انتخاب بعض هجن البرتقال ثلاثي الأوراق *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. المُتحملة لإجهاد البرودة باستخدام بعض مؤشرات النمو والمؤشرات الكيميائية والأنزيمية

د. حسان خوجه*

د. علي الخطيب**

فينوس حسن***

(تاريخ الإيداع 3 / 12 / 2020. قبل للنشر في 14 / 2 / 2021)

ملخّص

أجريت الدراسة خلال عامي 2019–2020 في مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية، استخدم البرتقال ثلاثي الأوراق كأب (Pollen Parent) وأصلي اليوسفي كليوباترا والزفير كأم (Seed Parent). زرعت بذور الجيل الأول في أصص زراعية، ونقلت الغراس الناتجة في شباط إلى براد؛ حيث تم تعريضها للبرودة بشكل تدريجي وصولاً إلى (-2) مْ ثم إلى (-10) مْ وبالنتيجة أدى الإجهاد البارد (-2) مْ إلى موت 50% من الغراس المختبرة، وعند تخفيض درجات الحرارة إلى (-10) مْ أدت إلى أضرار على الغراس المتبقية ووصلت نسبة الضرر حتى (30%) من الغرسة، ولكن استعادت هذه الغراس حياتها في موسم النمو التالي وتابعت نشاطها. تم حساب بعض مؤشرات النمو: متوسط طول وقطر الغرسة، وأعطت الهجن الناتجة من الأم كليوباترا أفضل النتائج خاصة الهجن (210 و201 و233 و220)؛ إذ وصل ارتفاعها حتى 100 سم عند الهجين (210)، أما نسبة الضرر فتراوحت بين 7% عند الهجين 322 (الأم زفير) إلى 30% عند (210 و204 و200 و203 و202) الأم كليوباترا، أما من حيث نشاط أنزيم البيروكسيداز تزايد نشاطه عند (-10) مْ مقارنة بنشاطه عند (-2) مْ وبدلالة إحصائية عالية، وكانت أعلى القيم عند الهجين 202 (الأم كليوباترا)، وعند الهجين 322 (الأم زفير)، وعند حساب الفرق المُحدد لنشاط الأنزيم تفوقت الهجن (350 و300 و322 و320) على الهجن (233 و231 و240 و243 و203 و223) بدلالة إحصائية عالية. بالنسبة لمؤشر الكلوروفيل الكلي فكانت أعلى القيم عند 322 (الأم زفير)، وعند الهجين 202 (الأم كليوباترا)، مع وجود فروق معنوية بدلالة إحصائية عالية بين كمية الكلوروفيل عند (-2) مْ و كميته عند (-10) مْ، وتبيّن عند حساب الفرق المُحدد بين الهجن المدروسة من حيث قيم الكلوروفيل الكلي تفوق الهجن 322 و320 و202 على بقية الهجن.

الكلمات المفتاحية: إجهاد البرد، الكلوروفيل، البيروكسيداز، أصول الحمضيات.

* **أستاذ مساعد – قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

** **باحث حمضيات – دائرة البستنة، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، اللاذقية، سورية.**

*** **طالبة دراسات عليا (دكتوراه) – قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

Selection of some Hybrids of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Tolerant to Freezing Stress by using some Growth Markers and Chemical and Enzymatic Indicators

Dr. Hasan Khojah[*]
Dr. Ali Elkhateeb[**]
Venus Hasan[***]

(Received 3 / 12 / 2020. Accepted 14 / 2 /2021)

□ ABSTRACT □

The study was conducted during 2019-2020 at the Agricultural Scientific Research Center in Lattakia. Poncirus trifoliata were used as (Pollen Parent), Cleopatra, and Sour orange as (Seed Parent). The seeds of F1 were sown in agricultural pots, and the resulting plantings were transferred in February to a refrigerator, where they were exposed to cold gradually reaching (-2)°C m and then to (-10)°C. As a result, cold stress (-2)°C resulted in the death of 50% of the tested seedlings, and when the temperatures were reduced to (-10)°C, led to damage to the remaining seedlings, and the percentage of damage reached up to (30%) of the implant, but this seedling regained its life in the next growing season and continued its activity, Some growth indicators were calculated, the average length and diameter of the implant, and the hybrids produced by the female Cleopatra gave the best results, especially the hybrids (210, 201, 233 and 220). the height reached 100 cm in the hybrid (210), as for the damage percentage, it ranged between 7% when the hybrid 322 female sour orange to 30% at (210, 204, 200, 203 and 202) female Cleopatra, as for the activity of the peroxidase enzyme, where the enzyme activity increased at (-10)°C compared to its activity at (-2)°C and in high statistical significance, and the highest values were when the hybrid 202 femal Cleopatra, and when the hybrid (322) the femal sour orang, and when calculating the specified difference for the enzyme activity, the hybrids (350, 300, 322 and 320) outperformed the hybrids (233, 231, 240, 243, 203 and 223) with a high statistical significance. Regarding the total chlorophyll index, the highest values were at (322) femal Sour orang and the hybrid (202) femal Cleopatra, with significant differences in high statistical significance between the amount of chlorophyll at (-2)°C and its quantity at (-10)°C, and it was found when calculating the specified difference among the studied hybrids in terms of total chlorophyll values was the superiority of the hybrids 322, 320 and 202 over the rest of the hybrids.

Keywords: Freezing Stress, Chlorophyll, Peroxidase, Citrus rootstocks.

[*] **Associate Professor - Department Of Horticulture, Agriculture College, Tishreen University, Lattakia Syria.**
[**] **Citrus Reaearcher - Department Of Horticulture, General Commission For Scientific Agriculture Research (GCSAR), Lattakia, Syria.**
[***] **Postgraduate Student (PhD) - Department Of Horticulture, Agriculture College, Tishreen University, Lattakia Syria.**

مقدمة:

تحتل شجرة الحمضيات مكانة متقدمة بين الأشجار المثمرة في العالم، نظراً لأهميتها الاقتصادية والغذائية والطبية والجمالية والبيئية، وشهد القطر العربي السوري تطوراً ملحوظاً في زراعة الحمضيات؛ إذ تجاوزت المساحة المزروعة 42 ألف هكتار، وفاق الإنتاج المليون طن (Ministry Of Agricultur- Citrus Office, 2018)، وتعد محافظة اللاذقية عماد الوطن في زراعة وإنتاج الحمضيات بالقطر، حيث تشكل المساحة المزروعة في اللاذقية أكثر من 75% من إجمالي المساحة المزروعة بالحمضيات، وتعطي ما يزيد عن 81% من إجمالي الإنتاج.

نشأت الحمضيات في المنطقة الاستوائية والمدارية، في جنوب شرق آسيا وشرق الهند، وجنوب الصين والفلبين، وتنتشر الآن في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية بين خطي عرض 40 – 45 شمالاً و34– 40 جنوباً حيث درجات الحرارة المعتدلة (Manner *et al*., 2006).

كان اعتماد تقنية التطعيم على الأصول المناسبة ذات مقدرة على مقاومة أو تحمل المشاكل التي تعترض كل منطقة، أحد الحلول الضرورية، وأخذت الأصول الدور الكبير في نجاح زراعة الحمضيات؛ إذ يلعب الأصل دوراً مهماً في نمو وتطور وإنتاج هذه الشجرة (Elkhateeb ,2001,2009) (Elkhateeb *et al*., 2018)، كما يؤثر الأصل في الصنف المطعم عليه بأكثر من عشرين صفة بستانية، كميّة ونوعية مختلفة، وفق نتائج (Davies *and* Albrigo, 1994).

