به زراعی کشاورزی
دوره ۱۶ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۳
صفحه‌های ۱۳۸-۱۲۷

تأثیر اسید سالیسیلیک بر سطوح پرولین، قندهای محلول و نشت یونی دو رقم زردآلو تحت تنش سرما

حسین افشاری[1]*، راحله زاهدی[2]، طاهره پروانه[3]، مسعود زاده باقری[4]

۱. دانشیار گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
۳. مربی بخش باغبانی، مرکز تحقیقات کشاورزی استان سمنان، شاهرود، ایران
۴. استادیار گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۲۷

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک تحت تنش سرمایی در دو رقم زردآلوی 'شاهرود ۴۱' و 'جعفری'، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۱ در مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان شاهرود به اجرا درآمد. این آزمایش دارای چهار فاکتور، شامل رقم در دو سطح، محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک در سه سطح (۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌مولار)، دما در چهار سطح (۴، صفر، ۲- و۴- درجهٔ سانتی‌گراد) و مرحلهٔ رشدی در سه سطح (رکود، تورم جوانه و باز شدن گل)، و صفات اندازه‌گیری‌شده شامل مقدار پرولین، قندهای محلول و نشت یونی بود. بیشترین مقدار قندهای محلول مربوط به رقم 'جعفری' در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مول اسید سالیسیلیک در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد در مرحلهٔ تورم و بیشترین مقدار پرولین در همین رقم در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد و غلظت اسید ۰/۲۵ میلی‌مول بر لیتر در مرحلهٔ تورم بود. مقدار نشت یونی در دماهای مختلف و مراحل مختلف فنولوژیکی رشد دارای اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد شد. رقم 'جعفری' با نشت یونی کمتر در دمای ۴ - درجهٔ سانتی‌گراد و مقدار پرولین بیشتر نسبت به رقم 'شاهرود ۴۱' مقاومت بیشتر در برابر سرمازدگی داشت.

کلیدواژه‌ها: اسید سالیسیلیک (SA)، تنش سرمایی، پرولین، رقم، زردآلو.

* نویسنده مسئول Email: H.Afshari@Damghaniau.ac.ir

۱. مقدمه

جوانه‌های گل در درختان زردآلو قبل از باز شدن می‌توانند سرمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد را تحمل کنند و پس از باز شدن گل‌ها دماهای کمتر از ۲- درجهٔ سانتی‌گراد موجب سرمازدگی آنها می‌شود [۵]. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داده است که افت دما تا حد بحرانی در هر مرحله به کاهش مقدار باز شدن طبیعی جوانه، باز شدن گل، گرده‌افشانی و مهم‌تر از همه کاهش رشد لولهٔ گرده و لقاح خواهد انجامید [۷، ۵]. اسید سالیسیلیک می‌تواند در ایجاد مقاومت به سرما و تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو و سوخت‌وساز و متابولیسم پراکسید هیدروژن نقش داشته باشد [۱۸]. اسید سالیسیلیک و سایر مشتقات فنلی در ایجاد مقاومت گیاهان به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی مؤثرند. این اسید جزئی از مسیرهای سیگنالی است که به‌وسیلهٔ برخی تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه القا می‌شود و نیز یک پیام تنظیم‌کنندهٔ داخلی در گیاهان به‌شمار می‌آید که برای مقابلهٔ گیاه با شرایط نامناسب مؤثر است [۲۳،۳۴]. اسید سالیسیلیک به‌عنوان نوعی تنظیم‌کنندهٔ رشد، در رشد گیاه، القای گلدهی، حرکت مواد و فتوسنتز مؤثر است [۱۷]. غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و مدت زمان تأثیرگذاری آن واکنش‌های متعددی را در گیاه سبب می‌شود [۱۵،۲۹]. مقدار پرولین آزاد در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنش‌های محیطی مانند تنش سرما و خشکی به‌مقدار زیادی افزایش می‌یابد و سبب تثبیت غشا در هنگام تنش سرما می‌شود [۲۲]. تجمع پرولین آزاد اغلب با مقاومت گیاهان در وضعیت تنش‌های زیاد به‌ویژه دمای کم در ارتباط است [۲۲]. پرولین نقش مهمی در متابولیسم گیاهان تحت تنش دارد و در تنظیمات اسمزی سلول و نیز در محافظت پروتئین‌ها نیز مؤثر است [۳۶]. همچنین ذخایر قندهای محلول و نشاسته در دوره سرما به‌شدت تغییر می‌کند [۲۲]. افزایش مقاومت به سرما با مقدار کربوهیدرات‌های محلول در ارتباط است و کربوهیدرات‌هایی نظیر ساکاروز، سوربیتول و رافینوز اولین زیرواحدهای محافظت‌کنندهٔ گیاه هستند و مقدار کربوهیدرات‌ها، گیاه را در برابر درجهٔ حرارت کم تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۲]. در بررسی خسارت سرمازدگی روی چند رقم زردآلو نشان داده شد که مقاومت ارقام، متفاوت است و با افزایش شدت سرما، خسارت بیشتر پدیدار شد [۳]. کاربرد غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در مرحلهٔ گلدهی روی دو رقم زردآلو نشان داد که غلظت دو میلی‌مولار این تنظیم‌کنندهٔ رشد توانست خسارت ظاهری سرمازدگی را کاهش دهد [۶]. در تحقیقی بین چند رقم زردآلو و هلو تحت تأثیر سرماهای دیررس بهاره نشان داده شد که در هنگام رکود جوانه‌های درختان زردآلو مقاومت بیشتر، و هنگام باز شدن گل‌ها مقاومت کمتری از جوانه‌های ارقام هلو داشتند [۳۲].

نشت یون‌ها از دیوارهٔ سلولی ناشی از فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی است. فعالیت این آنزیم‌ها در سرما بیشتر می‌شود [۲۶]. قرار گرفتن بافت گیاه در معرض دمای کم، موجب ریزش کلسیم به سیتوپلاسم می‌شود و این در اثر تغییراتی است که در غشا پدید می‌آید. نشت الکترولیتی از سلول زمانی اتفاق می افتد که غشا در اثر خسارت آسیب دیده باشد. ثبت مقدار EL را می‌توان روشی برای تشخیص خسارت بافت در نظر گرفت. براساس دیگر مطالعات، تیمار با اسید سالیسیلیک ممکن است به سازگاری غشای سلول به دماهای اندک بینجامد و در حفظ سیالیت غشا در دمای پایین مؤثر واقع می‌شود [۲۷].

