

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

بهروز گلعن^{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 تنفس سرما را ایجاد 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 به عنوان 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، به جز 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: تنفس سرما، تحمل میوه، رسیدگی میوه

۱. مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

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

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

مقدمه

نمی‌دهد؛ ولی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیادی روی آن اتفاق می‌افتد (۲ و ۸).

گیاهان از مولکول اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند. در نتیجه احیای O_2 ، حد واسطه‌های خیلی فعال (Reactive oxygen species, ROS) و گونه‌های فعال اکسیژنی (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، فتوستتر 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 تحمل 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 لیکوپین) و محلول در آب (اسید آسکوربیک و گلوتاتیون) می‌باشد. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) کاتالاز (Catalase, CAT) و پرکسیداز (Peroxidase, POD)، پراکسیداز (Ascorbate peroxidase, APX) و آسکوربیات پراکسیداز (Ascorbate peroxidase) 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. مسئله یخبدان هر چند سال یکبار در بسیاری از کشورها، آسیب‌های سنگینی به باع‌های مرکبات وارد می‌کند. در ایران نیز

مرکبات گروه بزرگی از میوه‌ها شامل انواع پرتقال (*Citrus*), (*C. reticulata* Blanco), نارنگی (*C. sinensis* (L.) Osbeck)، لیموترش (*C. aurantifolia* (Chrism.) Swingle)، لیموشیرین (*C. paradisi* Macf.), گریپ‌فروت (*C. limettoides* Tan.) 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. به طوری که 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 حداقل رشد و عملکرد مطلوب را دارد و هر گونه انحراف از آن، به ویژه 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 موقعي که با دماهای کم (۱۵-۱۰ 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 گل دهی می‌شود. در میان ارقام و گونه‌های مختلف مرکبات از لحاظ مقاومت به تنش دمای کم تفاوت‌هایی وجود دارد، و در یک رقم نیز انداهای هوایی مختلف مثل گل، میوه، برگ و ساقه دارای مقاومت‌های متفاوتی هستند. به طوری که حد آستانه دمای بحرانی برای گل 1 ± 1 درجه، برای میوه و برگ 2 ± 1 -درجه و برای ساقه 4 ± 1 -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 $2/2$ -درجه سلسیوس کمتر شود، میوه دچار خسارت سرمازدگی می‌گردد. میوه سرمازده در بیشتر اوقات نشانه‌های ظاهری روی پوست از خود نشان

از رسیدگی و رسیدگی کامل میوه براساس استاندارد رسیدگی مرکبات به صورت دو آزمایش مجزا انجام گرفت و سپس صفاتی مانند فعالیت آنزیم SOD، میزان بتا-کاروتون، فنل کل و طرفیت آنتی اکسیدانی در پوست میوه اندازه گیری شد.

برداشت اول پرتفال والنسیا در اوخر آذر و برای ارقام دیگر در آبان ماه بود. استاندارد رسیدگی معمولاً میزان پذیرفته شده ای از نسبت مواد جامد کل به اسید قابل تیتر (TSS/TA) (۱:۱ تا ۸:۱ برای ارقام نارنگی و پرتفال)، حداقل درصد آب میوه (معمولًا برای لایم و لمونها) و حداقل رنگ قابل قبول (برای همه ارقام) می باشد (۲). تغییر رنگ میوه ها از سبز به زرد، و یا نارنջی مایل به قرمز به عنوان معیار زمان رسیدگی میوه (برداشت دوم) در نظر گرفته شد، که این زمان برای پرتفال والنسیا ماه خرداد و برای گونه های دیگر آذر ماه بود.

به منظور انجام تیمار سرمایی، همه میوه ها، به جز نمونه های کترول (15°C ~)، به دستگاه انکوباتور ویژه سرماده ه متقل شدند. بررسی های انجام شده در این تحقیق در تیمارهای دمایی ۳، صفر، -۳ و -۶ درجه سلسیوس بود. دمای نمونه ها به تدریج 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 به مدت ۱۰ ساعت انجام شد. به عبارت دیگر، نمونه برداری در دمای صفر درجه سلسیوس، ۱۲ ساعت بعد از نمونه برداری در دمای ۳ درجه سلسیوس صورت گرفت. بعد از تیمار سرمایی، پوست میوه ها جدا سازی شد و بلا فاصله با استفاده از نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان استخراج در فریزر 80° - درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی

به منظور استخراج عصاره سلولی جهت سنجش آنزیم، $5\text{ g}/5\text{ ml}$ 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 میلی لیتر از بافر مورد نظر را به عصاره تهیه شده اضافه کرده

در چند دهه گذشته، به فاصله هر $10-5$ سال، باغ های مرکبات شمال و جنوب کشور دچار صدمات سرمادگی شده اند (۲).

