بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بتا-کاروتن، فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه پنج رقم مرکبات در تیمار دمای کم

بهروز گلعین[۱*]، منصور محمدیان افشار[۲] و زینب مبرمی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۶)

چکیده

حساسیت میوه مرکبات به دماهای کم و تقارن فصل برداشت میوه با ایام سرد سال، تحقیق بیشتر روی اثر فیزیولوژی آسیب‌های تنش سرما را ایجاب می‌کند. در این پژوهش، میوه پنج رقم مرکبات شامل پرتقال خونی سانگینلا، لیموترش مازندرانی، پرتقال والنسیا، نارنگی انشو و پرتقال محلی پس از برداشت در مراحل قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل به دمای ۳، صفر، ۳- و ۶- درجه سلسیوس منتقل گردید. از دمای ۱۵ درجه سلسیوس به‌عنوان شاهد استفاده شد. تغییرات میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، بتا- کاروتن و فنل کل پوست میوه در مراحل قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل و نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله رسیدگی میوه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم SOD، بتا- کاروتن و فنل در مرحله رسیدگی نسبت به مرحله قبل از رسیدگی، در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار دمای کم، بیشتر است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با اعمال تیمار سرمایی در ارقام مختلف، به‌جز لیموترش، تا صفر درجه سلسیوس افزایش یافت و سپس ثابت ماند. افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در پوست میوه در مرحله رسیدگی کامل نسبت به مرحله قبل از رسیدگی، شاید دلیلی بر متحمل بودن میوه در این مرحله به سرما باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش سرما، تحمل میوه، رسیدگی میوه

۱. مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bgoleincitrus@yahoo.com

مقدمه

مرکبات گروه بزرگی از میوه‌ها شامل انواع پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)، نارنگی (*C. reticulata* Blanco)، لیموترش (*C. aurantifolia* (Chrism.) Swingle)، لیموشیرین (*C. limettioides* Tan.)، گریپ‌فروت (*C. paradisi* Macf.) و پوملو (*C. grandis* (L.) Osbeck) است. تولید مرکبات در مناطق مختلف جهان و میزان بالای تولید آن موجب شده که این محصول از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار باشد. به‌طوری‌که امروزه در تجارت جهانی، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه است (۱۰).

یکی از عوامل اساسی در بیولوژی گیاهان، دمای بهینه رشد است. هر گونه گیاهی در یک دامنه دمایی ویژه حداکثر رشد و عملکرد مطلوب را دارد و هر گونه انحراف از آن، به‌ویژه کاهش دما از حد بحرانی، موجب بروز تنش و کاهش رشد رویشی و زایشی می‌شود. بسیاری از گیاهان، مخصوصاً آن گروهی که بومی آب و هوای گرم هستند، علائمی از خسارت را موقعی که با دماهای کم (۱۰-۱۵ درجه سلسیوس) مواجه می‌شوند، نشان می‌دهند (۱۶).

شروع فعالیت‌های رشد و نمو مرکبات در محدوده دمای ۱۰ درجه سلسیوس است. در فصل بهار، با افزایش دما (بیشتر از ۱۰ درجه سلسیوس) گیاه وارد مرحله برگ و گل‌دهی می‌شود. در میان ارقام و گونه‌های مختلف مرکبات از لحاظ مقاومت به تنش دمای کم تفاوت‌هایی وجود دارد، و در یک رقم نیز اندام‌های هوایی مختلف مثل گل، میوه، برگ و ساقه دارای مقاومت‌های متفاوتی هستند. به‌طوری‌که حد آستانه دمای بحرانی برای گل ۱±۱ درجه، برای میوه و برگ ۱±۲- درجه و برای ساقه ۱±۴- درجه سلسیوس گزارش شده که این دماها با توجه به نوع ژنوتیپ، سن و اندام گیاهی تحت تنش، متغیر است. موقعی که دمای هوا بیش از چهار ساعت از ۲/۲- درجه سلسیوس کمتر شود، میوه دچار خسارت سرمازدگی می‌گردد. میوه سرمازده در بیشتر اوقات نشانه‌های ظاهری روی پوست از خود نشان نمی‌دهد؛ ولی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیادی روی آن اتفاق می‌افتد (۲ و ۸).

گیاهان از مولکول اکسیژن به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند. در نتیجه احیای O_2، حد واسط‌های خیلی فعال و گونه‌های فعال اکسیژنی(Reactive oxygen species, ROS) نیز تولید می‌شوند (۱۳)، که شکل‌های ویژه‌ای از اکسیژن اتمسفری شامل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل می‌باشند که طی مراحل اکسیداتیو طبیعی در سلول مثل تنفس، فتوسنتز و فسفریلاسیون اکسیداتیو تولید می‌شوند؛ اما غلظت آنها در طول پیری، پاسخ‌های خیلی حساس به حملات میکروارگانیسم‌ها، گیاه‌خواری و قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌یابد. دمای کم، تنش اکسیداتیو را بر گیاه تحمیل می‌کند و تجمع ROS را به دنبال دارد (۱۵).

به منظور تعیین مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی، توانایی جمع‌آوری اثرهای مواد سمی مثل اکسیژن فعال، حائز اهمیت است. از آنجایی که تحت شرایط تنش مانند دمای کم، توانایی طبیعی گیاه برای حذف رادیکال‌های اکسیژنی دچار نقص می‌شود، دو سیستم دفاعی در برابر تجمع وسیع ROS وجود دارد: آنزیمی و غیرآنزیمی. سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی شامل آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی (بتاکاروتن و لیکوپن) و محلول در آب (اسید آسکوربیک و گلوتاتیون) می‌باشد. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD)، کاتالاز (Catalase, CAT)، پراکسیداز (Peroxidase, POD) و آسکوربات پراکسیداز (Ascorbate peroxidase , APX) می‌باشد که با افزایش سطح آنها جهت مقابله با تنش اکسیداتیو، توازن احیایی سلول حفظ می‌شود (۵).

