

بهبود تحمل به سرمای نشاهای گوجه‌فرنگی با پیش تیمار تنش خشکی

فردین قنبری^۱ و محمد سیاری^{۲*}

۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۲)

چکیده

دمای پایین منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی به باخته در گیاهان حساس به سرمازدگی و از بین رفتن محصول در گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند گوجه‌فرنگی می‌شود. در این تحقیق امکان افزایش تحمل تنش سرمایی در نشاهای گوجه‌فرنگی به وسیله اعمال خشکی با ۱۰ و ۲۰ درصد پلی اتیلن گلیکول (PEG) ارزیابی شد. آزمایش در دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار و در سال ۱۳۹۴ انجام شد. پس از اعمال تیمار تنش خشکی، نشاها به مدت شش ساعت در شش روز متوالی در دمای ۳ درجه سلسیوس قرار گرفتند. نتایج نشان داد، پیش تیمار خشکی سبب حفظ رشد نشاهای گوجه‌فرنگی در شرایط تنش سرمایی و حفظ محتوای آب نسبی، محتوای سبزینه (کلروفیل) و فنل و همچنین سبزینه فلورسانس (Fv/Fm) آن‌ها در پایان دوره تنش شد. نتایج اثر متقابل نشان داد، بالاترین میزان وزن تر ریشه (۲/۲۵ گرم) و شاخساره (۴/۴ گرم)، محتوای آب نسبی (۸۸/۳۱ درصد)، Fv/Fm (۰/۸۳۴) و سبزینه کل (۱/۶۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در کاربرد ۰ درصد PEG و بدون تنش سرما به دست آمد. همچنین بالاترین محتوای مالون دی آلدئید (۱/۴۶ میکروگرم بر گرم وزن تر) و فنل (۱۰/۸۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در کاربرد ۲۰ درصد PEG و بدون تنش سرمایی مشاهده شد. به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد، پیش تیمار خشکی می‌تواند به‌طور مؤثری برای حفاظت نشاهای گوجه‌فرنگی از آسیب ایجادشده به وسیله تنش دمای پایین در مراحل اولیه رشد استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پلی اتیلن گلیکول، درخشندگی سبزینه، مالون دی آلدئید، مقاوم‌سازی، نشت یونی.

Chilling tolerance improving of tomato seedling by drought stress pretreatment

Fardin Ghanbari¹ and Mohammad Sayyari^{2*}

1, 2. Former Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

(Received: Apr. 18, 2016 - Accepted: Jul. 2, 2016)

ABSTRACT

Low temperatures lead to numerous physiological disturbances in the cells of chilling-sensitive plants, resulted in chilling injuries and death of tropical and subtropical plants such as tomatoes. In this study, the possibility of cold stress tolerance enhancement of tomato seedlings by imposing drought stress with 10 or 20 percent of polyethylene glycol (PEG) for 10 days was investigated in the greenhouse of agricultural faculty of Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. The layout was factorial experiment in CRD design with four replications. After drought pretreatment, the seedlings were subjected to chilling 6 h/day at 3°C for 6 days. Drought pretreatment improved growth rate of tomato seedlings subjected to chilling stress as well as RWC, phenol, chlorophyll content and chlorophyll fluorescence ratio (Fv/Fm) when compared with the controls un-chilled seedlings. Interaction effects showed that highest value of root (2.25 g) and shoot fresh (4.4 g) weight, RWC (88.31 %), Fv/Fm(0.834) and total chlorophyll (1.62 mg/g F.W) were obtained in 0 % PEG under the chilling control. In contrast, the highest amounts of MDA (1.46 μm/g F.W) and phenol (10.86 mg/g F.W) content were obtained from 20% PEG and non-chilling stress. In general, results indicated that drought pretreatment could be used effectively to protect tomato seedlings from damaging effects of low temperatures stress at the early stages of growth.

Keywords: Chlorophyll fluorescence, electrolyte leakage, hardening, malondialdehyde, polyethylene glycol.

* Corresponding author E-mail: m.sayyari@basu.ac.ir , sayyari_m@yahoo.com

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*, $2n=2x=24$) یکی از معروف‌ترین سبزی‌ها از خانواده بادمجان‌سانان (Solanaceae) است که به دلیل کالری کم، غنی بودن از آهن، ویتامین‌های A، C و یک پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) قوی به نام لیکوپن در سراسر جهان مصرف می‌شود (Chandera Rai *et al.*, 2013). بر پایه آمار موجود، ایران با تولید بیش از ۶ هزار تن گوجه‌فرنگی در سال ۲۰۱۳، پس از کشورهای چین، هند، آمریکا، ترکیه و مصر، ششمین کشور عمده تولید این محصول است و حدود ۴ درصد از تولید جهانی را به خود اختصاص داده است (FAO, 2013). گوجه‌فرنگی همانند دیگر گیاهان گرمسیری به سرما حساس است و در دمای زیر ۱۰ درجه سلسیوس دچار آسیب‌های سرمای می‌شود (Saltveit, 2000). تنش سرمای از مهم‌ترین عامل‌های محیطی محدودکننده کشت و تولید محصولات کشاورزی در مناطق معتدله است که تأثیر عمده‌ای بر توزیع جغرافیایی و زنده‌مانی گیاهان دارد. تنش سرمای شامل سرمازدگی (دمای کمتر از ۱۵ درجه سلسیوس) و یخ‌زدگی (دمای کمتر از ۰ درجه سلسیوس) است. حدود دوسوم از زمین‌های جهان سالانه در معرض دمای یخ‌زدگی و حدود نصف آن‌ها در معرض دمای سرمازدگی قرار می‌گیرند (Baladi *et al.*, 2001). تنش سرما به صورت مستقیم با ایجاد اختلال در واکنش‌های سوخت‌وسازی (متابولیسم) و به صورت غیرمستقیم با جلوگیری از جذب آب توسط گیاه و تنش اکسایشی (اکسیداتیو) قابلیت گیاهان را تغییر می‌دهد و بنابراین اثر زیانباری بر رشد و نمو بسیاری از گیاهان دارد (Krasensky & Jonak, 2012). اگرچه در بسیاری از نقاط کشور ایران شرایط آب و هوایی برای کاشت محصولات فصل گرم از جمله گوجه‌فرنگی در فضای باز مناسب است ولی پس از آغاز فصل رشد در بهار، به دلیل نوسان‌های دمایی و کاهش دما به زیر ۱۰ درجه سلسیوس گیاهچه‌های تازه سبزشده در معرض دمای سرمازدگی قرار می‌گیرند که باعث سرمازدگی، توقف رشد و در موارد شدید سبب نابودی آن‌ها می‌شود که کشت دوباره و تأخیر انداختن برداشت محصول را سبب می‌شود (Baninasab, 2009).

