

تقييم بعض هجن البرتقال ثلاثي الأوراق *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. المُنتخبة من الجيل الأول لتحمل إجهاد البرودة باستخدام بعض مؤشرات النمو والبرولين واليخضور

فينوس إبراهيم حسن*⁽¹⁾ وعلي عيسى الخطيب⁽¹⁾ وحسان يوسف خوجه⁽²⁾

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية-مركز اللاذقية ، سورية.

(2) جامعة تشرين - كلية الزراعة - قسم البساتين - سورية.

(* للمراسلة م. فينوس حسن البريد الإلكتروني venushasan80@gmail.com)

الملخص

أجريت الدراسة خلال عامي 2019-2020 في مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية، استخدم البرتقال ثلاثي الأوراق كأب (Pollen Parent) وأصلي اليوسفي كليبواترا والزفير كأب (Seed Parent)، بهدف الحصول على بذور الجيل الأول؛ واختبار تحمل الغراس الناتجة عنها لإجهاد البرد؛ زُرعت هذه البذور في أصص زراعية، ونقلت الغراس الناتجة في شباط إلى براد مضبوط الحرارة حيث تم تعريضها للبرودة بشكل تدريجي وصولاً إلى (-2) م ثم إلى (-10) م وبالنتيجة أدى الإجهاد البارد (-2) م إلى موت حوالي 50% من الغراس المختبرة، وعند تخفيض درجات الحرارة إلى (-10) م أدت إلى أضرار على الغراس المتبقية ووصلت نسبة الضرر حتى (30%) من الغرسة، ولكن استعادة هذه الغراس حياتها في موسم النمو التالي وتابعت نشاطها، تم حساب بعض مؤشرات النمو متوسط طول وقطر الغرسة وأعطت الهجن الناتجة من الأم كليبواترا أفضل النتائج خاصة الهجن (210 و 201 و 233 و 220) وصل ارتفاعها حتى 100 سم عند الهجين (210)، أما نسبة الضرر فتراوحت بين 7% عند الهجين 322 الأم زفير إلى 30% عند (210 و 204 و 200 و 203 و 202) الأم كليبواترا، وعند حساب مؤشر البرولين فقد لوحظ أن تراكم البرولين بدأ عند الإجهاد (-2) م بفروق معنوية بالمقارنة بين قبل وبعد التعرض للبرودة، وعند درجة حرارة (-10) م ارتفع التراكم عند الغراس الناجية وكمية التراكم ترتبط مع شدة الإجهاد، حيث وصلت كمية البرولين المتراكم إلى أكثر من (2.2مغ / غ نبات) عند الهجن (233 و 243 و 210 و 202 و 240) الأم كليبواترا، وأكثر من (2.60مغ / غ نبات) عند (300 و 320 و 322) الأم زفير. بالنسبة لمؤشر الكلوروفيل الكلي فكانت أعلى القيم عند (322) الأم زفير وعند الهجين (202) الأم كليبواترا، مع وجود فروق معنوية بدلالة إحصائية عالية بين كمية الكلوروفيل عند (-2) م و كميته عند (-10) م، وتبين عند حساب الفرق المُحدد بين الهجن المدروسة من حيث قيم الكلوروفيل الكلي تفوق الهجن 322 و 320 و 202 على بقية الهجن.

الكلمات المفتاحية: البرولين - إجهاد البرد - الكلوروفيل - البرتقال ثلاثي الأوراق.

المقدمة:

تعد الحمضيات من الأشجار الهامة في الزراعة المحلية والعالمية، إذ شهد القطر العربي السوري تطوراً ملحوظاً في زراعة الحمضيات، فقد زادت المساحة المزروعة عن 42 ألف هكتار، وفاق الإنتاج المليون طن (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي - مكتب الحمضيات، 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 بالقطر، وتعطي ما يزيد عن 81% من إجمالي الإنتاج من الحمضيات.

تنتمي الحمضيات إلى العائلة السببية *Rutaceae* وإلى تحت عائلة *Aurantioideae*، ونشأت 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).

وكان 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 حيث يلعب الأصل دوراً مهماً في نمو وتطور وإنتاج هذه الشجرة (الخطيب، 2001؛ الخطيب، 2009؛ الخطيب وآخرون، 2018)، وهناك أكثر من عشرين صفة بستانية، كمية ونوعية مختلفة، يؤثر فيها الأصل على الصنف المطعم عليه حسب (Davies and Albrigo, 1994)، يستخدم مقدار تراكم البرولين كأحد أهم المؤشرات الأولية المهمة في تحديد درجة تحمل النباتات للإجهادات اللاحياتية، وهومن الأحماض الأمينية غير الأساسية التي تدخل في تكوين البروتينات، وهو الحمض الأميني الوحيد الذي يحوي زمرة أمينية NH_2 غير حرة فهو إذ يحتوي على وظيفة ثانوية وليست أولية وذلك يسمى بالحمض الإميني *Acide imine* (wray, 1988). يتراكم البرولين في أنسجة النبات عادة كرد فعل لتأقله أو تحسسه مع إجهاد معين كدرجات الحرارة المنخفضة، والملوحة أو نقص الماء، وهذا يمكن معرفته مبكراً خلال دورة النبات. يلعب البرولين دوراً مهماً على المستوى الخلوي في المحافظة ارتفاع الضغط الأسموزي الداخلي (Bates *et al.*, 1973). يعد تحمل البرودة أو الصقيع عاملاً محدداً لنجاح زراعة وانتشار الحمضيات، ويلعب الأصل والصنف ومدة التعرض دوراً في ذلك. لقد وجد أن البرولين يتراكم في أوراق أشجار الحمضيات عند تعرضها لإجهاد برودي؛ ليكسبها تحملاً للحرارة المنخفضة، لأنه يقي الأغشية الخلوية ويضبط الأنزيمات؛ لذلك يستخدم البرولين كمؤشر قوي عندما تتعرض النباتات لأي إجهادات بيئية مختلفة ومن ضمنها الإجهاد البرودي (Yelenosky, 1978)، كما أكد Yelenosky (1979) أن البرولين يتراكم في أوراق الحمضيات عند تعرضها للصقيع، ويلعب البرولين دوراً هاماً في التعديل الأسموزي عند النباتات المعرضة للإجهاد (Delauney and Verma, 1993).

