

## مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پرتقال تامسون و لیموی

## لیسبون در مواجهه با تنش سرما

علی صالحی ساردویی<sup>۱\*</sup>، مهدی شریفانی<sup>۱</sup>، مصطفی خوشحال سرمست<sup>۱</sup> و محمود قاسم نژاد<sup>۲</sup><sup>۱</sup> ایران، گرگان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده تولید گیاهی، گروه علوم باغبانی<sup>۲</sup> ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

## چکیده

پرتقال تامسون (*Citrus sinensis* cv Thomson Navel) و لیموی لیسبون (*Citrus limon* cv Lisbon) جهت مطالعه میزان آسیب‌پذیری به تنش سرما در سطوح تیمار دمایی (۴-، ۸- و ۱۲- درجه سلسیوس) مورد بررسی قرار گرفتند. تست دمایی با دستگاه تست چمبر انجام شد. پژوهش بر مبنای آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. قبل از شروع تیمارهای دمایی به منظور سازگاری گیاه به کاهش دما، نهال‌ها به درون گلخانه معتدله با شرایط دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ الی ۵ روز انتقال یافتند. شروع کاهش دمای دستگاه تست چمبر از دمای ۴+ درجه سلسیوس بود. کاهش دمای دستگاه یک و نیم درجه سلسیوس به ازای هر ساعت بود که پس از رسیدن به هر تیمار دمایی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ ساعت در دماهای ذکر شده نگهداری و پس از اتمام این دوره زمانی نمونه‌برداری برگ برای اندازه‌گیری صفات انجام گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر آن بود که بیشترین مقدار نشت یونی برگ (۵۹/۶۵ درصد)، محتوای مالون دی‌آلدئید (۰/۷۷ میکروگرم در گرم در وزن تر برگ) در لیمو و فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز برگ (به ترتیب با میانگین ۳۳/۴۳ میکرومول در گرم وزن تازه در دقیقه و ۱۶۰/۳ میکرومول در گرم وزن تازه) در پرتقال در دمای ۸- درجه سلسیوس بود. در مقابل، بیشترین مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ (۳۹/۷ واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن تازه در دقیقه) در لیمو و فلاونوئید کل (۳۲/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بافت تازه برگ) نیز در پرتقال در دمای ۴- درجه سلسیوس ثبت گردید. در بین دماهای مورد بررسی در این پژوهش نیز واکنش‌های متفاوتی مشاهده شد. با کاهش دما به ۴- و ۸- درجه سلسیوس بین سطوح تیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. به طوری که در سطح دمای ۸- درجه سلسیوس تاثیر منفی بالایی بر کلروفیل، کارتونئیدها محتوای رطوبت نسبی برگ در هر دو رقم مشاهده گردید که در رقم لیمو میزان آنها بیشتر بود. و در بین دماها، دمای ۸- درجه سلسیوس، میزان تنزل آن در مقایسه با ۴- و ۴+ درجه سلسیوس بیشتر بود.

واژه های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپید، مرکبات، فلاونوئید، سبزی‌نگی برگ

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [alisalehisardoei1987@gau.ac.ir](mailto:alisalehisardoei1987@gau.ac.ir)

## مقدمه

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در دنیا محسوب می‌شوند (۴۳)، که در ایران نیز کشت و پرورش آن، جایگاه ویژه‌ای دارد. در بین استان‌های تولیدکننده مرکبات در کشور، مازندران با عملکرد ۸۸/۱ میلیون تن، رتبه اول تولید را به خود اختصاص داده است (۲). مرکبات

جز محصولات مناطق نیمه‌گرمسیری و متعلق به خانواده روتاسه (Rutaceae) بوده که اغلب گیاهان تجاری موجود در این خانواده به دلیل همیشه سبز بودن، نسبتاً حساس به تنش دمای پایین هستند (۵۲).

تأثیرگذار باشد. نقش عمده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پایداری گیاهان تحت تنش به تأثیر بر پتانسیل اسمزی مرتبط بوده، افزایش مقاومت به سرما با مقدار اسمولیت‌ها نیز در ارتباط است (۱). همچنین در مدیریت کم آبیاری انگور (۵۷) عنوان شده است که کم آبیاری با تأثیرگذاری بر افزایش تولید ترکیبات موثر بر پتانسیل اسمزی توانسته بر سازگاری بیشتر گیاه نسبت به تنش سرما، تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فلاونوئیدی به سبب تغلیظ شیره سلولی، دمای انجماد را کاهش داده و باعث حفظ محتوای آب گیاهی و افزایش مقاومت به دمای پایین می‌شوند. سازگاری به سرما موجب تجمع ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود که این ترکیبات به طور مثبت با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارتباط دارند (۷).

علاوه بر شاخص‌های فیزیولوژیکی ذکر شده، برخی صفات مورفولوژیکی نیز می‌توانند در ارزیابی میزان آسیب‌پذیری گیاهان تحت تنش سرما، مورد استفاده قرار گیرند (۸). از جمله این صفات در مرکبات می‌توان به سبزیگی برگ در زمان تنزل دما و با تغییر رنگ این اندام بعد از وقوع تنش اشاره داشت (۳).

استفاده از ارقام مناسب یکی از راهکارهای منطقی و کم‌هزینه برای تولید پایدار در هر منطقه است، که انتخاب رقم متحمل و انجام فعالیت‌های به‌زراعی مناسب، می‌تواند در تعدیل این آسیب موثر واقع گردد. باتوجه به شرایط کشور، هدف از اجرای این پژوهش، مقایسه نحوه واکنش رقم پرتقال تامسون (نیمه‌حساس) و لیموی لیسبون (حساس) به تنش سرما در شمال کشور است.

### مواد و روشها

این آزمایش طی سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه باغبانی، دانشگاه گیلان با هدف تعیین میزان تحمل به تنش سرما ارقام پرتقال تامسون و لیموی لیسبون بر پایه نازنج در ۳ سطح دمایی (۴، -۴، -۸) اجرا شد. پژوهش بر مبنای آزمایش

تنش سرما جز تنش‌های غیرزیستی است که از اثرات منفی آن بر گیاهان می‌توان به اختلال در فتوسنتز، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسیب به غشاء سلولی، تخریب رنگدانه‌های گیاهی و اسیدهای نوکلئیک اشاره کرد (۴۷). یکی از اثرات منفی تنش سرما، اختلال در فرایند انتقال الکترون در عرض غشاء تیلاکوئید بوده که منجر به تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده که می‌تواند، تخریب کلروفیل‌های گیاهی و پراکسیداسیون لیپید غشایی را به همراه داشته باشد (۲۵ و ۵۷).

پراکسیداسیون غشاهای زیستی یکی از سریعترین واکنش‌هایی است که اغلب در سلولها مخصوصاً در گیاهان حساس به تنش‌های محیطی و در حضور رادیکال‌های فعال اکسیژن اتفاق می‌افتد (۲۰ و ۲۸). رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند با گروه‌های متیل اسیدهای چرب غیراشباع وارد واکنش شده و رادیکال‌های فعال اسید چرب تولید نمایند. رادیکال‌های شکل گرفته بسیار واکنش‌گر بوده که قادر به شروع واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لیپید می‌باشد (۲۶). تداوم این وضعیت موجب از هم گسیختگی ساختار غشاء و خروج آب و یون‌ها از سلول می‌شود (۳۱). مطالعه انجام گرفته بر روی برخی از ارقام تاک (۷) و انار (۶) مشخص کرد که با تنش سرما، پراکسیداسیون غشاء و نشت یونی افزایش می‌یابد.

در مواجهه با تنش سرما گیاهان سعی می‌کند تا از طریق تغییراتی در فرایندهای فیزیولوژیکی و بکارگیری سیستم آنتی‌اکسیدانی، بقاء خویش را حفظ کنند (۳). یکی از مسائل مطرح سازگاری در زمان وقوع تنش یخبندان، حفظ محتوی آب و جلوگیری از انجماد سیتوپلاست بوده که عموماً گیاهان از طریق افزایش اسمولیت‌ها در مقابله با چالش ذکر شده مقابله می‌نمایند (۸). مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنش‌های محیطی مانند تنش سرما افزایش می‌یابد و این واکنش فیزیولوژیک می‌تواند بر مقاومت ماده گیاهی تحت تنش

جهت اندازه‌گیری خصوصیات بیوشیمیایی نمونه‌های برگ‌ها جدا شده با نیتروژن مایع منجمد و سپس در فریزر منفی ۸۰ تا قبل از شروع آزمایش نگهداری شدند. اما برای صفاتی همچون نشت الکترولیت و محتوای رطوبت نسبی برگ بلافاصله از نمونه برگ‌ها تازه استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کارتنوئیدها برگ: برای تعیین غلظت کلروفیل و کارتنوئید از روش بارس و همکاران (۱۲) استفاده شد. ابتدا نیم گرم نمونه برگ‌ها تازه از هر تیمار آزمایشی در ۱۰ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به مدت سه ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد تا رنگیزه‌ها استخراج و بافت برگ‌ها کاملاً بی‌رنگ گردید. از نمونه حاصل ۲۵۰ میکرولیتر برداشته و مجدداً دو میلی‌لیتر DMSO به آن اضافه شد. نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید و از DMSO خالص به‌عنوان شاهد استفاده شد. اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید به ترتیب در طول موج ۶۴۵، ۶۲۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر انجام گردید. و اعداد به‌دست‌آمده در رابطه‌های (۱)، (۲)، (۳) و (۴) جای‌گذاری شدند.