تنش سرمایی معضلی است که بر تولید مرکبات اثر گذاشته و بازارهای جهانی این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مسأله یخبندان هر چند سال یکبار در بسیاری از کشورها، آسیب‌های سنگینی به باغ‌های مرکبات وارد می‌کند. در ایران نیز

در چند دهه گذشته، به فاصله هر ۵-۱۰ سال، باغ‌های مرکبات شمال و جنوب کشور دچار صدمات سرمازدگی شده‌اند (۲).

در طول دوره سرما، تغییرات عمده فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیک در گیاه رخ می‌دهد. رابطه ویژه‌ای میان پروتئین‌های تحریک شده توسط سرما با میزان بقای گیاهان تحت تنش سرمازدگی وجود دارد. این موضوع کمک می‌کند تا بتوان با حداکثر نمودن بیان قابلیت‌های ارثی و ژنتیکی، میزان تحمل به سرما را افزایش داد. براساس گزارش موجود، افزایش یک تا دو درجه سلسیوس دما در تحمل مقاومت دمایی ارقام تجاری موجود، خسارت‌های اقتصادی وارده به درختان میوه را حداقل ۱۰-۲۰ درصد در نواحی مستعد به یخبندان کاهش خواهد داد (۲۰). از آنجایی که یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های گیاهان برای افزایش توان مقابله با دماهای کم، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و غیرآنتی‌اکسیدانی می‌باشد و با توجه به حساسیت مرکبات به دماهای کم و تقارن فصل برداشت میوه با ایام سرد سال، در این پژوهش، سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، میزان بتا- کاروتن، فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در پوست میوه پنج رقم مرکبات در تیمارهای دمایی ۳، صفر، ۳- و ٦- درجه سلسیوس بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار سرمادهی

برای انجام این پژوهش، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با دو عامل متغیر شامل پنج رقم مرکبات [پرتقال محلی سیاورز (*C. sinensis* cv. Local siavaraz)، پرتقال خونی سانگینلا (*C. sinensis* cv. Sanguinello)، نارنگی انشو (*C. unshiu*)، لیموترش مازندرانی (*C. limon* cv. Local lemon) و پرتقال فراست والنسیا (*C. sinensis* cv. Frost Valencia)] از کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا و پنج تیمار دمایی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (۱۵ میوه برای هر تیمار در هر تکرار) انجام شد. نمونه‌برداری در دو مرحله شامل قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل میوه براساس استاندارد رسیدگی مرکبات به‌صورت دو آزمایش مجزا انجام گرفت و سپس صفاتی مانند فعالیت آنزیم SOD، میزان بتا- کاروتن، فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه اندازه‌گیری شد.

برداشت اول پرتقال والنسیا در اواخر آذر و برای ارقام دیگر در آبان ماه بود. استاندارد رسیدگی معمولاً میزان پذیرفته شده‌ای از نسبت مواد جامد کل به اسید قابل تیتر (TSS/TA) (۷:۱ تا ۸:۱ برای ارقام نارنگی و پرتقال)، حداقل درصد آب میوه (معمولاً برای لایم و لمون‌ها) و حداقل رنگ قابل قبول (برای همه ارقام) می‌باشد (۲). تغییر رنگ میوه‌ها از سبز به زرد، و یا نارنجی مایل به قرمز به‌عنوان معیار زمان رسیدگی میوه (برداشت دوم) در نظر گرفته شد، که این زمان برای پرتقال والنسیا ماه خرداد و برای گونه‌های دیگر آذر ماه بود.

به منظور انجام تیمار سرمایی، همه میوه‌ها، به‌جز نمونه‌های کنترل ($15^{\circ}C$~)، به دستگاه انکوباتور ویژه سرمادهی منتقل شدند. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق در تیمارهای دمایی ۳، صفر، ۳- و ٦- درجه سلسیوس بود. دمای نمونه‌ها به‌تدریج و در طول مدت ۲۰ ساعت به دمای ۳ درجه سلسیوس رسید و حدود ۱۰ ساعت در این دما باقی ماندند. برای اعمال سایر تیمارهای دمایی، عبور از هر دما به دمای کمتر طی دو ساعت و ماندگاری در هر دما به‌مدت ۱۰ ساعت انجام شد. به عبارت دیگر، نمونه‌برداری در دمای صفر درجه سلسیوس، ۱۲ ساعت بعد از نمونه‌برداری در دمای ۳ درجه سلسیوس صورت گرفت. بعد از تیمار سرمایی، پوست میوه‌ها جداسازی شد و بلافاصله با استفاده از نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان استخراج در فریزر ۸۰ – درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی

به منظور استخراج عصاره سلولی جهت سنجش آنزیم، ۰/۵ گرم از پوست میوه هر رقم با نیتروژن مایع به خوبی پودر شد. با توجه به نوع آنزیم مورد مطالعه، بافر استخراج آنزیمی تهیه شد. یک میلی‌لیتر از بافر مورد نظر را به عصاره تهیه شده اضافه کرده

و پس از سانتریفیوژ محلول رویی جدا شد. برای استخراج SOD از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷ شامل ۰/۵ EDTA میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت SOD طبق روش جیانوپلیتیس و ریس (۹) و از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج و سنجش بتا- کاروتن