تهدف برامج التهجين في الحمضيات إلى الحصول على أصناف ذات صفات إنتاجية ممتازة وكمية إنتاج عالية، أو الحصول على أصول متحملة أو مقاومة للإجهادات الإحيائية وغير الإحيائية (Akgolet *et al.*, 2017)، حيث استخدم سوينغل 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). لقد بينت نتائج تجربة نفذها Valashkolee وآخرون (2018) على أربعة أنواع من الحمضيات، هي: Kumquat, Fingereed citron, Limequat و Calamondin ضمن أربع درجات من الحرارة (3، 0، -3، -6) م، وقد تحمل الكمكوات حتى -3 درجة مئوية، وترافق ذلك تراكم كمية كبيرة من البرولين من أنسجة النبات.

بين Britton (1983) أن أصباغ التمثيل الضوئي (الكوروفيل Chlorophyll) هي مواد تختلف كثيراً في التركيب الكيميائي، وهي موجودة على شكل أصباغ البورفيرين (الكوروفيل أ، ب، ج)، والكاروتينات، والأنثوسيانين والفلافونات.

تشتمل أصباغ الأوراق الكاملة على الكوروفيل أ، والكوروفيل ب والكاروتينات الضرورية لعملية التمثيل الضوئي، ويختلف محتوى الأصباغ الورقية باختلاف الأنواع، ويمكن أن يزداد الاختلاف في أصباغ الأوراق (الكوروفيل 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; Vicaset *al.*, 2010). يلعب هذا الصباغ أيضاً دوراً مهماً كمؤشر على نمو النباتات وإنتاج المواد العضوية فيها (Lahaiet *al.* 2003)، بين (Tripathi and Gautam 2007) أن قلة نسبة الكلوروفيل أ ب تستخدم كعلامة بيولوجية حساسة للتلوث والإجهاد البيئي.

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

ويعتبر الزفير الأصل الوحيد المعتمد في مراكز إنتاج غراس الحمضيات المحلية، وأدى انتشار مرض المالسايكو الفطري إلى موت معظم أشجار الحامض بالقطر، كذلك الأمر الذي يجعل خطورة استخدامه وضرورة البحث عن البدائل هو تسجيل المرض لأول مرة رسمياً في سوريا عام 2006. من ناحية أخرى تعرض القطر 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 من حيث المناخ، من هنا جاءت أهمية هذا البحث إذ يعتبر التحمل للإجهادات البيئية من أهم الشروط الواجب توفرها في أصول الحمضيات الجيدة المرغوبة محلياً.

يهدف من هذا البحث إلى تقييم هجن الجيل الأول F1 عن طريق التهجين أصول الحمضيات، ثم انتخاب الهجن الأكثر تحملاً للإجهاد البرودي عن طريق تعريضها لدرجات الحرارة المنخفضة (الصفير المئوي، -2، -10 تحت الصفير المئوي)، من خلال البقاء على قيد الحياة، ودراسة المؤشرات الكيميائية، كتراكم البرولين، والكلوروفيل، لإعتمادهما في تطوير الزراعة المحلية ضمن برامج إكثار الحمضيات ونشر زراعتها كأصول للتطعيم عليها بأصناف مختلفة.

مواد البحث وطرائقه:

1. المادة النباتية المدروسة:

1-1- 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)، وهو 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 (Hutchison, 1977)، ومقاوم للنيماتودا بدرجة جيدة، وحساس لارتفاع تركيز كربونات الكالسيوم 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).

1-2- الزفير (النارنج) (Citrus aurantium L.):

يعتبر 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 الياباوي 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 عالية، ويتحمل الملوحة وارتفاع درجة الحموضة pH.

إلا أنه 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 هجن الثلاثي، يعتبر الزفير الأصل الوحيد في مراكز إنتاج غراس الحمضيات المحلية، وأدى انتشار مرض المالسكيو الفطري إلى موت معظم أشجار الحامض بالقطر.

3-1- اليوسفي كليوباترا (Cleopatra mandarin) (Citrus reticulata Blanco):

استخدم لأول مرة في الولايات المتحدة عام 1917 تعتبر الهند الموطن الأصلي لليوسفي كليوباترا، والأشجار المطعمة عليه بطيئة النمو، ثماره صغيرة الحجم، وهو يقاوم ال CTV، ويتحمل الترب الكلسية والمالحة (Fadliah, 1977)، كما أكد Nava وAyala وMonter (1994) بأنه أصل بطيء النمو في المشتل وصعب التطعيم عليه، ويعتبر هذا الأصل من الأصول الجيدة المحتملة للأمراض الفطرية والفيروسية.

2. طريقة العمل:

تم التهجين بين الزفير، واليوسفي كليوباترا (Seed parent) والبرتقال ثلاثي الأوراق (pollen parent)، إذ جمعت أزهار البرتقال ثلاثي الأوراق في الصباح الباكر ووضعت في أطباق بيتري، تم إزالة أوراق التويج من البراعم الزهرية غير المتفتحة للنباتات الأم مع المحافظة على سلامة المبيض والميسم دون ضرر ثم تم هز حبوب الطلع من الأزهار المذكورة فوق الميسم بعد ذلك تم وضع أكياس ورقية فوق الأزهار المهجنة وربطها، بعد عقد الثمار ونضجها تمت زراعة بذور لكل من الزفير، واليوسفي كليوباترا (Seed parent) في شهر كانون الثاني عام 2019 ضمن مساكب محددة لكل منها، 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 ما أكدته (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 أصص 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.