ازآنجا که دمای بحرانی و افت دما در اوایل بهار گاهی خسارت‌های زیادی وارد می‌کند، استفادهٔ به‌موقع و مناسب از روش‌های پیشگیری ضروری به‌نظر می‌رسد [۸]. دماهای کم به تشدید فعالیت‌های اکسیداسیونی سلولی، تخریب ساختارهای سلولی و در نهایت قهوه‌ای شدن بافت‌ها که در

اصل آسیب‌هایی قطعی و برگشت‌ناپذیرند، می‌انجامد [۸]. دماهای کمتر به تخریب کامل اندام که به آن مرحلهٔ نکروز گفته می‌شود خواهد انجامید. این دماها را می‌توان دماهای بحرانی برای شروع بروز خسارت دانست [۹]. در تحقیقی، با کاربرد اسید سالیسیلیک روی میوهٔ انار در سردخانه، مقاومت به سرما و ماندگاری این میوه افزایش یافت [۴]. محققان دیگری نیز با استفاده از غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک روی میوه‌های لیمو به این نتیجه رسیدند که این ماده بدون اثر بر محتوای ویتامین ث و کیفیت ظاهری میوه توانست مقاومت به سرمازدگی در انبار را افزایش دهد [۱]. آشنایی با فیزیولوژی و تعیین مقاومت آسیب سرمازدگی با استفاده از روش‌هایی همانند بررسی مقدار پرولین، قندهای محلول و نشت یونی در گیاه تحت تنش سرمایی و استفاده از مواد مؤثر همچون اسید سالیسیلیک در مراحلی از رشد که بیشترین احتمال آسیب‌دیدگی گیاه به تنش سرمازدگی وجود دارد، می‌تواند مؤثر و مفید واقع شود.

هدف از این تحقیق، بررسی مقدار پرولین، قندهای محلول و نشت یونی در ارقام تجاری زردآلو هنگام مواجهه با سرما و بررسی امکان استفاده از مواد مؤثر همچون اسید سالیسیلیک در مراحلی از رشد که بیشترین احتمال آسیب-دیدگی گیاه در برابر تنش سرمازدگی وجود دارد است.

۲ .مواد و روش‌ها

برای اجرای این پژوهش، دو رقم زردآلوی تجاری به نام-های 'شاهرود ۴۱' و 'جعفری' در مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود انتخاب شد. برای هر رقم ۱۲ درخت ۱۵ساله درنظر گرفته شد. هر واحد آزمایشی شامل سه شاخهٔ انتخابی از سه درخت و هر شاخه حاوی ۱۰ جوانه بود و حدود ۳۰ جوانه برای هر تیمار بررسی شد. در این طرح، محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در مراحل فنولوژیکی رشد جوانه‌های درختان زردآلوی موجود در بهار ۱۳۹۱ صورت پذیرفت. این آزمایش دارای چهار فاکتور رقم در دو سطح (دو رقم تجاری زردآلو شامل شاهرود ۴۱ و جعفری)، محلول‌پاشی در سه سطح یک (۰/۰۶۲۵ مول بر لیتر)، دو (۰/۱۲۵ مول بر لیتر) و سه (۰/۲۵ مول بر لیتر)، دما در چهار سطح (۴، صفر، ۲- و ۴- درجهٔ سانتی‌گراد) و مرحلهٔ رشدی در سه سطح (رکود جوانه‌ها، متورم شدن جوانه‌ها و باز شدن گل‌ها) بود. در ابتدا مواد انتخابی با آب مقطر اسپری شد و در داخل انکوباتور قرار گرفت و با سرعت انجماد ۱۰ درجه در ساعت تا دو درجهٔ سانتی‌گراد خنک شد سپس با سرعت انجماد ۰/۵ درجه در ساعت تا دماهای تیمارهای مذکور خنک شده و سه ساعت در دماهای مذکور نگه داشته شد. بعد از اعمال هر تیمار، جوانه در ظروف پلی‌پروپیلن حاوی ۱۵ سی‌سی آب مقطر قرار داده شد تا نمونه‌ها کاملاً پوشیده از محلول شود. محلول با دستگاه تکاننده کمی تکان داده شد و پس از ۲۴ ساعت مقدار نشت ثابت شد و توسط دستگاه Ec متر دیجیتالی، هدایت الکتریکی اولیه (نشت ابتدایی) یا EC اولیه (ELf) قرائت شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو شدند و بعد از ۱۲ ساعت هدایت الکتریکی نهایی (نشت نهایی) یا EC کل (ECAutocl) آنها اندازه‌گیری شده و درنهایت درصد نشت یونی نسبی[1] از معادلهٔ زیر محاسبه شد [۲۶]:

(۱)

۱۰۰ × نشت نهایی / نشت ابتدایی = درصد نشت یونی نسبی

۲ .۱.اندازه‌گیری قندهای محلول

برای اندازه‌گیری مقدار کل قندهای محلول از روش اشلیگل[2] استفاده شد. جوانه‌های تیمارشده به مقدار ۰/۲

1. REL
2 Shlegl

گرم در سه میلی‌لیتر آب مقطر عصاره‌گیری شدند و سپس محلول همگن حاصل به‌کمک کاغذ صافی صاف شد. برای اندازه‌گیری قند نمونه، به ۵۰ میکرولیتر از محلول صاف‌شده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز ترسیم شد. جذب استانداردها به‌همراه جذب قند نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۸۰،۴۸۷ و ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۳۰].

۲.۲. اندازه‌گیری پرولین

برای اندازه‌گیری مقدار پرولین از مادهٔ نین هیدرین استفاده شد. به این منظور ۰/۲ گرم بافت جوانه توزین و در هاون چینی در سه میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به‌خوبی ساییده شد. محلول همگن حاصل با ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس دو میلی-لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال اضافه شد. لوله‌ها سپس به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم گذاشته و بعد از سرد شدن به هر کدام چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. فاز رویی که حاوی پرولین بود برداشته شده و با نمونه‌های استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد [۱۳].

