



در
پژوهش‌های سازندگان

زراعت و باغبانی شماره ۷۸، بهار ۱۳۸۷

اثر تیمارهای پس از برداشت کلسیم بر پوست فرورفتگی میوه لیموی (*Citrus limon* (L.) Burm) لیسبون در دمای سرمازدگی: یک بررسی بافت‌شناختی

• محمدرضا صفی‌زاده

استادیار بخش تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب

• مجید راحمی

استاد بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی

• هما رجایی

دانشیار بخش زیست‌شناسی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: شهریورماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: خردادماه ۱۳۸۶

Email: Safizade @ shirazu. ac.ir

چکیده

با هدف کاهش آسیب سرمازدگی پس از برداشت و ارزیابی بافت‌شناختی سرمازدگی و مقاومت به آن، لیموهای لیسبون قبل از اینکه به مدت ۶ و ۱۲ هفته در دمای ۱/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد و یک هفته اضافه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند، با محلول‌های تا ۷/۵ درصد (W/V) کلرور کلسیم توسط غوطه‌وری (۱۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۵ دقیقه) یا نفوذ در خلاء (۱۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۳- کیلو پاسکال، به مدت ۱۰ دقیقه) تیمار شدند. پس از ۱۲ هفته نگهداری، تیمارهای غوطه‌وری در ۳ درصد کلرور کلسیم و نفوذ در خلاء با ۱/۵ درصد کلرور کلسیم موثرترین بودند و شدت پوست فرورفتگی را به ترتیب ۵۸/۹ و ۵۳/۲ درصد کاهش دادند. پوست فرورفتگی به صورت تخت شدن پاراننشیم و فرو ریختن اپیدرم و تعداد متغیری از لایه‌های سلولی زیر اپیدرم که بین غده‌های روغنی گسترده شده بود، بروز نمود. اولین علائم صدمه سلولی با سلول‌های فرو رفته در بالای غده‌های روغنی و تراوش جانبی محتویات غده‌های روغنی مرتبط بودند، احتمالاً نشان می‌دهد که منشاء لایه‌های سلولی صدمه دیده، پارگی غده روغنی می‌باشد. دیواره‌های سلولی اپیدرم، زیر اپیدرم و پاراننشیم میوه‌های تیمار شده با کلسیم بعد از نگهداری در دمای سرد رنگ بیشتری گرفتند که احتمالاً شاهدی برای ورود کلسیم به داخل میوه می‌باشد. این نتایج با نقش کلسیم در چسبندگی سلول به سلول و ویژگی‌های استحکام در گیاهان هم‌خوانی داشتند.

کلمات کلیدی: *Citrus limon* L.، پوست فرورفتگی، تیمارهای پس از برداشت کلسیم، بافت‌شناختی

Pajouhesh & Sazandegi No 78 pp: 88-95

Effect of postharvest calcium treatments on peel pitting of Lisbon Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) fruit at chilling temperature: A histological study

By: M.R. Safizadeh, M. Rahemi, and H. Rajaie, Assistant Professor Department of Plant Production, College of Agriculture and Natural Resources of Darab, Professor Department of Horticulture and Associate Professor Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran, Respectively

To reduce postharvest chilling injury and histological evaluation of chilling and resistance, Lisbon lemons were treated with CaCl₂ solutions up to 7.5% (W/V) by dipping (15 °C, 25 min.) or vacuum infiltration (15 °C, -33 kPa, 10 min.) before storage at 1.5 °C and 85-90 % RH for 6 and 12 weeks and 1 additional week at 20 °C. After 12 weeks storage, dipping in 3% CaCl₂ and vacuum infiltration with 1.5% CaCl₂ were the most effective treatments and reduced the severity of pitting by 58.9 and 53.2 %, respectively. Pitting was manifested by parenchyma flattening and collapse of epidermal and a variable number of sub-epidermal cell layers extending between oil glands. The first signs of cellular damage were associated with collapsed cells immediately above oil glands, and lateral release of oil gland contents possibly indicating that the injured cell layers originated from oil gland disruption. Epidermal, sub-epidermal and parenchyma cell walls of Ca-treated fruits stained strongly following cold temperature storage, possibly an evidence for Ca entry into fruit. These results were consistent with the role of calcium in cell-to-cell adhesion and tissue coherence properties in plants.

Keywords: *Citrus limon* L., Pitting, Postharvest calcium treatments, Histology

مقدمه

در ارتباط با کاهش نابسامانی‌های پوست در دمای سرمازدگی، نارنگی فورچون نسبت به کاربرد قبل از برداشت کلسیم واکنش مثبتی نشان داده است (۲). در یک آزمایش دیگر پاشیدن قبل از برداشت نیترات کلسیم و پتاسیم باعث بهتر شدن عناصر معدنی پوست نارنگی در هنگام برداشت شده و به طور معنی‌دار نابسامانی‌های پوست را بعد از نگهداری در دمای ۴ و ۸ درجه سانتی‌گراد کاهش داده است (۹). در ارتباط با سرمازدگی، مطالعات نسبتاً کمی در زمینه واکنش‌های سیتولوژیکی گیاهان در مقایسه با تحقیقات بیوشیمیایی انجام گرفته است (۲۴). مطالعات بافت شناختی میوه‌های لیمو رقم Eureka در شرایط سرمازدگی نشان داد که زخم‌های سطحی ایجاد شده بزرگ (۲ تا ۳ سانتی‌متر) و شبیه به صدمه Oleocellosis می‌باشند، ولی هیچ گونه شباهتی به زخم‌های ناشی از پوسیدگی نداشتند. هر چند غده‌های روغنی^۴ تخت شده بودند، ولی لایه‌های سلولی بالای غده‌های روغنی دست نخورده و صاف بودند. قهوه‌ای شدن بافت در اثر تغییر رنگ ناحیه اطراف غده‌های روغنی بروز نمود (۲۳). تاکنون کاربرد پس از برداشت کلسیم جهت تعدیل سرمازدگی لیمو گزارش نشده است. بنابراین، اهداف این مطالعه شامل بررسی اثر تیمارهای پس از برداشت کلسیم به روش غوطه‌وری و یا نفوذ در خلاء بر میزان سرمازدگی میوه‌های لیمو، تعیین غلظت کلسیم موثر و همچنین، ارزیابی بافت‌شناختی پوست لیمو و اثرات این تیمارها بعد از انبار سرد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تیمارها و شرایط انبار