به منظور استخراج عصاره بافت میوه جهت سنجش بتا-کاروتن، از روش ناگاتا و یاماشیتا (۱۹) استفاده شد. به این منظور، ۰/۲۵ گرم از بافت با ۴ میلی‌لیتر استون- هگزان به نسبت ۴ به ۶ ترکیب شد. با تکان دادن نمونه در تاریکی و ایجاد دو فاز، محلول رویی نمونه در طول موج‌های ۴۵۳، ۵۰۵، ۶۴۵ و ۶۶۳ به‌ترتیب مربوط به رنگیزه‌های بتا-کاروتن، لیکوپن، کلروفیل b و کلروفیل a خوانده شد. با خواندن جذب هر کدام از نمونه‌ها و قرار دادن در معادله ۱، غلظت بتا-کاروتن هر نمونه برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد:

$$[\beta-\text{carotene}] = ۰/۲۱۶\ A_{۶۶۳} - ۱/۲۲۰A_{۶۴۵} - ۰/۳۰۴A_{۵/۵} + ۰/۴۵۲\ A_{۴۵۳} \quad [۱]$$

سنجش فنل تام

سنجش مقدار فنل تام با استفاده از روش مکدونالد و همکاران (۱۷) انجام شد که نیازمند استفاده از حلال فولین- سیوکالچو و استاندارد گالیک اسید است. برای انجام این کار، ابتدا ۰/۲۵ گرم از بافت پودر شده پوست میوه با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ مخلوط گردید و پس از سانتریفیوژ محلول رویی جدا شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده به ۱۲۵۰ میکرولیتر حلال فولین به نسبت ۱۰ به ۱ (به‌ترتیب آب دیونیزه و حلال فولین) و ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ در غیاب نور اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. جهت به‌دست آوردن غلظت فنل تام نمونه از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش میزان جمع‌آوری رادیکال آزاد و تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از سنجش DPPH (۲ و۲- دی فنیل پیکریل هیدرازیل) به‌کار رفته توسط بلویس (۴) استفاده شد. برای این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۶۰۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار در متانول مخلوط شد. سپس جذب کنترل و نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن جذب هر کدام در فرمول ۲، درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد به‌دست آمد:

$$\text{درصد جمع‌آوری DPPH} = \frac{A\ \text{control} - A\ \text{sample}}{A\ \text{control}} \times ۱۰۰ \quad [۲]$$

مطالعات آماری

تجزیه‌های آماری مربوطه با استفاده از آزمون دانکن در SPSS صورت گرفت و نمودارهای مربوط به تغییرات در برنامه Excel 2007 رسم شد.

نتایج و بحث

سنجش فعالیت آنزیم SOD

جدول ۱ بیانگر تغییرات مربوط به فعالیت آنزیم SOD در پوست میوه پنج رقم مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، صفر، ۳- و ۶- درجه سلسیوس)، در زمان قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل است. در مرحله قبل از رسیدگی میوه، پرتقال خونی، لیموترش و والنسیا کمترین مقدار فعالیت آنزیم را در $^{\circ}C$ ۳ نشان دادند و بعد از این دماها، روند فعالیت آنزیم افزایشی بوده و در دمای کنترل، کمترین مقدار فعالیت آنزیم مربوط به انشو بود. در مرحله رسیدگی کامل میوه، در ارقام لیموترش و والنسیا، تیمارهای سرمایی تأثیر چندانی در میزان فعالیت آنزیم ندارد ولی در سایر ارقام، رابطه معنی‌داری بین دما و مقدار فعالیت آنزیم حاکم می‌باشد. به این صورت که با کاهش دما از حالت کنترل، افزایش فعالیت آنزیم وجود دارد. در ارقام لیمو ترش و والنسیا، این امر شاید به‌دلیل عملکرد مناسب این آنزیم

جدول ۱. مقایسه فعالیت آنزیم SOD در پوست میوه پنج رقم مرکبات در مرحله قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل

رقم	تیمار (°C)	فعالیت SOD (IU/g FW)	
		مرحله قبل از رسیدگی	مرحله رسیدگی کامل
پرتقال خونی	کنترل	۶۷۸۸۹/۳۵± ۴۸۱۶/۵ c	۸۶۹۰۵/۲۲± ۵۵۷۵/۱ e
	۳	۶۰۷۳۳/۱۷± ۵۴۱۳/۸ b	۹۶۸۲۲/۹۵ ± ۳۳۱۴/۲ f
	۰	۷۸۸۳۹/۶۶ ± ۵۳۷۰/۵ d	۷۸۴۸۴/۵۴ ± ۲۷۴۶/۷ d
	-۳	۶۶۷۶۱/۸۰ ± ۱۰۹۹/۶ c	۴۷۴۷۹/۱۸± ۴۷۲۲/۶ a
	-۶	۹۷۴۹۲/۸۸ ± ۴۱۶۶/۶ f	۸۷۱۶۶/۲۸ ± ۳۴۳۸/۵ e
انشو	کنترل	۴۶۱۵۸/۲۴ ± ۲۴۷۸/۳ a	۷۱۸۰۴/۵۸ ± ۳۴۱۲/۲ d
	۳	۹۰۷۸۹/۴۹ ± ۵۵۶۹/۶ e	۷۳۴۵۲/۶۹ ± ۳۶۱۹/۴ d
	۰	۸۸۵۱۱/۲۷ ± ۴۲۱۲/۶ e	۹۳۰۹۴/۶۴ ± ۳۶۱۲ ef
	-۳	۶۴۲۱۶/۷۰ ± ۴۷۷۸ c	۷۵۲۴۳/۹۹ ± ۴۸۹۰/۹ d
	-۶	۶۵۴۰۵/۶۰ ± ۳۸۱۹/۲ c	۷۴۳۸۵/۹۰ ± ۴۸۵۲/۳ d
پرتقال محلی	کنترل	۶۷۷۳۷/۲۶ ± ۵۰۶۱/۳ c	۷۱۸۲۶/۲۴ ± ۴۰۱۹/۹ d
	۳	۸۲۵۲۳/۲۴ ± ۴۵۲۸/۹ d	۷۶۳۰۶/۱۴ ± ۴۵۰۶/۸ d
	۰	۵۰۲۵۳/۶۱ ± ۵۲۵۱/۱ a	۵۶۳۰۰/۸۸ ± ۴۰۵۵/۵ b
	-۳	۶۴۳۴۹/۹۱ ± ۵۲۷۳/۴ c	۶۵۱۲۵/۱۰ ± ۳۲۹۴/۲ c
	-۶	۶۴۳۷۸/۵۷ ± ۵۴۹۷/۱ c	۶۸۳۵۰/۵۸ ± ۴۹۸۲ c
لیمو	کنترل	۱۰۴۱۴۵/۸۰ ± ۱۸۵۱/۲ g	۱۰۱۵۸۹/۹۰ ± ۴۴۲۰/۸ g
	۳	۵۵۰۵۱/۷۴ ± ۳۷۹۶/۶ ab	۱۰۲۶۱۹/۳۰ ± ۳۱۱۹/۹ g
	۰	۱۰۰۴۹۱/۷۰ ± ۵۲۳۴/۶ g	۱۰۳۰۹۰/۵۰ ± ۳۰۴۰/۶ gh
	-۳	۸۸۶۱۸/۴۳ ± ۲۳۰۳/۷ e	۱۰۱۹۵۹/۷۰ ± ۳۲۲۴/۴ g
	-۶	۸۵۲۴۷/۳۰ ± ۴۹۳۵/۱ de	۱۰۴۴۶۷/۶۰ ± ۴۳۱۳/۶ gh
پرتقال والنسیا	کنترل	۱۰۰۳۸/۳۰ ± ۵۳۴۳/۴ g	۹۵۶۵/۹۳ ± ۲۱۷۴/۷ f
	۳	۵۲۷۴۷/۴۷ ± ۲۱۱۱/۲ a	۱۰۰۶۴/۴۰ ± ۲۰۲۶/۷ fg
	۰	۱۰۲۵۷۹± ۵۸۴۰/۴ g	۹۶۹۴۰/۲۳ ± ۲۳۳۷/۸ f
	-۳	۹۵۶۱۲/۱۷ ± ۱۸۲۵/۶ f	۹۷۴۵۹/۷۵ ± ۳۷۱۲/۲ f
	-۶	۹۵۰۸۰/۶۰ ± ۱۸۴۶/۵ f	۹۹۶۶۶/۹۹ ± ۲۲۱۸/۸ f

در جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید در تمام تیمارهای دمایی و هم‌چنین دمای کنترل باشد. با مقایسه بین ارقام در مرحله رسیدگی کامل، بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD در دمای کنترل و سایر تیمارهای دمایی انجام شده، در لیموترش دیده شد. پرتقال خونی در این مرحله از برداشت، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را در تیمار $3^{\circ}C$ دارا بود و با کاهش دما، کاهش فعالیت دیده شد و این روند کاهشی تا دمای $-3^{\circ}C$ ادامه یافت. اما در دمای $-6^{\circ}C$، میزان فعالیت آنزیم SOD به مقدار اولیه خود، یعنی در حالت کنترل بر می‌گردد. این مشاهده احتمالاً به‌دلیل سازگاری این رقم بعد از یک دوره سرمادهی ۶۶ ساعته می‌باشد. در پوست میوه انشو در مرحله رسیدگی کامل، بین میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه کنترل و تیمار $3^{\circ}C$ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و روند افزایشی تا صفر درجه دیده شد. یعنی بعد از ۴۲ ساعت سرمادهی، میزان فعالیت آنزیمی به بالاترین مقدار خود رسید و در سایر تیمارهای دمایی (زیر صفر درجه سلسیوس)، کاهش فعالیت در حد نمونه‌های کنترل دیده شد. اولین محل پذیرش سرما و به دنبال آن آسیب‌های سرمایی، پوست میوه‌ها است. در نتیجه، بالا بودن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه SOD، در این بخش حائز اهمیت می‌باشد. گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری اغلب حساس به سرما هستند و از آسیب‌های سرمایی (نه یخ‌زدگی) در دماهای صفر تا $15^{\circ}C$ صدمه می‌بینند (۸). عملکرد آنزیم SOD که رادیکال‌های خطرناک سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را جمع‌آوری می کنند، بسیار حائز اهمیت بوده و توازن بین فعالیت آنزیم مذکور برای بقای سلول در دوره‌های سرمایی، مهم است (۲۴). تنش سرما می تواند توازن بین تولید ROS و مکانیسم‌های دفاعی را به‌هم بریزد (۱۳).

نتایج این پژوهش نشان می دهد که به‌طورکلی میزان فعالیت آنزیم SOD در تمام ارقام در مرحله رسیدگی کامل نسبت به مرحله قبل از رسیدگی در نمونه‌های تحت تیمار کنترل و تیمار سرمایی، بیشتر بود. با توجه به این‌که آنزیم SOD اولین خط دفاعی در برابر آسیب‌های ناشی از تولید ROS می‌باشد، جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید توسط این آنزیم، مهم‌ترین مرحله مقاومت در برابر تیمارهای سرمایی است. تغییرات فعالیت SOD در گیاهان با مقاومت سرمایی مرتبط است و دمای کم به‌طور محسوسی فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد (۱۸). فعالیت بیشتر آنزیم SOD در اسفناج و گندم سازگار به سرما نسبت به گیاهان غیرسازگار در دمای کم نیز گزارش شده است (۲۵). بنابراین، می توان نتیجه گرفت که در ارقام مورد مطالعه در مرحله رسیدگی کامل، سیستم جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید توسط SOD کارآمدتر است.