در کشاورزی نوین برخی راهکارهای رویارویی با اثرگذاری سوء تنش بر گیاهان شامل انتخاب نژادگان (ژنوتیپ‌های مقاوم، شناسایی و انتقال ژن‌های مقاومت به گیاهان به‌وسیله روش‌های مهندسی ژنتیک، استفاده از مواد شیمیایی و هورمون‌ها و تغییر عملیات زراعی تولید محصول است. تغییر شرایط محیطی و روش‌های کاشت در خزانه می‌تواند درجه‌هایی از مقاومت به تنش‌های محیطی در نشاء را به وجود آورد (Javanmardi, 2009). برای مثال به‌خوبی مشخص شده است کمبود آب بر جنبه‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و فیزیولوژیکی وابسته به مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی تأثیر می‌گذارد. تنظیم اسمزی، تغییر در میزان هورمون‌ها و هدایت روزنه‌ای، کاهش رشد اندام‌های هوایی، رشد و افزایش ریشه‌ها از جمله این اثرگذاری‌ها هستند (Banon *et al.*, 2003) که ممکن است سبب مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی شود. در نتایج برخی بررسی‌ها گزارش شده است، تنظیم میزان آب در دسترس گیاهان منجر به تولید نشاهای قوی و مقاوم به تنش می‌شود که در نتیجه گیاهان می‌توانند تنش‌های محیطی پس از انتقال نشاء به مزرعه را به‌خوبی تحمل کنند. در این مورد شدت اعمال محدودیت آب تعیین‌کننده است (Liptay *et al.*, 1998). چنانچه کمبود آب در یک سطح شایان توجه باشد، نشاهای قوی و مقاوم به تنش ایجاد می‌شوند که می‌توانند پس از نشاکاری در برابر عامل‌های نامناسب محیطی بهتر مقاومت کنند. این روش بسیار ساده، ارزان، قابل‌اعتماد و ایمن است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های مورد استفاده مانند کاربرد مواد شیمیایی شود.

بررسی‌های پراکنده و به‌طور عمده قدیمی درزمینه مقاومت‌سازی نشاهای گوجه‌فرنگی به شرایط مزرعه با استفاده از تغییر عامل‌های محیطی از جمله محدود کردن آب و مواد غذایی، تغییر نور و تیمارهای مکانیکی انجام‌گرفته است. نشاء گوجه‌فرنگی که در دمای ۱۲/۵ درجه سلسیوس و به مدت سه ساعت قرار گرفته‌اند، نسبت به دمای ۱ درجه سلسیوس مزرعه، مقاوم‌تر از نشاهایی بودند که در معرض هیچ‌گونه تیمار

روز افزایش یک‌سوم تیمار مربوطه تا رسیدن به سطوح مورد نظر اعمال شد. در پایان تیمار خشکی به‌منظور اطمینان از خشکی اعمال‌شده پرولین و مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص‌های خشکی اندازه‌گیری شد. پس از اعمال سطوح مختلف خشکی و فرصت ۴۸ ساعته برای بازسازی (ریکاوری) آن‌ها، گیاهچه‌ها در شرایط تنش سرما و شرایط بدون تنش (نگهداری در گلخانه) قرار گرفتند. برای اعمال تنش سرما گیاهچه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۳ درجه سلسیوس و به مدت شش روز و در هر روز به مدت شش ساعت منتقل شدند. پس از پایان تیمار سرمایی همه گلدان‌ها به گلخانه با شرایط نور و دمای یادشده منتقل شدند و پس از ۷۲ ساعت در این شرایط، اندازه‌گیری صفات انجام گرفت (Baninasab, 2009).

برای تعیین محتوای آب نسبی در آغاز با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن ۱۰ برش (دیسک) برگ از هر نمونه انتخاب و جدا شد و بی‌درنگ نمونه‌ها در محیط آزمایشگاهی با ترازو (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) توزین شدند (وزن تر). سپس به مدت ۴ ساعت در آب مقطر (برای آب‌گیری کامل) قرار گرفته و پس از خشک شدن آب سطحی دوباره توزین شدند (وزن آماس). پس از آن برش‌های برگ به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس درون آون الکتریکی قرار داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها توزین شده تا وزن خشک به دست آید. سپس از رابطه ۱ محتوای نسبی آب برگ محاسبه شد.

$$(1) \quad \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر}}{\text{وزن خشک} - \text{وزن اشباع}} = \text{محتوای آب نسبی}$$

برای اندازه‌گیری نشت یونی از بخش میانی برگ‌های و ریشه‌ها ۰/۳ گرم برداشته شد. نمونه‌ها درون لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت قرار دادن روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، هدایت الکتریکی اولیه محلول توسط دستگاه سنجش هدایت الکتریکی اندازه‌گیری شد. آنگاه محلول حاوی نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آب جوش قرار داده شده و پس از سرد شدن آن‌ها، هدایت الکتریکی ثانویه محلول

