بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدهید ۳ گونه‌ی مختلف تمشک در طی فصل رشد

زهرا شمس*، سعید عشقی، عنایت‌الله تفضلی، علی قرقانی
گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول: zahrashams1987@gmail.com

چکیده

تمشک[1] از خانواده گلسرخیان و زیر خانواده‌ی Rosoideae است.Rubusis دارای ۱۲ زیر جنس می‌باشد که تخمین‌زده شده شامل ۷۵۰ گونه در سراسر جهان است. سه زیرجنس بزرگ آن شامل Idaeobatus, Malachobatus و Rubus می‌باشد. طبق آخرین گزارش در ایران ۸ گونه وجود دارد که بیشتر در مناطق مرطوب و معتدل شمال و حاشیه دریای‌خزر به‌صورت وحشی رشد می‌کنند. از سوی دیگر مطالعات نشان داد تغییرات آب و هوایی می‌تواند در تنوع زیستی و ژنتیکی درون‌گونه‌ای نقش داشته باشد و از طرفی این تنوع حیاتی است و باعث ایجاد پتانسیل سازگاری و تحمل گیاه به شرایط محیطی و استرس می‌شود.مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدهید و پراکسیداز در طول فصل رشد با توجه به تغییرات دمایی در بین ۳ ژنوتیپ مختلف از 3 گونه‌ی Sanctus,Hirtus,Persicus به‌منظور یافتن ژنوتیپی سازگار به شرایط آب و هوایی جنوب ایران با درجه حرارت بالا و رطوبت پایین، انجام شد. در این آزمایش از بافت برگ در طول سه ماه خرداد و مرداد و مهر با میانگین دمایی ۳۰،۳۸ و ۲۶ درجه سانتی‌گراد از کلکسیون تمشک دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز نمونه برداشت شد و میزان آنزیم کاتالاز و پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین سوپراکسیداز و مالون‌دی‌آلدهید در دو سال پیاپی، اندازه‌گیری شد. بر طبق نتایج میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ سنندج در ماه مرداد افزایش‌یافته درحالی‌که میزان مالون‌دی‌آلدهید و پراکسیداز فاقد تفاوت چشمگیری بود. بر این اساس می‌توان ژنوتیپ سنندج را به‌عنوان ژنوتیپی سازگار با این شرایط محیطی پیشنهاد داد.

کلمات کلیدی: **blackberry، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مالون‌دی‌آلدهید**

مقدمه

تمشک گیاهی متعلق به جنس Rubus و از خانواده گلسرخیان(Rosaceae) و زیر خانواده (Rosoideae) می‌باشد که علی رقم گسترگی فراوان در بیشتر اقلیم‌ها، از گیاهان مناطق معتدله محسوب می‌شوند(Finn, 2008). گونه‌ی *R.Sanctuse* را از شمال با آب‌وهوای مرطوب تا آب‌وهوای سرد غرب و حتی برخی از آب‌وهوای نیمه‌خشک در جنوب‌غربی مشاهده‌کرد (Kaume et al., 2012). چون۸۲ درصد از مساحت ایران خشک و نیمه‌خشک است و دمای هوا در بعضی مناطق گاهی تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد نیز می‌رسد (Amiri et al., 2010) بنابراین شناسایی ارقام و گونه‌های متحمل نسبت به تنش گرمایی لازم می‌باشد. دمای بالا یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که می‌تواند موجب محدود شدن رشد و نمو در گیاه و کاهش شدید در عملکرد اقتصادی گیاهان شود (Schellnhuber, 2008). درجه حرارت بالا، علاوه بر تنش گرما علل دیگر استرس غیرزیستی، مانند شوری و خشک‌سالی نیز می‌شود، که