تم نقل نباتات التجربة إلى المخبر لبدء التجربة وكانت الحرارة 15 م° لمدة اسبوع، ثم عرضت بالتدرج حتى درجة حرارة 2 تحت الصفر لمدة 24 ساعة بوضعها في براد مضبوط (في البداية خفضت الحرارة إلى الصفر لمدة أربع ساعات تلاها تخفيض الحرارة إلى -2 م° لمدة 24 ساعة)، نقلت الهجن مباشرة إلى الثلجة المضبوطة لتعريضها لإجهاد البرد الشديد -10 م° حسب (Yelenosky, 1978)، تم تنفيذ جميع العمليات الزراعية من تسميد وري وتعشيب... إلخ طول فترة التجربة وفق القواعد المتبعة في زراعة الحمضيات.

3. المؤشرات المدروسة

قياس البرولين: تم قياس محتوى الأوراق من البرولين قبل التعرض للإجهاد وبعد التعرض للإجهاد ب 24 ساعة حسب (Bates et al, 1973)، حيث حسبت قيمة البرولين المتراكم وفق المعادلة:

$$\text{ملغ برولين} \setminus \text{عينة نباتية غرام} = \frac{\text{التخفيف إن وجد} \times \text{حجم محلول الإستخلاص} \times \text{التركيز جزء بالمليون}}{\text{حجم محلول العينة المقطرة} \times \text{وزن العينة المستخلصة} \times 1000}$$

المؤشرات الخضرية: تم أخذ القياسات التالية في نهاية التجربة بعد الإنتهاء من التعريض للإجهاد ومعاودة النباتات لنشاطها الربيعي وهي

نسبة الضرر %: (عدد الأوراق الميتة / عدد الأوراق الكلي) × 100.
متوسط طول الغرسة سم: قياس طول الغرسة من سطح التربة باستخدام المتر القماشي.
متوسط قطر الغرسة سم: قياس قطر الساق باستخدام البياكوليس
متوسط مساحة الورقة سم²: تم حساب متوسط مساحة الورقة بالإعتماد على وزن وحدة المساحة من المسطح الخضري.
متوسط وزن الورقة غ: تم حساب متوسط وزن الورقة باستخدام الميزان الحساس
مادة جافة %: تم حساب النسبة المئوية للمادة الجافة للأوراق باستخدام المعادلة التالية بعد التجفيف على درجة 105 م حتى ثبات الوزن (الوزن بعد التجفيف / الوزن قبل التجفيف) × 100
قياس الكلوروفيل:

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

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

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

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

$$\text{chlorophyll T} = \text{chlorophyll a} + \text{chlorophyll b}$$

4. التحليل الإحصائي:

تم حساب الفروق المعنوية بين قيم المؤشرات المدروسة (البرولين، الكلوروفيل) للأبناء المنتخبة من المجتمع النباتي المدروس قبل الإجهاد وبعده باستخدام T_{student} العينات المرتبطة.

T المحسوبة = $\frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s\bar{d}}$ حيث أن $s\bar{d}$ الخطأ القياسي للفروق $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$. تقارن مع الجدولية T عند درجات حرية n-1، كما تم استخدام أشربة 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 للمؤشر المدروس في مقدرة الإئتلاف الخاصة في الهجن بعد التعرض للإجهاد.

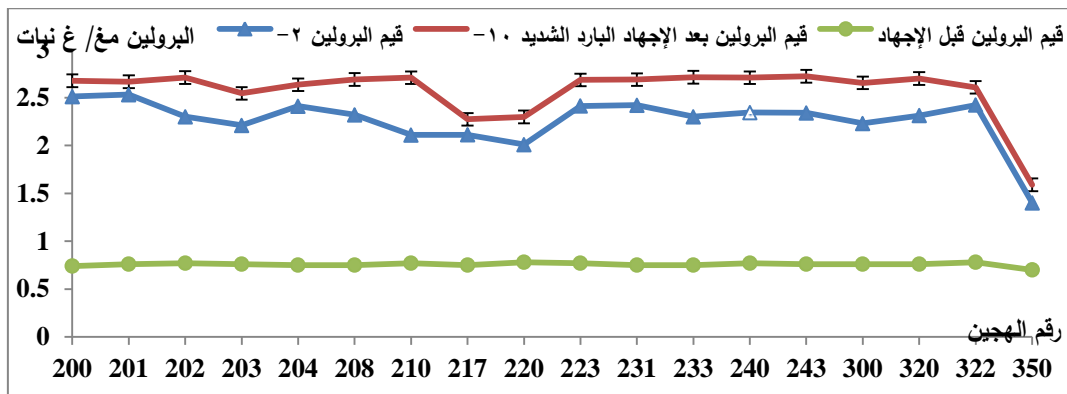
النتائج والمناقشة

أدى إجهاد البرد -2 م إلى موت 50% من هجن الجيل الأول، لعدم قدرتها على مقاومة الإجهاد، فأصبح عدد هجن الكليوباترا 135 (Seed Parent) هجين، وهجن الزفير 50 هجين، بينما بقي عند الإجهاد الشديد -10 م 4 هجين (الأم زفير) و 14 هجين (الأم كليوباترا) فقط، أما نسبة الضرر فتراوحت بين 7% عند الهجين 322 الأم زفير إلى 30% عند (210 و 204 و 200 و 203 و 202) الأم كليوباترا.