سنجش بتا- کاروتن

تغییرات میزان بتا- کاروتن در پوست میوه پنج رقم مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، صفر، ۳- و ۶- درجه سلسیوس)، در زمان قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). غلظت بتا- کاروتن با اعمال تیمار سرمایی در زمان قبل از رسیدگی، در ارقام مختلف تا صفر درجه سلسیوس روند افزایشی و سپس کاهشی نشان داد. در مقایسه مقدار بتا- کاروتن مربوط به همه ارقام در هر تیمار، زیاد بودن مقدار بتا- کاروتن در انشو نسبت به سایر ارقام کاملاً مشهود بود و رقم مذکور بیشترین مقدار بتا- کاروتن را در هر تیمار دارا می‌باشد. بعد از آن، به‌ترتیب در ارقام پرتقال خونی، محلی، والنسیا و لیموترش بیشترین مقدار بتا- کاروتن دیده شد. نارنگی‌ها در شدت رنگ به مقدار زیادی متنوع هستند و توسعه رنگ در آنها وابسته به دمای کم است (۷). کاروتنوئیدها دارای ویژگی‌های مهمی چون فعالیت پرووویتامین A و جمع‌کننده رادیکال آزاد (ROS) هستند. مرکبات منبع غنی از کاروتنوئیدها هستند که غلظت آنها در واریته‌های مرکبات متفاوت بوده و به شرایط رشد بستگی دارد. مطالعات قبلی نشان داده که غلظت کاروتنوئید به‌طور مشخصی در نارنگی انشو بیشتر از پرتقال است (۱). هم‌چنین، مرکبات نوع نارنگی مقدار بیشتری کاروتنوئید نسبت به مرکبات نوع پرتقال و پوملو دارد (۶) که تأییدکننده پژوهش حاضر است. میزان بتا- کاروتن در مرحله

جدول ۲. مقایسه غلظت بتا- کاروتن در پوست میوه پنج رقم مرکبات در مرحله قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل

رقم	تیمار (°C)	غلظت بتا- کاروتن (µg/ml)	
		مرحله قبل از رسیدگی	مرحله رسیدگی کامل
پرتقال خونی	کنترل	۰/۱۱۵±۰/۰۱۴ cd	۰/۱۹۶±۰/۰۰۵ b
	۳	۰/۱۴۰±۰/۰۱۸ d	۰/۲۰۵±۰/۰۰۷ bc
	۰	۰/۲۴۶±۰/۰۰۱ h	۰/۲۶۳±۰/۰۱۰ c
	-۳	۰/۱۷۷±۰/۰۱۱ e	۰/۱۹۵±۰/۰۰۳ b
	-۶	۰/۱۸۰±۰/۰۱۲ e	۰/۱۷۷±۰/۰۰۲ b
انشو	کنترل	۰/۱۴۰±۰/۰۰۲ d	۰/۲۴۷±۰/۰۴۰ c
	۳	۰/۲۰۰±۰/۰۱۲ f	۰/۳۵۰±۰/۰۰۷ e
	۰	۰/۳۸۰±۰/۰۰۸ j	۰/۵۰۰±۰/۰۳۰ g
	-۳	۰/۲۶۰±۰/۰۲۳ hi	۰/۳۶۰±۰/۰۰۵ e
	-۶	۰/۲۸۰±۰/۰۲۷ i	۰/۴۳۵±۰/۰۰۷ f
پرتقال محلی	کنترل	۰/۱۰۷±۰/۰۰۱ c	۰/۲۰۰±۰/۰۰۲ bc
	۳	۰/۱۴۱±۰/۰۰۱ d	۰/۱۸۰±۰/۰۲۰ b
	۰	۰/۲۲۰±۰/۰۰۳ g	۰/۳۲۰±۰/۰۰۲ d
	-۳	۰/۱۰۲±۰/۰۰۱ c	۰/۲۷۰±۰/۰۲۰ c
	-۶	۰/۱۳۱±۰/۰۰۲ d	۰/۳۲۰±۰/۰۰۷ d
لیمو	کنترل	۰/۰۳۹±۰/۰۱۰ a	۰/۰۴۵±۰/۰۰۵ a
	۳	۰/۰۵۰±۰/۰۱۰ a	۰/۰۵۶±۰/۰۰۲ a
	۰	۰/۰۶۵±۰/۰۰۲ ab	۰/۰۴۵±۰/۰۰۶ a
	-۳	۰/۰۵۵±۰/۰۰۷ a	۰/۰۵۷±۰/۰۱۰ a
	-۶	۰/۰۵۰±۰/۰۱۰ a	۰/۰۲۳±۰/۰۰۸ a
پرتقال والنسیا	کنترل	۰/۰۸۰±۰/۰۰۵ b	۰/۱۷۴±۰/۰۰۷ b
	۳	۰/۱۱۹±۰/۰۰۲ cd	۰/۱۷۱±۰/۰۰۲ b
	۰	۰/۱۱۲±۰/۰۰۱ cd	۰/۳۴۰±۰/۰۲۹ e
	-۳	۰/۱۲۰±۰/۰۲۰ cd	۰/۲۱۵±۰/۰۲۸ bc
	-۶	۰/۰۹۷±۰/۰۰۷ c	۰/۲۱۰±۰/۰۰۵ bc

