DOR: xx.xxxx.x.xxxxxxxx.xxxx.xx.x.x.x مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۱-۳۵۱

مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پرتقال تامسون و لیموی لیسبون در مواجهه با تنش سرما

علی صالحی ساردویی[1*]، مهدی شریفانی[1]، مصطفی خوشحال سرمست[1]، محمود قاسم نژاد[2]

[1]دانشجوی دکترا، دانشیار، استادیار علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[2]استاد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

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، ۴- و ۸- درجه سلسیوس) مورد بررسی قرار گرفتند. تست دمایی با دستگاه تست چمبر انجام شد. پژوهش بر مبنای آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا 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 (به‌ترتیب با میانگین ۳۳/۴۳ میکرومول درگرم وزن تازه در دقیقه و ۱۶۰/۳ میکرومول در گرم وزن تازه) در پرتقال در دمای ۸- درجه سیلسیوس 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، کارتنوئیدها 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 آنتی آکسیدانی، پراکسیداسیون لیپید، مرکبات، فلاونوئید، سبزینگی برگ

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۶۰۲۵۷۸۹ ، پست الکترونیکی: alisalehisardoei1987@gau.ac.ir

مقدمه

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در دنیا محسوب می شوند (۴۳)، که در ایران نیز کشت و پرورش آن، جایگاه ویژه‌ای دارد. در بین استان‌های تولید کننده مرکبات در کشور، مازندران با عملکرد ۸۸/۱ میلیون تن، رتبه اول تولید را به خود اختصاص داده است (۲). مرکبات جزء محصولات مناطق نیمه‌گرمسیری و متعلق به خانواده روتاسه[1] بوده که اغلب گیاهان تجاری موجود در این خانواده به دلیل همیشه سبز بودن، نسبتا حساس به تنش دمای پایین هستند (۵۲).

تنش سرما جزء تنش‌های غیر زیستی است که از اثرات منفی آن بر گیاهان می‌توان به اختلال در فتوسنتز، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسیب به غشاء سلولی، تخریب

[1] . Rutaceae

DOR: xx.xxxx.x.xxxxxxxx.xxxx.xx.x.x.x مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۱-۳۵۱

رنگدانه‌های گیاهی و اسیدهای نوکلوئیک اشاره کرد (۴۷). یکی از اثرات منفی تنش سرما، اختلال در فرآیند 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 (۵۷، ۲۵).

پراکسیداسیون غشاهای زیستی یکی از سریعترین واکنش-هایی است که اغلب در سلولها مخصوصاً در گیاهان حساس به تنش‌های محیطی و در حضور رادیگال‌های فعال اکسیژن اتفاق می‌افتد (۲۰، ۲۸). رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند با گروه‌های متیل اسیدهای چرب غیر اشباع 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 غشا و نشت یونی افزایش می یابد.

در مواجهه با تنش سرما گیاهان سعی می‌کند تا از طریق تغییراتی در فرایندهای‌های فیزیولوژیکی و بکارگیری سیستم آنتی اکسیدانی، 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 تاثیرگذار باشد. نقش عمده آنزیم-های آنتی اکسیدانی 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 تاثیرگذاری بر افزایش تولید ترکیبات موثر بر پتانسیل اسمزی توانسته بر سازگاری بیشتر گیاه نسبت به تنش سرما، تجمع آنزیم‌های آنتی اکسیدانی 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 سبزینگی 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 کم-هزینه برای تولید پایدار در هر منطقه است، که انتخاب رقم متحمل و انجام فعالیت‌های به‌زراعی مناسب، می‌تواند در تعدیل این آسیب موثر واقع گردد. با توجه 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 ۱۴۰۰در آزمایشگاه باغبانی، دانشگاه گیلان با هدف تعیین میزان تحمل به تنش سرما ارقام پرتقال تامسون و لیموی لیسبون بر پایه نارنج در ۳ سطح دمایی (۴، ۴-، ۸-) اجرا شد. پژوهش بر مبنای آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا 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).

DOR: xx.xxxx.x.xxxxxxxx.xxxx.xx.x.x.x مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۱-۳۵۱

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 ۵ ± ۶۵ درصد منتقل شدند. قبل از انتقال به دستگاه تست چمبر (Test Chamber) و اعمال تیمار یخزدگی و به منظور جلوگیری از آسیب دیدگی ریشه‌ها، قسمت ریشه گلدان‌ها با لایه‌ای ضخیم از پشم شیشه یه طور کامل پوشانیده شد و سپس برگ نهال-ها 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 نمونه-های برگی 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.