[1]Blackberry

به‌شدت می‌تواند تولید محصول و رشد گیاهان را در سراسر جهان تهدید کند (Mittler et al., 2012). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که ممکن است در اثر استرس دمایی برای گیاه اتفاق افتد، تولید رادیکال‌های آزاد (Almeselmani et al., 2006) که سمیت این رایکال‌های آزاد می‌تواند سبب آسیب به لیپیدها و پروتئین و در نهایت مرگ سلول شود (Fath et al., 2001). بااین‌حال، سلول‌ها با مکانیسم‌های دفاعی مختلف ازجمله آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و یا آنزیمی (به‌عنوان‌مثال سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربیک‌پراکسیداز) می‌توانند با اثرات مضر ROS مقابله کنند (Foyer et al. 1998). لذا بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در شرایط مختلف محیطی و تنش‌زا، به این منظور ارزیابی میزان تحمل گیاه ضروری است. پژوهشگران اثر این تغییرات را در درختان میوه مورد مطالعه قرار داده‌اند (Sivaci, 2006) نشان داده شده است میزان فعالیت آنزیم‌ها در ابتدای فصل و در طی دوره خفتگی تغییرات چشمگیری دارد (Citadin et al., 2001). اسکالابرلی و همکاران (۱۹۹۱) تغییرات میزان آنزیم کاتالاز را در جوانه‌های زردآلو همچنین زسکو و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی‌فنول‌اکسیداز را در درختان آلو و نقش آن‌ها را در فرایندهای داخلی ازجمله میزان گلدهی و توانایی مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی مورد بررسی قراردادند.

بنابراین با توجه به ارزش غذایی بالا و خواص آنتی‌اکسیدانی تمشک و پتانسیل‌های ژنتیکی موجود در ایران و توزیع گسترده‌ی گونه‌ی *R.Sanctus* در مناطق مختلف ایران، شناخت و بررسی تغییرات بیوشیمیایی ترکیبات درونی بافت‌های مختلف تمشک در طی فصل رشد و تأثیر شرایط محیطی بر این ترکیب‌ها ضروری است. این پژوهش برای اولین بار بر روی ۴ ژنوتیپ از گونه‌ی Sanctus در سه ماه جون با دمای نسبتاً گرم ۳۰ و آگوست با دمای بسیار گرم ۳۸ و اکتبر با دمای نسبتاً معتدل ۲۶ از کلکسیون تمشک دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز که در سال ۲۰۰۵ تأسیس شده بود، در دو سال پیاپی۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ جهت بررسی تغییرات بیوشیمیایی در طی فصول رشد انجام شد.

مواد و روش

جمع‌آوری نمونه گیاهی: نمونه‌های برگ و ساقه در طی سه ماه جون و آگوست و اکتبر از کلکسیون تمشک دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز در طی دو سال پیاپی جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه انتقال داده شد .

استخراج عصاره مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن: ۲۵. گرم از بافت تازه پودر شده با نیتروژن مایع را با ۵ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک ۱۰ درصد استخراج شد و در ۱۵۰۰۰دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانترفیوژ شد. از عصاره رویی برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهیدو پراکسید هیدروژن استفاده شد (Puckette et al. 2007).

پراکسیدهیدروژن: با توجه به Alexiva 2001 با کمی اصلاح میزان فعالیت H2O2 اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲۵۰µL عصاره و ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ mM (pH = 7) همراه با ۵۰۰ میکرولیتر KI بود که میزان جذب در ۳۹۰ نانومتر مشخص شد. مقدار پراکسید هیدروژن با استفاده از یک منحنی استاندارد آماده‌شده با غلظت‌های شناخته‌شده از H2O2 محاسبه شد.

مالون‌دی‌آلدهید: از روش اسید تیوباربیتوریک (TBA) (Puckette *et al.* 2007) با کمی تغییرات، برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی استفاده شد. در طول موج ۵۳۲ نانومتر، جذب اختصاصی از عصاره ثبت شد و جذب غیراختصاصی در طول موج۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از عدد جذب۵۳۲ نانومتر قرائت شده کم شد. غلظت MDA به‌عنوان یک اقدام پراکسیداسیون چربی محاسبه شد.

اندازه‌گیری سوپراکسید دسموتاز (SOD): مقدار ظرفیت مهار کاهش فتوشیمیایی از تترازولیوم آبی نیترو (NBT) برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم SOD مورد سنجش قرار گرفت (Wang et al., 2004).

آنزیم پراکسیداز: تغییر جذب در ۴۷۰ نانومتر مشخص‌کننده‌ی میزان فعالیت POD است که به دلیل اکسیداسیون گایاکول اندازه‌گیری شد (Wang *et al.*, 2005) به مدت ۱ دقیقه مورد سنجش قرارگرفت.