میوه‌های لیمو (*Citrus limon* (L.) Burm) رقم لیسبون در مرحله سبز متمایل به زرد از درختان ۲۰ ساله باغ مرکز تحقیقات حاجی‌آباد

سازمان جهانی خواربار و کشاورزی (فائو) در تازه‌ترین گزارش خود، رتبه ایران با تولید حدود ۴ میلیون تن مرکبات جزء ۲۰ کشور برتر دنیا معرفی نموده است. بر اساس این گزارش ایران سومین تولیدکننده لیمو ولایم در جهان است (۱۰).

در طول زمان برداشت مقداری از این میوه‌ها به بازارهای داخلی و بقیه در سردخانه نگهداری و سپس در بهار تا اوایل تابستان مورد مصرف قرار می‌گیرند. سرد کردن به احتمال زیاد قدیمی‌ترین و رایج‌ترین روش است که حداقل در کشورهای در حال توسعه برای طولانی کردن عمر فراورده فاسد شدنی مورد استفاده قرار می‌گیرد تا عمر فرآورده را طولانی نمایند. لیمو و ولایم در مقایسه با سایر مرکبات نسبت به دماهای سرد حساس هستند.

لیموها بطور معمول در دمای ۱۳ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند و نگهداری در این دماها برای مدت سه ماه یا بیشتر منجر به پوسیدگی زیاد می‌گردد. میوه‌های باقی مانده نیز چروکیده و رنگ پریده و در نتیجه بازار پسنندی آن‌ها کاهش می‌یابد. نگهداری آن‌ها هم در دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد باعث آسیب سرمازدگی^۱ در آن‌ها می‌شود که به صورت فرو رفتگی پوست^۲، قهوه‌ای شدن داخلی و تغییر در ترکیب آب میوه بروز می‌نماید (۵، ۱۲). کاربرد قبل و پس از برداشت کلسیم بر روی تعدادی از محصولات باغبانی نابسامانی‌های مربوط به پیری، رسیدگی، حساسیت به پاتوژن‌ها و آسیب‌پذیری به سرمازدگی را با کاهش یا به تاخیر انداختن فروپاشی دیواره سلولی، پایدار نمودن غشاء و طولانی نمودن ظرفیت انتقال پیام^۳ (دریافت و احساس شرایط محیطی سخت و انجام واکنش‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای ایجاد مقاومت) کاهش داده است (۱۱، ۱۳، ۱۹).

کدام از روش‌های کاربرد، مورد بررسی بافت‌شناختی قرار گرفتند. در هر تیمار نیز ۳ میوه به عنوان تکرار در نظر گرفته شدند. آماده‌سازی نمونه‌های بافتی به روش Raymond و همکاران (۲۰) به شرح زیر انجام شد:

تثبیت و آب‌گیری

برش‌های (۳/۰ × ۳/۰ × ۵/۰ سانتی‌متر) بافت پوست (شامل فلاویدو و آل‌بیدو) پس از جدا کردن از میوه‌ها در تثبیت‌کننده^۸ شامل ۹۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد، ۵ میلی‌لیتر اسید استیک غلیظ و ۵ میلی‌لیتر فورمالین قرار گرفتند (۲۳).

نمونه‌های جدا شده برای مدت ۸ الی ۱۲ هفته در تثبیت‌کننده باقی ماندند. پس از اینکه هوا توسط خلاء از نمونه‌ها خارج شد، در محلول ۷۰ درصد TBA^۹ برای مدت ۱۰ ساعت و سپس در محلول‌های ۸۵ و ۹۵ درصد TBA هر کدام برای مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس نمونه‌های بافت برای ۳ مرتبه در محلول ۱۰۰ درصد TBA به ترتیب برای مدت ۲، ۲ و ۱ ساعت قرار گرفتند. پس از خروج نمونه‌ها از TBA برای مدت ۲ ساعت در ترکیب ۱:۱ TBA و روغن پارافین قرار گرفتند و سرانجام، در پارافین (جامد) با نقطه ذوب ۵۸ درجه سانتی‌گراد قالب‌گیری شدند.

تهیه برش میکروسکوپی

بافت‌های فرو برده شده در پارافین در قطعه‌هایی با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر بر روی بلوک‌های چوبی قرار گرفتند و توسط میکروتوم چرخشی (Model ۸۲۰، Spencer, USA) به ضخامت ۱۱ میکرون از آن‌ها برش تهیه شد. برش‌ها توسط آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد بر روی لام‌های شیشه‌ای تثبیت شدند.

رنگ‌آمیزی

لام‌های شیشه‌ای حامل برش بافت در ظرف‌های رنگ‌آمیزی حاوی ۱۰۰ درصد زایلین برای دو مرتبه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند تا پارافین برطرف شود.