جهت اندازه گیری خصوصیات بیوشیمیایی نمونه های برگی 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 برگی تازه استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کارتنوئیدها برگ: برای تعیین غلظت کلروفیل و کارتنوئید از روش بارنس و همکاران (۱۲) استفاده شد. ابتدا نیم گرم نمونه برگی تازه از هر تیمار آزمایشی در ۱۰ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به مدت سه ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد تا رنگیزه‌ها استخراج و بافت برگی کاملاً بی‌رنگ گردید. از نمونه حاصل ۲۵۰ میکرولیتر برداشته و مجددا دو میلی‌لیتر DMSO به آن اضافه شد. نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید و از DMSO خالص به‌عنوان شاهد استفاده شد. اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید به ترتیب در طول‌موج ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر انجام گردید. و اعداد به‌دست‌آمده در رابطه‌های (۱)، (۲)، (۳) و (۴) جای‌گذاری شدند.

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

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

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

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

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

اندازه‌گیری نشت یونی: برای تعیین پایداری غشاء سلول‌های برگی از شاخص نشت الکترولیت استفاده شد. نشت یونی برگ‌ها بر مبنای شیوه سولیوان و رز (۵۰) اندازه‌گیری شد. قطعات برگی 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. ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت به کمک دستگاه شیکر قرار گرفتند. هدایت الکتریکی محلول (C_1) اندازه‌گیری و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و مجدداً هدایت الکتریکی آن‌ها (C_2) اندازه‌گیری شد. نشت یونی (٪) EC بر مبنای رابطه (۵) محاسبه شد.

رابطه (۵) $$EC\ (\%) = (C_1/C_2) \times 100$$

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 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 کشندگی نمونه‌ها (LT_{50}) 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 می‌آفتد (۳۷).

اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ (RWC): بالاترین (جوان‌ترین) برگ گیاه در هر تکرار برداشت و بلافاصله رابطه (۷)

$$\%RWC=[(W_f-W_d)/(W_t-W_d)]\times100$$

در این رابطه W_f وزن تازه برگ، W_t وزن آماس برگ و W_d 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 استات‌پتاسیم 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 طول‌موج 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 تیوباربیتوریک 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 ۰/۵گرم 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 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 مجدد در ۱۰۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدئید تیوباربیوتریک اسید(MDA-TBA) تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instruments

دمای شاهد در نمونه‌های برگ هر رقم از طریق رابطه ۶ محاسبه شد (۳۷).

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:

(ItdT80+UV/VIS) اندازه‌گیری شد و جذب سایر رنگیزه‌های گردید اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر مشخص شدند. غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل cm^{-1} $155mM^{-1}$ بر حسب $nmol.gFW^{-1}$ طبق رابطه (۸) زیر اندازه گیری شد.

رابطه (۸)

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

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 ۲میلی‌لیتری منتقل شد و به آن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج افزوده شد. سپس نمونه‌ها به خوبی ورتکس گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با دور۱۴۰۰۰ 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 اندازه گیری 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 میکرومولار) با pH=7

بافر۲: بافر ریبوفلاوین (۷۵ میلی‌مولار)، ریبوفلاوین به نور حساس است، بنابراین درظرفی با پوشش آلومینیومی نگهداری می‌شود، هر روز باید ساخته شود.

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

۱- نمونه شاهد شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر۱، ۱۵ میکرولیتر بافر۲، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار بود.

۲- نمونه بلانک شامل ۹۳۵ میکرولیت بافر ۱، ۱۵ میکرولیتر بافر۲، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار بود.

۳- نمونه حاوی عصاره آنزیمی شامل ۹۳۵ بافر ۱، ۱۵ میکرولیتر بافر۲ و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

پس از آماده سازی 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 روشنایی ۱۵ دقیقه و جذب عصاره آنزیمی در همان مدت زمان روشنایی 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 µMol/gFW محاسبه شد.

رابطه (۹)

$$\text{فعالیت آنزیم SOD} = 100 - \left[\frac{(ODControl - ODSampel)}{OD\ Control} \times 100\right]$$

DOR: xx.xxxx.x.xxxxxxxx.xxxx.xx.x.x.x مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۱-۳۵۱

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 میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار 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 پارافیلم 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 $mM^{-1}c^{-1}m$ محاسبه و فعالیت آنزیم در نهایت بر مبنای اندازه گیری µMol/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 ۰/۱میلی‌مولار، آسکوربیک اسید ۰/۲۵میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن ۱ میلی‌مولار 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 $mM^{-1}c^{-1}Mapx$ محاسبه و فعالیت آنزیم در نهایت بر مبنای µMol/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).