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا در آمد. تجزیهٔ آماری صفات تحت بررسی پس از اجرای پروژه و جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسهٔ میانگین‌ها از طریق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

۳.نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیهٔ واریانس، بین دو رقم زردآلوی این تحقیق در مقدار پرولین و نشت یونی اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد دیده شد. اثر دما و مراحل فنولوژیکی بر همهٔ صفات جداگانه اندازه‌گیری شد که در سطح ۱ درصد اختلاف معناداری پدید آوردند. اثر متقابل سه عامل دما، غلظت اسید و رقم بر مقدار پرولین، قندهای محلول و نشت یونی تحت تنش سرمایی معنادار بود. در بررسی اثر متقابل رقم و مرحلهٔ رشد بر صفات مذکور اختلاف معنادار در مقدار پرولین و قندهای محلول وجود داشت. اثر متقابل غلظت اسید سالیسیلیک و مراحل مختلف رشد فقط بر مقدار پرولین معنادار بود. همچنین اثر متقابل دما و غلظت اسید بر مقدار نشت یونی در سطح ۱ درصد معنادار شد. در بررسی اثر متقابل سه عامل غلظت اسید سالیسیلیک، مراحل فنولوژیکی رشد و رقم بر مقدار قندهای محلول اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد وجود داشت (جدول ۱).

پرولین آزاد در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنش‌های محیطی مانند تنش سرما و خشکی به‌مقدار زیادی افزایش می‌یابد و سبب استحکام غشا در هنگام تنش سرما می‌شود و همچنین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت پرولین در طی مقاوم شدن به سرما زیاد می‌شود [۱۵]. نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها همچنین حاکی از این بود که میانگین مقدار پرولین در مراحل مختلف رشد شامل مرحلهٔ رکود، تورم و گلدهی دارای اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد بوده است. بدین‌ترتیب که میانگین پرولین در مرحلهٔ تورم جوانه‌ها ۰/۹۳ میکرومول بر گرم مادهٔ تر بوده و نسبت به مرحلهٔ رکود و گل که به‌ترتیب دارای میانگین مقدار پرولین ۰/۳۶ و ۰/۲۷ میکرومول بر گرم بوده‌اند بیشترین مقدار پرولین را به خود اختصاص داده است (شکل ۱). در گیاهان حساس به سرمازدگی افزایش پرولین سلولی به اندازه‌ای نیست که موجب افزایش مقاومت به سرما شود [۱۲]. البته افزایش پرولین سلولی همیشه موجب افزایش مقاومت به سرما نمی‌شود [۳۶]. تولید پرولین از

اسیدی شدن بیش از حد سلول جلوگیری می‌کند. پس از تنش پرولین تجزیه می‌شود که فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی را تسهیل و با تولید ATP به بهبود آسیب ناشی از تنش کمک می‌کند[۱۵]. در این زمینه، مقدار پرولین نمونه‌ها پس از تیمار سرما اندازه‌گیری شد و مشاهده شد که بیشترین پرولین در مرحلهٔ جوانهٔ متورم و کمترین آن در مرحلهٔ گلدهی وجود دارد و این مورد با درصد آسیب اندام‌های زایشی در مرحلهٔ یادشده همسو است. بنابر نتایج موجود، عامل دما بر میانگین مقدار پرولین اثر معنادار دارد. در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد، مقدار پرولین در مقایسه با دیگر دماها بیشتر بوده است، به این ترتیب که میانگین مقدار پرولین در دمای ۴- درجهٔ سانتی-گراد ۱/۱۱ میکرومول بر گرم بوده و نسبت به دمای ۲- درجه با میانگین مقدار پرولین ۰/۵۲ میکرومول بر گرم، دمای صفر درجه با میانگین ۰/۲۳ میکرومول بر گرم و دمای ۴ درجه یا شاهد با میانگین مقدار ترشح پرولین ۰/۲۳ میکرومول بر گرم تأثیر بیشتری در تشکیل پرولین دارد.

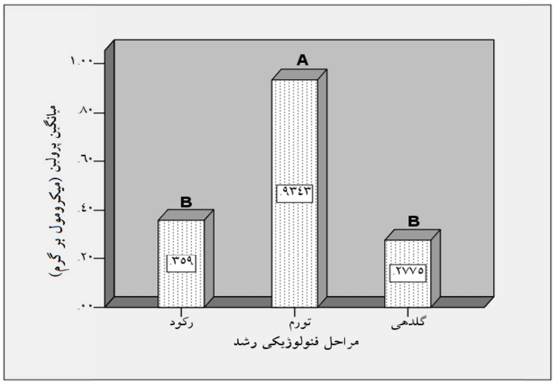
جدول ۱. تجزیهٔ واریانس اثر اسید سالیسیلیک در دماها و مراحل فنولوژیکی رشد بر دو رقم زردآلو