دمایی قرار نگرفتند (Wang, 1990). تنش ملایم خشکی در گیاه صنوبر با تغییر میزان کربوهیدرات‌ها در گیاه سبب افزایش تحمل این گیاه به تنش سرما می‌شود (Amondsun *et al.*, 1993). همچنین تیمار تنش خشکی در نشاء خیار سبب بهبود سیستم پاداکنسنگی و حفظ ساختار غشاء در شرایط تنش سرمایی شد (Dong *et al.*, 2013). با توجه به مطالب یادشده در این آزمایش تأثیر پیش تیمار تنش خشکی ایجادشده با PEG بر تحمل به تنش سرمایی در نشای گوجه‌فرنگی و برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک آن بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۴ در گلخانه و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. در آغاز بذره‌های گیاه گوجه‌فرنگی رقم سی اچ فلات (*Lycopersicon esculentum* cv Falat CH) در محیط کشت با نسبت ۲:۱ پرلایت و ورمیکولایت در تاریخ ۱۷ شهریور سال ۱۳۹۴ کشت و در گلخانه با نور طبیعی و دمای روزانه 25 ± 2 و شبانه 18 ± 2 درجه سلسیوس رشد یافتند. برای جلوگیری از کمبود عنصرهای غذایی آبیاری نشاها به‌صورت یک روز در میان با استفاده از غلظت یک در هزار کود کامل فوسامکو بیو (حاوی مواد غذایی: نیتروژن ۱۰۰، فسفر ۴۰، پتاسیم ۷۰، منیزیم ۱/۸، منگنز ۱/۳، مس ۱، روی ۰/۷، بر ۰/۲، آهن ۰/۷) و مولیبدن ۰/۳ گرم بر لیتر و همچنین حاوی عصاره جلبک دریایی آسکوفیلوم نودوسوم) در همه مدت انجام آزمایش انجام گرفت. در مرحله چهار برگ به‌کلی توسعه‌یافته گیاهچه‌ها به مدت ده روز، تحت تنش خشکی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول در سه سطح شاهد (۰ درصد PEG)، تنش متوسط (۱۰ درصد PEG)، معادل پتانسیل اسمزی ۰/۱۸ مگاپاسکال) و تنش شدید (۲۰ درصد PEG، معادل پتانسیل اسمزی ۰/۵۷ مگاپاسکال) قرار گرفتند. برای پرهیز از وارد شدن تکانه (شوک) ناگهانی به نشاها، تیمار خشکی به‌صورت ملایم و در سه روز متوالی هر

شاخص سرمازدگی بر پایه پژمردگی، آب از دست دهی و بافت مرده (نکروزه) شدن برگ‌ها و شاخه‌ها و بر پایه نمره‌دهی از یک (بدون آسیب) تا پنج (آسیب شدید) ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری شاخص‌های درخشندگی (فلورسانس) سبزینه برگ شامل F_0 (درخشندگی کمینه)، F_m (درخشندگی بیشینه) و F_v/F_m (عملکرد کوانتومی فتوشیمیایی) از دستگاه سبزینه‌سنج فلئومتر (مدل OS-30 p, OPTI-Scences, ساخت آمریکا) استفاده شد. برای این کار در آغاز برگ‌های به‌کلی توسعه‌یافته در موقعیت یکسان توسط فویل آلومینیومی به مدت ۳۰ دقیقه پوشانده شد. سپس حسگر (سنسور) دستگاه را به آن متصل کرده و خوانده شد. میانگین اعداد خوانده‌شده به‌عنوان معیاری از شاخص درخشندگی سبزینه برگ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹.۱)، رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های رشد

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی بر فراسنجه‌های ارتفاع، قطر ساقه، وزن تر شاخساره و ریشه و حجم ریشه در سطح ۱ درصد و اثر اصلی تنش سرما بر وزن تر شاخساره و حجم ریشه در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل تنش خشکی و تنش سرما بر وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه و حجم ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

مقایسه میانگین اثر اصلی تنش خشکی نشان داد، با افزایش تنش خشکی ارتفاع و قطر ساقه به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که کمترین میزان آن‌ها در تنش شدید (۲۰ درصد PEG) به دست آمد. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی × تنش سرما نشان داد، پیش تیمار خشکی به‌طور مؤثری سبب جلوگیری از کاهش وزن تر شاخساره و ریشه نشاء گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما شده است. در هر دو حالت تنش سرما و بدون تنش با افزایش خشکی وزن

اندازه‌گیری شد. درصد نشت یونی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Baninasab, 2009).

$$(۲) \quad \text{نشت الکترولیت‌ها} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشاء بر پایه تشکیل کمپلکس مالون دی آلدید ایجادشده با تیوباری تیوریک اسید اندازه‌گیری شد. نمونه‌های تازه به میزان ۰/۲ گرم در ۵ میلی‌لیتر کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره به‌دست‌آمده به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ شد. پس از آن به ۱ میلی‌لیتر از دروایه (سوسپانسیون) پالایش‌شده ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد که ۰/۵ درصد تیوباریتیوریک داشت، اضافه شد. نمونه‌ها در حمام آب گرم ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بی‌درنگ سرد شدند. پس از سرد شدن مخلوط دوباره به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس جذب نمونه‌ها در دو طول‌موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) مدل کری ۱۰۰، واریان، ساخت آمریکا صورت گرفت و بر پایه ضریب خاموشی میزان مالون دی آلدید محاسبه شد (Stewart & Bewely, 1980).

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل از روش فولین-سیکالته استفاده شد (MacDonald *et al.*, 2001) و با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک و نسبت رقیق شدن میزان فنل کل بر پایه میلی‌گرم اسید گالیک در کیلوگرم وزن تر گزارش شد. برای اندازه‌گیری میزان سبزینه (کلروفیل) در آغاز ۰/۱ گرم بافت برگ‌گی تازه را با استفاده از ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی کامل ساییده شد تا توده یکنواختی به دست آمد. پس از سانتریفیوژ محلول، روش‌ناور حاصل را برداشته و میزان جذب آن در طول‌موج‌های ۶۴۳ و ۶۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری خوانده شد. و بر پایه رابطه ۳ میزان سبزینه محاسبه شد (Strain & Svec, 1966).

$$(۳) \quad Ch a + b \frac{mg}{gFW} =$$

$$(20.2 \times A645) + (8.02 \times A663)$$

سبب جلوگیری از کاهش وزن شدند (شکل ۱ A و B). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و تنش سرما نشان داد، با افزایش خشکی در هر دو سطح تنش سرمایی حجم ریشه در آغاز افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد. پیش تیمار خشکی ایجاد شده با ۲۰ درصد PEG سبب جلوگیری از کاهش حجم ریشه شد (شکل ۱ C).