سپس اسلایدها به ترکیب ۱:۱ زایلین و ۱۰۰ درصد اتانول برای مدت ۵ دقیقه و سپس به ترتیب به ۱۰۰، ۹۵، ۷۰، ۵۰ و ۳۰ درصد اتانول هر کدام برای مدت ۵ دقیقه انتقال یافتند و سپس با محلول ۱ درصد سافرانین برای مدت ۸ ساعت رنگ‌آمیزی گردیدند. بعد از اینکه سافرانین با آب مقطر و فرو بردن‌های متوالی در اتانول (عکس حالت قبل) برطرف شد، برش‌های بافت با فاست‌گرین به مدت یک دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. محلول فاست‌گرین با حل کردن ۱ گرم فاست‌گرین در ۱۲۵ میلی‌لیتر کلاوویل به علاوه ۱۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد تهیه گردید.

لام‌ها بعد از اینکه به طور متوالی به ۹۵ و ۱۰۰ درصد اتانول انتقال یافتند، با مخلوط ۱:۱ زایلین و ۱۰۰ درصد اتانول برای مدت ۳ دقیقه تیمار شدند.

سرانجام، لام‌ها در زایلین ۱۰۰ درصد قرار گرفتند و سپس با کانادا بالزام قاب شدند.

بندرعباس در ۱۵ آذر ماه سال ۱۳۸۳ با دست برداشت شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه فیزیولوژی پس از برداشت بخش علوم باغبانی دانشگاه شیراز، در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در طول مدت ۲ روز پس از برداشت میوه‌های شسته شده که اندازه و ظاهر یکنواختی داشتند، به طور تصادفی به دو گروه ۸۴۰ عددی تقسیم شدند. هر گروه به یکی از روش‌های کاربرد غوطه‌وری و نفوذ در خلاء اختصاص یافت. هر گروه روش کاربرد نیز به هفت زیر گروه ۱۲۰ عددی تقسیم گردید و تیمارهایی به شرح زیر بر روی هر زیر گروه به کار رفت. بدون تیمار، صفر، ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶ و ۷/۵ درصد (W/V) محلول کلرور کلسیم (CaCl_۲ · ۲H_۲O)؛ در آب مقطر به علاوه ۰/۰۲۵ درصد ماده‌تر کننده (سیتوت^۵، ماده موثره ۱۰۰٪ Alkylary polyglycol ether).

برای انجام روش غوطه‌وری، میوه‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۵ دقیقه در محلول‌های کلرور کلسیم غوطه‌ور گردیدند. برای انجام روش نفوذ در خلاء، میوه‌ها در آن خلاء (Model B-۱۸۳۴، Gallen Kamp, England) تحت فشار ثابت ۳۳- کیلو پاسکال برای مدت ۱۰ دقیقه (۱۳) در محلول‌های کلرور کلسیم در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد فرو برده شدند.

پس از کاربرد تیمارها، میوه‌ها قبل از اینکه با هوا خشک شوند با آب مقطر ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ثانیه آبکشی شدند. هر زیر گروه (۱۲۰ میوه) سپس به دسته‌های ۲۰ تایی میوه تقسیم شدند و هر دسته در یک کیسه تور پلاستیکی قرار گرفت. برای هر تیمار و زمان انبار سه کیسه میوه (تکرار) اختصاص داده شد. کیسه‌های میوه به انبار سرد منتقل شدند و برای مدت ۶ و ۱۲ هفته در دمای ۰/۲ ± ۱/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد نگهداری شدند. در پایان دوره انبار، میوه‌ها برای مدت یک هفته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۸۰ درصد قرار گرفتند تا تقلیدی از دوره عرضه به بازار (SMP)^۶ باشد. تمام ارزیابی‌ها بعد از دوره انبار و SMP انجام گرفتند.

تخمین صدمه سرمازدگی

پوست فرورفتگی و قهوه‌ای شدن سطحی جزء سرمازدگی محسوب شدند، اما نمره کل داده شده به صدمه سرمازدگی ترکیبی از هر دو نوع علائم بود. نمره صدمه سرمازدگی به صورت صفر (بدون صدمه)، ۱ (ملایم)، ۲ (متوسط) و ۳ (شدید) گروه‌بندی گردید و میزان شاخص سرمازدگی^۷ به شرح زیر محاسبه گردید (۹):

$$\text{تعداد میوه هر گروه} \times \text{نمره سرمازدگی هر گروه} = \sum \text{شاخص سرمازدگی کل میوه‌های بررسی شده}$$

بررسی ساختاری

انتخاب نمونه‌ها

برش‌های میکروسکوپی میوه در زمان‌های قبل از انبار، پس از ۶ و ۱۲ هفته تهیه شدند.

به دلیل کثرت تیمارها، نمونه‌های میوه شامل بدون تیمار، تیمار ۳ درصد (غلظت کم) و ۷/۵ درصد (غلظت زیاد) کلرور کلسیم برای هر

طرح آماری

وقوع سرمازدگی نیز بیشتر است (۵). نتایج با این یافته‌ها مطابقت دارند. زمان برداشت لیموها در آذر ماه، یعنی بین برداشت زود در آبان ماه و برداشت دیر در دی ماه صورت گرفت، چون میوه‌ها از درجه بلوغ بالاتری برخوردار بوده‌اند و همچنین، نگهداری کوتاه مدت باعث شده‌اند که سرمازدگی کمتر توسعه پیدا کند.