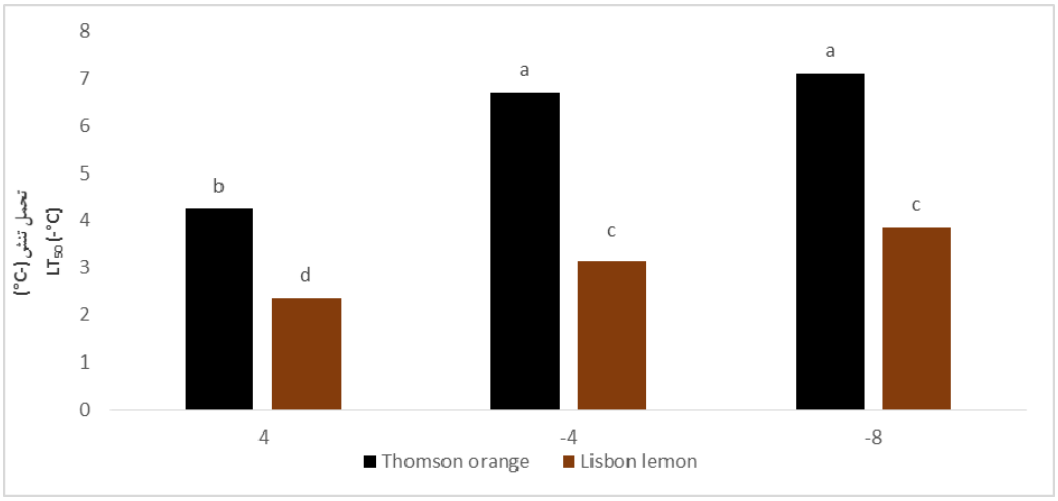
مجله پژوهشهای **گیاهی** (مجله زیست شناسی ایران)
DOR: xx.xxxx.x.xxxxxxxx.xxxx.xx.x.x.x

جلد ۳۶، شماره ۳، ۱۴۰۲
مقاله پژوهشی، صفحات ۳۶۱-۳۵۱

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دمای پایین بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پرتقال و لیمو

	درجه آزادی	LT_{50}	کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کارتنوئید	کلروفیل کل	نشت یونی	محتوای رطوبت نسبی	فلاونوئید کل	پراکسیداسیون لیپید	سوپر اکسید دیسموتاز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
رقم	۱	۲/۴۷**	۱۳۹/۱۱**	۳/۵۱*	۱۴/۹۱**	۱۹۰/۳۷**	۱۴۰۷/۱**	۱۷۲/۱۷**	۶۸۸/۳۲**	۰/۰۸۱**	۵۸۶۸/۰۵**	۱۳/۸۶**	۲۰۰/۱**
دما	۲	۳۱/۵۹$^{sn.}$	۱/۱۵$^{sn.}$	۱/۹۲*	۰/۱۷۷*	۵/۷۶**	۹۲۱/۲۴**	۵۴۲۶/۲**	۳۶۰/۷۶**	۰/۰۵۳**	۱۶۷۸/۱**	۳۵/۸**	۵۶۳/۱۶**
رقم × دما	۲	۲۱/۰۱**	۱۲/۶۷**	۱/۷۳*	۱/۵۵**	۲۰/۳۲**	۴۱۲/۷**	۹۵۱۸/۸**	۷۴/۳۵**	۰/۲۷**	۵۳۵۷/۰۵**	۱/۵۵*	۳۶/۵**
ضریب تغییرات (٪)	-	۲۰/۴۹	۱۶/۳۲	۵۱/۷۳	۵/۶۸	۲۰/۱۳	۲/۵۱	۴/۸۸	۸/۲۱	۱۱/۰۷	۳/۲۷	۱/۸۴	۸/۶۵

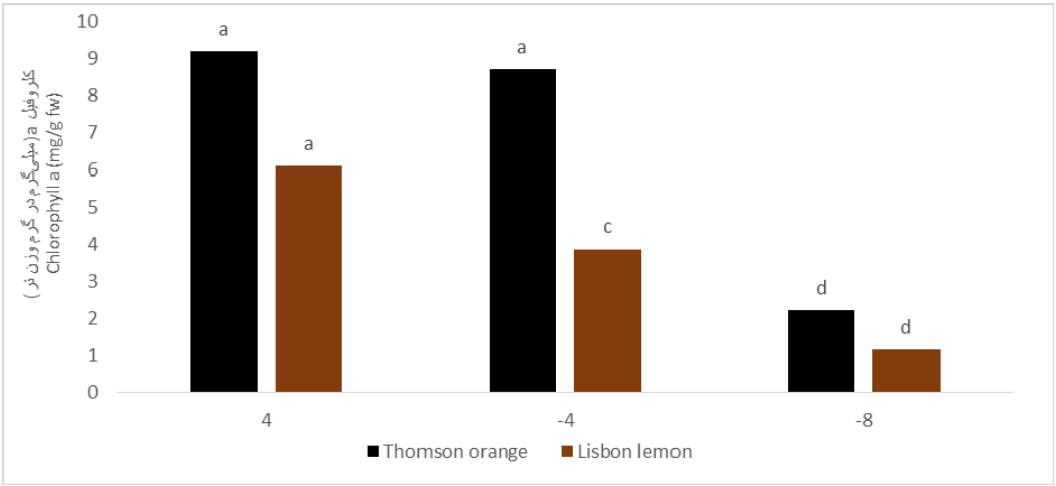
**،* و $^{n.s}$ به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار



شکل ۱- اثر ارقام و دما بر LT_{50} در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

پرتقال در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد ثبت شد. 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 تاثیر منفی بالایی بر کلروفیل *a* در هر دو رقم مشاهده گردید (شکل ۲).