منابع تغییرات		میانگین مربعات		
	درجهٔ آزادی	پرولین	قند	نشت یونی
بلوک	۲	۰/۰۲ ns	۰/۵۱ ns	۳۳۳/۰۳ ns
رقم	۱	۰/۰۹۹۱*	۰/۲۱ ns	۲۴۷/۴۰*
مرحلهٔ فنولوژیکی رشد	۲	۹/۲۳ **	۱۰/۰۰**	۱۴۴۲/۲۰**
غلظت اسید	۲	۰۰/۰۳۴ns	۰/۷۰ ns	۱۴۵/۷۰ ns
دما	۳	۹/۳۰**	۳۷/۷۰**	۱۴۵۷/۶۳**
رقم × دما	۳	۰/۰۱۴ns	۰/۰۳ ns	۱۷/۹۰ ns
رقم × مرحلهٔ فنولوژیکی رشد	۲	۰/۰۷۳*	۶/۱۰**	۱۴۲/۱۴۲ ns
رقم × غلظت اسید	۲	۰/۰۴۵ ns	۰/۵۱ ns	۱۸۷/۷۰ ns
دما× مرحلهٔ فنولوژیکی رشد	۶	۳/۲۳**	۱/۶۳**	۴۴۰/۹۰*
غلظت اسید × مرحلهٔ فنولوژیکی رشد	۴	۰/۷۰**	۰/۶۰ ns	۳۱۹/۵۰ ns
دما × غلظت اسید	۶	۰/۰۳۲ ns	۰/۱۳ ns	۱۳۴/۷۴ **
دما × مرحلهٔ فنولوژیکی رشد × رقم	۶	۰/۰۱ ns	۰/۲۱ ns	۳۷۶/۲۲*
غلظت اسید × مرحلهٔ فنولوژیکی رشد× رقم	۴	۰/۰۱۵ ns	۰/۹۳*	۱۴۳/۲۲ ns
دما × غلظت اسید × مرحلهٔ فنولوژیکی رشد	۱۲	۰/۰۱۴ ns	۰/۲۳ ns	۱۰۶/۶۰ ns
دما × غلظت اسید × رقم	۶	۰/۰۶۵*	۰/۶۲ *	۱۶۲/۹۰ *
دما × غلظت اسید × مرحلهٔ فنولوژیکی رشد × رقم	۱۲	۰/۰۱ ns	۰/۲۲ ns	۱۴۶/۹۰ ns
خطا	۱۴۲	۰/۰۲۵	۰/۲۷	۰/۳۱
ضریب تغییرات		۳۰	۳۷	۲۹

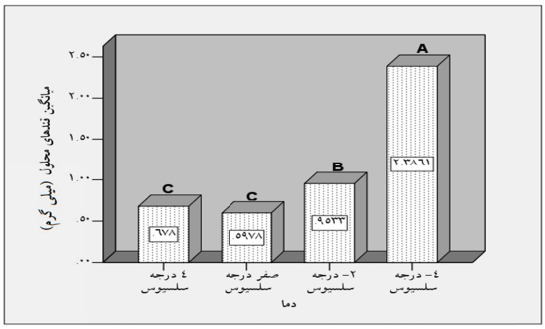
ns، *و ** به‌ترتیب غیرمعنادار، معنادار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

میانگین مقدار پرولین در دمای ۲- درجهٔ سانتی‌گراد نیز با میانگین مقدار پرولین در دمای صفر و ۴ درجهٔ سانتی‌گراد دارای اختلاف معنادار بود و بین دمای صفر و ۴ درجهٔ سانتی‌گراد اختلاف معناداری مشاهده نشد (جدول ۱). گزارش شده است که اغلب ارقام مقاوم به سرما بیش از ارقام حساس پرولین دارند که البته در این بین استثناهایی نیز وجود دارد [۲۴]. دماهای کم به تشدید فعالیت‌های اکسیداسیونی سلولی، تخریب ساختارهای سلولی و در نهایت، قهوه‌ای شدن بافت‌ها که در اصل آسیب قطعی و برگشت‌ناپذیر استرس شناخته می‌شود می‌انجامد [۵]. نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که دو رقم زردآلوی شاهرود ۴۱ و جعفری تحت تنش سرمایی دارای مقدار قندهای محلول مشابهی هستند و اختلاف معناداری بین این دو رقم وجود ندارد؛ هر چند که مقدار قندهای محلول موجود در رقم جعفری تحت تنش سرمایی بیشتر بوده است که ممکن است به‌علت افزایش قند کل در دورهٔ پس از سرما که موجب کاهش ذخایر نشاسته می‌شود باشد که در این زمان قندهای ساده‌تر تجمع می‌یابند. تحقیقات نشان داده است که افزایش مقاومت به سرما با مقدار کربوهیدرات‌های محلول رابطه دارد و کربوهیدرات هایی نظیر ساکاروز، سوربیتول و رافینوز اولین زیرواحدهای محافظت‌کنندهٔ گیاه هستند [۲۰]. دورهٔ مقاوم شدن به‌طور عادی با انباشته شدن یک یا چند ماده از مواد ساخته‌شده در سلول‌ها و اغلب در واکوئل‌های گیاهی همراه است که یکی از این مواد قندها است [۳۴].

مقدار بیشتر قندهای محلول در رقم جعفری (۱/۲۴ میلی‌گرم) در مقاومت بیشتر این رقم زردآلو نسبت به رقم شاهرود ۴۱ (۱/۰۵ میلی‌گرم) در برابر تنش سرمایی ممکن است مؤثر باشد. به‌نظر می‌رسد افزایش قند در طول دورهٔ مقاوم شدن گیاه نوعی سازوکار دفاعی در برابر خسارت سرما باشد. گزارش شده است که در این مرحله گیاه با از دست دادن تدریجی آب، غلظت مواد را افزایش می‌دهد و به این ترتیب از طریق افزایش مقدار قند، تشکیل یخ کاهش می‌یابد و از آبگیری القاشده توسط یخ جلوگیری می‌شود [۵].



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین مقدار پرولین در مراحل مختلف فنولوژیکی رشد جوانه‌ها



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین مقدار قندهای محلول در دماهای ۴، صفر، ۲- و ۴- درجهٔ سانتی‌گراد

میانگین مقدار قندهای محلول در مراحل مختلف رشدی دارای اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد بود. بدین ترتیب که میانگین قندهای محلول در مرحلهٔ تورم جوانه‌ها ۱/۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بود و نسبت به مرحلهٔ رکود و گل که به‌ترتیب دارای میانگین مقدار قندهای محلول ۱/۲۵ و ۰/۷۴ میلی‌گرم بودند بیشترین مقدار قندهای محلول را به خود اختصاص داد. بیشترین مقدار قندهای محلول در