تر شاخساره و ریشه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ولی در سطوح تنش خشکی، سرما تأثیر یکسانی بر این فراسنجه‌ها نداشت. در مورد وزن تر شاخساره تیمار سرما در سطوح ۰ و ۱۰ درصد PEG سبب کاهش معنی‌دار وزن تر شد، ولی در تیمار ۲۰ درصد PEG سرما سبب افزایش این صفت شد. در مورد وزن تر ریشه تیمار ۱۰ و ۲۰ درصد PEG به‌طور مؤثری

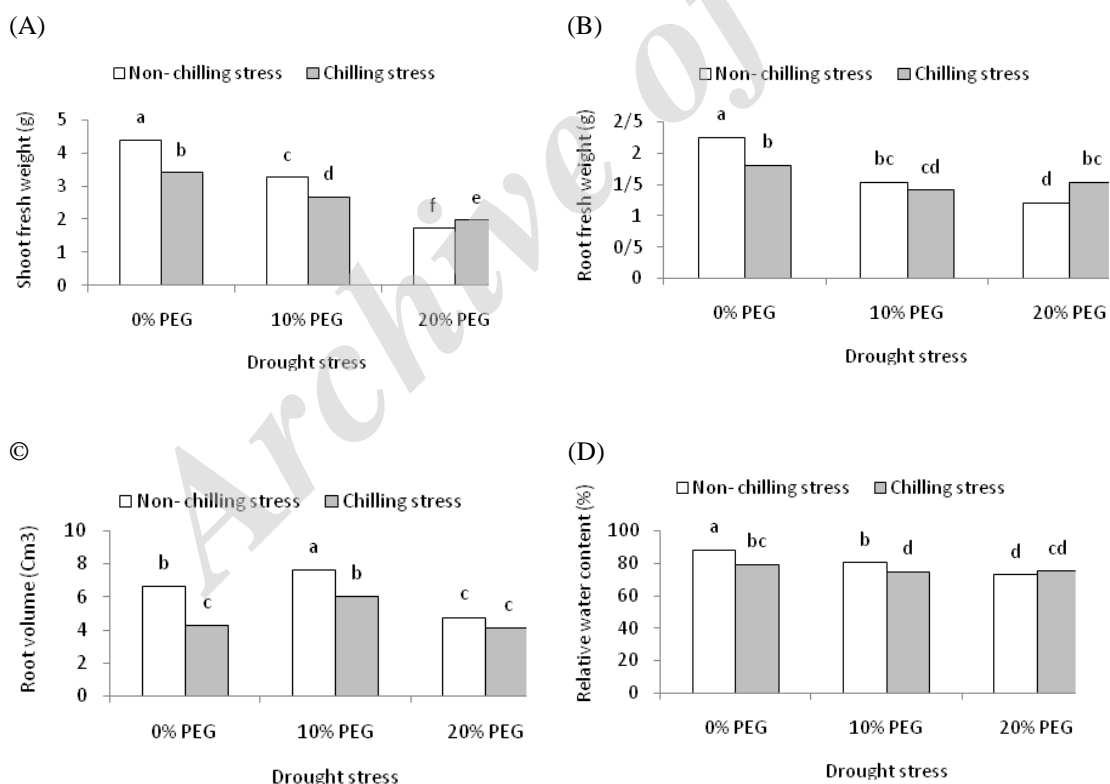
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در نشاهای گوجه‌فرنگی تحت تأثیر تنش‌های خشکی و سرما

Table 1. Anova for some measured parameters in tomato seedling subjected to drought and chilling stresses

Sources of Variation	df	Plant height	Stem diameter	Shoot fresh weight	Root fresh weight	Root volume	Relative water content	Electrolyte leakage
Drought stress	2	38.42**	0.0051**	8.58**	0.994**	11.37**	187**	40**
Chilling stress	1	0.07 ^{ns}	0.0015 ^{ns}	1.14**	0.04 ^{ns}	14.26**	106**	32**
Drought × Chilling	2	0.81 ^{ns}	0.00008 ^{ns}	0.80**	0.30**	1.54**	67**	48**
Error	18	1.34	0.0003	0.05	0.040	0.37	6.89	1.55
C. V		7.84	5.72	8.31	12.42	11.08	3.34	6.60

*, **, ns: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

*, **, ns: Significantly difference at 5 and 1% probability levels, respectively, and non-significant.



شکل ۱. تأثیر پیش تیمار خشکی بر وزن تر شاخساره (A)، وزن تر ریشه (B)، حجم ریشه (C) و محتوای آب نسبی (D) در نشاهای گوجه‌فرنگی در شرایط تنش سرما (ستون‌هایی که حرف‌های مشترک دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند).

Figure 1. The effect of drought pretreatment on shoot fresh weight (A), root fresh weight (B), root volume (C) and relative water content (D) in tomato seedling under chilling stress (Values followed by different letters were significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at $p < 0.05$).

(جدول ۱). با افزایش خشکی در هر دو حالت تنش و بدون تنش سرما میزان این صفت کاهش یافت. نتایج نشان داد، پیش تیمار خشکی با PEG به‌طور مؤثری سبب حفظ آب نشاء گوجه‌فرنگی در شرایط تنش سرما شد. بیشترین محتوای آب نسبی (۸۸/۳۱ درصد) در ترکیب تیماری ۰ درصد PEG و شرایط بدون تنش سرما و کمترین آن (۷۳/۱ درصد) در ترکیب تیماری ۲۰ درصد PEG و بدون سرما به دست آمد (شکل ۱ D). به‌طور کلی محتوای نسبی آب برگ معرف خوبی از وضعیت آب گیاه است و در برنامه‌های اصلاحی به‌عنوان شاخص مناسب و مهمی در انتخاب برای مقاومت به تنش‌های محیطی مد نظر قرار می‌گیرد. بین پتانسیل آب گیاه و محتوای نسبی آب همبستگی مثبت و بالایی وجود دارد و گیاهانی که در پایان دوره تنش بتوانند محتوای نسبی آب برگ بالاتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به تنش نیز برتر خواهند بود. کاهش محتوای نسبی آب برگ باعث می‌شود که هدایت روزنه‌ای، نوری ساخت و فرآوری CO_۲ کاهش پیدا کند (HassanPour *et al.*, 2008). در هنگام تنش سرما گیاه دچار تنش آبی نیز می‌شود که با کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه آغاز و با کاهش شدید در پتانسیل آب و آماس برگ ادامه می‌یابد، روزنه‌ها بسته‌شده و کاهش تعرق سبب کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه شده و در نتیجه تنش آبی ناشی از سرمازدگی تشدید می‌شود (Joshi *et al.*, 2007). در این تحقیق پیش تیمار تنش خشکی ایجادشده با استفاده از PEG سبب حفظ محتوای آب نسبی برگ‌های گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما شد که با یافته‌هایی در مورد مقاوم‌سازی گیاه خرزهره با استفاده از کمبود آب و کاهش رطوبت نسبی هوا همخوانی دارد (Banon *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد که خشکی با کاهش آسیب سرمایی گیاه سبب حفظ محتوای آب نسبی برگ آن تحت تنش دمایی پایین می‌شوند.