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



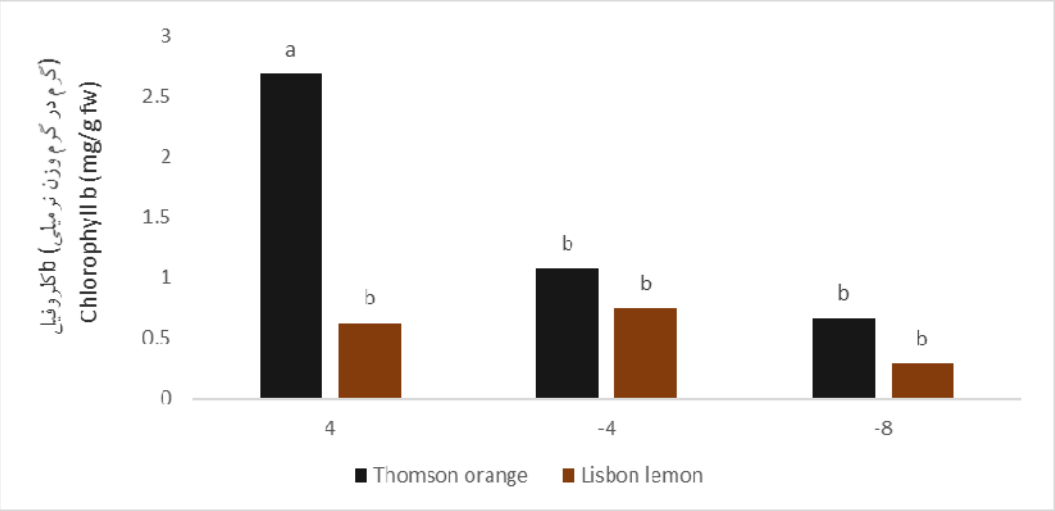
شکل ۲- اثر دما بر کلروفیل *a* در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

برگ بوده که در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در لیمو مشاهده شد. در نقطه مقابل بیشترین میزان کلروفیل *b* در پرتقال در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد با مقدار ۲/۶۹ میلی-گرم در گرم وزن تر برگ ثبت شد (شکل ۳). با کاهش

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

دمای ۸- درجه سلسیوس تاثیر منفی بالایی بر کلروفیل b در هر دو رقم مشاهده گردید (شکل ۳).

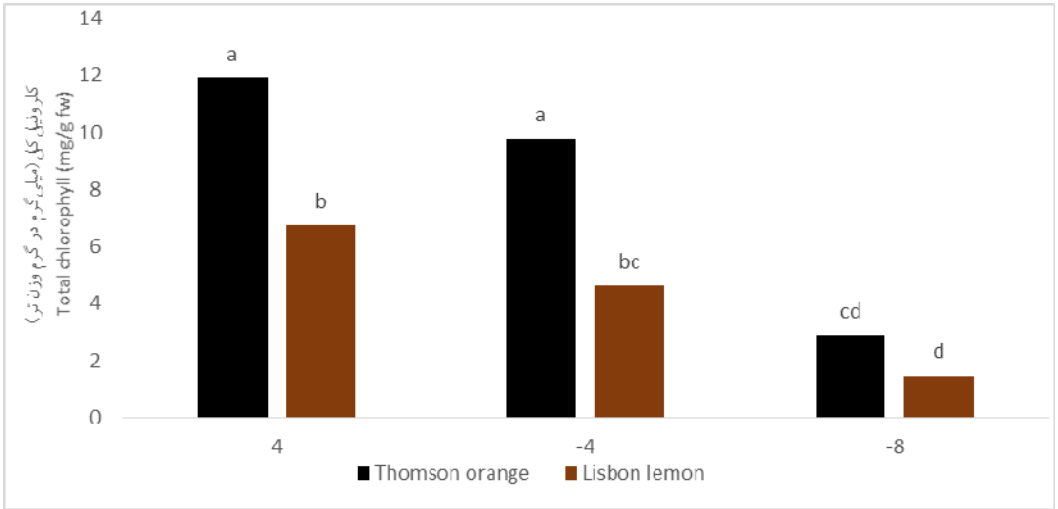
دما به ۴- و ۸- درجه سلسیوس در پرتقال و لیمو، بین سطح تیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در سطح



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

کل ۱/۴۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود که در لیمو در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، در بین ارقام مورد مطالعه نیز ملاحظه کردید که از لحاظ آماری لیمو در رتبه دوم قرار گرفت (شکل ۴).