در طول دوره سرما، تغییرات عمده فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیک در گیاه رخ می دهد. رابطه ویژه ای میان پروتئین های تحریک شده توسط سرما با میزان بقای گیاهان تحت تنش سرمادگی وجود دارد. این موضوع کمک می کند تا بتوان با حداکثر نمودن بیان قابلیت های ارشی 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، خسارت های اقتصادی وارد به درختان میوه را حداقل $20-10$ درصد در نواحی مستعد به یخبندان کاهش خواهد داد (۲۰). از آنجایی که یکی از مهم ترین مکانیسم های گیاهان برای افزایش توان مقابله با دماهای کم، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و غیر آنتی اکسیدانی می باشد 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-کاروتون، فنل کل و طرفیت آنتی اکسیدانی کل در پوست میوه پنج رقم مرکبات در تیمارهای دمایی 3 ، صفر، -3 و -6 درجه سلسیوس بررسی شده است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و تیمار سرماده ه

برای انجام این پژوهش، آزمایشی به صورت فاکتوریل با دو عامل متغیر شامل پنج رقم مرکبات [پرتفال محلی سیاورز (*C. sinensis* cv. Local siavaraz)، پرتفال خونی سانگینلا (*C. unshiu* cv. Ansho)، (*C. sinensis* cv. Sanguinello) لیموترش مازندرانی (*C. limon* cv. Local lemon) و پرتفال فراست والنسیا (*C. sinensis* cv. Frost Valencia)] از *C. sinensis* cv. Frost Valencia) کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا و پنج تیمار دمایی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (15 میوه برای هر تیمار در هر تکرار) انجام شد. نمونه برداری در دو مرحله شامل قبل

تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی برای سنجش میزان جمع‌آوری رادیکال آزاد و تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی از سنجش DPPH (۲-۲ دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل) به کار 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 به دست آمد:

$$\text{DPPH} = \frac{\text{درصد جمع‌آوری}}{\text{A control} - \text{A sample} \times 100} \quad [2]$$

A control – A sample $\times 100$ / A control

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، ۶-۳ و ۶-۶ 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 ۳°C 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 لیموترش و والنسیا، این امر شاید به دلیل عملکرد مناسب این آنزیم

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

استخراج و سنجش بتا- کاروتون

به منظور استخراج عصاره بافت میوه جهت سنجش بتا-کاروتون، 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، ۴۵۵، ۵۰۵ و ۶۶۳ به ترتیب مربوط به رنگیزه‌های بتا-کاروتون، لیکوپن، کلروفیل b و کلروفیل a خوانده شد. با خواندن جذب هر کدام از نمونه‌ها و قرار دادن در معادله ۱، غلظت بتا-کاروتون هر نمونه برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد:

$$[\beta\text{-carotene}] = \frac{A_{663} - 1/220 A_{455}}{A_{455} + 0/452} \quad [1]$$

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 ۰/۵ میکرولیتر عصاره استخراج شده به ۱۲۵۰ میکرولیتر سیس ۰/۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ در غیاب نور حلal فولین به نسبت ۱۰ به ۱ (به ترتیب آب دیونیزه و حلal فولین) و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. جهت به دست آوردن غلظت فنل تام نمونه از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد.