تُعد درجات الحرارة إحدى أهم العوامل المحددة لانتشار زراعة الحمضيات بالعالم، ويعد الأصل الزفير Sour Orange أشهر الأصول وأكثرها استخداماً، إلا أنه قد بدأ الاستغناء عنه عقب ظهور مرض التدهور السريع الفيروسي؛ الذي فتك بأكثر من 100 مليون شجرة حمضيات مطعمة على الأصل الزفير (النارنج) حتى عام 1991 (Roistacher, 1992)، فتم استبداله بالأصول المتحملة أو المقاومة لهذا المرض، وخاصة أصل البرتقال ثلاثي الأوراق وهجنه من السيترانج، والسيتروميلو، كبدائل عن الزفير لتطعيم الحمضيات عليها، حيث لم يعد يستخدم الزفير في كثير من البلدان التي ينتشر فيها هذا المرض (Gallasch, 1999)، ولايزال الأصل الزفير هو الأصل الوحيد المُعتمد في مراكز إنتاج غراس الحمضيات في سورية.

تهدف برامج التهجين في الحمضيات الى الحصول على أصناف ذات صفات انتاجية ممتازة وكمية إنتاج عالية، أو الحصول على أصول متحملة أو مقاومة للإجهادات الإحيائية وغير الإحيائية (Akgol *et al*, 2017)، حيث استخدم Swingle البرتقال ثلاثي الأوراق كأب في برنامج التهجين الذي قام به للحصول على أصول مقاومه للبرودة وحصل على أهم مجموعتين هما: السيترانج والسيتروميلو، وكانت مع البرتقال وحصل على (مجموعة السيترانج)، ومع الجريب فروت وحصل على (السيتروميلو).

أنزيم البيروكسيداز Peroxidase

هو أحد الإنزيمات الرئيسة المضادة للأكسدة، يوجد على نطاق واسع في الطبيعة، ويحفز أكسدة مختلف الركائز (الفينولية وكذلك غير الفينولية RH) المانحة للإلكترون المصاحبة لتحلل H2O2.(Zia *et al*., 2011)

$$RH + H_2O_2 \longrightarrow 2R^o + 2H2O$$

أفادت بعض الدراسات أن إجهاد البرودة قد أدى إلى تغيرات كيميائية حيوية وفيزيائية في النباتات، خاصة عندما تصل إلى درجة التجمد فتؤدي إلى تلف الغشاء البلازمي وأنظمة بيروكسيد الدهون؛ عن طريق تقليل مرونة أغشية الخلايا في

معظم النباتات (Levitt, 1980). يحصل ذلك بشكل رئيس في جدار الخلية وفي فجوات الخلايا في النباتات، يختلف موقعها حسب العمر والأنواع ومراحل النمو (Gaspar *et al*., 1982).

درس Amaya وآخرون (1999) دورالبيروكسيداز في جدار الخلية في الاستجابة لإجهاد الملح؛ فلاحظوا زيادة معدلات إنبات البذور في التبغ المعدل وراثيا، مع الإفراط في التعبير عن البيروكسيداز تحت الضغط الأسموزي بإجهاد الملح، وتبين لهم أن تعزيز نشاط البيروكسيداز يعمل على استقرار بنية جدار الخلية، وفسروا معدل الإنبات العالي لبذور التبغ بزيادة القدرة على الاحتفاظ بالمياه؛ فتقلل من تأثير نقص المياه الناجم عن الملوحة. ذكر Quiroga وآخرون (2000) أن زيادة نشاط البيروكسيداز يحمي الأنسجة من فقدان الماء وغزو العوامل الممرضة، بالإضافة إلى تميز بعض الخلايا النباتية بالمقدرة على تكوين جدران خلوية ثانوية.

تعمل بيروكسيدات جدار الخلية على بلمرة حمض الهيدروكسي سياميك ومشتقاته؛ عن طريق تحويلها إلى جذور الفينوكسي التي تترسب بعد ذلك على السطح الخارجي للخلية، فيقوي تراكم هذه البوليمرات جدار الخلية و يحد من تمددها فيمنع غزو العوامل الممرضة، ويمنح القوة الهيكلية لجسم النبات، وهو أمر بالغ الأهمية للأشجار في بناء أوعية نسيج الخشب. لذلك يستخدم كمية البيروكسيداز كأحد مؤشرات الإجهاد في النباتات، لأن مستواها يزداد كثيراً بتحفيز الإجهاد، كما يتراكم اللجنين أيضًا بسبب استجابات الإجهاد (Jansen *et al*., 2001).

أكد Andrews وآخرون (2002) أنه تم توثيق دور البيروكسيداز والأنزيمات الأخرى المضادة للأكسدة في الإجهاد الحراري من قبل العديد من الباحثين، وبينوا أن البيروكسيدات النباتية تشارك في مختلف العمليات الفسيولوجية الأساسية لنمو النبات وتطوره طوال دورة حياته؛ نظرًا لقدرة البيروكسيدات على تحفيز تفاعل الأكسدة والاختزال لمجموعة واسعة من المركبات، بما في ذلك استقلاب جدار الخلية والسوبرة، واستقلاب أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، وأيض الأكسين، ونمو الفاكهة ونضجها، والدفاع ضد مسببات الأمراض وما إلى ذلك نظرًا لتعدد الاستخدامات في التفاعل المحفَز بواسطة البيروكسيداز.

يكمن دور أنزيم البيروكسيداز كمحفز بشكل عام للتفاعل بين H2O2 كمستقبل للإلكترون وأنواع كثيرة من الركائز عن طريق تحرير O2 من H2O2، أيضا تؤكسد العديد من المركبات العضوية وغير العضوية يعمل البيروكسيداز على إزالة ذرة الهيدروجين في الغالب من مجموعات الكحول، والتي يتم دمجها مع بيروكسيد الهيدروجين من أجل تكوين جزيئات من الماء والمركبات الفينولية المؤكسدة، والتي تعمل كأنزيمات إزالة السموم(مقاومة السموم) وكجدار خلوي عبر إنزيم مرتبط أثناء الإجهاد، كما تحفز تفاعلات الأكسدة والإختزال للعديد من المركبات (Passardi *et al*., 2005). وهو أنزيم ضروري في استجابة النبات للإجهادات اللاإحيائية من خلال تخفيض بيروكسيد الهيدروجين عبر نقل الطاقة من البيروكسيد التفاعلي الى الجلوتاثيون، ويسبب الإجهاد البارد للنبات تغيرات فيزيائية وكيميائية وحيوية تؤدي لتلف أنظمة غشاء الخلية وبيروكسيد الدهون عن طريق تقليل مرونة هذه الأغشية في معظم النباتات، كما يؤثر الإجهاد البارد في معدل النتح والنمو وعلى زعزعة استقرار الغشاء الخلوي ومحتوى السكر القابل للذوبان؛ حيث أن أنزيم البيروكسيداز من الأنزيمات المحفزة الحيوية الهامة (Zia *et al* , 2011).