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 سانتی‌گراد بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل کمترین میزان کلروفیل



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

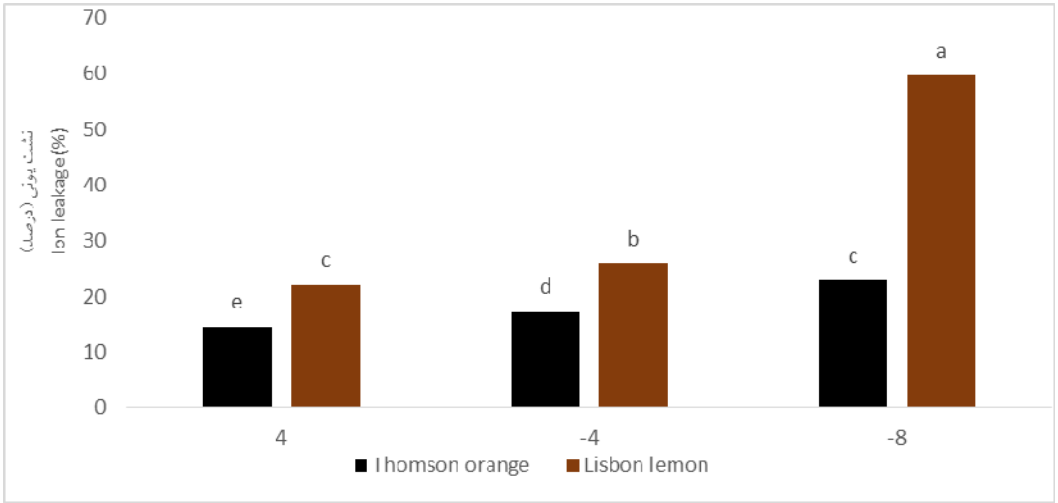
سانتی‌گراد بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل کمترین میزان کارتنوئید ۰/۹۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود که در لیمو در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۵).

اثر دو عامل رقم و برهمکنش آنها بر میزان کارتنوئید در سطح آماری یک درصد و برای سطح تنش در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در مورد میزان کارتنوئید نیز مشاهده گردید که پرتقال در دمای ۴- درجه

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

داری یافت و بیشترین میزان این صفت در دمای ۸- سانتی‌گراد مشاهده شد. در دمای ۸- درجه سانتی گراد میزان نشت یونی برگ در پرتقال (۲۲/۸۸ درصد) و مقدار نشت یونی برگ لیمو (۵۹/۶۵ درصد) ثبت شد.

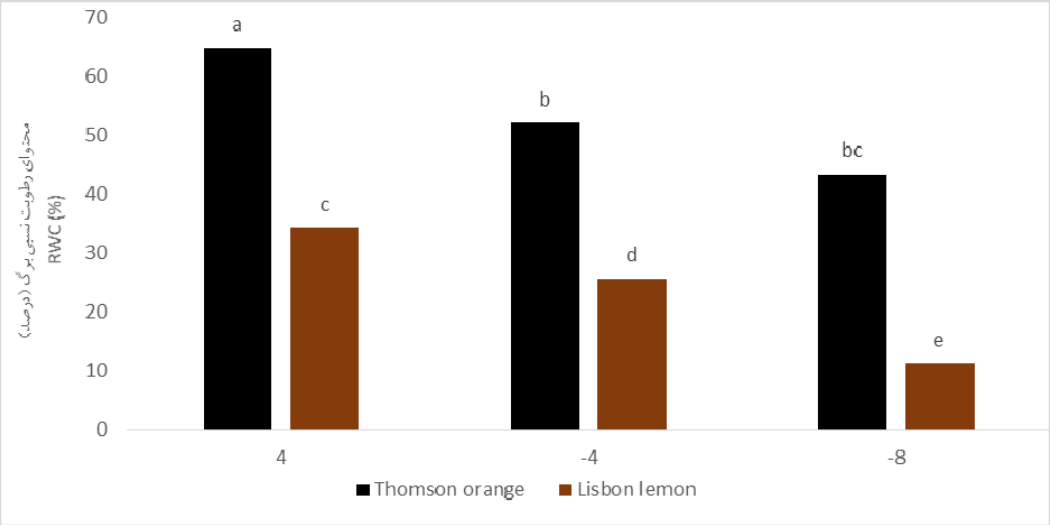
اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر میزان نشت یونی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین نشت یونی (شکل ۶) نشان داد که با کاهش دما میزان نشت یونی در هر دو رقم افزایش معنی



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

آن قدری تنزل داشت. بر این اساس بیشترین محتوای رطوبت نسبی، متعلق به 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).

