014
Accepted: 14-09-2015

Introduction: Peppermint or Mentha is an aromatic, medicinal and perennial herb from Lamiaceae family which has been used for healing a variety of diseases such as common cold, bronchitis, nausea, flatulence, diarrhea, vomiting, indigestion, stomach cramps, menstrual cramps and parasitoids. Peppermint is largely cultivated in Indiana, Mexican and California for the production of peppermint oil. Mentha reveals suitable winter hardiness in warm and temperate regions, But in cold areas, it confronts with winter stresses particularly freezing stress. So recognizing the freeze tolerance of peppermint for successful planting and using of this plant in cold regions such as Mashhad, Iran where peppermint is cultivated now is important. Among the many laboratory methods which have been developed to evaluate freezing tolerance of plants, electrolyte leakage (EL) test is widely used. This test is based on this principle that any damage to the cell membranes results in enhanced leakage of solutes into the apoplastic water, hence measuring the amount of leakage after stress treatments provides an estimation of tissue injury. Often, the 50% level of relative EL, or index of injury, is simply equaled to 50% sample mortality. This study was done to evaluate the freeze tolerance of peppermint organs by electrolyte leakage test and also to determine the winter survival ability of this plant by lethal temperature at which 50% of electrolytes leaked from the cell (LT_{50el}).

Materials and methods: In order to evaluate the cold tolerance of peppermint, a factorial experiment based on completely randomized design with four replications was carried out under controlled conditions. For this aim samples from stolon and rhizome of peppermint were selected monthly (December 2010 to April 2011) from Research Field, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad and were exposed to low temperatures (from 0 to -20°C with 4°C intervals) in a thermo gradient freezer at laboratory. The initial temperature of programmable freezer was 5°C; but gradually decreased in a rate of $2°C.h^{-1}$ until reached to desired temperatures. When the temperature reached to -2°C, the plants were sprayed with the Ice Nucleation Active Bacteria (INAB) to help the formation of ice nuclei in them. As well the spraying had been conducted to prevent from super-cooling of samples and to ensure that the mechanism of freeze resistance is tolerance not avoidance. After a desired freezing temperature was reached, the samples were removed from the freezer and then were thawed slowly during 24 h in a refrigerator at 5±1°C. In order to assess plasma membrane stability, four freeze stressed samples from stolon and rhizome were incubated in vials which containing 50 ml of double distilled water and the initial electrolyte leakage (E_1) was measured by an electrical conductivity meter next day. Afterward for determining of final electrolyte leakage due to the death of whole sample, accessions were boiled in autoclave with pressure near to 1.2 bar and temperature around 110°C for 20 minutes. E_2 was measured next day similar to E1. Electrolyte leakage percentage was expressed as E1 to E2 ratio. Afterward lethal temperature for 50% of samples according to the EL% (LT_{50el}) was calculated to estimate the freeze tolerance of peppermint organs during different sampling times.

Results and discussion : Results showed that by decreasing of temperatures, EL% increased in both organs and at -20°C, EL% was 50 percent more than control (0°C) treatment. Moreover at -12°C, EL% from stolons was eight % less than rhizomes. Studies showed that cold sensitive plants or organs showed further amount of ions leakage from their cells. So further leaked material from rhizomes should be interpreted as more sensitivity of this organ to freezing temperatures in comparison to stolon. The least and the most EL% was observed in January and April, respectively. And the least and the most value of LT_{50el} was achieved in February and April, respectively. It seems that due to the occurrence of cold hardening in both organs during cold months of year, stability of membranes have been increased, so EL% has been decreased. Stabilization of membranes to cold stress damage is a key role of cold hardening. In addition it could be stated because of occurrence of de-

1, 2, 3, 4, 5- Professor in Department of Agronomy and Plant breeding, Ph.D Student of Crop Physiology, MSc Graduated Student of Agronomy, Associate Professor in Department of Agronomy and Plant breeding, Assistant Professor in Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad Respectively
(*- Corresponding Author Email: nezami@um.ac.ir)

hardening in samples during warm months of year, freeze tolerance level of organs have been declined based on LT_{50el}. LT_{50el} for stolons depend on sampling date varied between -8.4 to -14.5 °C and for rhizome LT_{50el} ranged between -8.8 to -13.9 °C. Interaction effect of organs, temperature and sampling date on EL% was significant. The most EL% belonged to stolon in April at -20°C and the lowest EL% was seen in this organ in December at -4°C. Similarity in rhizome the highest EL% was recorded in April at -20 °C and the least EL% was observed at 0 °C in February.

Conclusion: According to the electrolyte leakage and LT_{50el} indices, peppermint can tolerate freezing temperature up to -14°C during the cold months of year. Despite this for complete understanding of peppermint response to freezing stress, further studies and reaserches under controlled and field conditions are required.

Key words: Freezing, Hardening, LT_{50}, Rhizome and Stolon