اندازه‌گیری نشت یونی: برای تعیین پایداری غشاء سلول‌های برگ‌ها از شاخص نشت الکترولیت استفاده شد. نشت یونی برگ‌ها بر مبنای شیوه سولیوان و رز (۵۰) اندازه‌گیری شد. قطعات برگ‌ها یکسان از برگ‌های جوان گیاهان کاملاً رشد کرده مربوط به هر تیمار، ابتدا با آب مقطر شسته و در لوله‌های آزمایشی درب‌دار قرار داده شدند.

فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. نخست نهال‌های دو ساله یکنواخت انتخاب شدند و در داخل گلدان‌های ۱۰ کیلویی از خاک منطقه (بافت لومی سیلتی) قرار داده شدند (۳).

قبل از شروع تیمار دمای پایین و به منظور سازگاری دمایی، نهال‌های پیوندی ابتدا در گلخانه معتدله (۴۲) با شرایط دمایی ۱۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری شدند. پس از آن نهال‌ها به دمای ۴+ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی  $5 \pm 65$  درصد منتقل شدند. قبل از انتقال به دستگاه تست چمبر (Test Chamber) و اعمال تیمار یخ-زدگی و به منظور جلوگیری از آسیب دیدگی ریشه‌ها، قسمت ریشه گلدان‌ها با لایه‌ای ضخیم از پشم شیشه به طور کامل پوشانیده شد و سپس برگ نهال‌ها با آب مقطر اسپری شدند. دمای دستگاه به تدریج به میزان ۱/۵ درجه سلسیوس در هر ساعت تا ۴- درجه سلسیوس و سپس ۸- درجه سلسیوس کاهش داده شد. نمونه‌های از برگ پس از ۱۰ ساعت قرار گرفتن در دمای ۴- و ۸- درجه سلسیوس جهت انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدا گردید. همچنین نمونه‌های برگ نهال‌ها بعد از ۱۰ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس به عنوان شاهد استفاده شد. رطوبت نسبی درون دستگاه تست چمبر، ۴۵ درصد و شرایط فاقد نور بوده است (۲۷). به دلیل محدود بودن فضای داخلی دستگاه تست چمبر در هر مرحله تیمار دمایی تنها از یک رقم استفاده شد. در مجموع، ۹ نهال پیوندی برای هر رقم با سه تیمار دمایی (۴، ۴-، ۸- درجه سلسیوس) در سه تکرار استفاده شد.

$$\text{Chl } a \text{ (mg/g. F.w)} = 12.7(A663) - 2.69(A645) \times V/1000 \times W \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg/g. F.w)} = 22.7(A645) - 4.68(A663) \times V/1000 \times W \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$\text{Chl total (mg/g. F.w)} = 20.2(A645) - 8.02(A663) \times V/1000 \times W \quad \text{رابطه (۳)}$$

$$\text{Carotenoids (mg/g. F.w)} = 7.6(A480) - 1.49(A510) \times V/1000 \times W \quad \text{رابطه (۴)}$$

در این رابطه‌ها، A: طول موج؛ V: حجم نهایی محلول و W: وزن نمونه است.

۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت به کمک دستگاه شیکر قرار گرفتند. هدایت الکتریکی محلول (C<sub>1</sub>) اندازه‌گیری و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و مجدداً هدایت الکتریکی آن‌ها (C<sub>2</sub>) اندازه‌گیری شد. نشت یونی (EC (%)) بر مبنای رابطه (۵) محاسبه شد.

$$\text{رابطه (۵)} \quad \text{EC (\%)} = (C_1/C_2) \times 100$$

درصد آسیب یخ‌زدگی و آستانه تحمل به یخ‌زدگی هر رقم: با کمک داده‌های موجود از اندازه‌گیری نشت یونی در هر تیمار دمایی، درصد آسیب ایجاد شده در مقایسه با دمای شاهد در نمونه‌های برگ هر رقم از طریق رابطه ۶ محاسبه شد (۳۷). رابطه (۶):

$$LT_{50} = [ \% IL (t) - \% IL (c) / 100 - \% IL (c) ] \times 100$$

IL(t): نشت یونی هر تیمار دمایی یخ‌زدگی در نمونه‌ها و IL(c): نشت یونی تیمار شاهد بدون یخ‌زدگی

در نهایت دمای ۵۰ درصد کشتندگی نمونه‌ها (LT<sub>50</sub>) که از آن به عنوان واحد تحمل به یخ‌زدگی یاد می‌کنند. برای دو رقم مورد آزمایش به کمک تعیین دمایی که در آن ۵۰ درصد آسیب اتفاق می‌افتد (۳۷).

اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ (RWC): بالاترین (جوان‌ترین) برگ گیاه در هر تکرار برداشت و بلافاصله وزن تر برگ‌ها اندازه‌گیری شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در داخل آب مقطر قرار داده شد و پس از اندازه‌گیری وزن برگ‌ها در این شرایط، برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و وزن خشک آن‌ها با ترازوی دقیق ۰/۰۰۱g اندازه‌گیری شد (۴۵). مقدار RWC از رابطه (۷) به دست آمد:

$$\text{رابطه (۷)} \quad \%RWC = [(W_f - W_d) / (W_f - W_a)] \times 100$$

در این رابطه W<sub>f</sub> وزن تازه برگ، W<sub>i</sub> وزن آماس برگ و W<sub>d</sub> وزن خشک برگ است.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش آلومینیوم‌کلرید استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم‌کلرید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد، متانول خالص جایگزین عصاره متانولی گردید. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (۱۷). برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف استاندارد کوئرستین (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد.

پراکسیداسیون لیپید: محاسبه غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان محصول واکنش پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشاء با کمک روش کامپوز و همکاران (۱۵) انجام شد. مراحل انجام آن به شرح زیر است:

تهیه محلول‌ها: محلول تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتریک اسید (TBA) به صورت زیر تهیه گردید:

۱- ۰/۵ گرم از TBA در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد، برای حل شدن بهتر روی هیتر با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۲- ۲۰ گرم از TCA در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر شد.

۳- محلول ۱ و ۲ با هم مخلوط گردید و با کمک آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به عنوان محلول ذخیره استفاده شد.

اندازه‌گیری MDA: ابتدا ۰/۵ گرم بافت برگ با استفاده از نیتروژن مایع در هاون آسیاب شد و به آن ۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (TCA) ۱۰ درصد افزوده

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم نیاز به محلول‌های زیر است:  
 بافر ۱: بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، حاوی EDTA (۱/۵) میلی‌مولار، متیونین (۲۰۰ میلی‌مولار)، و NBT (۱/۱۲) میلی‌مولار) با pH=7

بافر ۲: بافر ریبولوین (۷۵ میلی‌مولار)، ریبولوین به نور حساس است، بنابراین در ظرفی با پوشش آلومینیومی نگهداری می‌شود، هر روز باید ساخته شود.

شیوه آماده‌سازی نمونه‌های شاهد، بلانک و آنزیمی به شکل زیر است:

۱- نمونه شاهد شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر ۱، ۱۵ میکرولیتر بافر ۲، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار بود.

۲- نمونه بلانک شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر ۱، ۱۵ میکرولیتر بافر ۲، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار بود.

۳- نمونه حاوی عصاره آنزیمی شامل ۹۳۵ بافر ۱، ۱۵ میکرولیتر بافر ۲ و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، نمونه بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی گذاشته شد و نمونه‌های کنترل (شاهد) و عصاره آنزیمی، به مدت ۱۵ دقیقه، در شیکر با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دارای دو عدد لامپ فلورسنت ۴۰ وات با دور ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شدند. سپس میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد SOD به مقدار آنزیمی گفته می‌شود که سبب مهار ۵۰ درصد NBT به فورمازان شود. تفاوت بین جذب هر عصاره در مدت زمان روشنائی ۱۵ دقیقه و جذب عصاره آنزیمی در همان مدت زمان روشنائی در واقع حاکی از بازداشتن واکنش خود بخودی و تشکیل فورمازان توسط SOD است. فعالیت آنزیمی SOD بر اساس رابطه (۹) محاسبه گردید و فعالیت آنزیم در نهایت بر حسب  $\mu\text{Mol/gFW}$  محاسبه شد.