نشست یونی و محتوای مالون دی آلدئید

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی و سرما و همچنین اثر متقابل خشکی و سرما بر نشست یونی برگ و میزان مالون دی آلدئید در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد (جدول‌های ۱ و ۲).

تنش سرمایی همانند تنش‌های محیطی دیگر اثرگذاری زیانباری بر رشد و نمو گیاهان دارد. برخی از اختلال‌های شناخته‌شده در گیاهان در هنگام قرار گرفتن در دماهای پایین شامل کاهش سبزینه، کاهش فعالیت آنزیم‌های نوری‌ساختی (فتوسنتزی) و هدایت روزنه‌ای، کاهش انتقال الکترون در نورساخت، آسیب به ریشه و کاهش جذب عنصرهای غذایی است، که همه این عوامل نقش مؤثری در کاهش رشد گیاهان در شرایط تنش سرما دارند (Berova *et al.*, 2002). در این تحقیق برخی اثرگذاری‌های سودمند پیش تیمار خشکی در حفظ و افزایش رشد نشاء گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما مشاهده شد. تیمار تنش خشکی ایجادشده با ۲۰ درصد PEG سبب افزایش وزن تر شاخساره و ریشه و حفظ حجم ریشه در شرایط سرما شد. به‌طور همسان گزارش شده است که تنش کمبود آب در گیاه گوجه‌فرنگی سبب افزایش تحمل آن به سرما شد و رشد نشاء گوجه‌فرنگی و میزان عملکرد آن را در شرایط سرد گلخانه حفظ کرد (Paradossi *et al.*, 1988). تنش کمبود آب در نشاهای کشت‌شده در سینی در گیاه کلم سبب بهبود نگهداری آن‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۱۰ درجه سلسیوس شد. در این بررسی تنش آبی سبب حفظ ویژگی‌های رشد نشاء، حفظ سبزینه، کاهش پتانسیل آب برگ و حفظ قندهای محلول شد (Sato *et al.*, 2004). همچنین پیش تیمار خشکی سبب افزایش رشد گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری شده است که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد (Cauela *et al.*, 2007). هنگامی که گیاهان در شرایط تنش خشکی قرار می‌گیرند، میزان رشد طولی ساقه و گسترش برگ‌ها کاهش یافته و تجمع مواد جذب و ساخت‌شده (آسیمیلاته) در برگ‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین تنش آبی باعث تغییرپذیری‌هایی در میزان رشد گیاه می‌شود که در آماده‌سازی آن‌ها برای نشاکاری و تحمل شرایط نامطلوب مزرعه سودمند است (Javanmardi, 2009).

محتوای آب نسبی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی، تنش سرما و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر محتوای آب نسبی در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در نشاهای گوجه‌فرنگی تحت تأثیر تنش خشکی و تنش سرما

Table 2. Anova for some measured parameters in tomato seedling subjected to drought and chilling stress

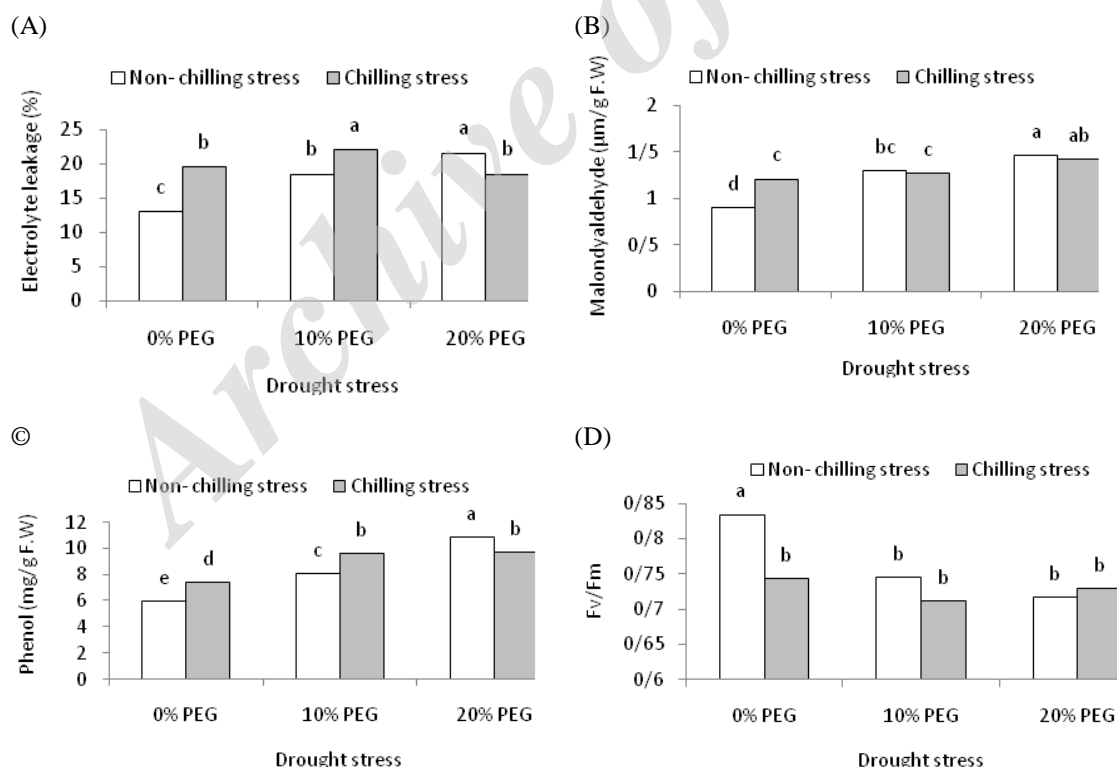
Sources of Variation	df	Malondyaldehyde	Total phenol	Total chlorophyll	F ₀	F _m	Fv/Fm	Chilling injury
Drought stress	2	0.296**	24.10**	0.317**	1875**	147915**	0.0106**	2.01**
Chilling stress	1	0.039**	3.45**	0.065**	61 ^{ns}	41072**	0.0083**	14.00**
Drought × Chilling	2	0.078**	3.22**	0.020**	42 ^{ns}	5369 ^{ns}	0.052**	2.01**
Error	18	0.008	0.12	0.0032	198	5262	0.0008	0.94
C. V	-	7.37	4.00	4.40	3.38	4.49	3.91	17.45

*, **, ns: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

*, **, ns: Significantly difference at 5 and 1% probability levels, respectively, and non-significant.