حساب مؤشر البرولين Proline

البرولين هو واحد من أكثر الأحماض الأمينية وفرة في أنسجة الحمضيات، ويؤثر على قابلية ذوبان البروتينات المختلفة في أوراق الحمضيات (Young, 1963) (Abraham et al., 2003)

تم حساب تراكم البرولين في الأنسجة كمؤشر في تحديد درجة تحمل الإجهاد البيئي (البرودة الشديدة)؛ حيث قُدرت كمية البرولين في أوراق النباتات قبل التعرض للإجهاد على حرارة 15 م، ولم تصل كميته إلى 1مغ بكافة الأصول وحُسبت بعد الانخفاض الحراري -2 م وأيضاً بعد تعرضها لإجهاد البرودة الشديد (-10)م. يُبين الشكل (1) تراكم كميات كبيرة من البرولين في الأوراق بعد إجهاد البرودة، الهجن التي تحملت درجتي الحرارة (-2)م، (-10)م، راكمت البرولين بشكل واضح، وتبعاً للتركيب الوراثي لأبوي كل هجين.



الشكل (1) تراكم البرولين في الهجن المعرضة لإجهاد البرودة في درجتي الحرارة (10-م) وضعت أشربة الخطأ المُحدد لسلسلة المخطط باستخدام الخطأ القياسي 0.03

لقد تراكم البرولين بعد التعرض للإجهاد البارد (2-م) و شديد البرودة (10-م)، مع وجود فرق معنوي بدلالة إحصائية عالية * بين تراكم البرولين عند التعرض ل-2 وبعد التعرض لدرجة حرارة -10م (T المحسوبة <T الجدولية 0.01)، ووصلت كمية البرولين المتراكم في أوراق الهجن إلى أكثر من (2.7ملغ/ غ نبات) بعد التعرض للإجهاد الشديد حيث بلغت قيم البرولين 2.71 ، 2.72 ، 2.7 ، 2.7 (مغ/غ نبات) للهجن 202 و 210 و 243 و 233 و 240 على التوالي، وكانت الأم الأصل كليوباترا، بينما كانت قيمة البرولين 2.65، 2.69، 2.60 للهجن 300 و 320 و 322 وكانت الأم الأصل الزفير، أي تميل الحمضيات إلى مراكمة البرولين مع تعرضها للإجهاد (البرودة)، حيث بدأ تراكم البرولين عند انخفاض درجة الحرارة إلى (-2م)، ويزداد هذا التراكم مع زيادة شدة الإجهاد. ولكن هذا يتفاوت بحسب النبات حيث نجد بعض الأفراد مثل (202 و 208 و 210 و 233 و 300) راكمت البرولين بكميات كبيرة مقارنة بمقدرة أفراد أخرى مثل (201 و 350) لم تتمكن من مراكمة هذه الكميات من البرولين، لذلك ماتت الأفراد التي لم تتمكن من تحمل البرودة والأفراد التي تمكنت من مراكمة البرولين بالوقت والكمية المناسبة تمكنت من النجاة بنسب مختلفة منها تأذى وتضرر لكنه تعافى وتابع نموه بالربيع التالي، حيث سبب الإجهاد الشديد (10-م) بموت الأجزاء الفتية والغضة من النبات وصل إلى 30% من الجزء الخضري للهجن التي أبدت تحملاً للإجهاد البارد الشديد، وتابعت نموها في موسم النمو التالي، في حين جفت باقي الهجن بشكل كامل وفقدت القدرة على متابعة النمو والنشاط. وكان أقل تراكم للبرولين 2.5 مع/غ للهجين 203 (الأم الأصل كليوباترا) و 1.58 للهجين 350 (الأم الأصل زفير). وعند حساب الفرق المُحدد بين الهجن بعد التعرض للإجهاد الشديد البرودة نجد تفوق الهجن 243 و 233 و 210 و 202 و 240 و 201 و 204 و 231 و 200 و 320 و 208 و 223 و 203 و 300 و 322 تفوقت بدلالة إحصائية معنوية عند المستوى 1% على 217 و 220 و 350 دون وجود فروق معنوية فيما بينها، كما تفوق الهجينين 220 و 217 معنوياً عند المستوى 1% على 350 دون وجود فرق معنوي بينهما.

يعود دور البرولين في تحمل النبات لإجهاد البرد إلى مساهمته في حماية الأغشية الخلوية وفي تنظيم عمل الأنزيمات (Yelonsky and Hearn, 1967) (Gardner and Horanic, 1958)، يفسر تراكم البرولين في أوراق هجن الحمضيات المنتخبة كرد فعل طبيعي من النبات في مقاومة الإجهاد، إذ أن الزيادة في تراكم البرولين في الهجن قد ترافقت مع زيادة إجهاد البرودة، وهذا يتفق مع نتائج دراسة (Norris, 1970)، ولا بد من التنويه لان تراكم البرولين الحر هو أحد ميزات التحمل لإجهاد البرد في الحمضيات؛ لأنه يحصل مع تأثيرات مرافقة للتوازن المائي في الأنسجة (Yelonsky, 1979)، ويبدو أن البرولين يلعب دوراً مهماً في ضبط الإسموزية في أصول الحمضيات حيث تكون الكتلة الحيوية أكبر عندما يكون المحتوى من البرولين أكبر توافقاً مع دراسة (Balalet al, 2011)، لقد تبين فيما بعد أن الكثير من الهجن لم تستطع معاودة النشاط في فصل الربيع، بل عجزت عن الاستمرار في الحياة واستئناف النمو وماتت، رغم تراكم البرولين فيها، وبالنتيجة لم تستطع هذه الهجن مقاومة إجهاد البرودة فماتت.