شد. عصاره حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی جدا شد. به ۱۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۱۵۰۰ میکرولیتر TCA ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد TBA اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله در یخ سرد گردید. نمونه‌ها مجدداً در ۱۰۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدئید تیوباریتوریک اسید (MDA-TBA) تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instruments LtdT80+UV/VIS) اندازه‌گیری شد و جذب سایر رنگیزه‌های گردید اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر مشخص شدند. غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل  $155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  بر حسب  $\text{nmol.gFW}^{-1}$  طبق رابطه (۸) زیر اندازه‌گیری شد.

$$\text{رابطه (۸)} \quad \text{MDA غلظت} = \frac{(A532 - A600)}{155} \times 1000$$

برای استخراج و محاسبه آنزیم‌ها، نمونه‌های برگ منجمد شده در حضور نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد. نیم گرم از برگ پودر شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و به آن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج افزوده شد. سپس نمونه‌ها به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از آن عصاره رویی با استفاده از سمپلر برداشته و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و دوباره به مدت ۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. عصاره رویی برداشته و به میکروتیوب‌های با همان حجم منتقل شدند. از این عصاره برای سنجش آنزیم‌های SOD، APX، CAT استفاده شد.

آنزیم SOD: فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش (۴۸) با اندازه‌گیری توانایی آنزیم در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلو-تترازولیوم (NBT) تعیین شد. برای

رابطه (۹)

فعالیت آنزیم SOD =

$$\frac{(OD_{Control} - OD_{Sample}) \times 100}{OD_{Control} \times 50}$$

آنزیم CAT: فعالیت این آنزیم به روش (۱۸) مورد سنجش قرار گرفت. برای سنجش فعالیت این آنزیم نیاز به محلول‌های زیر است:

۱- محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار

۲- بافر سنجش حاوی بافر پتاسیم فسفات، EDTA ۰/۱ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار است.

سنجش فعالیت آنزیم CAT از طریق اندازه‌گیری تجزیه پراکسید هیدروژن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۴۰۰ میکرولیتر بافر پراکسید هیدروژن و ۴۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. پس از بهم زدن مخلوط واکنش (با گذاشتن پارافیلیم بر روی کووت یک بار کووت سر و ته شد) سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با کمک فرمول بیر لامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز  $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  محاسبه و فعالیت آنزیم در نهایت بر مبنای اندازه‌گیری  $\mu\text{Mol/gFW.min}$  گردید.

آنزیم APX: فعالیت این آنزیم به روش (۱۶) با اندک تغییرات مورد سنجش قرار گرفت. برای سنجش فعالیت این آنزیم به محلول‌های زیر احتیاج دارد:

۱- محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار

۲- بافر سنجش حاوی بافر پتاسیم فسفات، EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۰/۲۵ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۱ میلی مولار است.

سنجش فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری اکسید شدن آسکوربات به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰

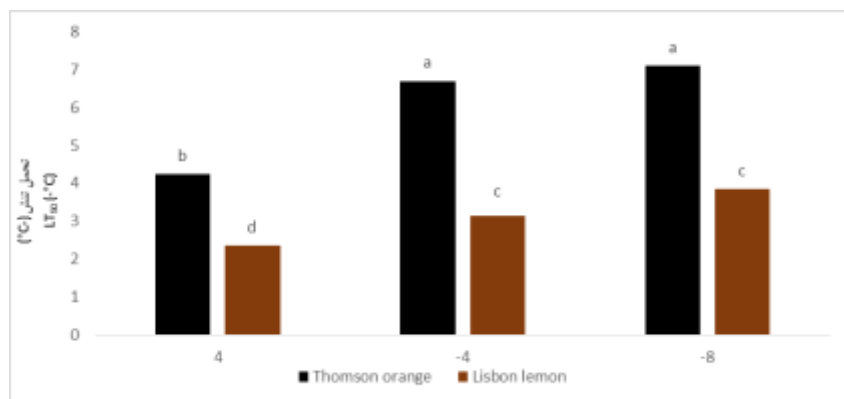
نانومتر برای مدت زمان ۱ دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش شامل حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲۹۰۰ میکرولیتر از بافر شماره سنجش شماره ۲ بود. پس از بهم زدن سرعت واکنش آنزیمی به شکل تغییرات جذب و زمان (OD/min) در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای ۱ دقیقه ثبت گردید. یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک میکرومول آسکوربات در مدت زمان یک دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است (۱۶). فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی  $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  محاسبه و فعالیت آنزیم در نهایت بر مبنای  $\mu\text{Mol/gFW.min}$  اندازه‌گیری گردید.

**تجزیه آماری:** داده‌های حاصل از این پژوهش بر مبنای آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار تجزیه واریانس و سپس میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد از طریق نرم افزار SAS مقایسه شدند.

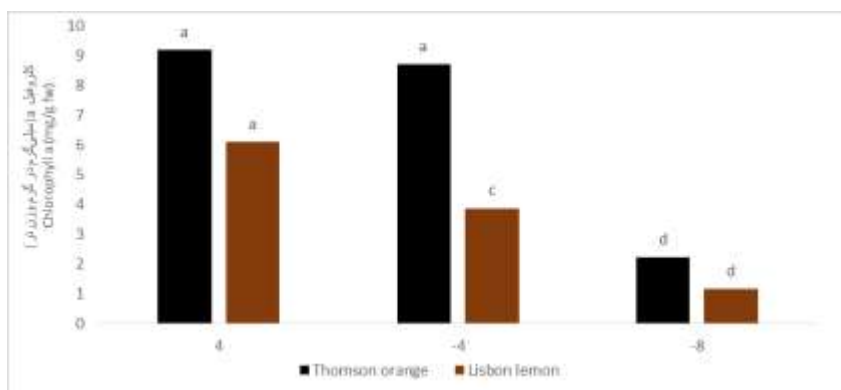
### نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) بیانگر آن بود که اثر ارقام و برهمکنش متقابل دما و ارقام در صفت  $LT_{50}$  در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار بوده است. در مورد میزان  $LT_{50}$  نیز مشاهده گردید که پرتقال ( $LT_{50} = -5.92$ )، تحمل‌پذیری بیشتری را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل میزان تحمل‌پذیری مربوط به لیمو ( $LT_{50} = -2.36$ ) کمترین بود (شکل ۱).

اثر دو عامل رقم و برهمکنش رقم و دما بر محتوای کلروفیل  $a$  در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، مقایسه میانگین محتوای کلروفیل  $a$  نشان داد (شکل ۲) که کمترین میزان این رنگدانه ۱/۱۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در لیمو مشاهده شد. در نقطه مقابل بیشترین میزان کلروفیل  $a$  در پرتقال در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد ثبت شد.



شکل ۱- اثر ارقام و دما بر LT50 در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

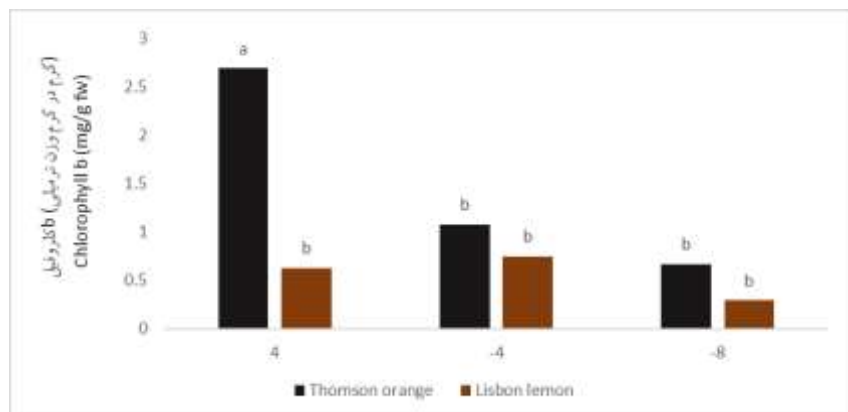


شکل ۲- اثر دما بر کلروفیل a در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در لیمو مشاهده شد. در نقطه مقابل بیشترین میزان کلروفیل *b* در پرتقال در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد با مقدار ۶/۶۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ ثبت شد (شکل ۳). با کاهش دما به ۴- و ۸- درجه سلسیوس در پرتقال و لیمو، بین سطح تیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در سطح دمای ۸- درجه سلسیوس تأثیر منفی بالایی بر کلروفیل *b* در هر دو رقم مشاهده گردید (شکل ۳).

با کاهش دما به ۴- و ۸- درجه سلسیوس در پرتقال و لیمو، بین سطح تیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در سطح دمای ۸- درجه سلسیوس تأثیر منفی بالایی بر کلروفیل *a* در هر دو رقم مشاهده گردید (شکل ۲).

اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر محتوای کلروفیل *b* در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (شکل ۳) که کمترین میزان این رنگدانه ۰/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بوده که در

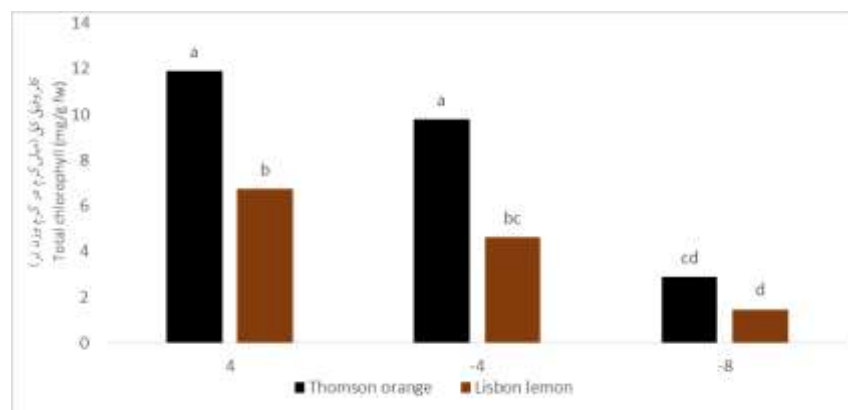


شکل ۳- اثر دما بر محتوای کلروفیل *b* در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، در بین ارقام مورد مطالعه نیز ملاحظه کردید که از لحاظ آماری لیمو در رتبه دوم قرارگرفت (شکل ۴).

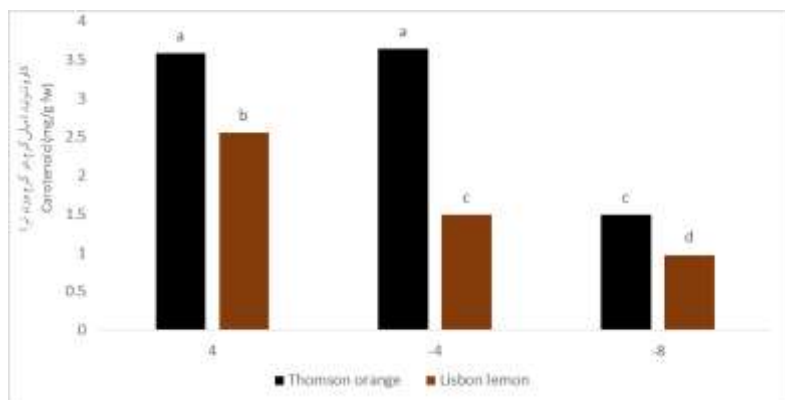
اثر دو عامل رقم و برهمکنش آنها بر میزان کارتونوید در سطح آماری یک درصد و برای سطح تنش در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر محتوای کلروفیل کل در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در مورد میزان کلروفیل کل پرتقال در دمای +۴ درجه سانتی-گراد بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل کمترین میزان کلروفیل کل ۱/۴۷ میلی-گرم در گرم وزن تر برگ بود که در لیمو در دمای -۸-



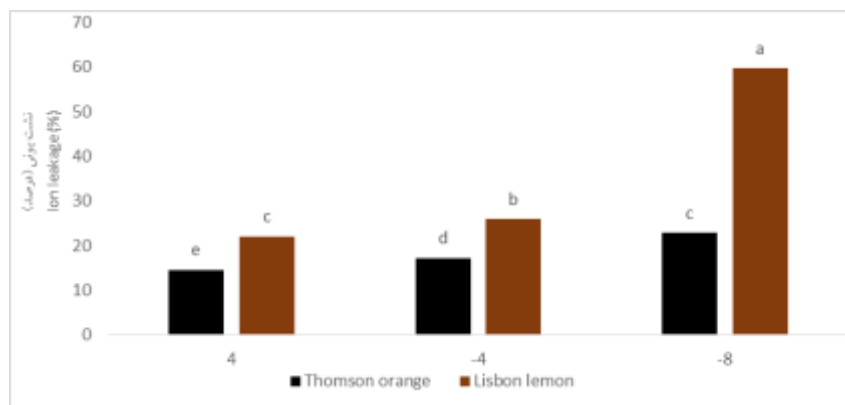
شکل ۴- اثر دما بر کلروفیل کل در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

در مورد میزان کارتنوئید نیز مشاهده گردید که پرتقال در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل کمترین میزان کارتنوئید ۰/۹۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود که در لیمو در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵- اثر دما بر کارتنوئید در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

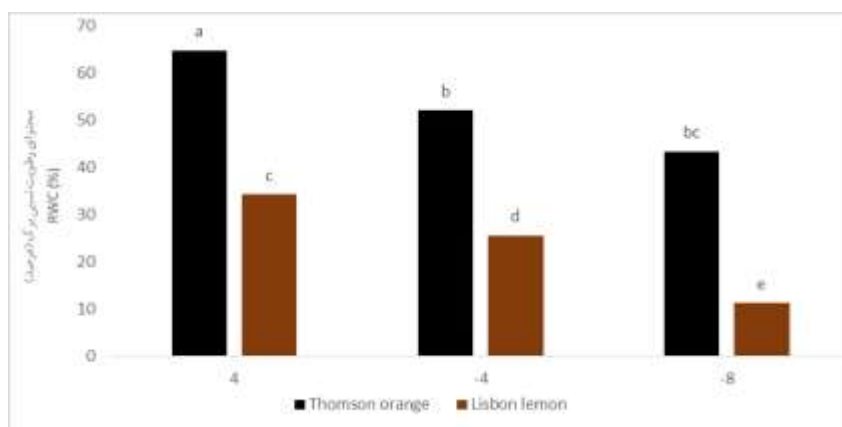
اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر میزان نشست یونی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین نشست یونی (شکل ۶) نشان داد که با کاهش دما میزان نشست یونی در هر دو رقم افزایش معنی‌داری یافت و بیشترین میزان این صفت در دمای ۸- اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر محتوای رطوبت نسبی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان نشست یونی برگ در پرتقال (۲۲/۸۸ درصد) و مقدار نشست یونی برگ لیمو (۵۹/۶۵ درصد) ثبت شد.



شکل ۶- اثر دما بر نشست یونی در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

پرتقال (۶۴/۶۸ درصد) در دمای +۴ درجه سانتی‌گراد بود. در بین دماها، مقدار محتوای رطوبت نسبی لیمو در تمامی نمونه‌ها در پایین‌ترین سطح بود (شکل ۷).

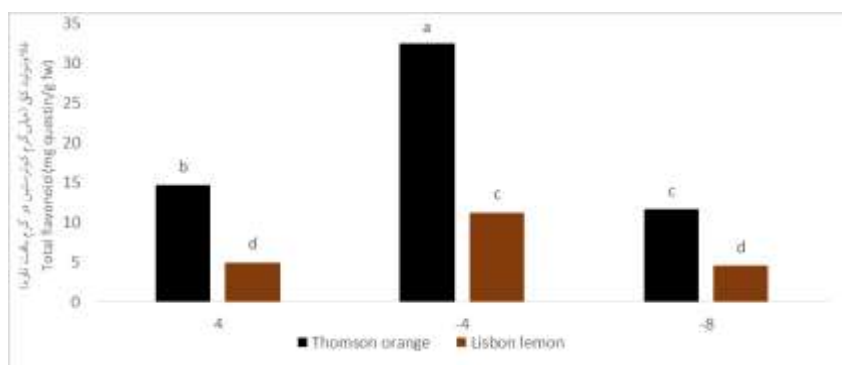
لذا مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که با کاهش دما تا -۴ درجه سانتی‌گراد میزان آن رو به کاهش نهاد و مجدداً در دمای -۸ درجه سانتی‌گراد میزان آن قدری تنزل داشت. براین اساس بیشترین محتوای رطوبت نسبی، متعلق به



شکل ۷- اثر دما بر محتوای رطوبت نسبی برگ در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

گردد کمترین میزان فلاونوئید برگ در لیمو ثبت شد. در بین ارقام مورد مطالعه در دمای -۴ درجه سانتی‌گراد نیز واکنش‌های متفاوتی ملاحظه شد، بیشترین مقدار این صفت ۳۲/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بافت تازه بود که در رقم پرتقال تامسون ثبت گردید (شکل ۸).

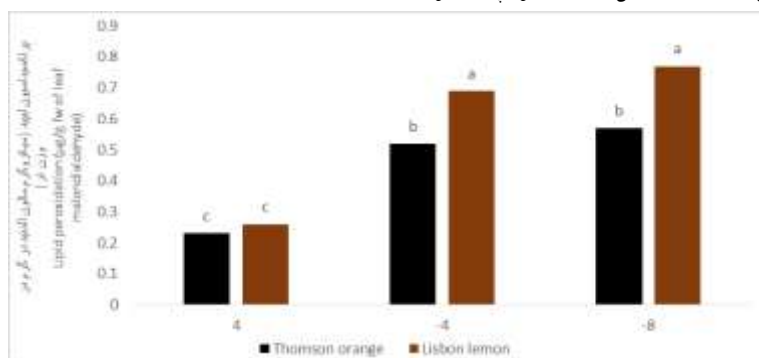
اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر فلاونوئید کل در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌های حاصل از فلاونوئید کل (شکل ۸) بیانگر آن بود که مقدار این صفت باتوجه به نوع ژنوتیپ با تنزل دما افزایش داشت. به طوری که در دمای -۸ درجه سانتی-



شکل ۸- اثر دما بر فلاونوئید کل در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

مطالعه در این دما نشان داد که (شکل ۹) کمترین میزان واکنش (با ۰/۲۳ میکروگرم مالون آلدئید در گرم در وزن تر برگ) مربوط به پرتقال بود. بیشترین میزان این صفت نیز ۰/۷۷ میکروگرم در گرم وزن تر برگ مالون آلدئید بود که در لیمو ثبت شد.