(شکل ۲-۱). نتایج در مورد مالون دی آلدئید تا حدودی همسان بود. هر دو غلظت PEG به‌کاررفته به‌طور معنی‌داری سبب جلوگیری از افزایش مالون دی آلدئید در نشاهای تحت تنش سرما شدند (شکل ۲-۲). به‌طور همسان نشان داده شده است، پیش تیمار خشکی با استفاده از PEG به‌طور معنی‌داری سبب کاهش میزان مالون دی آلدئید و حفظ ساختار غشا در نشاهای خیار تحت تنش سرما شد که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد (Dong *et al.*, 2013).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد، میزان نشت یونی در برگ با افزایش سطح PEG در هر دو حالت تنش سرما و بدون تنش سرما به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. پیش تیمار خشکی به‌طور مؤثری سبب جلوگیری از افزایش نشت یونی در برگ شد، به‌طوری‌که در سطوح ۰ و ۱۰ درصد PEG تنش سرمایی سبب افزایش معنی‌دار نشت شد ولی در سطح ۲۰ درصد PEG این روند متوقف شد و حتی این تیمار سبب کاهش نشت یونی برگ در نشاهای تحت تنش سرما شد.



شکل ۲. تأثیر پیش تیمار خشکی بر نشت یونی (A)، محتوای مالون دی آلدئید (B)، فنل کل (C) و عملکرد کوانتومی نظام نوری دو (D) در نشاهای گوجه‌فرنگی تدر شرایط تنش سرما (ستون‌هایی که حرف‌های مشترک دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند).

Figure 2. The effect of drought pretreatment on electrolyte leakage (A), malondyaldehyde content (B), total phenol (C) and Fv/Fm (D) in tomato seedling under chilling stress (Values followed by different letters were significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at $p < 0.05$).

به دست آمد (شکل ۲-۲). افزایش محتوای فنل گیاهان تحت تنش‌های محیطی یک پدیده عمومی بوده، در بررسی‌های زیادی گزارش شده است و اندازه‌گیری آن می‌تواند به‌عنوان یکی از سازوکارهای دفاعی یاخته‌ای در تنش‌های محیطی مطرح باشد (Dat et al., 2000). به‌طور همسان نشان داده شده است، میزان ترکیب‌های فنلی در نشاهای کلزا که به سرما مقاوم شده‌اند افزایش یافته و نقش مؤثری در تحمل دماهای پایین دارند (Hura et al., 2016). با توجه به نتایج این تحقیق افزایش محتوای فنل در گیاهان در شرایط تنش خشکی می‌تواند به‌عنوان یکی از سازوکارهای مؤثر در افزایش تحمل به تنش سرما در نشاهای گوجه‌فرنگی باشد.

درخشندگی سبزینه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی بر همه فراسنجه‌های درخشندگی، اثر اصلی سرما بر Fm و Fv/Fm و اثر متقابل آن‌ها تنها بر Fv/Fm در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین نشان داد، تنش سرما و خشکی باعث کاهش معنی‌دار F0 و Fm شدند (اثر اصلی گزارش نشده است). مقایسه میانگین اثر متقابل خشکی × سرما در مورد Fv/Fm نشان داد، تنش خشکی و همچنین سرما به‌طور معنی‌داری باعث کاهش این فراسنجه شده است. در سطح ۱۰ و ۲۰ درصد PEG تنش سرما سبب جلوگیری از کاهش Fv/Fm شد. بالاترین میزان این فراسنجه در ترکیب تیماری ۰ درصد PEG و شرایط بدون تنش به دست آمد و دیگر تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۲ D). گزارش شده است، درخشندگی سبزینه توسط تنش‌های محیطی دچار کاهش می‌شود که علت آن دگرگونی ساختار و تغییر در رنگی‌های نظام نوری (فتوسیستم) دو است (Behra et al., 2002). همچنین کاهش در میزان Fm و Fv/Fm در گیاهان تحت تنش‌های مختلف محیطی بارها در نتایج بررسی‌های پژوهشگران گزارش شده است (Maxwell & Johnson, 2000)، که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد. به نظر می‌رسد که مقاوم‌سازی نشاهای

تنش سرما همانند دیگر شرایط نامناسب محیطی سبب تولید انواع گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) می‌شود. یکی از واکنش‌هایی که در حضور ROS سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مانند مالون دی آلدئید و ترکیب‌هایی مانند اتانول می‌شود. تأثیر رادیکال‌های فعال بر چربی‌ها و پراکسیداسیون آن‌ها ناشی از اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع است که واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک کرده و منجر به تخریب اسیدهای چرب غشاء می‌شوند (Qiujie et al., 1996) و در نتیجه میزان نشت مواد درون یاخته‌ای افزایش می‌یابد. نتایج نشان داده است، کاهش در میزان مالون دی آلدئید موجب پایداری بیشتر اسیدهای چرب غیراشباع و تحمل بیشتر به تنش سرما و دیگر تنش‌های محیطی می‌شود (Maali-Amiri & Goldenkova-Pavlova, 2007). به نظر می‌رسد حفظ ساختار غشاء و جلوگیری از افزایش میزان مالون دی آلدئید و نشت یونی در نشاهای گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما، بیانگر فعالیت سازوکارهای دفاعی ایجادشده در شرایط تنش خشکی باشد.