آنزیم کاتالاز: ML۳ از مخلوط واکنش شامل mm۱۰۰ بافر پتاسیم فسفات (pH = ۷/۰۰)، µL۵۰ عصاره برگ و MM۱۵ از H2O2بود که مقدار مصرف H2O2 (ضریب انقراض mM۳۹,۴/سانتی‌متر) به مدت ۱دقیقه در ۲۴۰ نانومتر میزان فعالیت CAT تعیین شد(Lardinois *et al*., 1996).

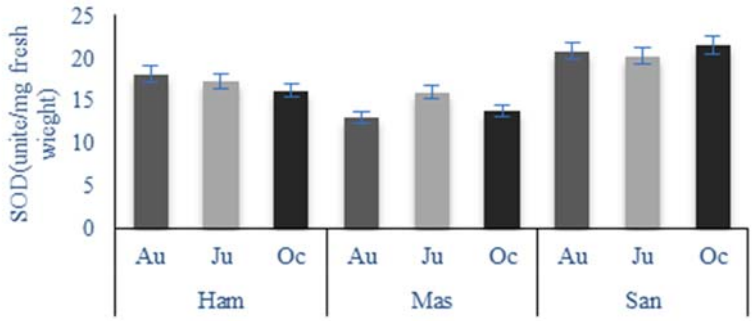
آنزیم آسکوربات پراکسیداز: میزان فعالیت APX بر اساس روش Nakanoand Asada, 1981. با کمی تغییرات انجام شد بر این اساس که میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر مشخص‌کننده‌ی مقدار اکسیداسیون آسکوربات در هر دقیقه است. مخلوط واکنش که یک میلی‌لیتر است و شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته‌ی ۷ و پراکسیدهیدروژن ۱. میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی است.

پس از نمونه‌برداری از صفات مورد بررسی، کلیه داده‌ها طبق آزمون کولموگوروف اسمیرنوف[۲]مورد آزمون نرمالیته قرار گرفت. جهت تجزیه واریانس و آنالیز داده‌ها از نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS، برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ با آزمون چند دامنه‌ای دانکن[۳]انجام شد.