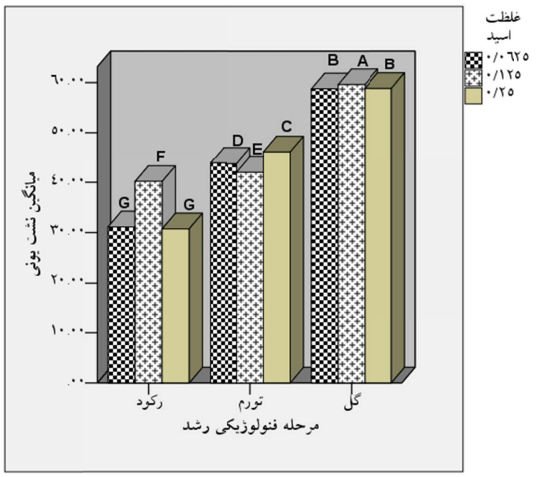
مرحلهٔ تورم جوانه‌ها و بلافاصله پس از این مرحله، کمترین مقدار قندهای محلول در مرحلهٔ باز شدن گل‌ها بود. در مرحلهٔ باز شدن گل‌ها مقدار قندهای محلول در دو رقم تحت مطالعه به حداقل خود رسید و می‌توان بیان کرد که متابولیسم کربوهیدرات‌ها با افزایش دما از فرم ذخیره‌ای به فرم قابل استفاده در گیاه در آمد تا گیاه در مرحلهٔ باز شدن گل‌ها از ترکیب قندهای محلول برای رشد زایشی استفاده کند [۵]. همچنین براساس جدول تجزیهٔ واریانس و مقایسهٔ میانگین‌ها، مقدار قندهای محلول در چهار سطح دمایی ۴، صفر، ۲- و ۴- درجهٔ سانتی‌گراد دارای اختلاف معنادار بود. در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد مقدار قندهای محلول، ۲/۴۰ میلی‌گرم از سایر دماها بیشتر بود. این مقدار در دمای ۲- درجه ۰/۹۵ میلی‌گرم، در دمای صفر درجه ۰/۶۰ میلی‌گرم و در دمای ۴ درجه یا شاهد ۰/۶۸ میلی‌گرم بود (شکل ۲). افزایش مقدار کربوهیدرات‌ها در گیاهان چوبی سبب افزایش مقاومت به سرما می‌شود که به‌خوبی شناخته شده است [۱۱]. در مورد اثر متقابل مرحلهٔ رشد جوانه و غلظت اسید سالیسیلیک بر مقدار قندهای محلول و پرولین شایان ذکر است که مقدار پرولین و قندهای محلول در مرحلهٔ تورم و با غلظت ۰/۱۲۵ مول اسید سالیسیلیک، بیشترین مقدار بود که نشان‌دهندهٔ اثر بر مقاومت به سرمازدگی در مرحلهٔ تورم جوانه‌ها است. افزایش قندها در جوانه‌ها ناشی از انتقال آنها از شاخه‌ها و پوست به جوانه‌ها است، بنابراین کاهش سطح قند در شاخه‌ها با افزایش مقاومت جوانه‌ها به سرما مرتبط است [۲۵]. حد تحمل به سرما به حضور معرف‌های ضد تشکیل هستهٔ یخی نظیر پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای آمینه و چربی‌ها بستگی دارد [۳۱]. غلظت زیاد مواد محلول در آب به‌ویژه قندها با وزن مولکولی کم در مرحلهٔ رکود به‌طور چشمگیری در درختان مقاوم گزارش شده است [۱۴]. کاهش ذخیرهٔ کربوهیدرات در گیاهان چوبی سبب کاهش مقاومت به سرما می‌شود که به‌خوبی شناخته شده است. کاهش نشاسته به حداقل و افزایش قندهای محلول به حداکثر، موجب افزایش سازش‌پذیری درختان به سرمای پاییز و زمستان می‌شود [۱۰]. رکود و مقاوم شدن از مراحل خاصی پیروی می‌کند. نخستین مرحله تجمع مواد قندی است که در پروتوپلاست افزایش می‌یابد. کاهش مقدار آب سلولی در واکوئل و سیتوپلاسم و سازماندهی مجدد غشای سلولی سبب تحمل دمای سرد در گیاهان و بسته ماندن فلس‌ها و حفاظت آنها در طی دورهٔ سرما می‌شود [۳۵]. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و دما بر میانگین پرولین و قندهای محلول معنادار نبود. هر چند بیشترین مقدار قندهای محلول و پرولین در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد در همهٔ غلظت ها مشاهده شد (جدول ۱). براساس جدول تجزیهٔ واریانس، اثر متقابل رقم و دما، رقم و غلظت اسید و اثر متقابل سه عامل غلظت اسید، دما و مرحلهٔ رشد و اثر متقابل دما، غلظت اسید و مرحلهٔ رشد و رقم بر مقدار نشت یونی تحت تنش سرمایی معنادار نبود، ولی اثر متقابل سه عامل دما، غلظت اسید و رقم بر مقدار نشت یونی معنادار بود (جدول ۱). نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که مقدار نشت یونی در رقم شاهرود ۴۱ با میانگین نشت یونی ۴۶/۸۰ درصد نسبت به رقم زردآلوی شاهرود ۴۱ با میانگین نشت یونی ۴۴/۶۳ درصد بیشتر بوده است. میانگین نشت یونی در مراحل مختلف فنولوژیکی رشد که شامل مراحل رکود، تورم و گلدهی است، دارای اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن بود. بدین ترتیب که میانگین نشت یونی در مرحلهٔ گلدهی جوانه‌ها برابر ۵۹/۰۵ بود و نسبت به مراحل تورم و رکود که به‌ترتیب دارای میانگین ۴۴/۰۴ و ۳۴/۰۰ درصد بودند بیشترین مقدار نشت یونی را به خود اختصاص داد که با نتایج دیگر مطالعات مطابقت دارد (شکل ۲) [۲].