رسیدگی کامل میوه نیز مانند مرحله قبل از رسیدگی در ارقام پرتقال خونی، محلی، والنسیا و نارنگی انشو تا صفر درجه سلسیوس روند افزایشی و سپس کاهشی نشان داد. در لیموترش، اعمال تیمار سرمایی اثری بر مقدار بتا- کاروتن نداشت. دماهای زمستان و افت سرما رنگ پوست مرکبات را افزایش می‌دهد، که دقیقاً مرتبط با کیفیت خوراکی میوه است. به‌طوری‌که گاهی اوقات در مناطق گرمسیری با آب و هوای مختلف، میوه رنگ مطلوب خود را توسعه نمی‌دهد (۶). افزایش دیده شده در میزان بتا- کاروتن با اعمال تیمار سرمایی می‌تواند به نقش آنتی‌اکسیدانی آن و کاهش آن به تجزیه

بتا- کاروتن در نتیجه حضور بیشتر ROS مربوط شود. بنابراین، افزایش بتا- کاروتن در پوست میوه مرکبات تا صفر درجه سلسیوس نشان‌دهنده این است که بتا- کاروتن تا دمای صفر درجه سلسیوس می‌تواند به‌عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی برای جمع‌آوری ROS عمل کند.

سنجش فنل تام

جدول ۳ تغییرات میزان فنل تام در پوست میوه پنج رقم مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، صفر، ۳- و ۶- درجه سلسیوس)، در زمان قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهند که با اعمال تیمار سرمایی، میزان فنل در زمان قبل از رسیدگی میوه، در ارقام مختلف ابتدا بدون تغییر بود و سپس روند افزایشی داشت. در مقایسه مقدار فنل مربوط به ارقام مختلف در هر تیمار دمایی، بیشترین مقدار فنل در تیمار صفر، ۳- و ۶- درجه سلسیوس و در رقم لیموترش و کمترین مقدار آن در پرتقال خونی دیده شد. در زمان رسیدگی کامل، میزان فنل با اعمال تیمار سرمایی در ارقام انشو، پرتقال خونی و محلی ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داد. در ارقام والنسیا و لیموترش، ابتدا بدون تغییر و سپس با روند افزایشی همراه بود. در مقایسه مقدار فنل مربوط به ارقام مختلف در هر تیمار دمایی، بیشترین مقدار آن در ارقام والنسیا و لیموترش در تیمار سرمایی ۶- درجه سلسیوس و در ارقام انشو، پرتقال محلی و خونی در تیمار سرمایی صفر درجه سلسیوس دیده شد.

در روش استفاده شده برای سنجش فنل تام در این تحقیق، ممکن است به‌دلیل برهمکنش ترکیباتی که سریعاً قابلیت اکسیداسیون دارند مانند قندها و آسکوربیک اسید، غلظت فنل بیشتر از مقدار واقعی نشان دهد و این تداخل وابسته به غلظت ترکیبات مزاحم است (۲۲). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از ویژگی احیایی آنهاست که می‌تواند نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد داشته باشد (۲۳). متابولیسم فنیل پروپانوئید اغلب زمانی‌که گیاه در معرض طیف وسیعی از تنش‌های محیطی مانند نور زیاد، تشعشع UV، دمای کم، حمله پاتوژن و اوزون قرار می‌گیرد، بیان می‌شود. با وجود القای سنتز فنلیک‌ها در تیمار سرمایی، دماهای زیر صفر می‌تواند اثر منفی بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان داشته و باعث کاهش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شود (۱۲). بنابراین، مقدار واقعی آنها حاصل توازن بین سرعت سنتز آنها (K_s) و سرعت کاهش یا مصرف (K_d) آنهاست. افزایش مشاهده شده در میزان ترکیبات فنلی محلول، نشان‌دهنده بزرگ‌تر بودن K_s نسبت به K_d است. یعنی فنلیک‌ها احتمالاً به‌عنوان مکانیسم‌های دفاعی برای تشکیل فیتوآلکسین یا برای جمع‌آوری ROS تولید می‌شوند. از طرف دیگر، کاهش مشاهده شده در مقدار فنلیک‌ها حاصل کوچک‌تر بودن K_s نسبت به K_d است که پیامد تشکیل فنلیک‌های نامحلول مانند لیگنین و سوبرین یا پلیمریزاسیون فنلیک‌ها در نتیجه اکسیداسیون است (۳).

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه پنج رقم میوه مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، صفر، ۳- و ۶- درجه سلسیوس) در زمان رسیدگی کامل مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با اعمال تیمار سرمایی در ارقام مختلف، به‌جز لیموترش، تا صفر درجه سلسیوس افزایش یافت و سپس ثابت ماند. در مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ارقام مختلف در هر تیمار دمایی، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار سرمایی صفر درجه سلسیوس در ارقام انشو، پرتقال خونی و محلی دیده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب می‌تواند از طریق ممانعت از تشکیل رادیکال یا از طریق جمع‌آوری آنها در یک سیستم تولیدکننده رادیکال تعیین شود (۲۳). تیمار سرمایی باعث تجمع ترکیبات فنلی و به‌طور مشابه افزایش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. با این وجود، به‌دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی

جدول ۳. مقایسه غلظت فنول تام در پوست میوه پنج رقم مرکبات در مرحله قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل

رقم	تیمار (°C)	فنل کل (mg/L)	
		مرحله قبل از رسیدگی	مرحله رسیدگی کامل
پرتقال خونی	کنترل	۲۰/۸۰±۴/۲۰ a	۱۶۲/۷±۱۶/۴۰ d
	۳	۳۰/۴۰±۶ a	۱۶۷/۵±۰/۴۰ d
	۰	۵۳±۰/۱۰ b	۱۹۷/۹±۱/۵۰ e
	-۳	۹۰/۵۰±۰/۳۰ d	۲۰۹/۳±۱۶ ef
	-۶	۸۴/۶۰±۹/۲۰ c	۱۷۱/۷±۱۳/۲۰ d
انشو	کنترل	۸۴/۷۰±۰/۴۰ c	۱۲۶/۵±۰/۳۰ bc
	۳	۸۴/۶۰±۰/۱۰ c	۱۳۸/۴±۱۳ c
	۰	۱۰۳/۵۰±۶/۷۰ e	۲۴۵/۰±۹/۴۰ g
	-۳	۱۳۰/۶۰±۰/۱۰ g	۲۳۸/۶±۸/۵۰ g
	-۶	۱۱۹/۶۰±۰/۳۰ f	۱۵۷/۸±۱/۵۰ d
پرتقال محلی	کنترل	۷۵±۵ c	۸۶/۷۰±۱۵/۴۰ a
	۳	۸۴/۶۰±۵ c	۹۱/۱۰±۰/۸۷ a
	۰	۹۴/۴۰±۰/۷۰ d	۲۱۱±۳/۴۰ ef
	-۳	۱۱۸/۷۰±۱۶ f	۱۷۰/۷±۱/۹۰ d
	-۶	۱۲۷/۵±۰/۵۰ g	۱۱۳/۶±۱۰/۴۰ b
لیمو	کنترل	۴۹±۵ b	۱۰۵/۶±۱/۸۰ ab
	۳	۵۶/۹۰±۰/۷۰ b	۱۱۱/۴±۰/۴۰ ab
	۰	۱۸۱/۹۰±۰/۷۰ hi	۱۳۵/۴±۱۲/۸۰ c
	-۳	۲۰۰±۰/۷۰ j	۱۷۳/۸±۱۴/۲۰ d
	-۶	۱۸۸/۴۰±۱/۴۰ i	۲۲۳/۹±۱۳ f
پرتقال والنسیا	کنترل	۸۵/۴۰±۰/۱۰ c	۱۶۸/۸±۳/۵۰ d
	۳	۸۰/۶۰±۴ c	۱۸۱/۳±۰/۴۰ de
	۰	۹۷±۱/۶۰ d	۱۸۰±۶/۹۰ de
	-۳	۱۳۰±۰/۳۰ g	۲۰۸±۱۷/۴۰ ef
	-۶	۱۵۹/۴۰±۱/۴۰ h	۲۱۰±۰/۴۰ ef

ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت، ممکن است با وجود مقدار فنل زیاد ولی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کم، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم باشد (۱۴). تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دیده شده در این تحقیق در مرحله رسیدگی مشابه تغییرات میزان فنل بوده و با اعمال تیمار سرمایی در ارقام مختلف، به‌جز لیموترش، تا صفر درجه سلسیوس افزایش یافت و سپس ثابت ماند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی جمع‌آوری رادیکال آزاد، مرتبط با مقدار ترکیبات فنلی و گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار شیمیایی آنهاست که به‌عنوان جمع‌کننده رادیکال آزاد است. مقدار بیشتر ترکیبات فنلی تام مرتبط با فعالیت

جدول ۴. مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه پنج رقم مرکبات در مرحله رسیدگی کامل

رقم	تیمار (°C)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (٪)
		مرحله رسیدگی کامل
پرتقال خونی	کنترل	۸۲/۲±۰/۰۴۰ [a]
	۳	۸۸/۴±۰/۰۲۲ [b]
	۰	۹۸/۶±۰/۰۲۰ [c]
	-۳	۹۶/۶±۰/۰۱۱ [c]
	-۶	۹۶/۹±۰/۰۰۹ [c]
انشو	کنترل	۸۸/۳±۰/۰۴۳ [b]
	۳	۸۹/۱±۰/۰۱۰ [b]
	۰	۹۷/۸±۰/۰۱۹ [c]
	-۳	۹۷/۴±۰/۰۳۰ [c]
	-۶	۹۷/۱±۰/۰۴۱ [c]
پرتقال محلی	کنترل	۹۰/۱±۰/۰۲۲ [b]
	۳	۸۸/۲±۰/۰۰۸ [b]
	۰	۹۷/۲±۰/۰۰۸ [c]
	-۳	۹۵/۴±۰/۰۵۲ [c]
	-۶	۹۴/۹±۰/۰۲۹ [c]
لیمو	کنترل	۹۷/۲±۰/۰۱۱ [c]
	۳	۹۷±۰/۰۰۶ [c]
	۰	۹۷/۲±۰/۰۱۷ [c]
	-۳	۹۶/۳±۰/۰۳۳ [c]
	-۶	۹۶/۸±۰/۰۵۶ [c]
پرتقال والنسیا	کنترل	۸۸/۶±۰/۰۰۵ [b]
	۳	۸۸/۵±۰/۰۳۷ [b]
	۰	۸۹/۷±۰/۰۳۰ [b]
	-۳	۹۱/۱±۰/۰۱۳ [b]
	-۶	۹۱/۲±۰/۰۰۸ [b]

آنتی‌اکسیدانی بیشتر است. به‌طور مشابه، تحمل سرمایی با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی القا می‌شود. القای تولید ROS توسط تنش سرمایی یک سری از فرآیندهای مخرب مانند پراکسیداسیون لیپید، تجزیه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در سلول را به راه می‌اندازد. برای تحمل سرمازدگی در گیاهان، متابولیت‌های ثانویه مانند فنلیک‌ها تجمع می‌یابند. بنابراین، سرعت برگشت به حالت قبل از تنش سرمازدگی به حفاظت آنتی‌اکسیدانی و ارتباط بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تحمل سرمایی، به جمع‌آوری رادیکال آزاد نسبت داده می‌شود. اگرچه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تا اندازه‌ای مرتبط با تحمل سرمازدگی