أظهرت النتائج أن معدلات نمو وتبخر عشب Bermuda البري تحت درجة حرارة 4 مْ قد انخفضت كثيراً. كما ساهم إجهاد البرد في زعزعة استقرار غشاء الخلية بشدة، وزيادة محتوى مالون ثنائي الدهيد وقيمة التسرب الإلكتروليتي، وزاد نشاط أنزيم البيروكسيداز في النظام البارد بالمقارنة مع الشاهد (Fan *and* Ren, 2014)

الكلوروفيل Chlorophyll

بيّن Britton (1983) أن أصباغ التمثيل الضوئي (الكلوروفيل Chlorophyll) هي مواد تختلف كثيراً في التركيب الكيميائي، وهي موجودة على شكل أصباغ البورفيرين (الكلوروفيل أ، ب، ج)، والكاروتينات، والأنثوسيانين والفلافونات. تشتمل أصباغ الأوراق الكاملة على الكلوروفيل أ، والكلوروفيل ب والكاروتينات الضرورية لعملية التمثيل الضوئي، ويختلف محتوى الأصباغ الورقية باختلاف الأنواع، ويمكن أن يزداد الاختلاف في أصباغ الأوراق (الكلوروفيل والكاروتينات) تبعاً للعوامل الداخلية والظروف البيئية (Costache *et al*., 2012).

لقد تم استخدام نسبة الكلوروفيل أ والكلوروفيل ب في النباتات الأرضية، كمؤشر على الاستجابة لظروف الظل الخفيف (Porra, 1991; Vicas *et al*., 2010). يلعب هذا الصباغ أيضًا دورًا مهماً كمؤشر على نمو النباتات وإنتاج المواد العضوية فيها (Lahai *et al*. 2003).

بين Tripathi *and* Gautam (2007) أن قلة نسبة الكلوروفيل أاب تستخدم كعلامة بيولوجية حساسة للتلوث والإجهاد البيئي.

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

تعرض القطر العربي السوري لموجات برودة شديدة ومتكررة كان آخرها شتاء 2016– 2017 أدت إلى خروج الكثير من أشجار الحمضيات المطعمة على الزفير من الإنتاج نتيجة الصقيع، وبالتالي كان لابد من البحث عن أصول تتحمل هذه الإجهادات، أو استنباط أصول جديدة تناسب البيئة المحلية وظروف مناخها المختلفة؛ لذلك فقد توجه هذا البحث نحو تهجين أصول متباينة وراثياً بغية الحصول على أصول جديدة من الحمضيات، خاصة أنه مطلب لوزارة الزراعة السورية؛ بسبب خطورة استخدام الزفير كأصل وحيد وضرورة البحث عن البدائل بعد تسجيل مرض التدهور السريع الفيروسي CTV المعروف باسم التريستيزا لأول مرة رسمياً في سورية عام 2006، فتوجب البحث الدؤوب لتوفير أصول حمضيات جيدة مرغوبة محلياً تلبي متطلبات المزارعين وظروف بيئتهم الخاصة (Micro climet)؛ من هنا جاءت أهمية هذا البحث حيث يعتبر التحمل للإجهادات البيئية من أهم الشروط الواجب توفرها في أصول الحمضيات الجيدة المرغوبة محلياً.

هدف البحث:

يهدف هذا البحث إلى استنباط أصول جديدة عن طريق التهجين، ثم انتخاب هجن الجيل الأول (F1) الأكثر تحملاً لإجهاد البرودة؛ عن طريق تعريضها لدرجات حرارة منخفضة متدرجة من الصفر المئوي، وصولاً إلى –10 مْ، ودراسة مدى تحمل الأفراد الهجينة الناتجة باتجاهين:

آ– بشكل مباشر من خلال البقاء على قيد الحياة، ونسب الضرر الناجم عن انخفاض الحرارة من خلال بعض مؤشرات النمو.

ب– وبشكل غير مباشر من خلال دراسة المؤشرات الكيميائية، كتراكم الكلوروفيل ونشاط أنزيم البيروكسيداز، والعمل على انتخاب هذه الأفراد الهجينة وصولاً لإعتمادها في تطوير الزراعة المحلية، وذلك ضمن برامج إكثار الحمضيات ونشر زراعتها كأصول للتطعيم عليها بأصناف مختلفة.

طرائق البحث ومواده:

1- المادة النباتية المدروسة:

آ- البرتقال ثلاثي الأوراق.*Poncirus trifoliata* (L.) Raf: هو الأصل الوحيد متساقط الأوراق من بين الأصول المستخدمة في تطعيم الحمضيات، وأكثر أصول الحمضيات تحملاً للبرودة، لذلك يستخدم كأصل في المناطق الباردة (Castle, 1987). يتميز بأنه أصل مقصر، ويدخل في برامج التهجين بكثرة في استنباط أصول متحملة للبرودة. وأشهر برامج الإكثار كانت في فلوريدا قام بها سوينغل للحصول على هجائن مختلفة بغرض تحمل البرودة بعد الصقيع الذي فتك بأشجار الحمضيات المطعمة على الزفير في ولاية فلوريدا عام/1894- 1895/ (Swingle *and* Reece, 1967)، وهو أصل مقاوم لمرض التدهور السريع الفيروسي CTV (Hutchion,1977)، ومقاوم للنيماتودا بدرجة جيدة، وحساس لارتفاع تركيز كربونات الكالسيوم الفعالة بالتربة، كما يعتبر قليل التوافق مع معظم الأصناف التجارية، ويعتبر البرتقال ثلاثي الأوراق مصدر وراثي مهم لبرامج التحسين الوراثي لأصول الحمضيات، وذلك لتحمل الإجهادات ومقاومة الأمراض (Zhu *et al*, 2015).

ب- الزفير(النارنج) Sour Orange واسمه العلمي .*Citrus aurantium* L: الأصل الأكثر انتشاراً وشهرة عالمياً ومحلياً، وهو أصل نصف مقصر متوسط النمو والأشجار المطعمة عليه متوسطة الحجم وذو توافق جيد مع معظم الأصناف التجارية (Hutchison, 1977)، البذور متعددة الأجنة. توافقه جيد مع معظم أصناف الحمضيات، عدا البرتقال اليافاوي والشاموتي واليوسفي الساتزوما، والحامض الماير، وهو متحمل لمرض التصمغ، ومتحمل الجفاف، لذلك يمكن زراعته في مختلف أنواع الترب، من الترب الثقيلة القوام إلى المتوسطة القوام حتى الخفيفة، ودرجة تحمله للكلس الفعّال عالية، ويتحمل الملوحة وارتفاع درجة الحموضة *p*H.

إلا أنّه أصل حساس لنيماتودا الحمضيات، ونيماتودا تعقد الجذور، ولكن من أخطر عيوبه حساسية الأصناف المطعمة عليه لمرض التدهور السريع الفيروسي CTV المعروف باسم التريستيزا، ثمار الأصناف المطعمة عليه جيدة النوعية لكنها أقل نوعية من هجائن البرتقال ثلاثي الأوراق، ويُعدّ الزفير الأصل السائد (إن لم يكن الوحيد) في مراكز إنتاج غراس الحمضيات المحلية، وأدى انتشار مرض المالسيكو الفطري إلى موت معظم أشجار الحامض بالقطر، ولكن الأمر الذي يجعل خطورة استخدامه وضرورة البحث عن البدائل هو تسجيل مرض CTV لأول مرة رسمياً في سورية عام 2006.