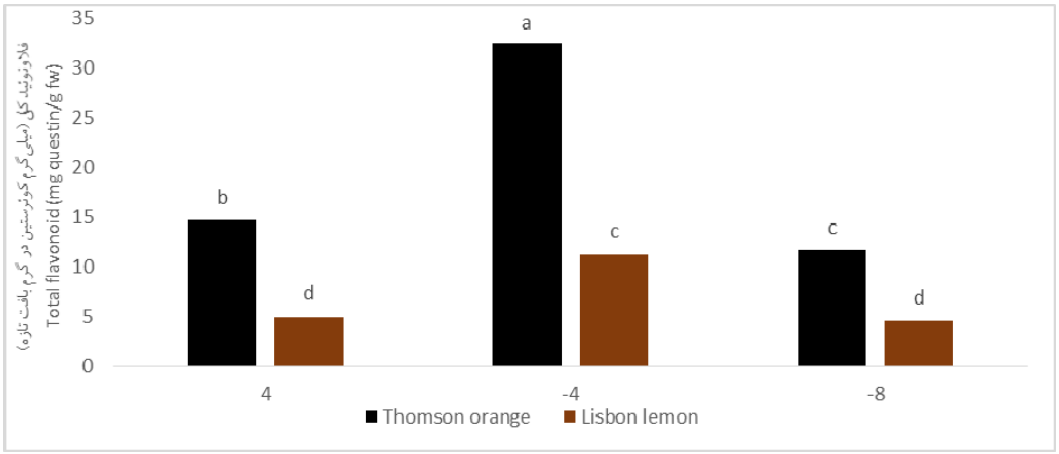
اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر محتوای رطوبت نسبی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). لذا مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که با کاهش دما تا ۴- درجه سانتی‌گراد میزان آن رو به کاهش نهاد و مجددا در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد میزان



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

لیمو ثبت شد. در بین ارقام مورد مطالعه در دمای ۴- درجه سانتی گراد 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 با توجه به نوع ژنوتیپ با تنزل دما افزایش داشت. به طوری که در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فلاونوئید برگ در



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

ژنوتیپ‌های مورد 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 وزن‌تر برگ مالون دآلدئید 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 دمای پایین است که در این پژوهش با توجه به نوع رقم بیشترین پراکسیداسیون لیپید در دمای ۸- درجه سانتی-گراد ثبت گردد. از این رو مقایسه میانگین داده‌های

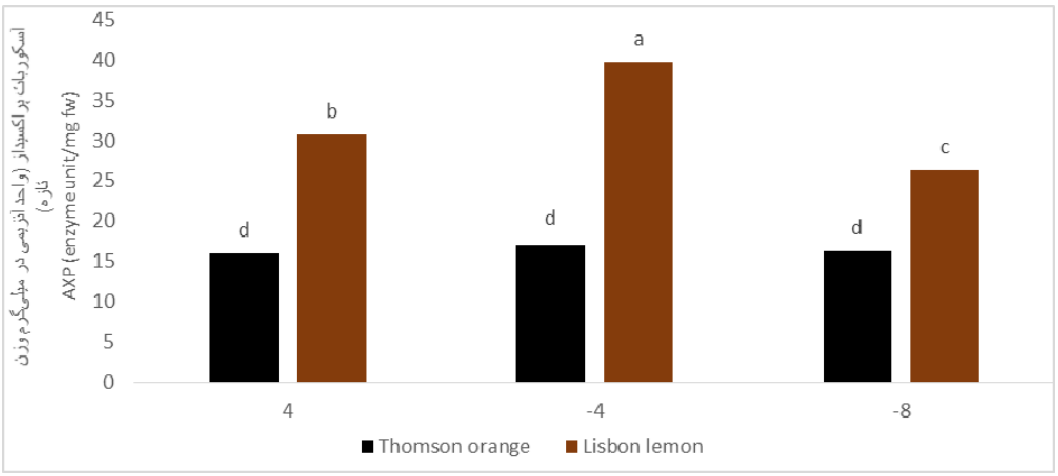
شکل ۹- اثر دما بر پراکسیداسیون لیپید در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

نشان داد که با توجه به نوع ژنوتیپ، آنزیم اسکوربات-پراکسیداز با تنزل دما افزایش یافت، به طوری که روند افزایش این صفت تا دمای ۴- درجه سانتیگراد ادامه داشت. از این رو بیشترین میزان فعالیت آنزیم اسکوربات-

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 دمای پایین و ژنوتیپ بر آنزیم اسکوربات‌پراکسیداز (شکل ۱۰)

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.

پراکسیداز 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



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

۳۳/۴۳ 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 مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن بود که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی

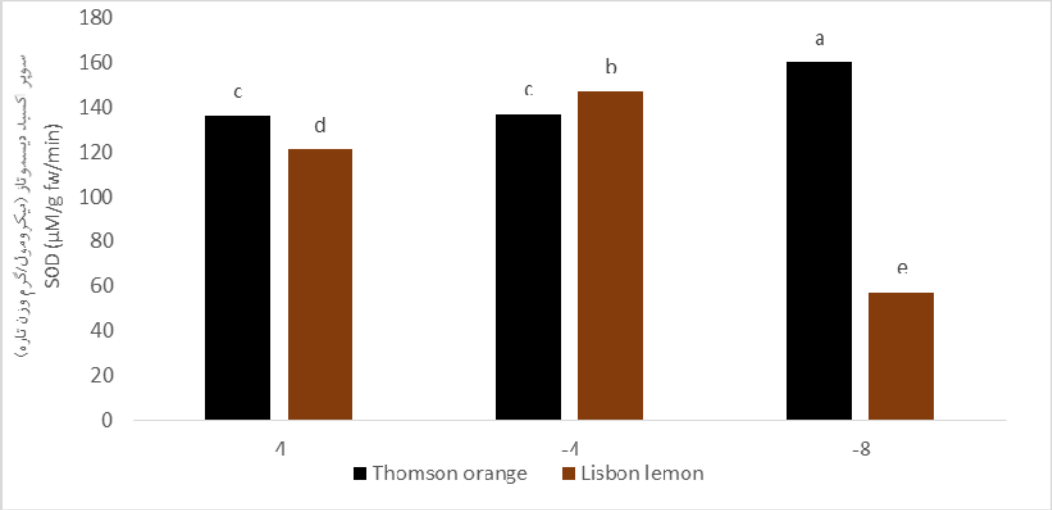
شکل ۱۱- اثر ارقام و دما بر آنزیم کاتالاز در دو رقم پرتقال تامسون و لیموی لیسبون