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

رقم	تیمار (°C)	فعالیت (IU/g FW) SOD	
		مرحله قبل از رسیدگی	مرحله رسیدگی کامل
کترل		۶۷۸۸۹/۳۵±۴۸۱۶/۵ ^c	۸۶۹۰۵/۲۲±۵۵۷۵/۱ ^e
۳		۶۰۷۳۳/۱۷±۵۴۱۳/۸ ^b	۹۶۸۲۲/۹۵±۳۳۱۴/۲ ^f
پرتقال خونی	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
کترل		۴۶۱۵۸/۲۴±۲۴۷۸/۳ ^a	۷۱۸۰۴/۵۸±۳۴۱۲/۲ ^d
۳		۹۰۷۸۹/۴۹±۵۰۶۹/۶ ^e	۷۳۴۰۲/۶۹±۳۶۱۹/۴ ^d
انشو	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±۴۸۰۲/۳ ^d
کترل		۶۷۷۳۷/۲۶±۵۰۶۱/۳ ^c	۷۱۸۲۶/۲۴±۴۰۱۹/۹ ^d
۳		۸۲۵۲۳/۲۴±۴۵۲۸/۹ ^d	۷۶۳۰۶/۱۴±۴۵۰۶/۸ ^d
پرتقال محلی	۰	۵۰۲۵۳/۶۱±۵۲۵۱/۱ ^a	۵۶۳۰۰/۸۸±۴۰۰۵/۵ ^b
	-۳	۶۴۴۳۴۹/۹۱±۵۲۷۳/۴ ^c	۶۵۱۲۵/۱۰±۳۲۹۴/۲ ^c
	-۶	۶۴۳۷۸/۵۷±۵۴۹۷/۱ ^c	۶۸۳۵۰/۵۸±۴۹۸۲ ^c
کترل		۱۰۴۱۴۵/۸۰±۱۸۰۱/۲ ^g	۱۰۱۰۸۹/۹۰±۴۴۲۰/۸ ^g
۳		۵۵۰۵۱/۷۴±۳۷۹۶/۶ ^{ab}	۱۰۲۶۱۹/۳۰±۳۱۱۹/۹ ^g
لیمو	۰	۱۰۰۴۹۱/۷۰±۵۲۳۴/۶ ^g	۱۰۳۰۹۰/۵۰±۳۰۴۰/۶ ^{gh}
	-۳	۸۸۶۱۸/۴۳±۲۳۰۳/۷ ^c	۱۰۱۹۵۹/۷۰±۳۲۲۴/۴ ^g
	-۶	۸۰۲۴۷/۳۰±۴۹۳۵/۱ ^{de}	۱۰۴۴۶۷/۶۰±۴۳۱۳/۶ ^{gh}
کترل		۱۰۰۳۸/۳۰±۵۳۴۳/۴ ^g	۹۵۶۵/۹۳±۲۱۷۴/۷ ^f
۳		۵۲۷۴۷/۴۷±۲۱۱۱/۲ ^a	۱۰۰۶۴/۴۰±۲۰۲۶/۷ ^{fg}
پرتقال والنسیا	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

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 به طور 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، می‌توان نتیجه گرفت که در ارقام مورد مطالعه در مرحله رسیدگی کامل، سیستم جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید توسط SOD کارآمدتر است.

سنجد بتا- کاروتون

تغییرات میزان بتا- کاروتون در پوست میوه پنج رقم مركبات 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- کاروتون 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- کاروتون مربوط به همه ارقام در هر تیمار، زیاد بودن مقدار بتا- کاروتون در انشو نسبت به سایر ارقام کاملاً مشهود بود و رقم مذکور بیشترین مقدار بتا- کاروتون را در هر تیمار دارا می‌باشد. بعد از آن، به ترتیب در ارقام پرتفال خونی، محلی، والنسیا و لیموترش بیشترین مقدار بتا- کاروتون دیده شد. نارنگی‌ها در شدت رنگ به مقدار زیادی متنوع هستند و توسعه رنگ در آنها وابسته به دمای کم است (۷). کاروتونئیدها دارای ویژگی‌های مهمی چون فعالیت پروویتامین A و جمع‌کننده رادیکال آزاد (ROS) هستند. مركبات منبع غنی از کاروتونئیدها هستند که غلظت آنها در واریتهای مركبات متفاوت بوده و به شرایط رشد بستگی دارد. مطالعات قبلی نشان داده که غلظت کاروتونئید به طور مشخصی در نارنگی انشو بیشتر از پرتفال است (۱). هم‌چنین، مركبات نوع نارنگی مقدار بیشتری کاروتونئید نسبت به مركبات نوع پرتفال و پوملو دارد (۶) که تأیید کننده پژوهش حاضر است. میزان بتا- کاروتون در مرحله