محققان براساس اندازه‌گیری مقدار نشت یونی نسبی

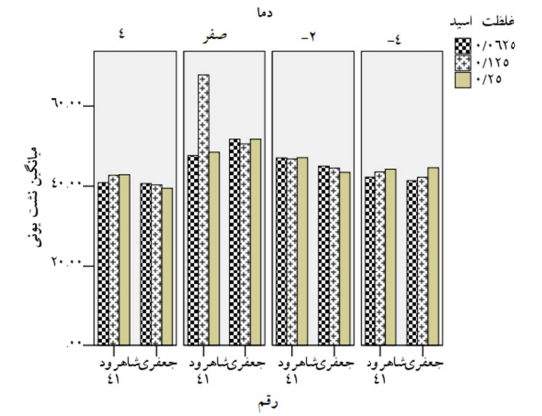
گزارش کردند که جوانه‌های زایشی حساس‌ترین اندام گیاه نسبت به سرما محسوب می‌شوند و افزایش نشت یونی در مرحلهٔ تورم و گلدهی در آزمایش یادشده بیانگر تحمل کمتر گیاه در این دو مرحلهٔ فنولوژیکی رشد است که نشان می‌دهد تحمل در مرحلهٔ متورم شدن جوانه‌ها و باز شدن گل‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. در دمای چهار، صفر و ۲- درجهٔ سانتی‌گراد، میانگین نشت یونی به‌ترتیب ۴۱/۱۴، ۴۵/۶۴ و ۴۳/۰۳ درصد بود و نسبت به میانگین مقدار نشت یونی در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد، به‌مقدار ۵۲/۹۸ درصد مقدار نشت یونی کمتر بود. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک و مراحل فنولوژیکی رشد سبب کاهش مقدار نشت یونی در مرحلهٔ رکود و افزایش نشت یونی در مرحلهٔ گل شد (شکل ۳). کمترین مقدار نشت یونی در در هر دو رقم زردآلوی جعفری و شاهرود ۴۱ در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ تأثیر مثبت اسید سالیسیلیک بر افزایش تحمل به سرما بود، زیرا همان‌طور که پیش از این ذکر شد، کاهش مقدار نشت یونی در گیاه تحت تنش سرمایی بیانگر تحمل زیاد گیاه نسبت به سرمازدگی است که در تحقیق یادشده این تحمل در اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک ایجاد شده است (شکل ۴). تیمار گیاهان با اسید سالیسیلیک سبب افزایش رشد، افزایش سرعت فتوسنتزی، کاهش هدایت روزنه‌ای و کاهش تعرق می‌شود [۲۱]. در این تحقیق، در راستای نتایج دیگر مطالعات مشخص شد که نشت یونی در مراحل مختلف فنولوژیکی رشد و در دماهای مختلف در گیاه زردآلو دستخوش تغییرات زیادی شد و سه عامل دما، مرحلهٔ فنولوژیکی رشد و رقم، و همچنین غلظت اسید، دما و رقم در مقدار نشت یونی، اختلاف معناداری داشتند. در نتیجه مشخص شد که بیشترین مقدار نشت یونی در هر دو رقم زردآلوی جعفری و شاهرود ۴۱ در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد در مرحلهٔ گلدهی رخ داد که نشان‌دهندهٔ حساسیت این دو رقم نسبت به تنش سرمایی بود. در ادامه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک مشاهده شد که این دو رقم در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد نسبت به تنش سرمایی تحمل نشان دادند و در نتیجه مقدار نشت یونی کاهش یافت و تأثیرات مفید اسید سالیسیلیک بر مقدار نشت یونی و مقاومت به سرمازدگی مشخص شد. بیشترین مقدار نشت یونی در تیمارهای مختلف در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد (۵۲/۹ درصد) و کمترین مقدار در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد (۴۱/۱ درصد) مشاهده شد و با کاهش دما از ۴ به ۴- درجهٔ سانتی‌گراد، نشت یونی افزایش شدیدی نشان داد. در گزارش مشابهی در زردآلو دمای ۲ درجهٔ سانتی‌گراد هیچ گونه آسیبی به اندام‌های بررسی‌شده وارد نکرد، درحالی‌که با کاهش دما به صفر و ۲- درجهٔ سانتی‌گراد افزایش تدریجی در مقدار آسیب به چشم خورد و بیشترین آسیب با کاهش دما به ۴- درجهٔ سانتی‌گراد گزارش شد [۳]. گفته می‌شود که این آسیب‌دیدگی ممکن است ناشی از افزایش تنفس بی‌هوازی نسبت به تنفس هوازی باشد که سبب انباشته شدن مواد سمی می‌شود و در پایان خسارت ایجاد می‌کند. قابلیت تحمل دماهای کم توسط برخی گونه‌ها و ارقام به ساختار غشای یاخته مربوط بوده و ناشی از مقدار پروتئین و اسیدهای چرب غیراشباع است [۱۶].

در بررسی اثر متقابل غلظت اسید، دما و رقم بر مقدار پرولین و قندهای محلول مشخص شد که اثر این سه عامل بر مقدار پرولین و قندهای محلول و معنادار بود. بیشترین میانگین مقدار قندهای محلول و پرولین در رقم جعفری در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد و غلظت اسید ۰/۲۵ مول بر لیتر مشاهده شد (شکل ۵). بررسی اثر متقابل غلظت‌های