معنی‌دار بود (جدول ۱). در پژوهش مذکور فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز نیز تحت تأثیر اثر ارقام، دمای پایین

اثر سه عامل رقم، دما و برهمکنش آنها بر فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز کل در سطح آماری یک درصد

تنزل داشت. بر این اساس بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز، متعلق به پرتقال (۱۶۰/۳ میکرومول/گرم وزن تازه) در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد بود.

و متقابل ارقام و دمای پایین بود (شکل ۱۲). لذا مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که در پرتقال با کاهش دما تا ۸- درجه سانتی‌گراد میزان آن رو به افزایش نهاد و مجدداً در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد میزان آن در لیمو



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

بحث

عموماً غشا 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 تیلاکوئید 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 فهیمی‌راد و همکاران (۲۰۱۳) (۲۱) می‌باشد. در خصوص کاهش کاروتنوئیدها در این آزمایش می‌توان این

تحمل به یخزدگی (با کاهش LT_{50}) برآورد شده در شکل ۱ نشان داده شده است. در این پژوهش تحمل به یخ زدگی 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 نسبتا 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 نسبتا 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

بیشتری دارند قطعاً نشت یونی کمتری خواهند داشت. بیشترین آسیب ناشی از تنش یخزدگی درون سلولی است. گیاهان متحمل به یخزدگی، می‌توانند یخزدگی برون سلولی را بدون پذیرش خسارت تحمل کنند، اما قادر به تحمل یخزدگی درون سلولی نیستند (۵۶).

فرآیند سازگاری به سرما و نقش آنها در القای تحمل به یخزدگی در مرکبات طی آزمایشاتی (۲۹، ۳۸) مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که تنش آب برای فرآیند 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 آسیمیلاسیون دی اکسید کربن کاهش پیدا کند. اگرچه پایین بودن محتوی 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 محتوی 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 غشا سلولی و افزایش میزان نشت سلولی شد. در همین رابطه محمدرضاخانی و همکاران (۴۰) در پژوهشی روی گونه‌های مرکبات نشان دادند که افزایش درصد محتوای نسبی آب برگ با کاهش میزان پایداری غشا همراه بود. علاوه بر این آسیب به گیاه با یخ زدن آب بین گونه استنباط نمود که احتمالاً کاهش کاروتنوئیدها به علت اکسیده شدن این رنگدانه توسط رادیکال فعال اکسیژن بوده 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 (۴۴، ۵۳).

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 احتمالا 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 غشا شده که در کنار پراکسیداسیون لیپیدها موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (۲۴). در پژوهشی روی نهال‌های زیتون، تنش یخزدگی موجب تسریع تخریب غشا 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 کاملا نمایان بود. در بسیاری از تنش‌ها آسیب به بافت با خسارت وارده به غشای پلاسمای 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

چربی‌های غشایی است که می‌تواند منجر به پارگی غشا سلولی در گیاهان شود (۳۳). مالون دی آلدهید که محصول تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع هیدروپروکسیداز و پراکسیداسیون لیپیدها تحت تأثیر تنش‌های اکسیداتیو است، به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای اکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار می-گیرد (۴۹). غلظت این ماده در محدوده نانومولار است و فرایندهای شدید پراکسیداسیون لیپید از قبیل تخریب و تغییر غشا 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.

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در این آزمایش، آنزیم‌های مقاومت به تنش می باشند و در نتیجه در پرتقال که نسبتا 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 نسبتا 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 آنجایی‌که 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 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 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 ماکرومولکول-های 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 ۴- 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 غشا (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 ۸- 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

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 ضداکسایشی با تحمل گیاه به تنش سرما همبستگی مثبت وجود دارد. نتایج تحقیقات در زمینه مرکبات نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی 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.

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 ضداکسایشی در دو رقم توت-فرنگی تحت 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 آسیب-های اکسیداتیو نشان می‌دهند (۵۱). نتایج آزمایشی دیگر نشان داد که با کاهش دما، فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد (۳۵).

نتیجه‌گیری کلی

کلروفیل گیاه را در مراحل ابتدایی پس از اعمال تنش کاهش داد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همواره با کاهش دما مقادیر فلاونوئید کل، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش یافته و عموماً سطح آنها در پرتقال تامسون بیشتر از لیموی لیسبون بوده است. در این حالت و احتمالا به دلیل افزایش فعالیت‌های اکسیداتیو تجمع ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز افزایش یافت.