لقد بيّنت نتائج هذه الدراسة أن إجهاد البرودة الشديدة (-10م) على غراس الحمضيات؛ أدى إلى حدوث ضرر في أنسجة النبات في الأوراق، وقد كان النبات استعداد للدخول في فصل الشتاء ومهياً للإجهاد فيزيولوجياً من حيث مراكمة الكربوهيدرات والمواد

الغذائية وغيرها، وهذا يؤكد أن لزيادة تراكم البرولين في أنسجة النباتات المتعرضة لإجهاد البرودة دور نسبي في تحمل أو مقاومة البرودة يقف عند عتبة محددة، وأن عوامل أخرى وراثية وغيرها تأخذ دورها في ذلك. تتوافق هذه النتيجة مع معطيات *et al*; Dahro (2016) الذين درسوا تأثير المورثة *PtrA / NINV* التي عزلوها من البرتقال ثلاثي الأوراق وتبين أنها تلعب دورًا إيجابيًا في تحمل إجهاد البرودة من خلال تعزيز التعديل التناضحي وإزالة السموم بالإضافة إلى زيادة فعالية التمثيل الضوئي. والجدول (1) يوضح نسبة الضرر وبعض المؤشرات المورفولوجية والمادة الجافة في الهجن المدروسة عند تعرضها لإجهاد البرودة الشديدة (10-) م.

جدول (1) نسبة الأوراق الميتة و البقاء على قيد الحياة في كل هجين تحت درجات الحرارة (10-) م

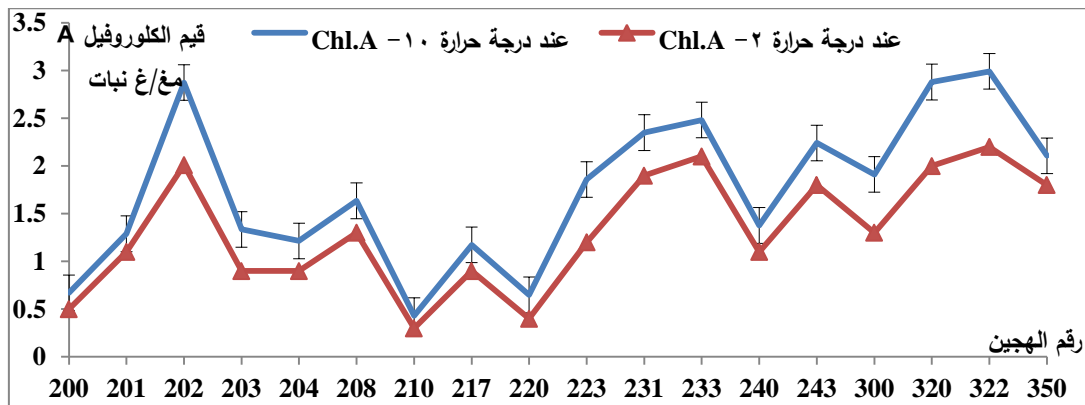
| رقم الهجين | نسبة الضرر | متوسط طول الغرسة سم | متوسط قطر الساق سم | متوسط مساحة الورقة سم ² | متوسط وزن الورقة غ | مادة جافة % |
|------------|------------|---------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|-------------|
| 200 | 30% | 50 | 0.5 | 2.33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

حساب مؤشر (الكلوروفيل) 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، وحتى في النبات الواحد تتباين حسب موسم النمو ونضج الورقة. ويشكل عام يتأثر الكلوروفيل بالإجهادات التي يتعرض لها النبات، حيث تُصاب النباتات التي تعرضت للإجهاد بالشحوب بسبب تدهور الكلوروفيل وتفاوت نسبة الشحوب بين النباتات، تم حساب قيم الكلوروفيل A و الكلوروفيل B و T الكلي للهجن المُنتخبة المُتحملة للإجهاد البارد -10 م قبل التعرض للإجهاد وبعد الإجهاد (Costache et al., 2012).

الكلوروفيل A:

يبين الشكل (2) قيم الكلوروفيل A للهجن المنتخبة قبل وبعد الإجهاد الشديد البرودة

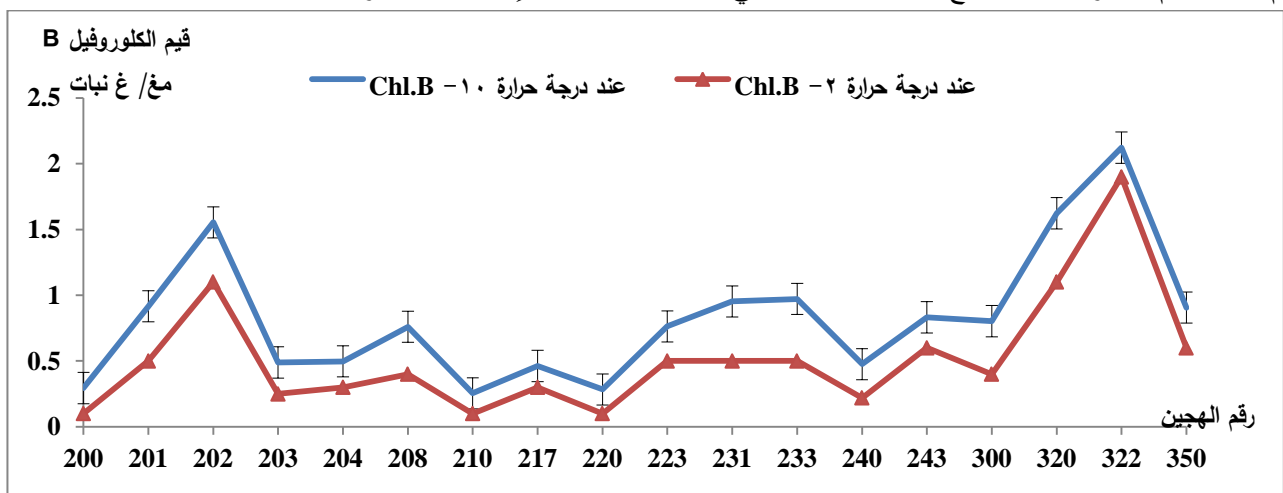


الشكل (2) قيم الكلوروفيل A في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجتَي الحرارة (10-) (-2)م وضعت أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة المخطط باستخدام الخطأ القياسي 0.06