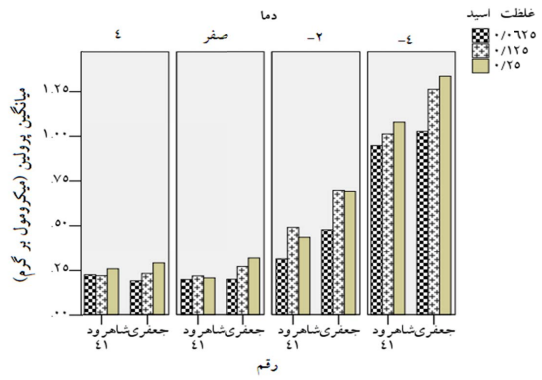
مختلف اسید سالیسیلیک، رقم و دما بر میانگین مقدار پرولین، نشان‌دهندهٔ تحمل به سرمای دو رقم زردآلوی شاهرود ۴۱ و جعفری در برابر سرمازدگی تحت تأثیر کاربرد اسید سالیسیلیک، و همچنین نشان‌دهندهٔ تحمل بیشتر رقم جعفری در برابر سرمازدگی تحت تأثیر غلظت ۰/۲۵ مول بر لیتر اسید سالیسیلیک نسبت به رقم شاهرود ۴۱ است. مقدار زیاد قندهای محلول در ۰/۲۵ مول بر لیتر اسید سالیسیلیک در رقم جعفری و در نتیجه تحمل به تنش سرمایی بیشتر نسبت به رقم شاهرود۴۱ مشاهده شد (شکل ۴). در مطالعهٔ اثر چهار عامل یادشده بر میانگین پرولین و قندهای محلول، بیشترین میانگین قندهای محلول در مرحلهٔ تورم، غلظت ۰/۱۲۵ مول بر لیتر اسید سالیسیلیک و در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد در رقم شاهرود ۴۱، و بیشترین مقدار پرولین در اثر متقابل دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد، مرحلهٔ تورم جوانه‌ها، رقم جعفری و در غلظت ۰/۱۲۵ مول بر لیتر اسید سالیسیلیک مشاهده شد. تجمع قندها با تیمار هورمون اسید سالیسیلیک افزایش می‌یابد و افزایش قندها و ایجاد شیب اسمزی در گیاهان به مقاومت در برابر از دست رفتن آب، افزایش محتوای آب برگ و تسریع رشد گیاهان در شرایط تنش‌زا منجر می‌شود [۲۸]. نقش اسید سالیسیلیک در کنترل سرمازدگی را به توانایی آن در القای سیستم آنتی‌اکسیدان و برخی پروتئین‌های شوک حرارتی نسبت می‌دهند. تیمار اسید سالیسیلیک به‌طور معناداری مقدار قندهای محلول را افزایش و نشت الکترولیت‌ها را کاهش می‌دهد. گفته می‌شود که کاربرد اسید سالیسیلیک در وضعیت دمای کم، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را فعال می‌کند و از این طریق تحمل در برابر تنش سرمازدگی را افزایش می‌دهد (شکل ۶) [۲۸،۳۳].



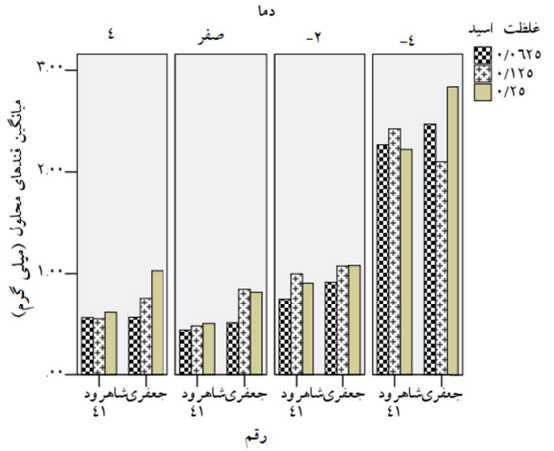
شکل ۳. اثر متقابل اسید سالیسیلیک و مرحلهٔ فنولوژیکی رشد بر میانگین نشت یونی



شکل ۴. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک، رقم و دما بر میانگین مقدار نشت یونی



شکل ۵. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک، رقم و دما بر میانگین مقدار پرولین



شکل ۶. اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک، رقم و دما بر میانگین مقدار قندهای محلول

۱.۳. نتیجه‌گیری کلی

کمترین نشت یونی در مرحلهٔ رکود جوانه و بیشترین آن در مرحلهٔ گلدهی وجود داشت که این یافته با درصد آسیب اندام‌های زایشی در مراحل یادشده همسو است. در این آزمایش، اختلاف میانگین مقدار پرولین در مراحل فنولوژیکی رشد جوانه‌ها، در دماهای مختلف و در دو رقم زردآلوی شاهرود ۴۱ و جعفری، و همچنین اثر متقابل عامل‌های غلظت اسید، دما و رقم در مقدار پرولین موجود معنادار شد، بدین صورت که بیشترین مقدار پرولین در رقم جعفری در دمای ۴- درجهٔ سانتی‌گراد و غلظت اسید ۰/۲۵ مول بر لیتر مشاهده شد. در نتیجه با استفاده از این تیمار هورمونی در رقم جعفری می‌توان در برابر سرمازدگی تحمل ایجاد کرد (جدول ۱ و شکل ۳). مشاهدهٔ مقدار بیشتر پرولین در مرحلهٔ تورم بلافاصله پس از بیدار شدن جوانه، نشان‌دهندهٔ شروع فعالیت‌های آنزیمی گیاه است، اگرچه بلافاصله در مرحلهٔ بعدی یعنی گلدهی، مقدار این ماده به کمترین حد خود می‌رسد که توجیه‌کنندهٔ کمترین مقدار مقاومت گیاهان به سرما در این مرحله نیز است. همچنین با توجه به نقشی که برای پرولین به‌عنوان نوعی ترکیب دفاعی در برابر تنش قائلیم ، افزایش مقدار آن با کاهش دما نیز توجیه‌شدنی است. مقدار زیاد پرولین در رقم جعفری نیز نشان‌دهندهٔ مقاومت بیشتر این رقم از رقم شاهرود ۴۱ است. نکتهٔ شایان توجه در این آزمایش این است که بیشترین مقدار پرولین در زمان کاربرد بیشترین غلظت اسید به‌دست آمده است که با نتایج دیگر محققان مطابقت دارد [۱۴، ۱۹]. نتایج مطالعات پیشین دربارهٔ درختان بادام و پسته نیز مشخص کرد که در دمای ۲ درجهٔ سانتی‌گراد مقاومت بیشتری به سرمازدگی وجود دارد و احتمال بروز خسارت بسیار کم است [۷]. با افت دما به صفر و زیر صفر درجه، مقاومت به‌شدت کاهش می‌یابد. در دمای صفر درجهٔ سانتی‌گراد مقاومت ۳۵ درصد نسبت به دمای ۲ درجه افت نشان می‌دهد و کمترین مقاومت در دمای ۴- و ۶- درجهٔ سانتی‌گراد است که حدود ۴۰ درصد است [۸ ، ۹].

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقایان حسین حکم‌آبادی و حمید هاشمی مقدم قدردانی می‌شود.

منابع

۱. ابوطالبی ع، بهروزنام ب، پشنگه ز، (۱۳۹۱). اثر سالیسیلیک اسید در القای مقاومت به سرمازدگی، کنترل پوسیدگی و حفظ کیفیت میوه لیمو شیرین . مجلهٔ علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران). ۲,۴۳: ۲۱۱-۲۱۶.