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. پرتفال خونی در این مرحله از برداشت، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را در تیمار 3°C دارا بود و با کاهش دما، کاهش فعالیت دیده شد و این روند کاهشی تا دمای 3°C - ادامه یافت. اما در دمای 6°C ، میزان فعالیت آنزیم SOD به مقدار اولیه خود، یعنی در حالت کنترل بر می‌گردد. این مشاهده احتمالاً به دلیل 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°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°C صدمه می‌بینند (۸). عملکرد آنزیم SOD که رادیکال‌های خطرناک سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را جمع‌آوری می‌کنند، بسیار حائز اهمیت بوده و توازن بین فعالیت آنزیم مذکور برای بقای سلول در دوره‌های سرمایی، مهم است (۲۴). تنفس سرما می‌تواند توازن بین تولید ROS و مکانیسم‌های دفاعی را به‌هم بریزد (۱۳).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد 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 این که آنزیم SOD اولین خط دفاعی در برابر آسیب‌های ناشی از تولید ROS می‌باشد،

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

رقم	تیمار (°C)	غلظت بتا-کاروتون (µg/ml)	
		مرحله قبل از رسیدگی	مرحله رسیدگی کامل
پرتقال خونی	کنترل	۰/۱۱۵±۰/۰۱۲ ^{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±۰/۰۰۲ ^b
	-۶	۰/۱۸۰±۰/۰۱۲ ^e	۰/۱۷۷±۰/۰۰۲ ^b
	کنترل	۰/۱۴۰±۰/۰۰۲ ^d	۰/۲۴۷±۰/۰۴۰ ^c
انشو	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
	کنترل	۰/۱۰۷±۰/۰۰۱ ^c	۰/۲۰۰±۰/۰۰۲ ^{bc}
	۳	۰/۱۴۱±۰/۰۰۱ ^d	۰/۱۸۰±۰/۰۲۰ ^b
پرتقال محلی	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
	کنترل	۰/۰۳۹±۰/۰۱۰ ^a	۰/۰۴۵±۰/۰۰۵ ^a
	۳	۰/۰۵۰±۰/۰۱۰ ^a	۰/۰۵۶±۰/۰۰۲ ^a
	لیمو	۰/۰۶۵±۰/۰۰۲ ^{ab}	۰/۰۴۵±۰/۰۰۶ ^a
پرتقال والنسیا	۰	۰/۰۵۰±۰/۰۰۷ ^a	۰/۰۵۷±۰/۰۱۰ ^a
	-۳	۰/۰۵۰±۰/۰۱۰ ^a	۰/۰۲۳±۰/۰۰۸ ^a
	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}

افزایش می دهد، که دقیقاً مرتبط با کیفیت خوراکی میوه است. به طوری که گاهی اوقات در مناطق گرمسیری با آب و هوای مختلف، میوه رنگ مطلوب خود را توسعه نمی دهد (۶). افزایش دیده شده در میزان بتا-کاروتون با اعمال تیمار سرمایی می تواند به نقش آنتی اکسیدانی آن و کاهش آن به تجزیه

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-کاروتون نداشت. دماهای زمستان و افت سرما رنگ پوست مرکبات را

اغلب زمانی که گیاه در معرض طیف وسیعی از تنفس‌های محیطی مانند نور زیاد، تشعشع UV، دمای کم، حمله پاتوژن و اوزون قرار می‌گیرد، بیان می‌شود. با وجود القای سنتز فتیک‌ها 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 فتیک‌ها احتمالاً به عنوان مکانیسم‌های دفاعی برای تشکیل فیتوآلکسین یا برای جمع‌آوری ROS تولید می‌شوند. از طرف دیگر، کاهش مشاهده شده در مقدار فتیک‌ها حاصل کوچک‌تر بودن K_s نسبت به K_d است که پیامد تشکیل فتیک‌های نامحلول مانند لیگنین و سوبرین یا پلیمریزاسیون فتیک‌ها در نتیجه اکسیداسیون است (۳).