در روش غوطه‌وری تمام تیمارهای کلرور کلسیم شدت سرمازدگی را نسبت به آب مقطر و بدون تیمار کاهش دادند. داده‌ها نشان می‌دهند که غلظت‌های کمتر یا بیشتر از ۳ درصد کلرور کلسیم در تعدیل سرمازدگی کمتر موثر هستند و این تیمار (۳ درصد کلرور کلسیم) شدت سرمازدگی را نسبت به شاهد به میزان ۵۸/۹ درصد کاهش داد. با روش نفوذ در خلاء نیز تمام تیمارهای کلرور کلسیم شدت سرمازدگی را نسبت به آب مقطر و بدون تیمار بطور معنی دار کاهش دادند. تیمار ۱/۵ درصد کلرور کلسیم در بین تیمارها کمترین سرمازدگی را نشان داد و شدت سرمازدگی را نسبت به شاهد به میزان ۵۳/۲ درصد کاهش داد. در این روش کاربرد نیز وقتی که غلظت کلرور کلسیم افزایش یافت، تعدیل سرمازدگی منفی‌تر شد. بر اساس این نتایج احتمالاً در لیمو اولاً فرآیند فیزیولوژیکی مقاومت به سرمازدگی در یک دامنه باریک از میزان کلسیم پوست ایجاد می‌گردد، به نحوی که کمتر از این مقدار بحرانی تأثیر کم و بیشتر از آن اثر منفی دارد. ثانیاً غلظت بهینه کلسیم تحت تأثیر روش کاربرد نیز قرار می‌گیرد. کاربرد کلسیم برای کنترل سرمازدگی مرکبات به طور عمده بر روی نارنگی فورچون و به روش قبل از برداشت مورد مطالعه قرار گرفته است. Ait-Oubahou و همکاران (۲) با کاربرد قبل از برداشت فرمول‌های مختلفی از ۱ یا ۲ درصد نیترات کلسیم، سرمازدگی نارنگی فورچون را به میزان ۶۰-۴۰ درصد کاهش دادند. El-hilali و همکاران (۹) نیز با کاربرد قبل از برداشت فرمول‌های

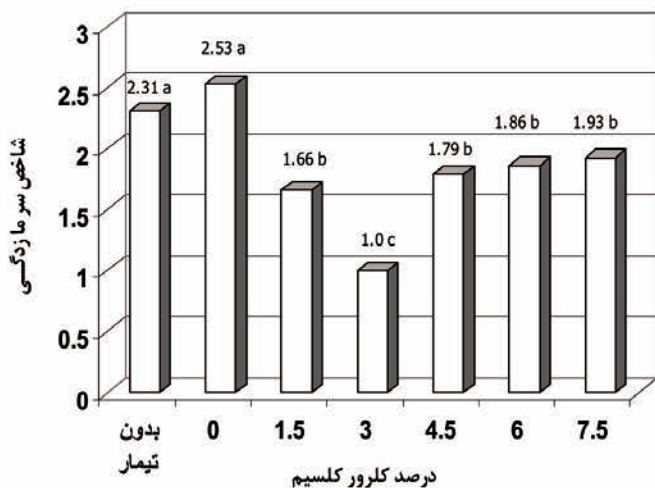
این آزمایش به صورت اسپلیت-اسپلیت پلات که شامل عامل زمان انبار به عنوان تیمار اصلی در دو سطح ۶ و ۱۲ هفته، عامل روش کاربرد کلرور کلسیم به عنوان تیمار فرعی در دو سطح و عامل غلظت کلرور کلسیم به عنوان تیمار فرعی در هفت سطح در یک طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نتایج شاخص سرمازدگی توسط نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $p = 5\%$ مقایسه شدند.

نتایج و بحث

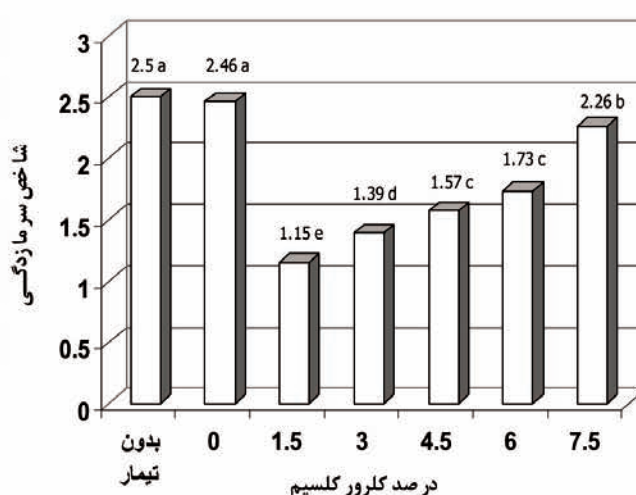
در انتهای دوره SMP میوه‌هایی که به مدت ۶ هفته در دمای سرد نگهداری شده بودند، سرمازدگی نسبتاً کمی بروز دادند و برای هر دو روش، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای کلرور کلسیم روی شاخص سرمازدگی مشاهده نشد. میانگین شاخص سرمازدگی میوه‌ها تا این مدت در روش غوطه‌وری و نفوذ در خلاء به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۷۸ برآورد گردید.

پس از ۱۲ هفته نگهداری میانگین شاخص سرمازدگی میوه‌ها بطور معنی دار تغییر کرد و در روش غوطه‌وری و نفوذ در خلاء به ترتیب به مقدار ۱/۸۸ و ۱/۸۷ افزایش یافت ($p = 5\%$). در هر دو زمان، اختلاف معنی‌داری بین روش‌های کاربرد بر شاخص سرمازدگی مشاهده نشد. میوه‌هایی که به مدت ۱۲ هفته نگهداری شده بودند، به میزان زیاد سرمازدگی را بروز دادند و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار گردید (نمودار ۱). به نظر می‌رسد که وقوع سرمازدگی نسبتاً کم منجر به این نتیجه شده، نه اینکه تیمارها موثر نبوده‌اند. گزارش شده که لیمو هر چه در زمان برداشت بالغ‌تر باشد، کمتر مستعد پوست فرورفتگی ناشی از سرمازدگی می‌باشد (۱۲) و هر چه طول مدت انبار سرد بیشتر باشد،