ج- اليوسفي كليوباترا Cleopatra mandarin الاسم العلمي *Citrus reticulata* Blanco: استخدم لأول مرة في الولايات المتحدة عام 1917، وتعتبر الهند الموطن الأصلي له، والأصناف المطعمة عليه بطيئة النمو، ثماره صغيرة الحجم، وهو يقاوم الCTV، ويتحمل الترب الكلسية والمالحة (Fadliah, 1977)، كما أنّه أصل بطيء النمو في المشتل وصعب التطعيم عليه، ويعد هذا الأصل من الأصول الجيدة المتحملة للأمراض الفطرية والفيروسية (Nava Ayala *and* Monter, 1994).

2- طريقة العمل:

تمت زراعة البذور الهجينة لكل من الزفير، واليوسفي كليوباترا (Seed parent) حسب موعد نضج الثمار في نهاية شهر شباط عام 2019 ضمن مساكب محددة لكل منها، في مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية، ثم تم انتخاب الغراس الهجينة في شهر أيار من نفس العام من كل مسكبة على حده بالإعتماد على صفة الورقة كصفة مظهرية

سائدة تنتقل إلى أفراد الجيل الأول الهجينة الجنسية دون الخضرية، هذا ماأكده(Zhu *et al*., 2013). وكان الأب (pollen parent) دائماً البرتقال ثلاثي الأوراق، *الأم اليوسفي كليوباترا (Seed parent) من الرقم 1 حتى الرقم 275 * الأم الزفير (Seed parent) من الرقم 300 حتى 400.

تم نقل الأفراد الهجينة إلى أكواب زراعية سعة 2 كغ وخلطة ترابية مكونة من التورب والرمل والتربة بنسب متساوية وتمت خدمتها والعناية بها حتى موعد بدء التجربة في شهر شباط عام 2020.

انخفضت درجة الحرارة في بداية شهر شباط وسجلت درجة 2 تحت الصفر، بعد نقل نباتات التجربة إلى المخبر لبدء التجربة وقد سبب هذا الإنخفاض في درجة الحرارة إلى فقدان 50% من نباتات الجيل الأول لعدم قدرتها على مقاومة الإجهاد فماتت، أي مات 50 هجين (الأم زفير) و140 هجين (الأم كليوباترا)، بعد ذلك تم تعريض بادرات الجيل الأول المتبقية لإجهاد البرد وفقاً لمعاملة (-10)مْ من درجات الحرارة حسب (Yelenosky, 1978)، وكان عدد الهجن الناجية 4 (الأم زفير) و14 (الأم كليوباترا).

استخلص أنزيم البيروكسيداز وفق طريقة (Altunkaya *and* Gokmenm, 2011)، وقدر نشاطه باستخدام جهاز المطياف الضوئي، ويتمثل نشاطه بعدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني التي تتفكك بواسطة 100 ملغ من النسيج النباتي الداخل في تشكيل المستخلص الأنزيمي في الدقيقة الواحدة عند حرارة 25 مْ. حسب النشاط وفق معادلة الشركة المصنعة للمادة القياسية للإنزيم (Technical bulletin): $\mathrm{PA} = \frac{B \times SDF}{Rt \times V}$

PA: pyroxidase activity نشاط الأنزيم

B: كمية الماء الأوكسجيني H2O2 المنخفضة بين الزمن الأولي والزمن النهائي مقدرة بـ نانومول (nmol).

SDF: Sample Dilution Factor معامل تمديد العينة

Rt: Reaction time : زمن التفاعل مقدرا بالدقيقة.

V: حجم العينة المضافة إلى حجرة المطياف الضوئي مقدرة بـ مل.

استخلص الكلوروفيل وفق طريقة (Gogoi *and* Basumatary., 2018) وتم حساب الكلوروفيل A والكلوروفيل B والكلوروفيل الكلي وفق المعادلات الآتية:

$$\text{mg chlorophyll a}/\ g\ tissue = \frac{12.7(A663) - 2.69(A645) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{mg chlorophyll b}/\ g\ tissue = \frac{22.9(A645) - 4.68(A663) \times V}{1000 \times W}$$

chlorophyll T= chlorophyll a + chlorophyll b

A الإمتصاصية عند طول الموجة المُحدد، V الحجم النهائي لمستخلص الكلوروفيل، W الوزن الطازج للنسيج النباتي الذي تم استخلاص الكلوروفيل منه

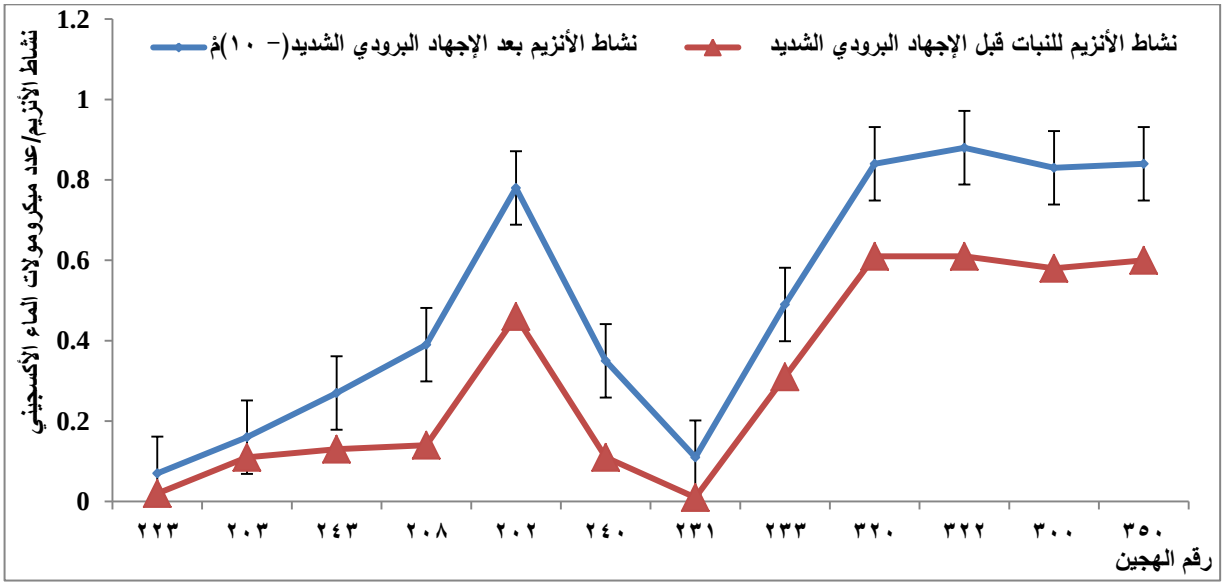
- تم تنفيذ جميع العمليات الزراعية من تسميد وري وتعشيب ...إلخ وفق القواعد المتبعة في زراعة الحمضيات، وتم إجراء التحاليل المخبرية في محطة الهنادي التابعة لمركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية.
- تم حساب النسبة المئوية للضرر في المجموع الخضري خلال 24 ساعة من التعرض للإجهاد البرودي الشديد، كما تم حساب متوسط وزن الورقة ومتوسط مساحتها والنسبة المئوية للمادة الجافة، ومتوسط طول الغرسة ومتوسط قطر الساق للهجن الأبناء الناجية من الإجهاد البرودي الشديد وبعد مرورفصل الربيع.