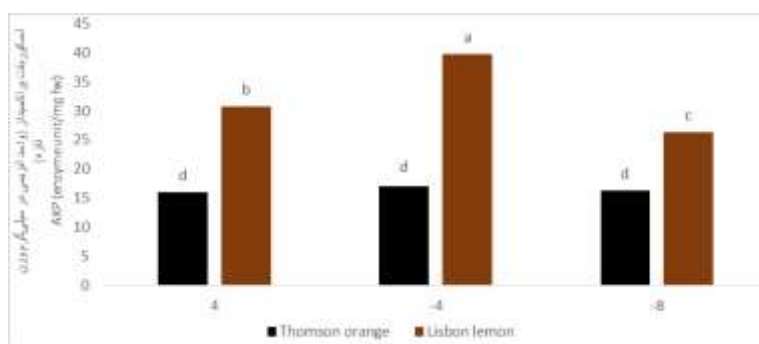
اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر پراکسیداسیون لیپید در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء از علائم تخریب تنش دمایی پایین است که در این پژوهش باتوجه به نوع رقم بیشترین پراکسیداسیون لیپید در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. از این رو مقایسه میانگین داده‌های ژنوتیپ‌های مورد



شکل ۹- اثر دما بر پراکسیداسیون لیپید در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

بیشترین میزان فعالیت آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز ۳۹/۷ واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن تازه بود که در لیمو در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. کمترین میزان فعالیت آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز نیز ۱۶ واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن تازه در دمای ۴- و ۸- درجه سلسیوس بود که در پرتقال ثبت شد که نسبت به نمونه لیمو نیز در رتبه آماری پایین‌تر قرار گرفت.

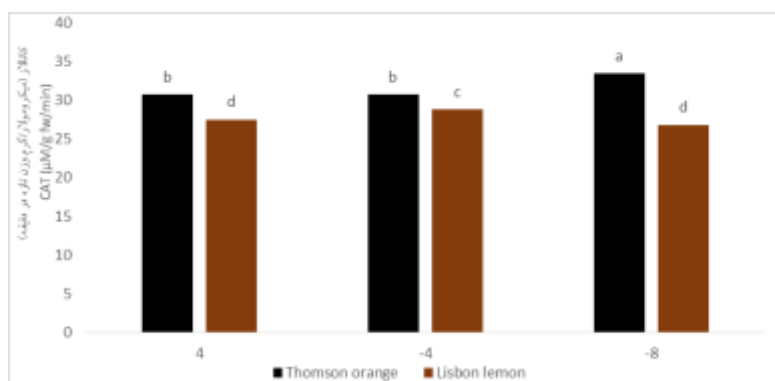
اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر فعالیت آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش دمایی پایین و ژنوتیپ بر آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز (شکل ۱۰) نشان داد که باتوجه به نوع ژنوتیپ، آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز با تنزل دما افزایش یافت، به طوری که روند افزایش این صفت تا دمای ۴- درجه سانتیگراد ادامه داشت. از این رو



شکل ۱۰- اثر دما بر آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

میکرومولار بر گرم وزن تازه در دقیقه بود که در پرتقال مشاهده شد. کمترین میزان این صفت نیز ۲۶/۸۳ میکرومولار بر گرم وزن تازه در دقیقه بود که در لیمو ثبت گردید (شکل ۱۱).

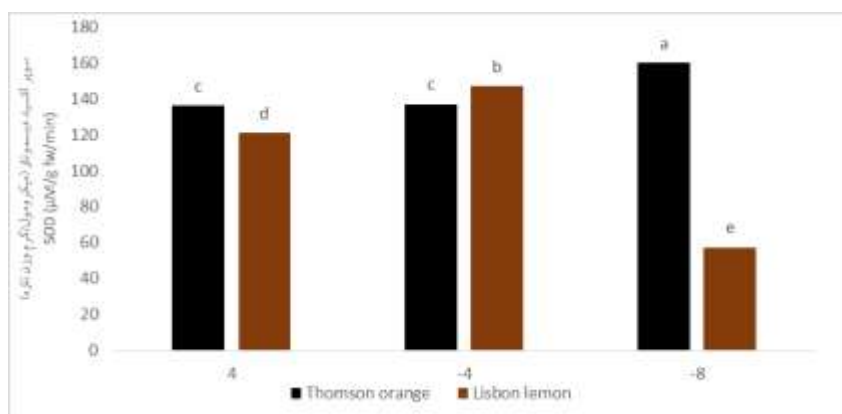
اثر دو عامل ارقام و تنش بر فعالیت کاتالاز در سطح آماری یک درصد و برای اثر متقابل در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). لذا مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن بود که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی ۳۳/۴۳



شکل ۱۱- اثر ارقام و دما بر آنزیم کاتالاز در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

۸- درجه سانتی‌گراد میزان آن رو به افزایش نهاد و مجدداً در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد میزان آن در لیمو تنزل داشت. براین اساس بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید-دیسموتاز، متعلق به پرتقال (۱۶۰/۳) میکرومول/گرم وزن تازه) در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد بود.

اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز کل در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در پژوهش مذکور فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز نیز تحت تأثیر اثر ارقام، دمای پایین و متقابل ارقام و دمای پایین بود (شکل ۱۲). لذا مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که در پرتقال با کاهش دما تا



شکل ۱۲- اثر دما بر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

## بحث

که از این طریق می‌تواند کلروفیل a را از گزند مولکول‌های اکسیژن یکتایی حفاظت کند. لیکن کلروفیل b در مقابل کلروفیل a نسبت به تنش دمای پایین حساسیت بیشتری داشته که به کاهش این رنگدانه در تنش مزبور منجر شده است (۵۳ و ۴۴).

در خصوص اثرات کاهش دما در افزایش نشت یونی گزارش‌های متعددی ارائه شده که می‌توان به مطالعات صورت گرفته روی گیاهچه مکزیکن لایم در مرکبات (۲۴) و درختان زیتون تحت شرایط کنترل شده تنش یخبندان (۱۳) اشاره داشت. در توجیه وقوع نشت یونی می‌توان این گونه استدلال داشت که احتمالاً وقوع یخبندان می‌تواند از طریق افزایش نشت یونی، موجب خروج آب از درون سلول به فضای بیرون شده که در چنین وضعیتی این بروز در برگ نیز قابل ملاحظه خواهد بود. بنابراین افزایش نشت یونی برگ نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش نیز می‌تواند تأییدکننده این استدلال باشد. غشاهای سلولی اولین نواحی هستند که تحت تأثیر آسیب‌های یخ‌زدگی قرار می‌گیرند. تنش دمای پایین باعث کاهش سیالیت غشاء شده که در کنار پراکسیداسیون لیپیدها موجب تخریب غشاء و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (۲۴). در پژوهشی روی نهال‌های زیتون، تنش یخ‌زدگی موجب تسریع تخریب غشاء و در نتیجه، افزایش نشت یونی شد (۱۱). نشت یونی کمتر در ارقام متحمل می‌تواند به دلیل پایداری بیشتر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی غشای پلاسمایی باشد که در این پژوهش کاملاً نمایان بود. در بسیاری از تنش‌ها آسیب به بافت با خسارت وارده به غشای پلاسمایی برگ یا دیگر بافت‌ها ارتباط دارد (۴۳، ۲۲، ۵۸، ۶۰، ۶۱). مطالعات ایمانی و همکاران (۲۰۱۱) (۳۰) روی مقاومت به سرمای ۶۰ رقم و ژنوتیپ بادام نشان داد که شدت آسیب یخ‌زدگی به ژنوتیپ گیاه بستگی دارد و ژنوتیپ‌هایی که مقاومت بیشتری دارند قطعاً نشت یونی کمتری خواهند داشت. بیشترین آسیب ناشی از تنش یخ‌زدگی درون سلولی است. گیاهان متحمل به یخ‌زدگی، می-