غوطه‌وری



نفوذ در خلاء



نمودار ۱- اثر غلظت‌های کلرور کلسیم بر صدمه سرمازدگی لیموی لیسبون. به نحوی که تحت تأثیر روش‌های کاربرد کلرور کلسیم قرار گرفته است. میوه‌ها برای ۱۲ هفته در ۱/۵ درجه

سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد و یک هفته اضافه در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

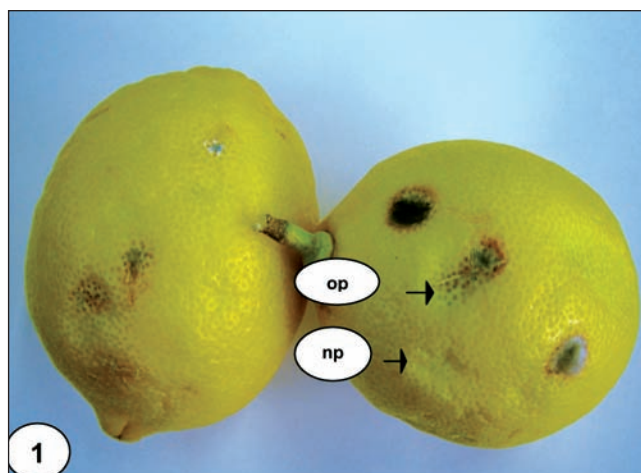
ستون‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند، توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

روغنی به پوست فرورفتگی گریپ فروت در دمای سرمازدگی (۱۷) و همچنین، گریپ فروت (۳) و نارنگی (۱۸) در دمای بدون سرمازدگی شبیه بود.

مشاهده نقاط پوست فرورفتگی در حالت پیشرفته مشخص نمود که لایه‌هایی که سلول‌هایی غده روغنی را احاطه می‌کنند، به موازات اپیدرم فرو رفته‌اند و تا حدود ۲۰-۱۰ لایه تخت شده‌اند. فرورفتگی کوتیکول همسان با فرورفتگی ناحیه اپیدرم و زیر اپیدرم گسترش داشت. هم چنان که سرمازدگی شدت یافت، لایه‌های سلولی فلاویدو در پایین غده روغنی و در مجاورت ناحیه‌های عمیق‌تر شکسته و چروکیده شدند. سرانجام، همزمان با قهوه‌ای شدن فلاویدو، غده‌های روغنی بد شکل و شروع به فروپاشی کردند (تصویر D۲). این مشاهدات نشان می‌دهد که احتمالاً منشاء اولیه لایه‌های سلولی صدمه دیده، پارگی غده روغنی می‌باشد و به دنبال آن، تراوش روغن‌های سمی به بافت پاراننشیم اطراف منجر به توسعه صدمه سرمازدگی و بروز پوست فرورفتگی گردیده است. فرو رفتن اپیدرم و زیر اپیدرم در ناحیه انتهایی غده روغنی را می‌توان به خروج محتویات غده روغنی نسبت داد. D-limonene یکی از ترکیبات اصلی روغن‌های ضروری غده‌های روغنی مرکبات می‌باشد که اگر با بافت‌هایی که روغن‌های ضروری را سنتز نمی‌کنند، تماس داشته باشد، سمی محسوب می‌شود و باعث نابودی سیستم غشاء می‌گردد (۲۲). شکسته شدن تونوپلاست در سلول‌های صدمه دیده، اکسیداسیون ترکیبات فنلی را تشدید می‌کند و محصول اکسیداسیون نیز ممکن است باعث آسیب رساندن به وظیفه سایر اندامک‌ها و غشاء گردد (۱). Obenland و همکاران (۱۵، ۱۶) نیز از بعد بیوشیمیایی اثبات نمودند که پارگی غده‌های روغنی در دمای سرمازدگی منجر به تراوش ترکیبات خاصی مثل D-limonene به بافت‌های اطراف و احتمالاً باعث توسعه صدمه سرمازدگی می‌گردد.

چند روز پس از بروز پوست فرورفتگی نقاط صدمه دیده قهوه‌ای رنگ شدند. چون سلول‌های تحت تأثیر قرار گرفته فشرده می‌شوند، به نظر می‌رسد سلول‌ها محتویات خودشان را از دست می‌دهند و چون محتویات سلولی و غده‌های روغنی به داخل فضای بین سلولی و اطراف ریخته می‌شود. همان گونه که قبلاً حدس زده شده است، اکسیداسیون آنزیمی این ترکیبات ممکن است علت بعدی قهوه‌ای شدن پوست باشد (۱۴).

مطالعه میکروسکوپی نمونه‌ها قبل از انبار سرد نشان داد که بین میوه‌های تیمار شده با کلسیم و آن‌هایی که تیمار نشده‌اند، تمایز ویژه بافتی وجود ندارد، اما بررسی نمونه‌ها پس از ۱۲ هفته نگهداری در دمای سرد نشان داد میوه‌هایی که توسط هر دو روش با کلرور کلسیم تیمار شده‌اند، به ویژه در غلظت‌های زیاد، دیواره سلول‌های اپیدرم، زیر اپیدرم و پاراننشیم اطراف غده‌های روغنی رنگ بیشتری گرفته‌اند. به نحوی که نسبت به نمونه‌های بدون تیمار قابل تشخیص بودند (تصویر ۳). رنگ‌پذیری دیواره سلولی بافت‌ها احتمالاً شاهدی بر نفوذ کلسیم به درون پوست می‌باشد، اما این رنگ‌پذیری قبل از نگهداری در دمای سرد قابل تشخیص نبود. حدس زده می‌شود تغییرات بیوشیمیایی که در طی نگهداری در دمای پایین انجام گرفته تولید فرآورده‌هایی نموده است که متعاقباً با کلسیم نفوذ یافته تشکیل ترکیباتی داده‌اند که با