- تم حساب الفروق المعنوية بين قيم المؤشرات المدروسة(الكلوروفيل، النشاط الأنزيمي) للأبناء المنتخبة من المجتمع النباتي المدروس قبل الإجهاد وبعده باستخدام $T_{student}$
- $T_{المحسوبة} = \frac{\overline{X1}-\overline{X2}}{S\bar{d}}$ حيث أن $S\bar{d}$ الخطأالقياسي للفرق $\overline{X1}-\overline{X2}$. تقارن مع $T_{الجدولية}$ عند درجات حرية n-1، كما تم استخدام أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة الأبناء الهجن المُنتخبة بعد التعرض لإجهاد البرد وحساب الفروق المعنوية بينها باستخدام الخطأ القياسي.
- تم حساب الفرق المُحدد Criticale Difference لتحديد الفرق المعنوي في مقدرة الإئتلاف الخاصة في الهجن.

النتائج والمناقشة:

1-حساب مؤشر نشاط أنزيم البيروكسيداز

تم حساب نشاط أنزيم البيروكسيداز لبعض الهجن المُنتخبة والمتحملة للإجهاد البرودي الشديد، ونلاحظ اختلاف نشاط الأنزيم باختلاف الأبوين لكل هجين.



المخطط (1) نشاط أنزيم البيروكسيداز في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجة الحرارة(-10) مْ

نلاحظ من المخطط (1) ازدياد النشاط الأنزيمي في جميع الهجن المدروسة بعد الإجهاد البرودي الشديد (-10) مْ بالمقارنة مع النشاط الأنزيمي عند التعرض للإجهاد (-2) مْ وبدلالة إحصائية معنوية عالية** ($T_{المحسوبة} > T_{الجدولية\ 0.01}$)، حيث كانت أعلى قيمة للنشاط الأنزيمي 0.78 في الهجين 202 وكانت الأم اليوسفي كليوباترا و0.88 في الهجين 322 وكانت الأم الزفير، بينما كان أدنى نشاط لأنزيم البيروكسيداز 0.07 و0.83 في كلا الهجينين 223 (الأم كليوباترا) و300 (الأم زفير) على التوالي. وعند حساب الفرق المُحدد لنشاط الأنزيم بين الهجن بعد التعرض للإجهاد الشديد البرودة نجد أن الفروق بين الهجن 350 و300 و322 و320 غير معنوية، لكنها تفوقت بدلالة إحصائية ** على 233, 231, 240, 208, 243, 203, 223. كما تفوق 233 بدلالة معنوية عالية **على 223 و203 و231 دون وجود فرق معنوي بين هذه الهجن الثلاثة الأخيرة. كما نلاحظ تفوق 202 بدلالة إحصائية

عالية **على 223 و203 و243 و208 و240 و231 و233 دون فرق معنوي بين الأخيرة، أيضاً تفوق 208 على 223 بدلالة إحصائية عالية**.

تؤكد الدراسات أن التعرض للإجهاد البارد يسبب زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز (Fan *and* Ren, 2014)، وأن التعرض البارد دون درجة التجمد سوف يؤدي إلى التأقلم مع البرودة؛ لذلك فإن تعرض الهجن الناجية لدرجة حرارة -2مْ (قبل الإجهاد البرودي الشديد) أدى إلى نشاط أنزيم البيروكسيداز كما هو مبين في المخطط (1)، ثم عند نقل هذه الهجن إلى الإجهاد الأشد برودة (-10) مْ عمل على تزايد النشاط الأنزيمي عند الهجن الأكثر تحملاً، حيث تأقلمت هذه الهجن بما يسمى التأقلم البارد، نلاحظ من المخطط 1 زيادة النشاط الأنزيمي عند الأبناء الهجن الناتجة من تصالب الزفير seed parent مع البرتقال ثلاثي الأوراق pollen parent عن النشاط الأنزيمي عن الأبناء الهجن الناتجة عن تصالب اليوسفي كليوباترا seed parent مع البرتقال ثلاثي الأوراق pollen parent وهذا يدل على حدوث الإجهاد التأكسدي عند هجن المجموعة الثانية (الهجن الناتجة عن تصالب اليوسفي كليوباترا seed parent مع البرتقال ثلاثي الأوراق pollen parent) بسبب تفوق انتاج الجذور الحرة على إزاحة الأنواع الأوكسجينية النشطة. وهذا مايتوافق مع العديد من المراجع (Levitt, 1980) (Zhu *et al*., 2007) (Hughes *and* Dunn 1996) (Wang *and* Cai, 2011) (Mohammadian *et al*., 2012) والجدول(1) يوضح النسبة المئوية للضرر في المجموع الخضري بعد الإجهاد مباشرة وبعض المؤشرات المورفولوجية والمادة الجافة في الهجن المدروسة المعرضة لإجهاد البرودة الشديدة (-10) مْ.

جدول (1) النسبة المئوية للضرر وبعض المؤشرات الخضرية بعد الإجهاد في كل هجين عند إجهاد البرودة الشديد(-10) مْ

رقم الهجين	متوسط طول الغرسة سم	متوسط قطر الساق سم	متوسط وزن الورقة غ	متوسط مساحة الورقة سم^2	مادة جافة %	نسبة الضرر في المجموع الخضري
201	90	0.9	0.22	1.8	44.44	30%
204	61	0.5	0.25	2.06	46.62	30%
231	78	0.8	0.36	2.74	35.51	10%
200	50	0.5	0.23	2.33	36.42	30%
223	62	0.7	0.23	1.61	32.59	15%
233	86	0.5	0.38	2.11	33.33	17%
203	75	0.75	0.42	5.25	32.38	30%
243	76	0.8	0.43	3.56	39.06	20%
210	100	0.7	0.29	3.22	38.5	19%
220	85	0.65	0.23	1.78	36.69	23%
208	20	0.7	0.13	1.15	31.74	25%
202	35	1	0.22	1.34	32.56	30%
217	70	0.7	0.31	2.19	35.87	10%
322	12	0.2	0.22	5.5	33.83	7%
320	30	0.3	0.4	5.71	35.5	10%
300	15	0.2	0.23	2.3	35.65	15%