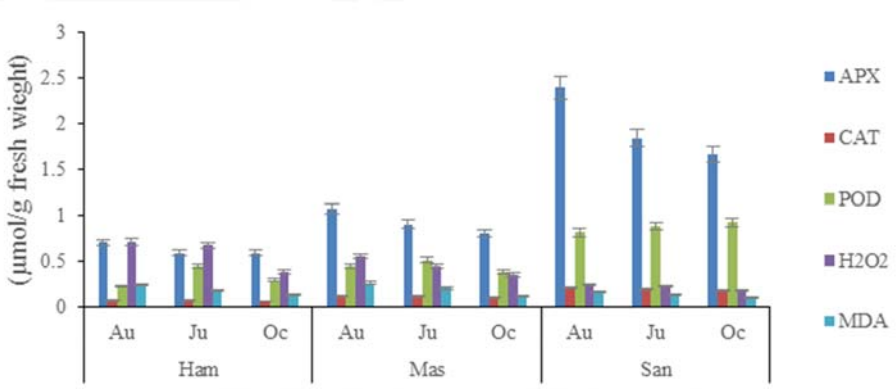
نتایج و بحث

با توجه به اینکه بیشتر مساحت ایران را مناطق گرم و خشک فرا گرفته است (Amiri *et al*., 2010)، نتایج این پژوهش که بر تغییرات بیوشیمیایی ۴ ژنوتیپ (سنندج، همدان و ماسوله) از گونه‌ی Sanctus، hirtus و persicus در طول فصل رشد با تأکید بر تغییرات دمایی انجام شد.با توجه به اینکه بر اساس اندازه‌گیری‌های به‌عمل‌آمده میانگین دمای مزرعه در طی سه ماه جون و آگوست و اکتبر به ترتیب ۳۰ ، ۳۸ و ۲۶ درجه سانتی‌گراد بود، بنابراین دمای گرم مزرعه منطقه گرم و خشک باجگاه در تابستان به‌خصوص ماه آگوست باعث ایجاد تنش دمایی می‌شود. از طرفی یکی از اثرات تنش دمای بالا ایجاد رادیکال‌های آزاد (Cao,*et al*.,2002) و تنش اکسیداتیو ثانویه است (Chaitanya,*et al*. 2001) که می‌تواند موجب کاهش در رشد و توسعه‌ی گیاه و اکسیداسیون پروتئین و لیپیدها (Rodriguez et al., 2005) و در نهایت مرگ سلول شود(Fath et al., 2001 . همچنین (Suzuki et al., 2011). نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که میزان مالون‌دی‌آلدهید و H2O2 در بین بافت‌ها و ماه‌های مختلف در ژنوتیپ سنندج برخلاف ماسوله و همدان در سطح پایین بودند(شکل۱و ۲)، که می‌تواند به دلیل تغییرات آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی باشد(Dai et al.,2012) که مطابق نتایج این پژوهش است. میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از ماه جون به ماه بسیار گرم آگوست به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته و از ماه آگوست به اکتبر که معتدل و مرطوب بود و ازنظر آب‌وهوایی شباهت بیشتری به منطقه‌ی بومی تمشک دارد، کاهش یافته است. اما ثبات نسبی در میزان مالون‌دی‌آلدهید و H2O2 در ماه‌های مختلف در این ژنوتیپ دیده شد که می‌تواند به دلیل مهار رادیکال‌های آزاد توسط افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در ماه آگوست باشد . این یافته در تأیید گزارش Xie et al., 2008 است که بیان می‌کند میزان رادیکال‌های آزاد می‌توانند به‌وسیله‌ی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربیک پراکسیداز و کاتالاز و سوپراکسیددسموتاز و غیر آنزیمی مانند ترکیبات فنولی و فلاونوییدی و آنتوسیانین‌ها، کارتنوییدها کنترل شود. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش می‌توان ژنوتیپ سنندج گونه‌ی سنکتوس را به‌عنوان گونه‌ای مناسب جهت کشت و پرورش در مناطق گرم-خشک و گرم-نیمه خشک پیش‌بینی کرد و ازآن‌جهت قرار گرفتن در برنامه‌های اصلاحی و تکمیلی به‌منظور دستیابی به ارقام جدیدی که قابلیت کشت تجاری در این مناطق دارند، پیشنهاد داد.

4. Kolmogorov–Smirnov test
5. Duncan's new multiple range test



شکل۱- میزان آنزیم سوپراکسیددسموتاز در سه ژنوتیپ در طی فصل رشد.



شکل۲-میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر مالون‌دی‌آلدهید و پراکسیداز

منابع

Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S. R., & Singh, T. P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. Plant Science, 171(3), 382-388.

Amiri, M. J., & Eslamian, S. S. (2010). Investigation of climate change in Iran. J Environ Sci Technol, 3(4), 208-216.

Cao, Q., Kong, W., & Wen, P. (2003). Plant freezing tolerance and genes express in cold acclimation: a review. Acta Ecologica Sinica, 24(4), 806-811.

Chaitanya, K. V., Sundar, D., Masilamani, S., & Ramachandra Reddy, A. (2002). Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. Plant Growth Regulation, 36(2), 175-180.

Citadin, I., Raseira, M. C., Herter, F. G., & da Silva, J. B. (2001). Heat requirement for blooming and leafing in peach. HortScience, 36(2), 305-307.

Dai, A. H., Nie, Y. X., Yu, B., Li, Q., Lu, L. Y., & Bai, J. G. (2012). Cinnamic acid pretreatment enhances heat tolerance of cucumber leaves through modulating antioxidant enzyme activity. Environmental and Experimental Botany, 79, 1-10.

Fath, A., Bethke, P. C., & Jones, R. L. (2001). Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. Plant physiology, 126(1), 156-166.

Foyer, C. H., Kingston-Smith, A. H., Harbinson, J., Arisi, A. C. M., Jouanin, L., & Noctor, G. (1998). The use of transformed plants in the assessment of physiological stress responses. Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Backhuys Publishers, The Netherlands, 251-261.

Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2011). The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. Journal of agricultural and food chemistry, 60(23), 5716-5727.

Finn, C. E., & Clark, J. R. (2012). Blackberry. In Fruit Breeding (pp. 151-190). Springer US.

Lardinois, O. M., & Rouxhet, P. G. (1996). Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1298(2), 180-190.

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, 22(5), 867-880.

Puckette, M. C., Weng, H., & Mahalingam, R. (2007). Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in Medicago truncatula. Plant Physiology and Biochemistry, 45(1), 70-79.

Rodriguez, R., & Redman, R. (2005). Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(9), 3175-3176.

Suzuki, Y., Uji, T., Terai, H., 2004. Inhibition of senescence in broccoli florets with ethanol vapor from alcohol powder. Postharvest Biol. Technol. 31, 177–182.

Schellnhuber, H. J. (2008). Global warming: Stop worrying, start panicking. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(38), 14239-14240.Mittler R, Finka A, Goloubinoff P. 2012. How do plants feel the heat? Trends in Biochemical Sciences 37: 118–125.

Sivaci, A. (2006). Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (Malus sylvestris Miller) stem cuttings. Scientia Horticulturae, 109(3), 234-237.

Szecsko, V., Hrotko, K., & Stefanovits-Banyai, E. (2002). Seasonal variability in phenol content, peroxidase and polyphenoloxidase enzyme activity during the dormant season in plum rootstocks. Acta Biologica **Szegediensis, 46(3-4), 211-212.Wang, S.H., Yang, Z.M., Yang, H., Lu, B., Li, S.Q., & Lu, Y.P. (2004).** Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of Brassica juncea L. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45, 203-212.

Wang, Y. S., & Yang, Z. M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of Cassia tora L. Plant and Cell Physiology, 46(12), 1915-1923.

Lardinois, O.M., & Rouxhet, P.G. (1996). Peroxidatic Degradation of Azide by Catalase and Irreversible Enzyme. Biochimica et Biophysica Acta, 1298, 180-190.

Xie, Z., Duan, L., Tian, X., Wang, B., Eneji, A. E., & Li, Z. (2008). Coronatine alleviates salinity stress in cotton by improving the antioxidative defense system and radical-scavenging activity. Journal of Plant physiology, 165(4), 375-384.

Antioxidant Enzyme Activity of 3 Species of Blackberry (Rubus Sp.) in Different Growth Seaens Regions

Zahra Shams*, Saeed Eshghei, E.A Tafazoli, Ali Ghareghani
Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
*Corresponding Author: zahrashams1987@gmail.com

Abstract

Blackberry, Rubus L. Focke belonging to Rosaceae family and Rosoideae subfamily. Rubusis a large genus that divided into 12 subgenera and has an estimated 750 species distributed world-wide. The three largest subgenera Contains Idaeobatus, Malachobatus, and Rebus. In Iran, the latest report showed 8 species include R.saxatilis L., R.caesius L. and R.sanctus Schreber (belonging to hyrcanian or Caspian), R.hirtus, R.hyrcanus, R.dolichocarpus, R. discolor and R.persicus. Rubus sanctus is a blackberry species which is widely distributed in Iran from the wet climate in the north (Caspian Sea) to the cold climate in the west and even to some semi-arid climates in the southwest of the country. On the other hand, studies showed climate change can be effected on biological diversity and intraspecific genetic variation. Genetic diversity within a species is crucial for its ability to adapt (short-term and long-term) survival. The present study aims to investigate and compare the changes in antioxidant enzyme in 3 genotypes of blackberries representing 3 species at different growing season to find superior genotypes well adapted to climate conditions of southern Iran with high-temperature and low relative humidity. so, the results of this experiment may be useful for identifying tolerant genotypes consistent with climate conditions in southern Iran and areas with similar climates. Different cultivars grown in the same season consistently showed differences in antioxidant enzyme activity and difference in MDA and H2O2. There was little effect of harvest season on MDA levels in Sanandaj. We conclude that levels of MDA and H2O2 mainly depended on the genotype and antioxidant enzyme activity. MDA and H2O2 were both highly correlated with each other, and with antioxidant enzyme activity and season.

***Key word*: *Rubus sanctus,* MDA, Antioxidant enzyme**