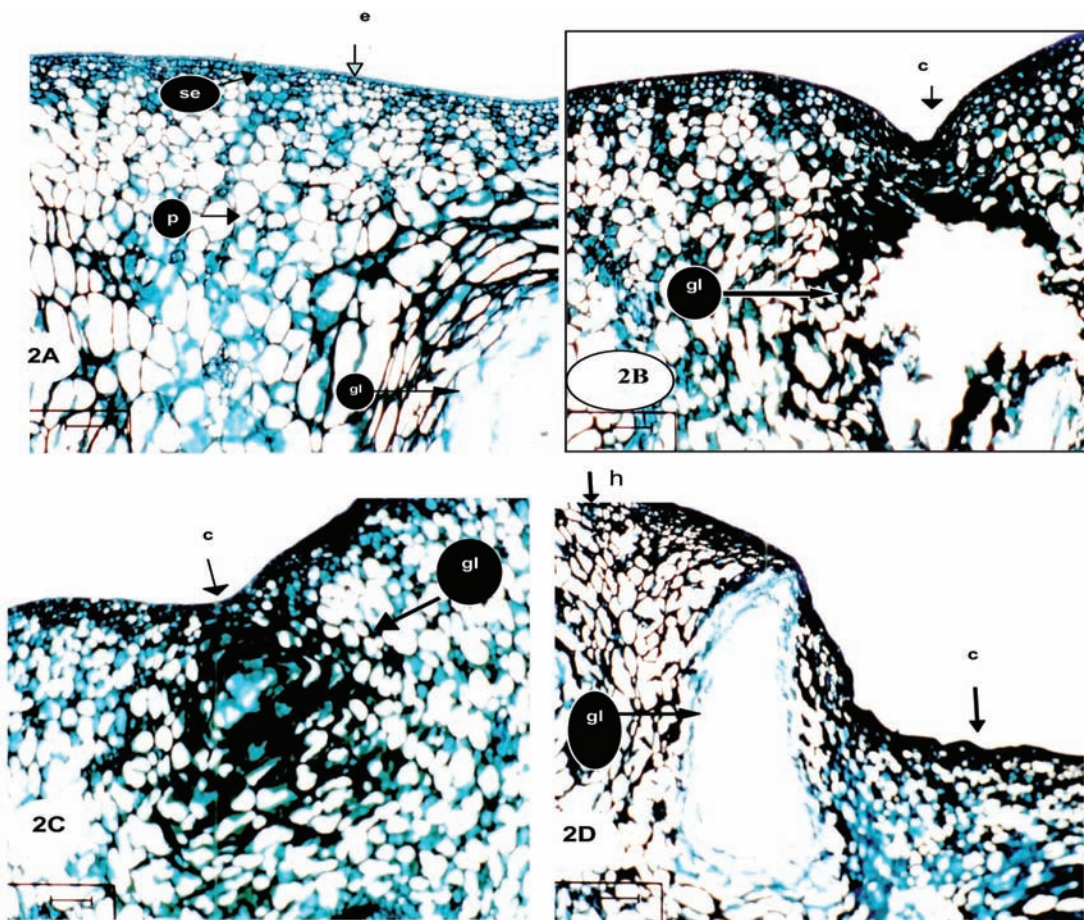


تصویر ۱- صدمه سرمازدگی بر روی پوست لیموی لیسبون پس از ۱۲ هفته نگهداری در ۱/۵ درجه سانتی‌گراد. (فرورفتگی نو (np)، فرورفتگی کهنه (op)).

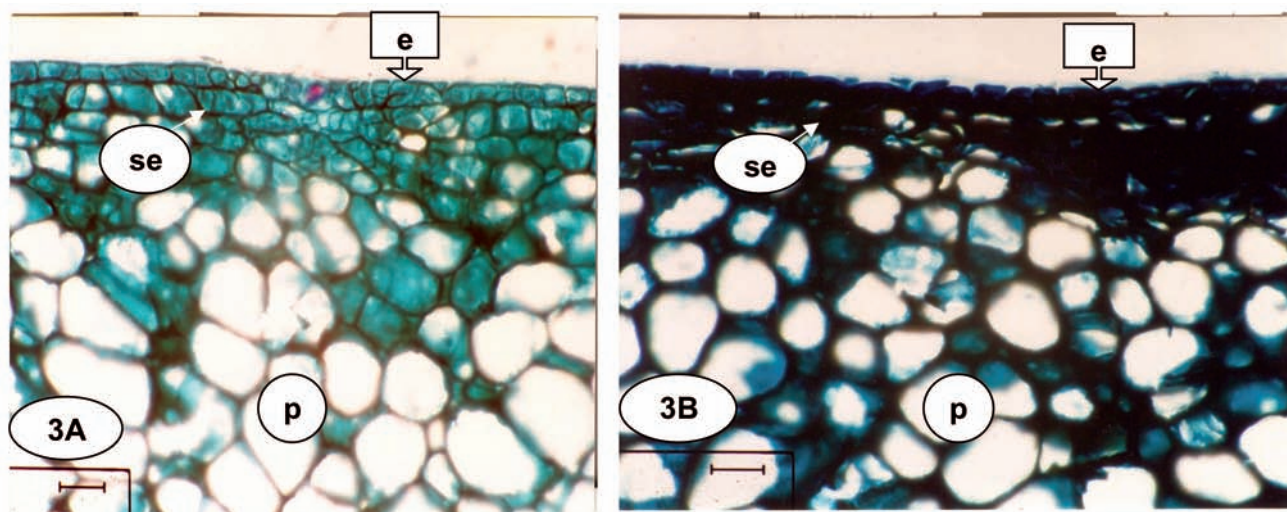
مختلفی از ۱ و ۲ درصد نیترات کلسیم، سرمازدگی نارنگی 'فورچون' را به ترتیب ۱۶ و ۱۳ درصد نسبت به شاهد تعدیل نمودند. نتایج این پژوهش علاوه بر این که نقش کلسیم را در تعدیل سرمازدگی مرکبات و سایر میوه‌ها تأیید نمود، نشان داد که کاربرد پس از برداشت کلسیم به روش غوطه‌وری و یا نفوذ در خلاء می‌تواند سرمازدگی میوه لیمو را به میزان قابل ملاحظه‌ای تعدیل نماید. این نتایج با گزارش اخیر D, Aquino و همکاران (۷) در ارتباط با کاربرد پس از برداشت کلسیم در تعدیل سرمازدگی نارنگی فورچون همخوانی دارد.