تحمل به یخ‌زدگی (با کاهش  $LT_{50}$ ) برآورد شده در شکل ۱ نشان داده شده است. در این پژوهش تحمل به یخ‌زدگی در ارقام مرکبات مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی‌دار و قابل توجهی بالا بود (جدول ۱)، که این نتایج بیانگر این است که توقف در رشد گیاه، نیاز قطعی برای سازگاری به سرما نیست، همچنین نتایج نشان می‌دهد که مرکبات مانند دیگر درختان میوه نسبتاً متحمل قادر است تا حدودی تحمل به سرما را متحمل نماید که این به این معنی است، که دارای مکانیسم اجتناب از یخ‌زدگی است (۳۲). با اینکه درختان مرکبات نسبتاً میزان تحمل به سرما را در بین درختان نیمه گرمسیری دارا است، اما میزان تحمل به یخ‌زدگی بین ارقام مرکبات متفاوت است که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی مرتبط با تحمل به یخ‌زدگی بین آنها باشد (۹). پژوهش‌های انجام شده بر روی مرکبات نشان داده است که ارقام متحمل به یخ‌زدگی عموماً غشاء سیتوپلاسمی پایدارتر و نشت الکترولیت کمتری نسبت به ارقام حساس دارند (۳۹). کاهش کلروفیل در ارقام مورد نظر می‌تواند ناشی از اکسیداسیون این رنگدانه‌ها در غشاء تیلکوئید باشند (۵۲). به عبارت دیگر افزایش پراکسیداسیون لیپید (ناشی از افزایش تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن) به موازات کاهش رنگدانه‌های کلروفیل می‌تواند توجیه‌کننده تفسیر فوق باشد، در ارزیابی واکنش لیمو در مواجهه با تنش یخبندان، تخریب رنگدانه‌های کلروفیل اشاره شده که با نتایج این آزمایش هماهنگی دارد (۲۴). کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل در این پژوهش می‌تواند به واسطه کاهش سنتز کلروفیل و تسریع در تخریب ساختمان آن تحت تأثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن باشد که هم راستا با نتایج فهمی‌راد و همکاران (۲۰۱۳) (۲۱) می‌باشد. در خصوص کاهش کاروتنوئیدها در این آزمایش می‌توان این گونه استنباط نمود که احتمالاً کاهش کاروتنوئیدها به علت اکسید شدن این رنگدانه توسط رادیکال فعال اکسیژن بوده

که دارای محتوای نسبی آب کمتری هستند هم به دلیل افزایش غلظت شیره سلولی و حفظ تعادل اسمزی و هم به دلیل پیوند محکم آب با ماکرومولکول‌های داخل سلول و عدم خروج به فضای بین سلولی است. مطابق با یافته‌های این پژوهش، Arias و همکاران (۲۰۱۵) (۹) گزارش کردند که برگ‌های ارقام زیتون سازگار شده به سرما در طی زمستان، دارای محتوای آب آپوپلاستی و  $LT_{50}$  و ظرفیت سوپرکولینگ بیشتری بودند.

در این پژوهش با کاهش دما به  $-4$  درجه سانتی‌گراد، فلاونوئید روند افزایشی را نسبت به شرایط بدون تنش نشان داد. گزارش مشابهی در خصوص تأثیر تنش یخبندان بر فلاونوئید برگ گیاهچه بذری هلو (۳۶) و ارقام مرکبات (۳۴) ارائه شده که مطابق نتایج این پژوهش است. فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در تنش‌های محیطی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تولید آنها افزایش می‌یابد (۴۱). مطالعات انجام شده نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را به عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (۵۵). خسارت بیشتر ساختار غشاء (افزایش پراکسیداسیون لیپید و نشت یونی) و افزایش فعالیت سه آنزیم SOD، CAT، AXP در طی تنش سرما، نشان‌دهنده تولید ROS و افزایش خسارت اکسیداتیو در دو تیمار دمای پایین می‌باشد. با این وجود، کاهش میزان فلاونوئیدها در این دمای  $-8$  ممکن است ناشی از اکسیداسیون آنها توسط ROS ها باشد (۵۴). یکی از واکنش‌هایی که در شرایط تنش و در حضور اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است که می‌تواند منجر به پارگی غشا سلولی در گیاهان شود (۳۳). مالون دی‌آلدهید که محصول تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع هیدروپروکسیداز و پراکسیداسیون لیپیدها تحت تأثیر تنش‌های اکسیداتیو است، به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای اکسیداسیون

توانند یخ‌زدگی برون سلولی را بدون پذیرش خسارت تحمل کنند، اما قادر به تحمل یخ‌زدگی درون سلولی نیستند (۵۶). فرایند سازگاری به سرما و نقش آنها در القای تحمل به یخ‌زدگی در مرکبات طی آزمایشاتی (۲۹ و ۳۸) مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که تنش آب برای فرایند سازگاری به سرما و القای تحمل کامل به یخ‌زدگی در مرکبات و توت‌فرنگی ضروری است. آنچه مسلم است بین پتانسیل آب گیاه و محتوای نسبی آب برگ رابطه 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، که در این آزمایش رقم پرتقال محتوای نسبی آب برگ بالاتری نسبت به لیمو در سطح دمایی داشت. کاهش محتوای آب برگ باعث می‌شود که هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز و آسمیلاسیون دی‌اکسید کربن کاهش پیدا کند. اگرچه پایین بودن محتوای آب نسبی برگ در دماهای پایین در ارقام مقاوم می‌تواند ناشی از شکستن مولکول‌های درشت مانند پلی‌ساکاریدها و تولید قندهای ساده‌تر باشد که منجر به افزایش پتانسیل اسمزی و کاهش محتوای آب نسبی می‌گردد (۴). محتوای نسبی آب برگ یکی از پارامترهای فیزیولوژیکی مهم است که همبستگی خوبی با تحمل به تنش یخ‌زدگی نشان داده است. به طور کلی با افزایش محتوای نسبی آب برگ، فشار درون سلول برای رشد و در نهایت اتساع دیواره سلول افزایش می‌یابد و همین امر باعث کاهش پایداری غشاء سلولی و افزایش میزان نشت سلولی شد. در همین رابطه محمدرضا خانی و همکاران (۴۰) در پژوهشی روی گونه‌های مرکبات نشان دادند که افزایش درصد محتوای نسبی آب برگ با کاهش میزان پایداری غشاء همراه بود. علاوه بر این آسیب به گیاه با یخ زدن آب بین سلولی و حرکت آب از پروتوپلاسم به فضای بین سلولی و تشکیل کریستال‌های یخ در داخل پروتوپلاسم صورت می‌گیرد. اما اغلب خسارت یخ‌زدگی به دلیل دهیدراسیون ناشی از یخ‌زدگی است (۵). بنابراین تحمل به یخ‌زدگی بالای ارقامی

شرایط دمای پایین، نشان داد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شروع تیمار سرما سریعاً افزایش یافت (۳۸). در آزمایشی روی نارنگی نتایج نشان داد با شروع تیمار سرما فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌ها افزایش یافته اما با طولانی شدن مدت سرما کاهش یافته و به سطح ثابتی رسیده است (۴۰). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحمل گیاه به تنش‌های غیرزنده مانند تنش سرما همبستگی وجود دارد و گیاهانی که دارای سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدانت‌ها هستند، مقاومت بیشتری را به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند (۵۱). نتایج آزمایشی دیگر نشان داد که با کاهش دما، فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارد به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد (۳۵). یکی از دلایل تحمل بیشتر رقم پرتقال می‌تواند، فعالیت بیشتر آنزیم‌های سوپراکسیداز و کاتالاز نسبت به رقم حساستر لیمو و در نتیجه حذف کاراتر هیدروژن پراکسید باشد. روسوس و همکاران (۴۶) دریافتند که در توت فرنگی نیز تیمار سرما موجب افزایش فعالیت پراکسیدازها می‌شود. مطالعه انجام شده نشان داد با کاهش دما فعالیت آنزیم کاتالاز، در پرتقال تامسون افزایش یافت. مطالعات مختلف روی توت‌فرنگی (۳۸) هم نشان می‌دهد که بین فعالیت آنزیم‌های ضدآکسایشی با تحمل گیاه به تنش سرما همبستگی مثبت وجود دارد. نتایج تحقیقات در زمینه مرکبات نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تنها در ارقام مقاوم به سرمای این دسته افزایش نشان داده است (۳۲). در پژوهشی در زمینه مقاومت به سرمای چای مشخص شد که سه آنزیم مهم آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در اثر کاهش دما فعالیت خود را با هدف خنثی کردن و به حداقل رساندن آسیب‌های اکسیداتیو افزایش می‌دهند (۴) که نتایج پژوهش حاضر با آن مطابقت دارد.

لیپیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۹). غلظت این ماده در محدوده نانومولار است و فرایندهای شدید پراکسیداسیون لیپید از قبیل تخریب و تغییر غشاء در نتیجه تنش اکسیداتیو یا تغییرات مورفولوژیکی باعث افزایش در غلظت آن می‌شود (۵۹). مطالعات ولیزاده-کامران و همکاران (۲۰۱۷) (۵۳)، که بروی چند ژنوتیپ جو انجام شده نشان می‌دهد که با کاهش دما در بازه ۲۰ تا ۴- درجه سانتی‌گراد مقدار مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافته و در ۴- درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان را داشته، همچنین مقدار آن در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر از ژنوتیپ‌های مقاوم جو بوده است. در پژوهش‌های متعددی به ارتباط خسارت تنش دمای پایین و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء اشاره شده که در این زمینه می‌توان به پژوهش‌های انجام شده روی ارقام انگور (۵۷)، عناب (۱۰) و قهوه (۱۵) اشاره داشت. براساس نتایج به دست آمده در این پژوهش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در این آزمایش، آنزیم‌های مقاوم به تنش می‌باشند و در نتیجه در پرتقال که نسبتاً مقاوم به دمای پایین می‌باشد، فعالیت بیشتری در مقایسه با لیمو داشتند. در مقابل آسکوربات پراکسیداز که آنزیم پاسخ به تنش هست و در لیمو که نسبتاً حساس به دمای پایین می‌باشد، سطح بالاتری داشت. رقم متحمل سریعتر به کاهش دما پاسخ می‌دهند و با حذف سریع‌تر گونه‌های فعال اکسیژن منجر به کاهش آسیب‌های ناشی از تنش می‌شوند، و از آنجایی که پرتقال بیشتر و سریعتر از لیمو تحت تأثیر تغییر دما قرار می‌گیرد به نظر می‌رسد بالا بودن سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پرتقال، امری طبیعی باشد. سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین سد دفاعی در مقابل حمله اکسیژن‌های فعال عمل می‌کند. این آنزیم نقش مرکزی در مکانیسم دفاعی ارگانیسم‌ها در برابر گونه‌های اکسیژن فعال دارد که در طی تنش‌های محیطی تولید می‌شود و جلوگیری از خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو را به عهده دارد (۱۹). نتایج آزمایشی در زمینه ارزیابی تغییر آنزیم‌های ضدآکسایشی در دو رقم توت‌فرنگی تحت

## نتیجه‌گیری

نشان داد که همواره با کاهش دما مقادیر فلاونوئید کل، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش یافته و عموماً سطح آنها در پرتقال تامسون بیشتر از لیموی لیسبون بوده است. در این حالت و احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت‌های اکسیداتیو تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش یافت.

## سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شده است.

در این پژوهش اثر متقابل دما و ژنوتیپ بر پراکسیداسیون لیپید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT، AXP، نشت یونی، فلاونوئید کل، کلروفیل و کلروفیل کل معنی‌دار بود. در بین دماهای مورد بررسی در این پژوهش تحت شرایط دو رقم پرتقال تامسون (متوسط) و لیموی لیسبون (حساس به تنش) دمای پایین نیز واکنش‌های متفاوت فیزیولوژیک مشاهده شد. بر این اساس لیمو در مقابل کاهش دما تا دمای ۴- پایداری مناسبی نشان داد. تنش سرما باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها شد و مقادیر کلروفیل گیاه را در مراحل ابتدایی پس از اعمال تنش کاهش داد. نتایج پژوهش حاضر

## منابع

- افشاری، ح.، زاهدی، ر.، پروانه، ت.، و باقری زاده، م.، ۱۳۹۳. تأثیر اسید سالیسیلیک بر نشت قند محلول پرولین و الکترولیت در رقم دو رقم زردآلو تحت تنش سرما، مجله به‌زراعی، ۱۶، صفحات: ۱۲۷-۱۳۸.
- آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۸. وزارت جهاد کشاورزی ایران.
- تاجور، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، حمید اوغلی، ی.، و حسن ساجدی، ر.، ۱۳۹۰. پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نارنگی پیچ روی پایه سیتریج به تنش دمای پایین، زیست‌شناسی گیاهی، ۳(۹)، صفحات: ۱-۱۲.
- سریری، د.، رنوفی ماسوله، ع.، و خانیکی، ر.، ۱۳۹۴. تأثیر سرما بر تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ چای شمال ایران، یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۲، صفحات: ۱۳۳-۲۹۲.
- افشاری، ح.، زاهدی، ر.، پروانه، ت.، و باقری زاده، م.، ۱۳۹۳. تأثیر اسید سالیسیلیک بر نشت قند محلول پرولین و الکترولیت در رقم دو رقم زردآلو تحت تنش سرما، مجله به‌زراعی، ۱۶، صفحات: ۱۲۷-۱۳۸.
- آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۸. وزارت جهاد کشاورزی ایران.
- تاجور، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، حمید اوغلی، ی.، و حسن ساجدی، ر.، ۱۳۹۰. پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نارنگی پیچ روی پایه سیتریج به تنش دمای پایین، زیست‌شناسی گیاهی، ۳(۹)، صفحات: ۱-۱۲.
- سریری، د.، رنوفی ماسوله، ع.، و خانیکی، ر.، ۱۳۹۴. تأثیر سرما بر تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ چای شمال ایران، یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۲، صفحات: ۱۳۳-۲۹۲.
- اصحی سارادویی، ع.، ۲۰۱۹. پیشرفت و استراتژی تنش سرما، فیزیولوژیکی و مولکولی، انتشارات نوروزی، ۲۶۴ صفحه.
- صلاح ورزی، ی.، دآوری نژاد، غ.ح.، تهرانی فر، ع.، نعمتی، ح.، و نظامی، ع.، ۱۳۸۹. پاسخ‌های فیزیولوژیکی شش رقم انار خراسان رضوی تحت تنش یخ‌زدگی، مجله علوم و فنون باغبانی ایران، ۱۱، صفحات: ۲۱۷-۲۳۰.
- کریمی، ر.، ارشادی، ع.، اثی عشری، م.، و مشهدی اکبربوچار، م.، ۱۳۹۴. تغییرات فصلی در محتوای پروتئین محلول، فنل کل و MDA و رابطه آنها با تحمل به سرما ارقام انگور، به‌زراعی کشاورزی، ۱۶، صفحات: ۹۹۹-۱۰۱۳.
- مشایخی، ک.، صادقی، ح.، اکبرپور، و.، آتشی، س.، قاسمی، ی.، و موسوی زاده، س.، ۱۳۹۳. تغییرات کربوهیدرات‌های برگ و میوه در طول فصل رشد در شلیل قرمز گلد در شرایط آب و هوایی گرگان. مجله علوم باغبانی، ۲۸، صفحات: ۱-۹.
- Arias, N.S., Buccicci, S.J., Scholz, F.G., and Goldstein, G., 2015. Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant, Cell and Environment*, 38(10), PP: 2061-2070.
- Ashraf, M., and Foolad, M.R., 2007. Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, PP: 206-216.
- Azzarello, E.S., Pandolfi, C., Masi, E., Marone, E., and Mancuso, S., 2009. Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive, *Trees*, 23, PP: 159-167.
- Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., and Davison, A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32(2), PP: 85-90.

13. Bartolozzi, F., Mencuccini, M., and Fontanazza, G., 2011. Enhancement of frost tolerance in olive shoots in vitro by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium. *Biomedical Life Science*, 67, PP: 299-302.
14. Bates, L.S., Waldren, R.P., and Tears, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, PP: 205-207.
15. Campos, P., 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, PP: 238-292.
16. Chance, B., and Maehly, A.C., 1995. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, PP: 764-775.
17. Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis*, 10, PP: 178-182.
18. Clarbone, A., 1985. Catalase Activity, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press, Florida, Boca Raton, 284 p.
19. Collin, L.J., diCenzo, G.C., and Walker, V.K., 2021. Cold acclimation and prospects for cold-resilient crops. *Plant Stress*, 2, 100028 p.
20. Ebrahimi, M., Souri, M.K., Mousavi, A., and Sahebani, N., 2021. Biochar and vermicompost improve growth and physiological traits of eggplant (*Solanum melongena* L.) under deficit irrigation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), PP: 1-14.
21. Fahimirad, S., Ghasem Karimzadeh, G., and Ghanati, F., 2013. Cold-induced changes of antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 3, PP: 1-11.
22. Fattahi, B., Arzani, K., Souri, M.K., and Barzegar, M., 2019. Effects of cadmium and lead on seed germination, morphological traits, and essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Industrial Crops and Products*, 138, 111584 p.
23. Fotouhi Ghazvini, R., Baghbanha, M.R., Hatamzadeh, A., and Heidari, M., 2008. Effect of water stress on freezing tolerance of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.) seedling. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 49, PP: 267-280.
24. Fotouhi Ghazvini, R., Baghbanha, M.R., Hatamzadeh, A., and Heidari, M., 2008. Effect of water stress and freezing tolerance of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.) seedling. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 49, PP: 267-280.
25. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., and Fotopoulos, V., 2020a. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681 p.
26. Hasanuzzaman, M., Borhannuddin Bhuyan, M.H.M., Parvin, K., Farha Bhuiyan, T., Islam Anee, T., Nahar, K., Hossen, S., Zulfiqar, F., Alam, M., and Fujita, M., 2020b. Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8695 p.
27. Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Sohani, M.M., Ghazvini, R.F., and Abedi, A., 2019. Effects of freezing stress on the expression of fatty acid desaturase (FAD<sub>2</sub>, FAD<sub>6</sub> and FAD<sub>7</sub>) and beta-Glucosidase (BGLC) genes in tolerant and sensitive olive cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(2), PP: 214-222.
28. Hatamian, M., Rezaei Nejad, A., Kafi, M., Souri, M.K., and Shahbazi, K., 2020. Interaction of lead and cadmium on growth and leaf morphophysiological characteristics of European hackberry (*Celtis australis*) seedlings. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1), PP: 1-8.
29. He, Z., Zhao, T., Yin, Z., Liu, J., Cheng, Y., and Xu, J., 2020. The phytochrome-interacting transcription factor CsPIF8 contributes to cold tolerance in citrus by regulating superoxide dismutase expression. *Plant Sciences*, 298, 110584 p.
30. Imani, A., Barzegar, K., and Piripireivatlou, S., 2011. Relationship between frost injury and ion leakage as an indicator of cold hardiness in 60 almond selections. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2, PP: 22-26.
31. Jakir Hossain, M.D., Tillaboeva, S., Sirel, I.A., Kaya, R.B., Dönmez, B.A., Aasim, M., and Bakhsh, A., 2021. Genetic engineering of ion transporters for osmotic stress tolerance: Transporters and plant osmotic stress, Academic Press publisher, 166 p.