فنل کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی، سرما و اثر متقابل آن‌ها بر میزان فنل کل در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۲). با افزایش تنش خشکی میزان فنل در شرایط تنش سرما و بدون تنش سرما افزایش یافت. این روند افزایش در شرایط ۱۰ و ۲۰ درصد PEG و تنش سرما معنی‌دار نشد. تنش سرمایی در سطوح ۰ و ۱۰ درصد PEG به‌طور معنی‌داری سبب افزایش فنل شد ولی در سطح ۲۰ درصد PEG این روند کاهشی بود، به‌طوری‌که بیشترین میزان فنل کل (۱۰/۸۶ میلی‌گرم اسید گالیک در کیلوگرم وزن تر) در ترکیب تیماری ۲۰ درصد PEG و شرایط بدون تنش سرمایی و کمترین آن (۵/۹۴ میلی‌گرم اسید گالیک در کیلوگرم وزن تر) در ترکیب تیماری ۰ درصد PEG و شرایط بدون سرما

تجزیه این رنگیزه در شرایط تنش می‌شوند (Schutz & Fangmeir, 2001). در نتایج بررسی‌ها گزارش شده است، مقاومت‌سازی نشاهای خیار با استفاده از تیمار دمایی سبب افزایش سبزینه و کاهش نشت یونی نشاها در شرایط تنش سرمایی می‌شود که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد (Helmy et al., 1999). به نظر می‌رسد پیش تیمار تنش خشکی با PEG از راه تغییر فیزیولوژیک مانند افزایش ترکیب‌های فنلی سبب کاهش اثرگذاری‌های تنش سرما به گیاه و کاهش سبزینه در این شرایط می‌شود.

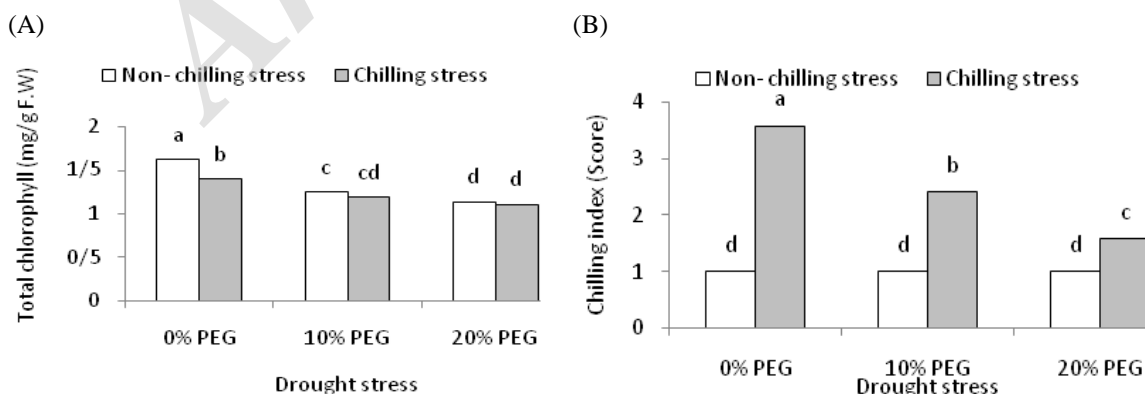
شاخص سرمادگی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر تنش خشکی، سرما و اثر متقابل آن‌ها بر شاخص سرمادگی در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد، کاربرد ۱۰ و ۲۰ درصد PEG نسب به بدون کاربرد آن به‌طور مؤثری سبب کاهش شاخص سرمادگی در نشاهای گوجه‌فرنگی شد. بیشترین کاهش نشانه‌های سرمادگی در کاربرد ۲۰ درصد PEG مشاهده شد (شکل ۳ B). دماهای پایین در گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ممکن است سبب کاهش رشد، ایجاد نقاط پژمرده و بافت مرده روی برگ‌ها و افزایش حساسیت به بیمارگر (پاتوژن)‌ها و بیماری‌ها شود (Hallgreen & Öquest, 1990).

گوجه‌فرنگی با اعمال تنش خشکی سبب کاهش آسیب به مراکز واکنش در نظام نوری دو و در نتیجه حفظ عملکرد کوانتومی این نظام شده است.

سبزینه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی، سرما و اثر متقابل خشکی \times سرما بر میزان سبزینه در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد، پیش تیمار تنش خشکی در هر دو سطح ۱۰ و ۲۰ درصد PEG به‌طور معنی‌داری سبب حفظ سبزینه در شرایط تنش سرما شد. بیشترین میزان سبزینه (۱/۶۲ میلی‌گرم در گرم) در ترکیب تیماری شرایط بدون تنش سرما و ۰ درصد PEG و کمترین آن (۱/۱۱ میلی‌گرم در گرم) در ترکیب تیماری ۲۰ درصد PEG و تنش سرمایی به دست آمد (شکل ۳ A). تنش سرما سبب اختلال در تولید سبزینه می‌شود و به کلروپلاست آسیب وارد می‌کند. با کاهش دما کل فرآیند سبزینه‌سازی متوقف می‌شود چون تولید سبزینه یکی از فرآیندهای حساس وابسته به دما است و با اندازه‌گیری آن می‌توان میزان حساسیت و یا مقاومت به تنش سرما را برآورد کرد (Krasensky & Jonak, 2012). کاهش میزان سبزینه در نتیجه تنش مربوط به افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن در یاخته است که سبب پراکسیداسیون و در نتیجه



شکل ۳. تأثیر پیش تیمار خشکی بر میزان سبزینه (A) و شاخص سرمادگی (B) در نشاهای گوجه‌فرنگی در شرایط تنش سرما (ستون‌هایی که حرف‌های مشترک دارند بر پایه آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند).