علائم سرمازدگی به صورت چند ناحیه پوست فرورفتگی به قطر ۲۰-۵ میلی‌متر که در نهایت به رنگ قهوه‌ای توسعه می‌یافتند، پس از انبار سرد و SMP بر روی پوست لیمو گسترش یافتند (تصویر ۱). علائم جزئی (۳-۱ نقطه) و کوچک‌تر پس از ۶ هفته و علائم بیشتر (۱۰-۵ نقطه) و بزرگ‌تر پس از ۱۲ هفته نگهداری در دمای سرد بر روی میوه‌ها ظاهر گشتند. این صدمه‌ها به طور مشخص با زخم‌های سطحی ناشی از سرمازدگی لیموی (۲۳) Eureka که بزرگ‌تر و صاف بودند، متفاوت بود. لیکن، با پوست فرورفتگی لیموی (Villa Franaka) (۶) و گریپ فروت (۴) بسیار شبیه بود. برش میکروسکوپی فلاویدو پوست لیموهای سالم نشان داد که اپیدرم دارای سلول‌های کوچک، فشرده و هم قطر است. پایین‌تر از اپیدرم، غده‌های روغنی به وسیله سلول‌های بیضی شکل زیر اپیدرم^{۱۱} محصور شده‌اند. سلول‌های زیرین غده‌های روغنی نیز بیضی و کروی شکل بودند. اندازه این سلول‌ها و فضای بین سلولی با عمیق‌تر شدن پوست تا حد لایه خارجی آلبیدو افزایش می‌یافت (تصویر A۲).

مطالعه بافتی نمونه‌های پوست لیمو که در دمای سرد قرار داده شده بودند نشان داد، مراحل اولیه صدمه سرمازدگی به صورت فرورفتگی جزئی در لایه فلاویدو و در ناحیه‌ای درست بالای یک غده روغنی منفرد آغاز می‌شود، به نحوی که لایه اپیدرم و زیر اپیدرم در ناحیه انتهایی غده روغنی فرو می‌رود (تصویر B۲). تراوش محتویات غده‌های روغنی به درون بافت پاراننشیم اطراف نیز در مراحل اولیه صدمه مشاهده شد (تصویر C۲). از نظر ریخت‌شناسی، فرورفتگی بافت انتهایی غده‌های



تصویر ۲- برش میکروسکوپی بخش فلاویدو پوست لیموی لیسبون. (A) میوه سالم قبل از نگهداری در دمای پایین. (B) مراحل اولیه صدمه سرمازدگی شامل فرورفتگی جزئی اپیدرم و زیر اپیدرم در ناحیه انتهایی غده روغنی. (C) مراحل اولیه صدمه سرمازدگی شامل تراوش محتویات غده روغنی به درون بافت پارانشیم اطراف. (D) مراحل پیشرفته صدمه سرمازدگی. (e) اپیدرم، (se) زیر اپیدرم، (p) پارانشیم، (c) فرورفتگی، (gl) غده روغنی، (h) قسمت سالم (x100).



تصویر ۳- برش میکروسکوپی بخش فلاویدو پوست لیموی لیسبون بعد از ۱۲ هفته نگهداری در ۱/۵ درجه سانتی گراد. (A) میوه تیمار نشده. (B) میوه تیمار شده با ۷/۵ درصد کلرور کلسیم توسط روش نفوذ در خلاء. (e) اپیدرم، (se) زیر اپیدرم، (p) پارانشیم، (x400).

at non-chilling temperatures in grapefruit is promoted by changes from low to high relative humidity during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 79-87.

4- Chalutz, E., J. Waks, and M. Schiffman-Nadel. 1985; A comparison of different citrus fruit cultivars to storage temperature. *Scientia Hort.* 25: 271-277.

5- Cohen, E., and M. Schiffman-Nadel. 1978; Storage capability at different temperatures of lemons grown in Israel. *Scientia Hort.* 9: 251-257.

6- Cohen, E., M. Shuali, and Y. Shalom. 1983; Effect of intermittent warming on the reduction of chilling injury of Villa Franka lemon fruit stored at cold temperature. *J. Hort. Sci.* 58: 593.

7- D'Aquino, S., A. Palma, F. Fronteddu, and M. Tedd. 2005; Effect of preharvest and postharvest calcium treatments on chilling injury decay of cold stored 'Fortune' mandarins. *Acta Hort.* 682: 631-637.

8- Demarty, M., C. Morvan, and M. Thellier. 1984; Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* 7: 441-448.

9- El-hilali, F., A. Ait-Oubahou, A. Remah, and O. Akhaya. 2003; Chilling injury and peroxidase activity changes in Fortune mandarin fruit during low temperature storage. *Bulg. J. Plant Physiol.* 29: 44-54.