است که این نشان می‌دهد فاکتورهای دیگر، علاوه بر فنل تام، ممکن است در تحمل سرمازدگی در مرکبات نقش داشته باشند (۲۳). بنابراین، افزایش دیده شده در میزان ترکیبات فنلی ناشی از دمای کم ممکن است ارزش تغذیه‌ای و دارویی بخش‌های مختلف مرکبات را افزایش دهد، اگرچه سرمای شدید ممکن است مقدار آنها را کاهش دهد (۲۲). هم‌چنین، نتایج حاضر نشان داد که پوست میوه می‌تواند به‌صورت بهینه به‌عنوان منبع قابل دسترس از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

تنش‌های محیطی اصلی‌ترین عامل محدودکننده تولیدات گیاهی می‌باشند. مکانیسم‌های مقاومتی مختلفی براساس تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مرتبط با آسیب سرمایی پیشنهاد شده است (۲۱). شواهد زیادی وجود دارد که نشان‌دهنده این است که آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی عوامل اصلی در جلوگیری از تنش اکسیداتیو در گیاهان هستند (۱۱). این شواهد نشان می‌دهند که تنش‌های محیطی می‌توانند تحریک سیستم‌های جمع‌آوری ROS گیاهی را افزایش دهند و این افزایش، حفاظت در برابر تنش را فراهم می‌آورد. ولی به نظر می‌رسد مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی کافی نباشد و هم‌چنین گیاهان مقاوم به سرما در طول دوره سرما، آنتی‌اکسیدان‌های بیشتر و یا ROS کمتری نسبت به گونه‌های حساس به سرما تولید می‌کنند (۱۳).

در این پژوهش، افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD، میزان بتا- کاروتن و فنل در پوست میوه در مرحله رسیدگی کامل نسبت به مرحله قبل از رسیدگی، می‌تواند دلیلی بر متحمل بودن میوه در این مرحله به سرما باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که در ارقام مورد مطالعه در مرحله رسیدگی کامل، سیستم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، کارآمدتر هستند. از این رو، ممکن است آثار آسیب سرمایی در پوست میوه که از صفت بازارپسندی میوه می‌کاهد، در مرحله رسیدگی کامل ظاهر نشود. اما در مرحله قبل از رسیدگی میوه، این اثرها دیده شود. به همین دلیل، در معرفی یک نمونه به‌عنوان میوه متحمل یا حساس به سرما، علاوه بر مهم بودن فصل برداشت، به بیان بهتر زمان مصادف شدن با دمای کم، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در پوست میوه مرکبات نیز مهم می‌باشد.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور و دانشگاه گیلان جهت فراهم نمودن مواد گیاهی و در اختیار قرار دادن تجهیزات، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Abeysinghe, D. C., X. Li, C. D. Sun, W. S. Zhang, C. H. Zhou and K. S. Chen. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry* 104: 1338-1344.
2. Aduoli, B. and B. Golein. 2011. Citrus 2. Novin Poya Press, Tehran, 172 p. (In Farsi).
3. Anagnostopoulou, M. A., P. Kefalas, V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou and D. Boskou. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry* 94: 19-25.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
5. Bowler, C., L. Slooten, S. Vandenbranden, R. De Rycke, J. Botterman, C. Sybesma, M. Van Montague and D. Inze. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO Journal* 10: 1723-1732.
6. Fanciullino, A. L., C. D. Mayer, F. Luro, J. Casanova, R. Morillon and P. Ollitrault. 2006. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4397-4406.
7. Ferguson, J. J. 2002. Your Florida Dooryard Citrus Guide- Appendices, Definitions and Glossary. University of Florida, Gainesville.

8. Fotouhi Ghazvini, R. and J. Fattahi Moghadam. 2010. Citrus growing in Iran. Guilan University Press, Rasht, Iran, 305 p. (In Farsi).
9. Giannoplitis, C. N. and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
10. Golein, B. and B. Adouli. 2011. Citrus 1. Novin Poya Press, Tehran, 160 p. (In Farsi).
11. Gressel, J. and E. Galun. 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems mullineaux. PP. 237-273. *In:* Foyer, P. (Ed.), Genetic Controls of Photooxidant Tolerant in Plants, CRC Press, Boca Raton.
12. Hagena, S. F., G. I. A. Borge, K. A. Solhaug and G. B. Bengtsson. 2009. Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biology and Technology* 51: 36-42.
13. Hodges, D. M., G. E. Lester, K. D. Munro and P. M. A. Toivonen. 2004. Oxidative stress: Importance for postharvest quality. *HortScience* 39: 924-929.
14. Klimczak, I., M. Maecka, M. Szlachta and A. Gliszczyn. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 313-322.
15. Knight, H. and M. R. Knight. 2001. Abiotic stress signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* 6: 262-267.
16. Lynch, D. V. 1990. Chilling injury in plant: The relevance of membrane lipids. PP. 17-34. *In:* Katterman, F. (Ed.), Enviromental Injury to Plants, Academic Press, New York.
17. McDonald, S., P. D. Prenzler, M. Antolovich and K. Robards. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73: 73-84.
18. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
19. Nagata, M. and I. Yamashita. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish* 9: 925-928.
20. Neish, W. 1964. Biochemistry of Phenolic Compounds. PP.295-359. *In:* Harbourne, J. B.(Ed.), Academic Press, London.
21. Oncel, I., Y. Keles and S. Ustun. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution* 107: 315-320.
22. Padda, M. S. 2006. Phenolic composition and antioxidant activity of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam). PhD Thesis, Louisiana State University.
23. Pennycooke, J. C., S. Cox and C. Stushnoff. 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia×hybrida*). *Environmental and Experimental Botany* 53: 225-232.
24. Sala, J. M. and M. T. Lafuente. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology* 20: 81-89.
25. Schoner, S. and G. H. Krause. 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180: 383-389.