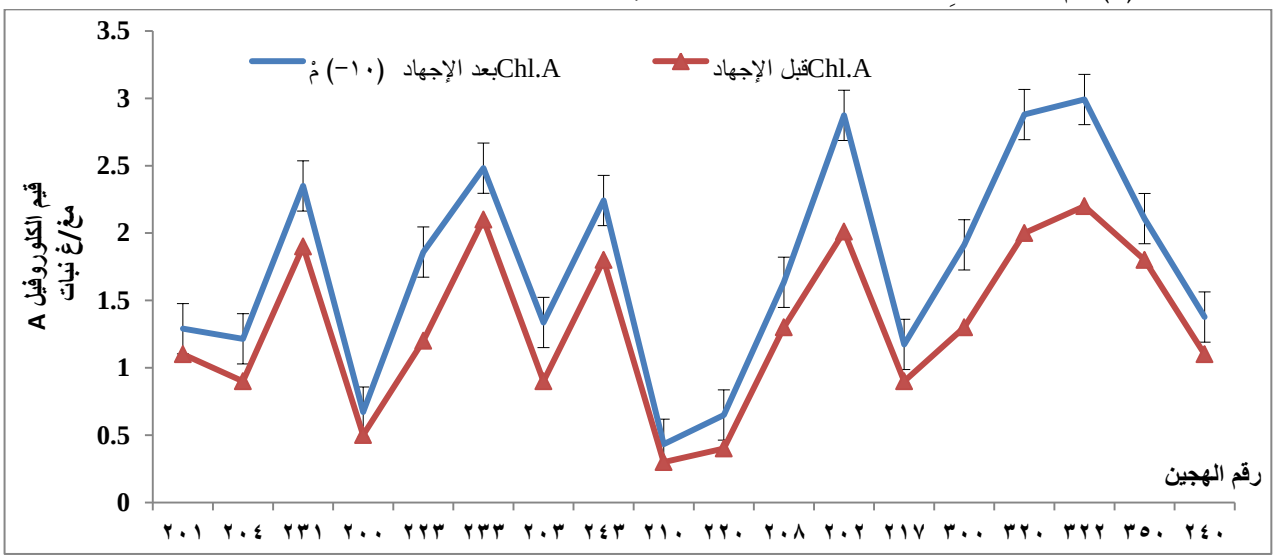
نلاحظ من الجدول (1) أن الإجهاد الشديد البرودة تسبب في موت الأجزاء الخضرية جزئياً للهجن الأبناء وصلت نسبته إلى30% في هجن الكليوباترا (203 و202 و200 و204 و201)، وكان أقله في الهجين 322 (الأم الزفير)، حيث أن الزفير أكثر تحملاً لإجهاد البرد من الكليوباترا، وبالتالي كانت الأبناء الهجينة من الأم الزفير أكثر تحملاً من أبناء الأم الكليوباترا، وأقلها تضرراً بالإجهاد البرودي الشديد، وتباينت مساحة الورقة في الهجن الأبناء حيث وصلت 5.7 سم^2 في الهجين 320 (الأم زفير) ومتوسط وزن الورقة لنفس الهجين 0.4غ؛ إذ يتميز الزفير بورقته الكبيرة مقارنة مع الكليوباترا، وكانت أصغر مساحة للورقة 1.15 سم^2 للهجين 208 (الأم كليوباترا) وأيضاً أصغر متوسط لوزن الورقة 0.13 غ لنفس الهجين، كما نلاحظ اختلفت الهجن الأبناء من حيث الطول فكان أقلها في هجن الزفير12 سم في الهجين رقم 322 مقارنة مع هجن الكليوباترا وصلت إلى 100 سم في الهجين 210.

2- حساب مؤشر (الكلوروفيل) اليخضور Chlorophyll

يتباين لون أوراق الحمضيات فيما بينها بشدة اللون الأخضر، من الأخضر الداكن إلى الأخضر الباهت، ويعود ذلك إلى نوع الكلوروفيل (a,b) والنسبة بينهما، وإلى كمية الكلوروفيل في الأوراق. تتباين حتى في النبات الواحد حسب موسم النمو ونضج الورقة. وبشكل عام يتأثر الكلوروفيل بالإجهادات التي يتعرض لها النبات؛ إذ تُصاب النباتات التي تعرضت للإجهاد بالشحوب بسبب تدهور الكلوروفيل وتتفاوت نسبة الشحوب بين النباتات، تم حساب قيم الكلوروفيل A والكلوروفيل B وT الكلي للهجن المُنتخبة المُتحملة للإجهاد البارد -10 مْ قبل التعرض للإجهاد وبعد الإجهاد خلال 24 ساعة، ويبين المخطط (2) النتائج المتوصل إليها:

الكلوروفيل A

يبين المخطط (2) قيم الكلوروفيلِ A للهجن المنتخبة قبل وبعد الإجهاد شديد البرودة



المخطط (2) قيم الكلوروفيل A في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجتي الحرارة (-10) مْ

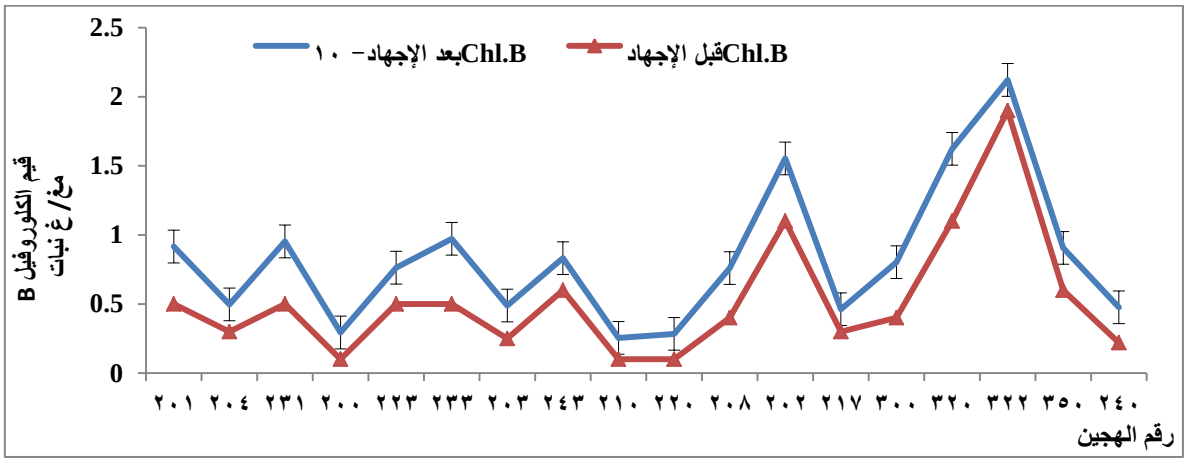
يلاحظ في المخطط (2) تراكم الكلوروفيل A في الهجن المُتحملة بعد الإجهاد شديد البرودة، وقد سجل أعلى قيمة (3) الهجين 322 الأم زفير، والهجين 202 الأم كليوباترا (2.8)، بينما ظهرت أدنى قيمة له (0.4) عند الهجين

210 (seed parent كليوباترا)، وبلغت قيمته (1.9) عند الهجين 300 (زفير seed parent) مع وجود فروق معنوية ** بدلالة إحصائية عالية في قيم الكلوروفيل A قبل وبعد إجهاد البرودة الشديد لكل الهجن المنتخبة.

كما تُبين معطيات المخطط عند حساب الفرق المُحدد بين الهجن المُنتخبة؛ تفوق الهجين 233 بدلالة إحصائية عالية **على الهجن (-240-300-217-208-220-210-203-223-200-204-201)، وتفوق الهجين 322 أيضا بدلالة إحصائية عالية **على جميع الهجن ماعدا (320-202-233)، وتفوق الهجين 320 معنوياً**على الهجن (-201 240-350-300-217-208-220-210-243-203-223-200-204). كما يلاحظ تفوق الهجن (-208-204-201 240) على الهجن 220-210-200 بدلالة إحصائية عالية، ودون وجود فرق معنوي بينها.

الكلوروفيل B

تم حساب قيم الكلوروفيل B لجميع الهجن المنتخبة والتي تحملت ونجت من الإجهاد شديد البرودة



المخطط (3) قيم الكلوروفيل B في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجتي الحرارة (-10)مْ

نلاحظ من المخطط (3) أن الكلوروفيل B قد سجل أعلى قيمة (2.1) عند الهجين 322 الأم زفير، وعند الهجين 202 الأم كليوباترا (1.5). بينما كانت أدنى قيمة له (0.25) عند الهجين 210 (seed parent كليوباترا) وبلغت قيمته 0.8 عند الهجين 300 (زفير seed parent) مع وجود فروق معنوية بدلالة إحصائية **في قيم الكلوروفيل B قبل وبعد الإجهاد شديد البرودة لكل الهجن المنتخبة

تُبيّن معطيات المخطط عند حساب الفرق المُحدد لقيم الكلوروفيل B للهجن بعد التعرض للإجهاد شديد البرودة، تفوق الهجين 322 على جميع الهجن بمعنوية عالية، وتفوق الهجين 320 على جميع الهجن بمعنوية عالية باستثناء الهجينين 202-322، وتفوق الهجين 202 على جميع الهجن معنوياً عند مستوى ثقة عالية باستثناء الهجينين -322 320، كما تفوقت الهجن 201 و231 و233 و350 بمعنوية عالية على 240-217-220-210-203-200-204 دون وجود فروق معنوية فيما بينها.