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 مشاهد 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

سپاسگزاری

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

منابع

۱. افشاری، ح.، زاهدی، ر.، پروانه، ت. و زاده باقری، م. ۱۳۹۳. تأثیر اسید سالیسیلیک بر نشت قند محلول پرولین و الکترولیت در رقم دو رقم زردآلو تحت تنش سرما. مجله بهزراعی، . ۱۶: ۱۲۷-۱۳۸.

۲. آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۹۸. وزارت جهاد کشاورزی ایران.

۳. تاجور، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، حمید اوغلی، ی. و حسن ساجدی، ر. ۱۳۹۰. پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نارنگی پیج روی پایه سیترنج به تنش دمای پایین. زیست-شناسی گیاهی. ۹(۳): ۱-۱۲.

۴. سریری، د.، رئوفی ماسوله، ع. و خانیکی، ر. ۱۳۹۴. تأثیر سرما بر تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در برگ چای شمال ایران. یافته‌های نوین در علوم زیستی. ۲: ۲۹۲-۱۳۳.

۵. صالحی ساردویی، ع. ۲۰۱۹. پیشرفت و استراتژی تنش سرما: فیزیولوژیکی و مولکولی. انتشارات نوروزی. ۲۶۴ ص.

۶. صلاح ورزی، ی.، داوری نژاد، غ.ح.، تهرانی فر، ع.، نعمتی، ح. و نظامی، ع. ۱۳۸۹. پاسخ‌های فیزیکوشیمیایی شش رقم انار خراسان رضوی تحت تنش یخزدگی. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۱۱: ۲۱۷-۲۳۰.

۷. کریمی، ر.، ارشادی، ع.، اثنی عشری، م. و مشهدی اکبربوجار، م. ۱۳۹۴. تغییرات فصلی در محتوای پروتئین محلول، فنل کل و MDA و رابطه آنها با تحمل به سرما ارقام انگور. بهزراعی کشاورزی، ۱۶: ۹۹۹-۱۰۱۳.

۸. مشایخی، ک.، صادقی، ح.، اکبرپور، و.، آتشی، س.، قاسمی، ی. و موسوی زاده، س. ۱۳۹۳. تغییرات کربوهیدرات های برگ و میوه در طول فصل رشد در شلیل قرمز گلد در شرایط آب و هوایی گرگان. مجله علوم باغبانی. ۲۸: ۱-۹.

9. Arias, N.S., Bucci1, 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): 2061-2070.
10. Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206-216
11. 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: 159-167.
12. 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): 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: 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: 205-207.
15. Campos, P., Quartin, V., Ramalho, J.C. and Nunes, M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity inleaves of *Coffea sp*. Plants journal of Plant Physiology. 160: 238-292.
16. Chance, B. and Maehly, A.C. 1995. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. 2: 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: 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.
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): 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: 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.
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: 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: 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.
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.
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_2, FAD_6 and FAD_7) and beta-Glucosidase (BGLC) genes in tolerant and sensitive olive cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(2): 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): 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.
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: 22-26.
31. Jakir Hossain, M.D., Tillaboeva, S., Sırel, 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.
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.
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: 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): 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: 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: 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: 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: 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*. 330:227–230
40. Mohammadrezakhani, S., Rezanejad, F. and Hajilou, J. 2021. Effect of putrescine and proline on proflies of GABA, antioxidant activities in leaves of three Citrus species in

response to low temperature stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 30(3): 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: 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, Ecosysyems and Environment*. 106: 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.
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: 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: 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): 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: 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: 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*. 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: 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): 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: 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 biosyntesis. *Molecular Plant*. 3: 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: 17-23.
57. Zhang, J., Wu, X., Niu, R., Liu, Y., Liu, N., Xu, W. andWang, Y. 2012. Cold resistance evaluation in 25 wild grape species. *Vitis*. 51(4): 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): 427-439.
59. Zou, Z., Xi W., Hu, Y., Nie, C. and Zhou, Z. 2016. Antioxidant activity of citrus fruits. *Food Chemistry*. 196: 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): 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 leriifolia* in the seedling stage. Plant Research Journal. 28(5): 962-973.

Abstract

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

Ali Salehi Sardoei[1*], Mehdi Sharifani[1], Mostafa Khoshhal Sarmast[1], Mahmoud Ghasemnejhad[2]

[1]Ph.D Student, Associate Professor, Assistant Professor of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Professor of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Guilan, Iran
Responsible author: alisalehisardoei@gau.ac.ir

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 µg g^{-1} FW MDA) in lemon and catalase and superoxide dismutase (33.43 µmol·g^{-1} FW and 160.3.3 µmol g $^{-1}$FW min respectively) in orange was recorded at -8 °C. In contrast, the highest levels of ascorbate peroxidase (39.7 µg g^{-1} FW) was recorded in lemon and total flavonoids (32.48 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