يلاحظ تراكم الكلوروفيل A في الهجن المُتحملة بعد الإجهاد شديد البرودة، وقد سجل أعلى قيمة (3 مع/غ نبات) (الهجين 322) الأم زفير، والهجين 202 الأم كليوباترا (2.8 مع/غ نبات)، بينما ظهرت أدنى قيمة له (0.4 مع/غ نبات) عند الهجين (210 الأصل كليوباترا seed parent)، وبلغت قيمته (1.9 مع/غ نبات) عند الهجين (300 الأصل زفير) مع وجود فروق معنوية بدلالة إحصائية عند المستوى 1% في قيم الكلوروفيل A قبل وبعد إجهاد البرودة الشديد لكل الهجن المنتخبة. كما تُبين معطيات الشكل السابق عند حساب الفرق المُحدد بين الهجن المُنتخبة؛ تفوق الهجين 233 بدلالة إحصائية عند المستوى 1% على الهجن (201-204-200-223-203-210-220-208-217-300-240-240)، وتُفوق الهجين 322 أيضاً بدلالة إحصائية عند المستوى 1% على جميع الهجن ماعدا (233-202-320)، وتُفوق الهجين 320 معنوياً عند المستوى 1% على الهجن (201-240-208-217-300-350-240). كما يلاحظ تفوق الهجن (201-204-208-240) على الهجن 200-210-220 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



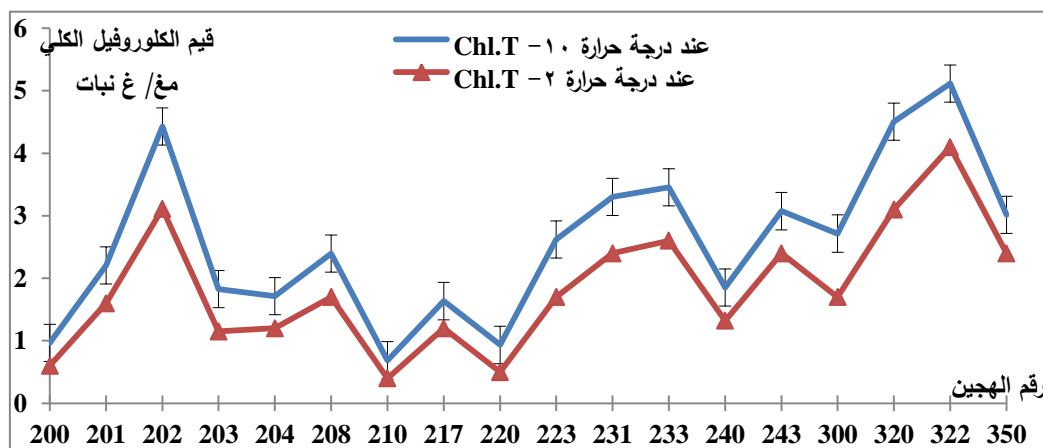
الشكل (3) قيم الكلوروفيل B في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجتَي الحرارة (10-) (-2)م وضعت أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة المخطط باستخدام الخطأ القياسي 0.03

نلاحظ من الشكل (3) أن الكلوروفيل B قد سجل أعلى قيمة هي (2.1 مع/غ نبات) عند الهجين 322 الأم زفير، وعند الهجين 202 الأم كليوباترا (1.5 مع/غ نبات). بينما كانت أدنى قيمة له (0.25 مع/غ نبات) عند الهجين (210 كليوباترا seed parent)

parent) وبلغت قيمته (0.8 مع/غ نبات) عند الهجين 300 (زفير) seed parent مع وجود فروق معنوية بدلالة إحصائية عند المستوى 1% في قيم الكلوروفيل B قبل وبعد الإجهاد شديد البرودة لكل الهجن المنتخبة تُبين معطيات الشكل السابق عند حساب الفرق المُحدد لقيم الكلوروفيل B للهجن بعد التعرض للإجهاد شديد البرودة؛ نجد تفوق الهجين 322 على جميع الهجن بمعنوية عالية، وتفوق الهجين 320 على جميع الهجن بمعنوية عالية باستثناء الهجينين 202 و 201، وتفوق الهجين 202 على جميع الهجن معنوياً عند مستوى ثقة عالية باستثناء الهجينين 322-320، كما تفوقت الهجن 201 و 231 و 233 و 350 بمعنوية عالية على 204-200-203-210-220-217-240 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 (Lahaiet al. 2003). أما بالنسبة لنوع الكلوروفيل (a,b) فقد لوحظ أن تراجع كلوروفيل b أكبر بكثير من كلوروفيل a والإجهاد يؤثر في النسبة بين (a,b) وتتباين أصول الحمضيات فيما بينها بهذه النسبة (a,b) chlo و يعتبر هذا المعيار هو المحدد للأصل الحساس من المحتمل للإجهادات في الحمضيات (Tripathi and Gautam, 2007).