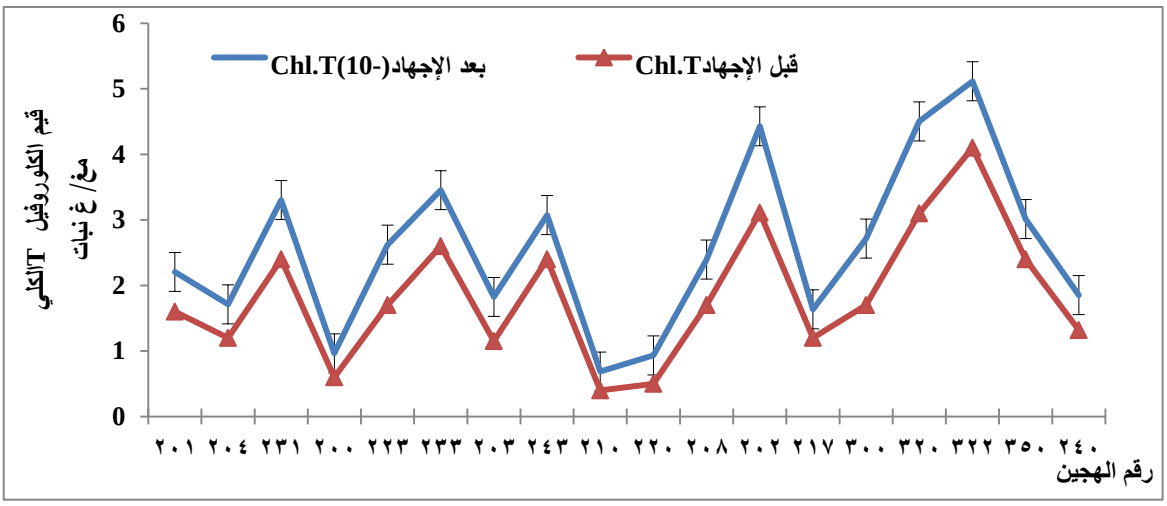
تؤكد معظم الدراسات على أن محتوى النبات من الكلوروفيل يتناقص مع شدة ظروف الإجهاد المختلفة وهذا التباين يختلف حسب النوع والصنف، وقد عزى الباحثون انخفاض محتوى الكلوروفيل إلى تراجع مستوى التمثيل الغذائي وانخفاض محتوى الماء(Lahai *et al.* 2003)، ويعود سبب عدم انخفاض كمية الكلوروفيل في هذه الدراسة؛ إذ يبدأ

تهدمه فور تعرض النبات للإجهاد البرودي الشديد ولكن ظهور أعراض الشحوب والإصفرار تستغرق عدة أيام من التعرض للإجهاد، في حين تم أخذ العينات الورقية خلال 24 ساعة من الإجهاد البرودي الشديد تجنباً لموت الأوراق وعدم إمكانية توفر عينات ورقية للتحليل وهذه الفترة 24 ساعة غير كافية لظهور الشحوب على الأوراق واستخلاص الصباغ وأخذ القراءات على جهاز المطياف الضوئي.

وقد وضحت عدة مراجع (Vicas *et al*., 2010) (Tripathi *and* Gautam, 2007) أن أوراق الحمضيات تتباين فيما بينها بشدة اللون الأخضر، من الأخضر الداكن إلى الأخضر الباهت، حيث تعطي أوراق الزفير لوناً أخضر داكن بينما تعطي أوراق الكليوباترا لوناً أقل اخضراراً (باهتاً) ويعود ذلك إلى نوع الكلوروفيل a أو b والنسبة بينهم، وهذا مايفسر كمية الكلوروفيل الأعلى في هجن الزفير منها في هجن الكليوباترا، ووضحت هذه المراجع تباين كمية الكلوروفيل حتى في النبات الواحد؛ بحسب موسم النمو فتبدأ خضراء باهتة ثم عند النضج تصبح داكنة أكثر. ولكن بعد تعرضها للإجهادات المختلفة يبدأ الكلوروفيل بالتهدم.

الكلوروفيل الكلي

الكلوروفيل الكلي هو مجموع كلا من الكلوروفيل A والكلوروفيل B، وتم حسابه لجميع الهجن التي تجاوزت الإجهاد البارد -10 مْ كما في المخطط (4)



المخطط (4) قيم الكلوروفيل T الكلي في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجتي الحرارة (-10) مْ

سجل الكلوروفيل الكلي T أعلى قيمة له (5) عند الهجين 322، تلتها القيمة (4.5) للهجين 320 الأم زفير، وسجل الهجين 202 الأم كليوباترا قيمة (4.4) للكلوروفيل الكلي. بينما كانت أدنى قيمة له 0.6 عند الهجين 210 (seed parent كليوباترا) وبلغت أدنى قيمة 2.7 عند الهجين 300 (زفير seed parent) مع وجود فروق معنوية قبل وبعد إجهاد البرودة الشديد (-10) مْ لكل الهجن المنتخبة بدلالة T- student بمعنوية عالية.

تُبيّن معطيات المخطط (4) عند حساب الفرق المحدد بين الهجن المدروسة من حيث قيم الكلوروفيل الكلي T، تفوق الهجن 322 و320 و202 بمعنوية عالية على بقية الهجن دون وجود فرق معنوي فيما بينها، وتفوق الهجن 231

و233 و243 بدلالة إحصائية عالية على الهجن 240-217-208-220-210-203-200-204-201 دون وجود فرق معنوي فيما بينها.

الاستنتاجات والتوصيات:

نخلص من هذه الدراسة إلى الاستنتاجات الآتية:

- كان نشاط أنزيم البيروكسيداز في الأفراد الهجينة الناتجة من الأم زفير أعلى منه في الأفراد الهجينة الناتجة من الأم اليوسفي كليوباترا.
- تتباين الهجن في محتواها من الكلوروفيل الكلي، وقد سجلت الهجن ذات الأرقام 322 و320 (الأم زفير) و202 (الأم كليوباترا) أعلى قيمة للكلوروفيل الكلي مقارنة مع بقية الهجن.

ونوصي نتيجة هذه الدراسة بالآتي:

- متابعة الدراسة على الأفراد الهجينة التي أبدت تحملاً لإجهاد البرد الشديد (10−)مْ، ليصار بالنهاية إلى اعتماد المناسب منها في برامج الإكثار المحلية.
- متابعة الدراسة على تصالبات أخرى بهدف انتخاب أصول تتحمل ارتفاع نسبة الكلس الفعال في التربة، وغيرها من العوامل المحددة لزراعة الحمضيات في سورية.

