بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گونه sanctus در مراحل مختلف رشد

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

چکیده

تمشک از خانواه Rosaceae و جنس Rubus می‌باشد که به‌صورت وحشی در مناطق معتدل و مرطوب ایران رشد می‌کند. این گیاه دارای ارزش غذایی و خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی است و بنابراین پتانسیل کشت تجاری را داراست. اما ازآنجایی‌که بیشترین مساحت ایران مناطقی با آب‌وهوای گرم و خشک با دمای بالا در تابستان، فراگرفته است، شناسایی و معرفی ارقام متحمل و سازگار نسبت این مناطق ضروری می‌باشد. لذا این آزمایش در منطقه باجگاه در دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در ۳ ماه جون با میانگین دمایی ۳۰ و آگوست با میانگین دمایی ۳۸ و اکتبر با میانگین دمایی ۲۶ درجه سانتی‌گراد در دو سال پیاپی ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ و ۴ تکرار به‌منظور ارزیابی گونه‌ی Sanctus نسبت به تغییرات آب‌وهوایی و به‌خصوص دمایی در طول فصل رشد، انجام شد. میزان فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی مانند آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، فنول، فلاونویید، فلاونون، مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میزان ترکیبات فنلی و فلاونونی و فلاونوییدی در ماه بسیار گرم آگوست نسبت به سایر ماه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت.

کلمات کلیدی: **sanctus، فنل، فلاونوییدی، آنتی‌اکسیدان**

مقدمه

تمشک گیاهی متعلق به جنس Rubus و از خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) و زیر خانواده (Rosoideae) می‌باشد که علی‌رغم گسترگی فراوان در بیشتر اقلیم‌ها، از گیاهان مناطق معتدله محسوب می‌شوند (Finn, 2012). تمشک در برخی از مناطق و به‌خصوص منطقه شمال ایران و دامنه رشته‌کوه‌های زاگرس به‌صورت وحشی رشد می‌کند (Hadadinejad, 2014) که می‌توان از بین۱۱ گونه‌ای که به‌طور وحشی در ایران رشد می‌کند گونه‌ی *R.Sanctuse* را از شمال با آب‌وهوای مرطوب تا آب‌وهوای سرد غرب و حتی برخی از آب‌وهوای نیمه‌خشک در جنوب‌غربی مشاهده کرد (Kaume*et al*., 2012).

مطالعات قبلی نشان دادند که انواع بری‌ها منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند (Heinonen*et al*., 1998). این آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی شامل ترکیبات فنولی و آنتوسیانین هستند (Wang and Lin, 2000) و چون و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که این ترکیبات اثرات مفیدی در مهار رادیکال‌های آزاد و درنتیجه محافظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال آزاد دارند (Wada and Ou, 2002).

(Kahkonen *et al*. ,2001) گزارش کردند که محتوای فنلی تمشک با توجه به بافت و گونه و مرحله‌ی رشدی و منطقه‌ی رشد گیاه و فصول مختلف متفاوت می‌باشد. همچنین Garc´ıa-Alonso et al., 2004 گزارش کردند که آنتوسیانین یک گروه از ترکیبات فنلی هستند که باعث رنگ قرمز یا آبی در گیاهان می‌شوند و ارزش غذایی فراوانی برای سلامتی انسان دارد.

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 گونه‌یSanctus 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 ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنلی در طی فصول رشد انجام شد.

مواد و آزمایش

عصاره‌گیری از نمونه‌ها به‌منظور سنجش برخی فاکتورهای بیوشیمیایی: به‌منظور عصاره‌گیری از نمونه‌ها جهت سنجش دیگر فاکتورهای بیوشیمیایی از حلال متانولی به نسبت ۵ به ۱ (حجمی- وزنی) با استفاده از حلال متانول ۷۰ درصد استفاده خواهد شد. برای تمامی تیمارها میزان ۱ گرم نمونه خشک (برگ) توزین شده و به لوله فالکون[7]انتقال می‌یابد، سپس میزان ۵ میلی‌لیتر حلال به آن‌ها اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) نگهداری شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفیوژ[1]با دور ۶۰۰۰ قرار می‌گیرند. سپس قسمت روشناور صاف کرده و به‌عنوان عصاره جهت انجام آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری خواهد شد (Wojdyło et al., 2007).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از آزمون DPPH[2]و روشOke و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد و سپس به مدت ۳۰ ثانیه جهت واکنش در دمای اتاق و در محیط تاریک نگهداری می‌شوند و سپس در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت خواهند شد. اعداد جذب پایین‌تر نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر خواهد بود. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (AOA%) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

درصد فعالیت آنتی = (عدد جذب شاهد – عدد جذب نمونه) / عدد جذب شاهد ×۱۰۰ اکسیدانی

غلظت عصاره‌ای که بتواند۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را خنثی کند (IC_{50}[3]که برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از این پارامتر استفاده می‌شود) با استفاده از رسم نمودار و محاسبه توالی‌یابی خطی محاسبه خواهد شد (Hashemi et al., 2011).

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی بر اساس روش فولین[1]انجام شد (Wojdyło et al., 2007). سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ nm انجام شد. اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل به روش Menichini و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد و درنهایت میزان جذب نور در طول موج ۵۱۰ nm قرائت شد. رسم منحنی استاندارد کوئرستین (غلظت‌های ۰ تا ۴۰۰ پی پی‌ام) انجام شد و داده‌ها به‌صورت میلی‌گرم اکی‌والانت کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان شد. میزان فلاون به روشPopova و همکاران (۲۰۰۴) اندازه‌گیری شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اکی‌والانت کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان شد. برای رسم منحنی استاندارد نیز از غلظت‌های مختلف کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید فلاونول نیز همانند فلاون به روشPopova و همکاران (۲۰۰۴) اندازه‌گیری می‌شود و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اکی‌والانت کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان شد.