الكلوروفيل الكلي:

الكلوروفيل الكلي هو مجموع كلا من الكلوروفيل A والكلوروفيل B تم حسابه لجميع الهجن التي تجاوزت الإجهاد البارد -10 م° كما في الشكل (4)



الشكل (4) قيم الكلوروفيل T الكلي في الأبناء المعرضة لإجهاد البرودة في درجتَي الحرارة (10°C) (-2)م وضعت أشرطة الخطأ المُحدد لسلسلة المخطط باستخدام الخطأ القياسي 0.07

سجل الكلوروفيل الكلي T أعلى قيمة هي (5 مغ/غ نبات) عند الهجين 322 تليها القيمة (4.5 مغ/غ نبات) للهجين 320 الأم زفير، وسجل الهجين 202 (كليبواترا) seed parent قيمة (4.4 مغ/غ نبات) للكلوروفيل الكلي. بينما كانت أدنى قيمة له 0.6 مغ/غ نبات عند الهجين (210 كليبواترا) seed parent وبلغت أدنى قيمة 2.7 مغ/غ نبات عند الهجين 300 (زفير) seed parent وجود فروق معنوية قبل وبعد الإجهاد البرودة الشديد لكل الهجن المنتخبة بدلالة T-student بمعنوية عالية. تُبين معطيات الشكل (4) عند حساب الفرق المحدد بين الهجن المدروسة من حيث قيم الكلوروفيل الكلي T، تفوق الهجن 322 و 320 و 202 بمعنوية عالية على بقية الهجن دون وجود فرق معنوي فيما بينها، وتفوق الهجن 231 و 233 و 243 بجلالة إحصائية عالية على الهجن 201-204-200-203-210-220-208-217-240 دون وجود فرق معنوي فيما بينها.

يُلاحظ عموماً ميل هجن الزفير إلى مراكمة الكلوروفيل عند التعرض لإجهاد البرودة أكثر قليلاً من هجن اليوسفي كليبواترا وذلك خلال 24 ساعة بعد الإجهاد، وهذه هي الفترة التي أُخذت فيها العينات الورقية للتحليل يليها بالأيام التالية للإجهاد تهدم الكلوروفيل، وقد وضحت عدة مراجع (Tripathi and Gautam, 2007) (Vicaset al., 2010) أن أوراق الحمضيات تتباين فيما بينها بشدة اللون الأخضر، من الأخضر الداكن إلى الأخضر الباهت ويعود ذلك إلى نوع الكلوروفيل a أو b والنسبة بينهما، ووضحت 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.

الإستنتاجات:

1. تباينت الأفراد الهجينة بمقدرتها على تراكم البرولين في أنسجتها.
2. كانت الهجن الناتجة من الأم كليوباترا والأب البرتقال ثلاثي الأوراق أكثر تحملاً لإجهاد البرد حيث أعطت تراكمًا أكبر للبرولين مقارنة مع الهجن الناتجة من الأم الزفير والأب البرتقال ثلاثي الأوراق.
3. كما تميزت الهجن ذات الأرقام 322 و 320 (الأم زفير) و 202 (الأم كليوباترا) بإعطاء أعلى قيمة للكلوروفيل الكلي مقارنة مع بقية الهجن بينما كان محتواها من البرولين (2.422، 2.312، 2.3 مع/غ) على التوالي.

التوصيات:

1. متابعة الدراسة على الأفراد الهجينة التي أبدت تحملاً لإجهاد البرودة الشديد (-10)م، ليصار بالنهاية إلى اعتماد المناسب منها في برامج الإكثار المحلية، بعد متابعة اختبارها من النواحي البستانية وإمكانية إكثارها خضرياً، ونجاح التطعيم عليها بالأصناف التجارية.
2. متابعة الدراسة على تصالبات أخرى بهدف انتخاب أصول تتحمل ارتفاع نسبة الكلس الفعال في التربة، وغيرها من العوامل المحددة لزراعة الحمضيات في سوريا.

المراجع:

- الخطيب، علي عيسى (2001) تأثير محتوى التربة من كربونات الكالسيوم في نمو بعض أصول الحمضيات ومحتوى أنسجتها من العناصر الغذائية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة تشرين، سورية. 219 صفحة.
- الخطيب، علي عيسى (2009) تأثير خمسة أصول من الحمضيات في نمو وإنتاجية ونوعية ثمار البرتقال صنف فالنسيا Valencia Orange. مجلة باسل الأسد للعلوم الهندسية، السلسلة الزراعية والغذائية والكيميائية و التقانات الحيوية. (25) 65-85.
- الخطيب، علي عيسى و محمد مهناو علي زهيرثو إشراق علي (2018) تأثير ثمانية أصول من الحمضيات في مواصفات النمو والإنتاج لسلسلة الكلمنتين 88. مؤتمر البحوث الثاني عشر للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية. دمشق.
- وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي (2018). قسم الإحصاء، مديرية الإحصاء والتعاون الدولي، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، سورية..
- Abraham, E; G. Rigo; G. Szekely; R. Vagy; C. Koncz and L. Szabados(2003) Light dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis, Plant Mol. Biol., 51:363-372.
- Akgol, M; O. Simsek; D. Donmez and Y. A. Kacar(2017). On Overview of In Vitro Haploid Plant Production in Citrus. American. Journal of Plant Biology. 2(5-1):19-23
- Balal, R. M; M. Y. Ashraf; M. M. Khan; M. J. Jaskani and M. Ashfaq(2011).Influence of salt stress on growth and biochemical parameters of citrus rootstocks. Pak. J. Bot., 43(4): 2135-2141
- Bates, L. S;R. P, Waldren and I. D, Tear (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39, 205-207.
- Castle, W.S. (1987) Citrus Rootstocks. (Eds. Rom. R.C and R.F. Carlson.).John Wiley and Sons, New York. USA. (Cit. Elkhateeb, 2001. Ph. D. Thesis.Lattakia. Uni. Tishreen).
- Britton G.(1983). The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press. 133–140.
- Costache M. A; G. Campeanu. and G. Neata(2012). Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. Romanian Biotechnolo. Letters., 17(5), 7702–7708
- Davies, F. S. and L. G. Albrigo(1994) Citrus Crop Production Science in Horticulture 2 USA,UK,CAB, International. P(73-107). Printed by Red Wood Books.Wiltshir. UK.