Commented [A1]: در متن اشاره نشده

Commented [A2]: تکراری با شماره ۲۴

32. Jiang, J., Hou, R., Yang, N., Li, L., Deng, J., Qin, G., and Ding, D., 2021. Physiological and TMT-labeled proteomic analyses reveal important roles of sugar and secondary metabolism in *Citrus junos* under cold stress, *Journal of Proteomics*, 237, 104145 p.
33. Juliana, M., Palacio, O., Graiver, N., Santos, M.V., and Zaritzky., N.E., 2019. Effect of the desiccation tolerance and cryopreservation methods on the viability of *Citrus limon* L, Burm cv, Eureka seeds. *Cryobiology*, 89, PP: 51-59.
34. Kamran Khan, M., Huma, Z.E., and Dangles, O., 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols, *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), PP: 85-104.
35. Kumar, S., Barnes, L.C., Schnable, J.C., and Roston, R.L., 2018. Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant Science*, 276, PP: 73-86.
36. Leng, P., and Qi, J.X., 2013. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress, *Scientia Horticulturae*, 97, PP: 27-39.
37. Lim, C.C., Arora, R., and Townsend, E.C., 1998. Comparing Gompertz and Richards functions to estimate freezing injury in *Rhododendron* using electrolyte leakage, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123, PP: 246-252.
38. Luo, Y., Tang, H., and Zhang, Y., 2011. Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperature, *Journal of Agricultural Science*, 3, PP: 89-96.
39. Moellering, E.R., Muthan, B., and Benning, C., 2020. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane, *Science*, 330, PP: 227-230.
40. Mohammadrezakhani, S., Rezanejad, F., and Hajilou, J., 2021. Effect of putrescine and proline on profiles of GABA, antioxidant activities in leaves of three Citrus species in response to low temperature stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 30(3), PP: 545-553.
41. Myung-Min, H., Trick, H.N., and Rajasheka, E.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166, PP: 180-191.
42. Pietrini, F., Chaudhuri, D., Thapliyal, A.P., and Massacci, A., 2005. Analysis of chlorophyll fluorescents in mandarin leaves during photooxidative cold shock and recovery. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106, PP: 189-198.
43. Primo-Capella, A., Martínez-Cuenca, M.R., and Ángeles Forner-Giner, M., 2021. Cold Stress in Citrus: A Molecular, Physiological and Biochemical Perspective, *Horticulturae*, 7(10), 340 p.
44. Radyuk, M.S., Domanskaya, I.N., Shcherbakov, R.A., and Shalygo, N.V., 2010. Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves, *Russian Journal of Plant Physiology*, 56, PP: 175-180.
45. Ritchie, S.W., and Nguyen, H.T., 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance, *Crop Science*, 30, PP: 105-111.
46. Roussos, P.A., Ntanos, E., Tsafouros, A., and Denaxa, N.K., 2020. Strawberry physiological and biochemical responses to chilling and freezing stress and application of alleviating factors as countermeasures, *Journal of Berry Research*, 10(3), PP: 437-457.
47. Shanker, A.K., and Venkateswarlu, B., 2011. Abiotic Stress in Plants Mechanisms and Adaptations, InTech Croatia, 428 p.
48. Shen Wu, Q., Zou, Y.N., and Xia, R.X., 2006. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots, *European Journal of Soil Biology*, 42, PP: 166-172.
49. Soleimanzadeh, H., Habibi, D., Ardakani, M., Paknejad, F., and Rejali, F., 2010. Effect of potassium levels on antioxidant enzymes and malondialdehyde content under drought stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5, PP: 56-61.
50. Sullivan, C.Y., and Ross, W.M., 1979. Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum, *Stress physiology in crop plants*, PP: 263-281.
51. Syvertsen, J.P., and Garcia-Sanchez, F., 2014. Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus, *Environmental and Experimental Botany*, 103, PP: 128-137.
52. Tajvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamid Oughly, Y., and Hasan Sajed, R., 2012. A Study of Rootstock and Low Temperature Effects on Antioxidant Reaction of Page Mandarin, *Iranian*

- Journal of Horticultural Science and Technology*, 12(3), PP: 307-316. (in Persian)
53. Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H., and Pessarakli, M., 2017. Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes, *Journal of Plant Nutrition*, 41, PP: 102-111.
54. Vincent, C., Morillon, R., Arbona, V., and Gómez-Cadenas, A., 2020. Citrus in changing environments: The Genus Citrus, Woodhead Publishing, 289 p.
55. Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis, *Molecular Plant*, 3, PP: 2-20.
56. Zabihi, H., Vogeler, I., Mat Amin, Z., and Ramezani Gourabi, B., 2016. Mapping the sensitivity of citrus crops to freeze stress using a geographical information system in Ramsar, Iran, *Weather and Climate Extremes*, 14, PP: 17-23.
57. Zhang, J., Wu, X., Niu, R., Liu, Y., Liu, N., Xu, W., and Wang, Y., 2012. Cold resistance evaluation in 25 wild grape species, *Vitis*, 51(4), PP: 153-160.
58. Soleimani Aghdam, M., and Asghari, M.R., 2013. Reduction of frostbite after harvesting tomato fruit with brassinosteroid treatment, *Plant Research Journal*, 27(3), PP: 427-439.
59. Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., and Zhou, Z., 2016. Antioxidant activity of citrus fruits, *Food Chemistry*, 196, PP: 885-896.
60. Tariq al-Islami, M., Kafi, M., Nizami, A., and Zarghami, D., 2015. The effect of freezing stress on biochemical and physiological characteristics of three maize hybrids (*Zea mays*) at the seedling stage. *Plant Research Journal*, 29(3), PP: 540-552.
61. Dashti, M., Kafi, M., Tawakli, H., Mirza, M., and Nizami, A., 2014. The effect of freezing stress on the morphophysiological indicators and chlorophyll fluorescence of the medicinal plant *Salvia lerifolia* in the seedling stage, *Plant Research Journal*, 28(5), PP: 962-973.

## Comparison of physiological and biochemical responses of Thomson oranges and Lisbon lemons to cold stress

Salehi Sardoei A.<sup>1\*</sup>, Sharifani M.<sup>1</sup>, Khoshhal Sarmast M.<sup>1</sup> and Ghasemnejhad M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

### Abstract

*Citrus sinensis* cv Thomson Navel and *Citrus limon* cv Lisbon are known as relatively resistant and cold-sensitive garden products. Thus, in the present study attempts are made to investigate the vulnerability of Thomson oranges and Lisbon lemons to cold stress under controlled environmental conditions compared to treatment temperatures (4, -4 and -8 °C). This factorial experiment was conducted according to a completely randomized design. The ANOVA results showed that the temperature/cultivar interaction can significantly affect some traits such as lipid peroxidation, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, total flavonoids, ion leakage, chlorophyll a, carotenoids, total chlorophyll and LT50 ( $P > 0.001$ ). However, the catalase/chlorophyll b interaction was found to be significant at  $P < 0.01$ . The highest levels of ion leakage (59.65%), lipid peroxidation reaction ( $0.77 \mu\text{g g}^{-1}$  FW MDA) in lemon and catalase and superoxide dismutase ( $33.43 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW and  $160.3.3 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FW min}$  respectively) in orange was recorded at -8 °C. In contrast, the highest levels of ascorbate peroxidase ( $39.7 \mu\text{g g}^{-1}$  FW) was recorded in lemon and total flavonoids ( $32.48 \text{ mg g}^{-1}$  FW of catechin) was recorded in oranges at 4 °C. In the present study, different reactions were also observed at different temperatures. Oranges showed higher resistance to cold compared to lemons. As for the measured traits, however, oranges were mostly ranked higher than lemons. Exposure of genotypes to cold stress led to an increase in malondialdehyde. Under cold stress conditions, the accumulation of antioxidant compounds such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase increased due to increased oxidative activity.

**Key words:** Citrus genotype, Chlorophyll, Free radical, Lipid peroxidation.