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه پنج رقم میوه مركبات در تیمارهای سرمایی (۳، صفر، ۳-۶ درجه سلسیوس) در زمان رسیدگی کامل مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با اعمال تیمار سرمایی در ارقام مختلف، به جز 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 به طور مشابه افزایش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. با این وجود، به دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی

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

سنجهش فنل تام

جدول ۳ تغییرات میزان فنل تام در پوست میوه پنج رقم مركبات در تیمارهای سرمایی (۳، صفر، ۳-۶ 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، ۳-۶ درجه سلسیوس و در رقم فنل در تیمار انسو، 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 سنجهش فنل تام در این تحقیق، ممکن است به دلیل 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 عمدهاً ناشی از ویژگی احیایی آنهاست که می‌تواند نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد داشته باشد (۲۳). متabolیسم فنیل پروپانوئید

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 کامل	مرحله رسیدگی کامل
	کنترل	۲۰/۸۰±۴/۲۰ ^a	۱۶۲/۷±۱۶/۴۰ ^d
۳		۳۰/۴۰±۶ ^a	۱۶۷/۵±۰/۴۰ ^d
پرتفال خونی	۰	۵۳±۰/۱۰ ^b	۱۹۷/۹±۱/۵۰ ^e
	-۳	۹۰/۵۰±۰/۲۰ ^d	۲۰۹/۳±۱۶ ^{ef}
	-۶	۸۴/۶۰±۹/۲۰ ^c	۱۷۱/۷±۱۳/۲۰ ^d
	کنترل	۸۴/۷۰±۰/۴۰ ^c	۱۲۶/۵±۰/۳۰ ^{bc}
انشو	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
پرتفال 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
لیمو	-۶	۱۲۷/۵±۰/۵۰ ^g	۱۱۳/۸±۱۰/۴۰ ^b
	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
پرتفال والنسیا	-۳	۲۰۰±۰/۷۰ ^j	۱۷۳/۸±۱۴/۲۰ ^d
	-۶	۱۸۸/۴۰±۱/۴۰ ⁱ	۲۲۳/۹±۱۳ ^f
	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}

لیموترش، تا صفر درجه سلسیوس افزایش یافت و سپس ثابت ماند. فعالیت آنتی اکسیدانی و ویژگی جمع آوری رادیکال آزاد، مرتبط با مقدار ترکیبات فنلی و گروههای هیدروکسیل موجود در ساختار شیمیایی آنهاست که به عنوان جمع کننده رادیکال آزاد است. مقدار بیشتر ترکیبات فنلی تام مرتبط با فعالیت

ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوت، ممکن است با وجود مقدار فنل زیاد ولی با ظرفیت آنتی اکسیدانی کم، فعالیت آنتی اکسیدانی کم باشد (۱۴). تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی دیده شده در این تحقیق در مرحله رسیدگی مشابه تغییرات میزان فنل بوده و با اعمال تیمار سرمایی در ارقام مختلف، به جز

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

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

متابولیت‌های ثانویه مانند فنلیک‌ها تجمع می‌یابند. بنابراین، سرعت برگشت به حالت قبل از تنش سرمادگی 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 سرمادگی

آنтиاکسیدانی بیشتر است. به طور 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 سرمادگی در گیاهان،

سرما در طول دوره سرما، آنتی اکسیدان‌های بیشتر و یا ROS کمتری نسبت به گونه‌های حساس به سرما تولید می‌کنند (۱۳). در این پژوهش، افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD، میزان بتا-کاروتون 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 موردن 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 به عنوان میوه متحمل یا حساس به سرما، علاوه بر مهم بودن فصل برداشت، به بیان بهتر زمان مصادف شدن با دمای کم، میزان فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در پوست میوه مربکات نیز مهم می‌باشد.

سپاسگزاری

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

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

نتیجه گیری

تنش‌های محیطی اصلی ترین 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 آنتی اکسیدان‌های 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 آنتی اکسیدانی برای حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی کافی نباشد و هم‌چنین گیاهان مقاوم به

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. Vandendriessche, R. De Ryck, J. Boterman, 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. Giannopoulis, 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. Hagen, 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.), *Environmental 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 Kogakuaih* 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.