- Dahro, B; F. Wang; T. Peng and J. Hongliu(2016).PtrA/NINV, an alkaline/neutral invertase gene of *Poncirus trifoliata*, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency. *BMC Plant Biology*, (16):76.
- Delauney, A. j and D. P.Verma(1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*.4(2),215-223
- Fadliah, Z.G(1977) 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. (Cit. Elkhateeb, 2001. Ph. D. Thesis. Lattakia. Uni. Tishreen).
- Gallasch, P. T(1999) Chilean Citrus Industry: Rootstocks. SARDI Citrus Information. SARDI Exporting South Australian Research and Innovation Worldwide.
- Gardner, F. E and G. Horanic(1958). Influence of various rootstocks on the cold resistance of the scion variety. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 71:81-86.
- Gogoi, M and M, Basumatary(2018).Estimation of the chlorophyll concentration in seven *Citrus* species of Kokrajhar district, BTAD, Assam, India. *Tropical Plant Research*.5(1):83-87.
- Hutchison, D.J(1977). Influence of rootstock on the performance of Valencia sweet orange. *Proc International of the Society of Citriculture*. 2:523-525.
- Lahai, M.T; I.J. Ekanayake and J.B. George (2003). Leaf chlorophyll content and tuberous root yield of cassava in inland valley. *African J. Crop Sci.* 11: 107–117.
- Manner, H. I; R. S. Buker; V. E. Smith; D. Ward and C. R. Elevitch(2006). Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. 2(1):2-35.
- Nava Ayala, J and A. Villegas Monter(1994) Nursery performance of rootstocks tolerant to citrus tristeza. *Proceedings of the Interamerican Tropical Horticulture*. 38: 86 – 89. *Hort. Abs.* 66 (11) :98-78.
- Norris, J. C(1970) Young tree decline from a grower viewpoint. *Proc. Fla. State Hort.* 83:46-48.
- Porra, R. J(1991). 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*. 31–57
- Roistacher, C. N(1992) Should we introduce protective isolates of citrus Tristeza virus? *Citrograph*. Nov: 5 – 9.
- Swingle, W.T and P. C. Reece(1967) The botany of citrus and its wild relatives. In Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, editors. *The Citrus Industry*, vol. . Berkeley: University of California Press. 389-390.
- Tripathi A. K. and M. Gautam(2007). Biochemical parameters of plants as indicators of air Pollution, *J. Environ. Biol.*, 28, 127–132
- Valashkolee, S. M. H; Y. Tajvar; M. Azadbakht and Z. Rafie-Rad(2018). Evaluation of physiological and biochemical responses of some ornamental Citrus varieties under low temperature stress. *Crops Improvement (Journal of Agricultural Crops Production)*. 19(4):979-993.
- Vicas, S. I; V. Laslo; S. Pantea. and G. Bandict(2010). Chlorophyll and carotenoids pigments from Mistletoe (*Viscum album*) leaves using different solvents, *Fascicula Biol.*(2)213–218.
- Wray, J. L.(1988)Plant cell environ. 11,369-382. (Cit. Hanefah, 2015. MSc. Thesis. Uni. Des Frères Mentouri Constantine).
- Yelenosky, G. and C. J. Hearn(1967). Cold damage to young mandarin-hybrid trees on different rootstocks in flatwood soil. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 80:53-56.
- Yelenosky G(1978) Cold hardening 'Valencia' orange trees to tolerate -6.70C without injury. *J Am SocHortSci* 103: 449-452.
- Yelenosky G(1979) Accumulation of Free Proline in Citrus Leaves during Cold Hardening of Young Trees in Controlled Temperature Regimes. *Plant Physiol.* 64, 425-427.
- Young, R.(1963). Freeze injury to young seedlings of citrus cultivars and related species in the lower Rio Grande Valley. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* 17:37-42.

- Zhu, S; B. Wu; Y. Ma; j. Chen and G. Zhong(2013) Obtaining citrus hybrids by in vitro culture of embryos from mature seeds and early identification of hybrid seedlings by allele-specific PCR. *Scientia horticulturae*161:300-305.
- Zhu, S; F. Wang; W. Shen; D. Jiang and Q. Hong(2015) Genetic diversity of Poncirus and phylogenetic relationships with its relatives revealed by SSR and SNP/InDel markers. *ActaPhysiol Plant.* 37:141-152.

Evaluation of some *Poncirus trifoliata* (L.) Raf hybrids Selected by F1 for Tolerance to chilling Stress using some growth indicators, proline and chlorophyll

Venus Ebraheem Hasan⁽¹⁾, Ali Essa Elkhateeb⁽¹⁾ and Dr. Hasan Yosef Khojah⁽²⁾

(1) General Commission Agriculture Scientific Research- Lattakia Syria.

(2) Tishreen University- Agriculture College- Horticulture Department- Syria.

(*Corresponding author: Venus Hasan. E-Mail: venushasan80@gmail.com).

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). For getting F1 seeds; and its seedling tolerance of chilling. These seeds were sown in agricultural pots, then the seedlings were transferred in February to a temperature controlled refrigerator, where they were exposed to cold gradually reaching (2-)°C and then to (10-)°C. As a result, cold stress (2-)°C caused in the death of about 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 plants, but these seedlings regained its life in the next growing season and continued its activity, Some growth indicators were calculated, the average length and diameter of the plant, 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% in the hybrid with sour orange 322 to 30% in the hybrid with Cleopatra (210, 204, 200, 203 and 202), Proline index, showed that the accumulation of proline began at stress (2-)°C with significant differences in comparison before and after exposure to cold, and at a temperature of (-10)°C. The accumulation increased at the surviving plants and the amount of accumulation correlates with the severity of stress, as the accumulated amount of proline reached to more than (2.2 mg / g) in the hybrids with Cleopatra (233, 243, 210, 202 and 240), and more than (2.60 mg / g) in the hybrids with sour orange (300, 320 and 322). Regarding the total chlorophyll index, the highest values were in (322) and (202), with significant differences 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.

Key words: proline, chilling Stress, Chlorophyll, *Poncirus trifoliata*.