۲. آرین پویا ز، داوری نژاد غ، عطار ش، (۱۳۸۸). «بررسی حساسیت برخی ارقام هلو و شلیل به سرمای زمستان ۱۳۸۶ مشهد». مجله علوم باغبانی. ۱,۲۳: ۷۸-۸۷.

۳. روحانی نیا م، گریگوریان و، مطلبی آذر ع، دژم پور ج، (۱۳۸۶). «بررسی خسارت و تغییرات سطوح

پرولین در جوانه‌های گل چند رقم زردآلوی تجاری در مراحل مختلف فیزیولوژیکی». مجلهٔ علوم و فنون باغبانی ایران. ۲،۸: ۱۰۳-۱۱۲.

٤. سیاری م، بابالار م، کلانتری س، (.۱۳۹). «تأثیر کاربرد اسید سالیسیلیک بر افزایش مقاومت به سرمازدگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کیفیت انار رقم رباب فارس طی دوره سرد انباری». مجلهٔ علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران). ۴،۴۲: ۳۳۹-۳۴۷.

5. Akca Y and Sen SS (1999) Studies on selection of apricots with good fruit quality and plain resistance to late spring frosts in Gevas plain. Acta Horticulturae. 488: 135-137.

6. Alirezaie noghondar M, Bayat H and Nemati H (2013) Effect of Salicylic Acid on Alleviating of Electrolyte Leakage and Flower Organ Damage in Apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. 'Shahroudi') under Artiicial Cold Stress. Notulae Scientia Biologicae. 5(1): 1-5.

7. Afshari H, ParvaneT, Ebadi AG, Abbaspour H and Arab H (2011) Studding cold resistance of three commercial cultivars of Iranian almonds via Ion leakage parameter at different times after chilling. Food, Agriculture and Environment. 9(3,4): 449-454.

8. Afshari H and Homkabadi H (2009) Investigation on the resistance of main pistachio cultivars of Damghan region (Iran) to spring frost. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds – ISHS – Sanliurfa – Turkey, Oct. 06-10.

9. Afshari H, Tajabadipour A, Hokmabadi. H and Mohammadi Moghadam M (2009) Determining the chilling requirements of four pistachio cultivars in Semnan Province (Iran). African Journal of Agricultural Research. 4:55-59.

10. Ameglio T, Alves G, Decurteix M, Poirer M, Bonhome M, Guiliot A, Sake S, Brunel N, Petel G, Regcau R, Cochard H, Julien JLJ and Lacointe A (2006) Winter biology in walnut tree: Freezing tolerance by cold acclimation and embolism repair. Acta Horticulturae. Pp. 241-250.

11. Aron J, Suzanne M, Volenec J and Zachary J (2007) Differences in freeze tolerance of Zoysia grasses: carbohydrate and proline accumulation. Crop Science. 47(5): 2170-2181.

12. Chen YZ and Ane L (2005) The relationship between seasonal changes in anti oxidative system and freezing tolerance in the leaves in Woody plants. Scientia Horticulturae. 73: 272-279.

13. Girija C, Smith BN and Swamy PM (2002) Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Environmental and Experimental Botany. 47: 1-10

14. Gusta LV, Tyler NJ and Chen THH (1983) Deep under cooling in woody taxa growing north of the -40 degrees-c iso therm. Plant Physiology. 72: 122-128.

15. Hare PD and Cress WA (2004) Implications of stress induced proline accumulation in plant. African Journal of Biotechnology. 9(7):1008-1015.

16. Hare PD and Cress WA (1997) Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. Plant Growth regulation. 21: 79-102.

17. Hayat S and Ahmad A (2007) Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

18. Janda T, Szalai G, Gonzalez RK, Veisz O and Paldi E (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. Plant Science. 164: 301-306.

19. Larque SA (1979) Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatment. Z. Pflanzenphysiologie. 93: 371-5.

20. Levitt J (1982) Responses of plants to environmental stresses. Academic. New York.

21. Nejatian MA (2001) Evaluation of genetic variation, some of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars in local of Iran. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture Tarbiat Modares University, Iran.

22. Ranney TG, Bassuk NL and Whitlow TH (1991) Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of- water-stressed cherry trees. The American Society for Horticultural Science. 116: 684-688.

23. Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. Annual Review Plant Physiology. 43: 439-463.

24. Rodrigo J (2000) Spring frost in deciduous fruit trees morphological damage and flower hardiness. Scientia Horticulturae. 85: 155-173.

25. Rosa RD and Rallo L (2000) Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring bud-break. HortScience. 35(7): 1223-1227.

26. Ryyppo A, Repo T, Vapaavuori E (1998) Development of freezing tolerance in roots and shoots of Scots pine seedlings at non-freezing temperatures. Canadian Journal of Forest Research. 28: 557-565.

27. Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Serrano M and Valero D (2009) Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. Postharvest Biology and Technology. 53: 152-154.

28. Senaratna T, Touchell D, Bunn E and Dixon K (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Regulation. 30:57–161.

29. Senaratna T, Merrit D, Dixon K, Bunn E, Touchell D and Sivasithamparam K (2003) Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. Plant Growth Regulation. 39: 77-81.

30. Sheligl HG (1986) Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Planta. 47: 51-51.

31. Sung DY, Kaplan F, Lee KJ and Guy CL (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. Trends Plant Science. 8: 179-189.

32. Szymajda M, Pruski K, Zurawicz E and Sitarek M (2013) Freezing injuries to flower buds and their influence on yield of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and peach (*Prunus persica* L.). Canadian Journal of Plant Science. 93(2): 191-198.

33. Wang L, Chen S, Kong W, LiS and Archbold DD (2006) Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and effects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. Postharvest Biology and Technology. 41: 244-251.

34. Weiser CJ (1970) Achievements In plant chilling stress and injuries studies. Science. 169: 1269-1275.

35. Westwood MN (1993) Temperate zone pomology. Freeman and Co Timer press. Organ 482p Weiser C J (1970) Cold resistance and acclimation in woody plants. Hort Science. 5: 403-408.

36. Yelonsky G (1979) Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young tree in controlled temperature regimes. Plant Physiology. 64: 425-427.