References:

1. AKGOL, M; O. SIMSEK; D. DONMEZ and Y. A. KACAR. *On Overview of In Vitro Haploid Plant Production in Citrus*. American. Journal of Plant Biology,Vol:2(5-1), 2017, P19-23.
2. AMAYA, I; MA. BOTELLA; D. CALLE; M. MEDINA; A. HEREDIA; R. BRESSAN; P. HASEGAWA; M. QUESADA; V. VALPUESTA. *Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase*. Febs Lett 457: 80-84.1999
3. ANDREWS, J; S. ADAMS; K. BURTON; C. Evered. *Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth*. J Exp Bol 53. 2002. 2185-2191.
4. BRITTON, G. *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge University Press.1983. 133–140.
5. CASTLE, W.S. *Citrus Rootstocks*. (Eds. Rom. R.C and R.F. Carlson.).John Wiley and Sons, New York. USA, 1987.
6. COSTACHE, M, A; G, Campeanu. and G, Neata. *Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables*. Romanian Biotechnolo. Letters, 17(5), 2012, 7702–7708
7. DAVIES, F. S. and L. G. ALBRIGO. *Citrus Crop Production Science in Horticulture 2. USA, UK, CAB, International*. Printed by Red Wood Books. Wiltshir. UK, 1994, P(73-107).
8. ELKHATEEB, A. *Effect of calcium carbonate in the soil on growth and mineral content of some citrus rootstock seedlings.* ph.d thesis, horticulture factuly, tishreen university, 2001, P219.

9. ELKHATEEB, A. *The effect of five citrus rootstocks on the growth productivity and quality of orange fruits Valencia Orange.* Basil Al-Assad Journal for Engineering Sciences, V25, 2009, P 65-85.

10. ELKHATEEB, A; MOHAMAD, M; ALI, Z. *The effect of eight citrus origins on the growth and production characteristics of Clementine 88*. Twelfth Research Conference of General Commission For Scientific Agriculture Research (GCSAR), 2018.

11. FADLIAH, Z.G. *Effect of different Cations in the irrigation water on growth, mineral content, and som organic constituents of Sour orange and Cleopatra mandarin seedlings*. Ph.D. Thesis. Fac. Agric. Alex. Univ. A.R.E. 1977.

12. FAN, J; and J. REN. *Antioxidant Responses and Gene Expression in Bermudagrass under Cold Stress*. J. Amer. Soc. Hort.Sci. 139(6), 2014, 699–705.

13. GALLASCH, P. T. *Chilean Citrus Industry: Rootstocks*. SARDI Citrus Information. SARDI Exporting South Australian Research and Innovation Wordwide, 1999.

14. GOGOI, M and M, BASUMATARY. *Estimation of the chlorophyll concentration in seven Citrus species of Kokrajhar district*, BTAD, Assam, India. Tropical Plant Research, 5(1), 2018, 83-87.

15. ALTUNKAYA, A and V.GOKMEN. *Purification And Characterization Of Polyphenol Oxidase, Peroxidase And Lipoxygenase From Freshly Cut Lettuce (L.Sativa).* Food Technol. Biotechnol. 49(2), 2011, 249-256.

16. HUGHES, M.A. and M.A. DUNN. *The molecular biology of plant acclimation to low temperature*. J. Expt. Bot. 47, 1996, 291–305.

17. JANSEN, MA; R. NOORT; My. TAN; E. PRINSEN; L. LAGRIMINI; R. THORNELEY. *Phenol oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress*. Plant Physiol 126, 2001, 1012-1023.

18. LAHAI, M.T; I.J. EKANAYAKE and J.B. GEORGE. *Leaf chlorophyll content and tuberous root yield of cassava in inland valley*. African J. Crop Sci. 11, 2003, 107–117.

19. LEVITT, J. *In responses of plants to environmental stress Chilling, freezing, and high temperature stress*. Freezing resistance Types, measurement and changes. Academic Press, New York, NY. In: Levitt, J. (ed.). 1, 1980. 137–141.

20. QUIROGA, M; C. GUERRERO; M. BOTELLA; A. BARCELO; I. AMAYA; M. MEDINA; F. ALONSO; S. FORCHETTE; H. TIGIER; V. VALPUESTA. *A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin*. Plant Physiol, 122, 2000, 1119-1128.

21. HUTCHISON, D.J. *Influence of rootstock on the performance of Valencia sweet orange*. Proc International of the Society of Citriculture, Vol: 2, 1977, P523-525.

22. LEVITT, J. *In responses of plants to environmental stress*. Freezing resistance—Types, measurement and changes. Academic Press, New York, NY Chilling, freezing, and high temperature stress In: Levitt, J. (ed.), (1), 1980, 137–141.

23. MANNER, H. I; R. S. BUKER; V. E. SMITH; D. WARD and C. R. ELEVITCH. *Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat)***.** Species Profiles for Pacific Island Agroforestry, 2(1):2006, P2-35.

24. MOHAMMADIAN, M.A; Z.K. LARGANI and R.H. SAJEDI. *Quantitative and qualitative comparison of antioxidant activity in the flavedo tissue of three cultivars of citrus fruit under cold stress*. Austral. J. Crop Sci. 6, 2012, 402–406.

25. MINISTRY OF AGRICULTURE, Citrus Office, Tartous. Statistics for the season 2018.

26. NAVA AYALA, J and A. VILLEGAS MONTER. *Nursery performance of rootstocks tolerant to citrus tristeza. Proceedings of the Interamerican Tropical Horticulture*. Vol:38:P86 – 89, Hort. Abs. 66 (11), 1994, P98-78.

27. PASSARDI, F; C. COSIO; C. PENEL; C. DUNAND. *Peroxidases have more functions than a Swiss army knife*. Plant Cell Rep 24, 2005, 255-265.

28. PORRA, R. J. *Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae*. In: Scheer H (ed) Chlorophylls. 1991, 31–57.

29. ROISTACHER, C. N. *Should we introduce protective isolates of citrus Tristeza virus? Citrograph*. 1992, P5 – 9.

30. SWINGLE, W.T and P. C. REECE. *The botany of citrus and its wild relatives*. In Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, editors. The Citrus Industry, Berkeley: University of California Press. 1967, P389-390.

31. TRIPATHI A. K. and M. GAUTAM. *Biochemical parameters of plants as indicators of air Pollution*, J. Environ. Biol, 28, 2007, 127–132.

32. VICAS, S. I; V. LASLO; S. PANTEA. and G. BANDICT. *Chlorophyll and carotenoids pigments from Mistletoe (Viscum album) leaves using different solvents*, Fascicula Biol.(2) 2010, 213–218.

33. WANG, L. and Q. CAI. *Impacts of cold stress on activities of sod and pod of rice at seedling stage*. Hunan Agr. Sci, 11, 2011, 56–58.

34. YELENOSKY G *Cold hardening 'Valencia' orange trees to tolerate -6.70C without injury*. J Am Soc Hort Sci, Vol: 103, 1978, P:449-452.

35. ZHU, J; C. DONG, and J. ZHU. *Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation*. Curr. Opin. Plant Biol. 10, 2007, 290–295.

36. ZHU, S; B. WU; Y. MA; J. CHEN and G. ZHONG. *Obtaining citrus hybrids by in vitro culture of embryos from mature seeds and early identification of hybrid seedlings by allele-specific PCR*. Scientia horticulturae, Vol: 161, 2013, P300-305.

37. ZHU, S; F. WANG; W. SHEN; D. JIANG and Q. HONG. *Genetic diversity of Poncirus and phylogenetic relationships with its relatives revealed by SSR and SNP/InDel markers*. Acta Physiol Plant, Vol: 37, 2015, P:141.

38. ZIA, M.A; M. KOUSAR; I, AHMED; H. IQBAL and R. ABBAS. *Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds*. African Journal of Biotechnology. (10), 2011, 33.