10- FAO. 2002; A report, world agriculture: Towards 2015/2030. Food and Agricultural Organization of the United Nation, Rome. Available at: www.fao.org/english/newsroom/news/2002/7833-en.html. Accessed August 30, 2004.

11- Fergusson, I.B. and B.K. Drobak. 1988; Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *HortScience* 2: 262-266.

12- Houk, L.G., J.F. Jenner, and B.E. Mackey. 1990; Seasonal variability of the response of desert lemons to rind injury and decay caused by quarantine cold treatments. *J. Hort. Sci.* 65: 611-617.

13- Joyce, D.C., A.J. Shorter, and P.D. Hockings. 2001; Mango fruit calcium levels and the effect of postharvest calcium infiltration at different maturities. *Scientia Hort.* 91: 81-85.

14- Lafuente, M.T. and J.M. Sala. 2002; Abscisic acid and the influence of ethylene, humidity and temperature on the incidence of postharvest rindstaining of Navelina orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 49-57.

15- Obenland, D.M., D.C. Fouse, L.H. Aung, and L.G. Houck. 1996; Release of d-limonene from non-injured and

رنگ آمیزی قابل تشخیص شده‌اند. با این آزمایش، تغییرات بیوشیمیایی انجام گرفته و مکانیزم کلسیم را در فرآیند سرمازدگی نمی‌توان حدس زد. اما، با توجه به اینکه کلسیم به کار برده شده با گروه‌های کربوکسلی زنجیره پکتیک تشکیل پل های کلسیمی می‌دهد، و تشکیل پکتات کلسیم در تیغه میانی سلول‌ها را بهم می‌چسباند و باعث سفتی و استحکام بافت می‌گردد (۸) و همچنین، معلوم شده است که در شرایط استرس مثل دمای پایین پس از برداشت انبار، کلسیم در پایداری سلول و به ویژه غشاءها نقش دارد (۲۱). احتمالاً کلسیم از طریق افزایش تماس دیواره سلول‌ها باعث پایداری بیشتر بافت شده و به دنبال آن، از پارگی غده‌های روغنی پوست و بروز صدمه سرمازدگی جلوگیری نموده است.

به طور کلی، کاربرد پس از برداشت کلسیم به روش غوطه‌وری و نفوذ در خلاء در کاهش سرمازدگی میوه‌های لیمو موثر بود. اما برای استفاده تجارتي و تعیین تیمار بهینه لازم است در مورد روش کار مناسب و شرایط آن و همچنین، مطالعات بافتی در رابطه با اثر کلسیم بر تغییرات ترکیب دیواره سلولی و شناخت مکانیزم مقاومت به سرمازدگی، در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات سازمان جهاد کشاورزی حاجی آباد بندر عباس برای همکاری در تهیه میوه قدردانی به عمل می‌آید.

پاورقی‌ها

- 1 - Chilling injury
- 2 - Peel pitting
- 3 - Signal transduction
- 4 - Oil gland
- 5 - CITTOWETT, BASF, Germany
- 6 - Simulate a marketing period
- 7 - Chilling injury index
- 8 - Fixative
- 9 - Tertiary butyl alcohol
- 10 - Surface lesions
- 11 - Sub-epidermal

منابع مورد استفاده

- 1- Abe, K. 1990; Ultrastructural changes during chilling stress. In: *Chilling injury of horticultural crops*. Boca Raton, USA; C.R.C. Press, Inc. pp. 71-84.
- 2- Ait-Oubahou, A., E. El-Otmani, R. Taraf, M. Goumari, M. Talhi, E.B. Nadori, D. Ezzoubir, and M. Hanich. 2003; Effect of preharvest foliar spray of K and Ca on the incidence of Fortune mandarin fruit peel pitting in low temperature storage. *Proc. Int. Soc. Citriculture* pp. 414-416.
- 3- Alferez, F. and J.K. Burns. 2004; Postharvest peel pitting

- injured lemons treated with hot water and low temperature. J. Hort. Sci. 71: 389-394.
- 16- Obenland, D.M., D.A. Margosan, L.G. Houck, and L.H. Aung. 1997; Essential oils and chilling injury in lemon. HortScience 32: 108-111.
- 17- Petracek, P.D., W.F. Wardowski, and G.E. Brown. 1995; Pitting of grapefruit that resembles chilling injury. HortScience 30: 1422-1426.
- 18- Petracek, P.D., L. Montalvo, H. Dou, and C. Davis. 1998; Postharvest pitting of Fallglo tangerine. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123: 130-135.
- 19- Poovaiah, B.W. 1986; Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. Food Technology 40: 86-89.
- 20- Raymond, L., B. Schaffer, J.K. Brecht, and J.H. Crane. 1998. Internal breakdown in mango fruit: Symptomology and histology of jelly seed, soft nose and stem-end cavity. Postharvest Biol. Technol. 13: 59-70.
- 21- Roux, S.J. and R.D. Slocum. 1982; The role of calcium in mediating cellular functions important for growth and development in higher plants. In: Cheung, W.Y. (Ed.), Calcium and Cell Function. Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 409-453.
- 22- Sawamura, M., T. Manabe, K. Oonishi, K. Yasuoka, and H. Kusunose. 1984. Effects of rind oils and their components on the induction of rind spot of citrus species. J. Hort. Sci. 59: 575-579.
- 23- Underhill, S.J., R.L. McLaughlan, and I.L. Eaks. 1995; Eureka lemon chilling injury. HortScience 30: 309-312.
- 24- Wang, C.Y. 1982; Physiological and biochemical response of plants to chilling stress. HortScience 17: 173-186.