Figure 3. The effect of drought pretreatment on total chlorophyll (A) and chilling injury index (B) in tomato seedling under chilling stress (Values followed by different letters were significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at $p < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق به منظور افزایش تحمل به تنش سرمایی در نشاهای گوجه‌فرنگی از پیش تیمار تنش خشکی ایجاد شده به وسیله PEG استفاده شد. نتایج نشان داد، پیش تیمار خشکی (به ویژه ۱۰ درصد پلی اتیلن گلیکول) به طور مؤثری سبب کاهش اثرگذاری‌های تنش سرمایی، که با فراسنجه‌هایی همچون نشت یونی، مالون دی آلدئید و شاخص سرمازدگی ارزیابی شد، بر نشاهای گوجه‌فرنگی می‌شود. این نتایج وابسته به افزایش ترکیب‌های فنلی و حفظ سبزینه، درخشندگی سبزینه و محتوای رطوبت نسبی گیاهان در شرایط تنش سرمایی بود. با توجه به شرایط تنش‌زای کشور و آسیب سالیانه دماهای پایین بر گیاهان زراعی و محصولات کشاورزی تحقیقات بیشتر و آزمایش‌های صحرائی در این مورد ضروری است که بخشی از آن توسط مؤلفان در حال انجام است.

در این بررسی به منظور اندازه‌گیری آسیب سرمایی به گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی از ویژگی‌هایی مانند نقاط بافت مرده و سبزی‌روی (کلروز) روی برگ‌ها و میزان آسیب به برگ‌های گیاه استفاده شد. نتایج نشان داد، پیش تیمار خشکی به طور مؤثری سبب کاهش این اثرگذاری‌های شده است. به طور همسان نشان داده شده است که تنش خشکی با افزایش فعالیت پاداکسندگی سبب کاهش اثرگذاری‌های سرما بر نشاء خیار می‌شود، که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد (Dong *et al.*, 2013). به احتمال تنش خشکی با تأثیر بر ترکیب‌هایی مانند محتوای فنل و همچنین حفظ سبزینه و ظرفیت نورساختی و همچنین حفظ قابلیت آماس (تورژانس) یاخته‌ها، باعث بهبود مقاومت به سرما در نشاء شده است.

REFERENCES

- HassanPour, J. M., Kafi, M. & Mirhadi, M. J. (2008). Effect of drought stress on yield and some physiological characters in barley. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 39, 165-177. (in Farsi)
- Javanmardi, J. (2009). Scientific and applied basis for vegetable transplant production. *Jahade Daneshgahi Press*, 256 pp. (in Farsi)
- Amundson, R. G., Kohut, R. J., Laurence, J. A., Fellows, S., & Colavito, L. J. (1993). Moderate water stress alters carbohydrate content and cold tolerance of ted spruce foliage. *Environmental and Experimental Botany*, 33, 383-390.
- Food and Agriculture Organization. (2016). Retrieved April 10, 2016, from FAO website. <http://faostat.fao.org>.
- Baldi, P., Pedron, L., Hietala, A. M. & Porta, N. A. (2011). Cold tolerance in cypress (*Cupressus sempervirens* L.): a physiological and molecular study. *Tree Genetics Genomes*, 7, 79-90.
- Baninasab, B. (2009). Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. *Scientia Horticulture*, 121, 144-148.
- Banon, S., Ochoa, J., Franco, J. A., Sanchez-Blanco, M. J. & Alarcon, J. J. (2003). Influence of water deficit on low air humidity in the nursery on survival of *Rhannus alaternus* seedlings following planting. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 518-522.
- Behra, R. K., Mishra, P. & Choudhury, N. K. (2002). High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology*, 159, 967-973.
- Berova, M., Zlatev, Z. & Stoeva, N. (2002). Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 28, 75-84.
- Cayuela, E., Munoz-Mayor, A., Vicente-Agullo, F., Moyano, E., Garcia-Abellan, J. O., Estan, M. T. & Bolarin, M. C. (2007). Drought pretreatment increases the salinity resistance of tomato plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170, 479-484.
- Chandra Rai, A., Singh, M. & Shah, K. (2013). Engineering drought tolerance tomato plants over-expressing BcZAt12 gene encoding aC2H2 zinc finger transcription factor. *Phytochemistry*, 85: 44-50.
- Dat, J. V. S., Vranova, E. & Van Montagu, M. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecule Life Science*, 57(5), 779-795.
- Dong, X., Bi, H., Wu, G. & Ai, X. (2013). Drought-induced chilling tolerance in cucumber involves membrane stabilisation improved by antioxidant system. *International Journal of Plant Production*, 7(1), 67-79.
- Hallgreen, J. E. & Öquest, G. (1990). Adaptations to low temperatures. Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms. *Wiley-Liss Inc.* New York, NY. 265-293.

15. Helmy, Y. I., Singer, S. M. & El-Abd, S. O. (1999). Reduction chilling injury by short term cold acclimation of cucumber seedlings under protected cultivation. *Acta Horticulturae*, 491: 177-184.
16. Hura, K., Hura, T., Rapacz, M. & Pazez, A. (2016). Effects of low-temperature hardening on the biochemical response of winter oilseed rape seedlings inoculated with the spores of *Leptosphaeria maculans*. *Biologia*, 70(8), 1011-1018.
17. Joshi, S. C., Chandra, S. & Palni, L. M. S. (2007). Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. *Photosynthetica*, 45, 594-600.
18. Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1593-1608.
19. Liptay, A., Sikkema, P. & Fonteno, W. (1998). Transplant growth control through water deficit stress. *Horticulture Technology*, 8, 540-543.
20. Maali-Amiri, R. & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2007). Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with delta 12-desaturase gene from cyano-bacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5), 678-685.
21. Maxwell, K. & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
22. McDonald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M. & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73, 73-84.
23. Pardossi, F., Tognoni, F. & Lovemore, S. S. (1988). The effect of different hardening treatments on tomato seedling growth, Chilling resistance and crop production in cold greenhouse. *Acta Horticulturae*, 229, 371-379.
24. Qiujie, D., Bin, Y. S., Xiao, Z. & Wang, Z. (1996). Flooding- induce membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil*, 179, 261-268.
25. Saltveit, M. E. (2000). Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 169-177.
26. Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Uragami, A. & Tokuda, S. (2004). Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. *Scientia Horticulturae*, 101, 349-357.
27. Schutz, M. & Fangmeir, E. (2001) Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO₂ and water limitation. *Environmental Pollution*, 11, 187-194.
28. Stewart, R. R. C. & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65, 245-248.
29. Strain, H. H. & Svec, W. A. (1966). *Extraction, separation and isolation of chlorophylls*. Chlorophylls. Academic Press, New York. 24-61 pages.
30. Wang, C. Y. (1990). Alleviation of chilling injury of horticultural crops. *CRC Press*, 313 pages.