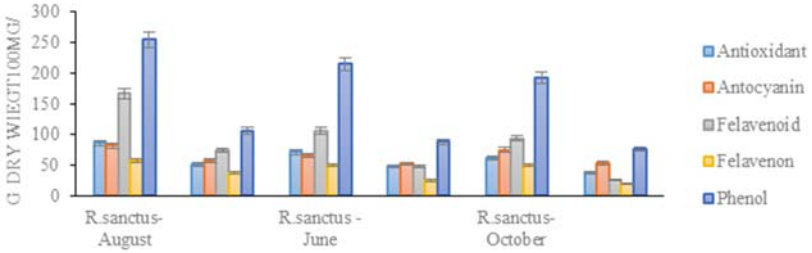
7. Falcontube
1. Centrifuge
2. 2,2-diphenylpicrylhydrazyl, Sigma, Aldrich
3. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50})
1. FolinCiocalteu Method

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از نمونه‌برداری از صفات مورد بررسی، کلیه داده‌ها طبق آزمون کولموگوروف- اسمیرنوف[4]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[5]یا LSD[6]انجام شد.

نتایج و بحث

ازآنجایی‌که ترکیباتی مانند فنل و فلاونویید و فلاونون‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و برای سلامتی انسان بسیار مفید هستند و انواع توت‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی شناخته شدند لذا لازم بود که میزان خواص آنتی‌اکسیدانی در طول فصل رشد مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج این پژوهش(شکل۱)نشان می‌دهد که میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل فنل و فلاونویید و فلاونون از ماه جون به ماه بسیار گرم آگوست به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته و از ماه آگوست به اکتبر که معتدل و مرطوب بود و از نظر آب‌وهوایی شباهت بیشتری به منطقه‌ی بومی تمشک دارد، کاهش‌یافته است. همچنین مشاهده شده است که میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی تمشک در ماه آگوست به‌طور چشمگیری بیشتر است که بر اساس تجزیه رگرسیون بیشتر مربوط به ترکیبات فنلی بود که در ماه آگوست با اختلاف چشمگیری بیشتر بوده است.علاوه بر این فلاونویید‌ها به‌طور گسترده‌ای در برگ، قطعات گل و گرده گیاه وجود دارند. فلاونویید‌ها معمولاً در واکوئل‌های گیاهی مانند گلیکوزیدها تجمع می‌یابند، اما آن‌ها نیز در سطح برگ و سایر قسمت‌های هوایی گیاه ترشح می‌شوند و معمولاً غلظت فلاونویید در سلول‌های گیاهی بیش از یک میلی‌متر است (Vierstra et al.,1982). فلاونویید بر اساس ساختار به رده‌های مختلف ازجمله فلاونول، فلاون، ایزوفلاون و آنتوسیانین تقسیم می‌شود. پیشنهاد می‌شود که فلاونویید‌ها دارای نقش زیادی در حفاظت گل و میوه و بذر و برگ در برابر نور UV و پاتوژن‌های گیاهی مانند میکروارگانیسم‌هایی بیماری‌زا و حشرات و حیوانات و همچنین نقش مهمی در باروری گیاهان و جوانه‌زنی دانه گرده دارد و همچنین به‌عنوان یک سیگنال برای پاسخ گیاه به میکروب می‌باشد(Olsen *et al.*,2010). (Løvdal*et al.*, 2010) گزارش کرده است که فلاونویید، فعال‌ترین ترکیب در بین ترکیبات ثانویه‌ی گیاهی است.که می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌ای برای رادیکال‌های آزاد سلول و یا خنثی‌سازی ROSها قبل از ایجاد آسیب به سلول، تحت شرایط محیطی نامطلوب، باشد.Løvdal*et al.*, 2010بیان کرده است که بیان بسیاری از ژن‌های بیوسنتز کننده‌ی فلاونویید تحت تنش زیستی و غیرزیستی، افزایش قابل‌توجهی پیدا می‌کند. در تأیید آن می‌توان نتیجه‌ی Peng*et al.*, 2008 را عنوان کرد که فلاونویید نقش مهمی در تحمل بهتر گیاه نسبت به کمبود نیتروژن در A.thaliana دارد.



شکل۱- میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گونه‌ی sanctus

4. Kolmogorov–Smirnov test
5. Duncan's new multiple range test
6. Least Significant Difference

منابع

Chun, O.K., Kim, D.O., Lee, C.Y., 2003. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums.J. Agric. Food Chem. 51, 8067–8072.

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

Garc´ıa-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., Pascual-Teresa, S., 2004. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisinsa studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. J. Agric. Food Chem. 52, 3378–3384.

Hadadinejad, M. (2014). Establishment of research collection of blackberries in east of mazandaran. In: Proceedings of 3rd national congress of organic and customary agriculture, 20-21 Aug., *University of MohagheghArdabili, Ardabil, Iran*, pp. 1-4. (in Farsi)

Hashemi, M. B., Niakousari, M., &Saharkhiz, M. J. (2011). Antioxidant activity of *Saturejabachtiarica* Bunge essential oil in rapeseed oil irradiated with UV rays. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*(9), 1132-1137.

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.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., Di Cindi, B., Houghton, P.J., &Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense*Jacq.cv Habanero. *Food Chemistry*, *114*(2), 553-560.

Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., &Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Saturejacuneifolia*Ten. *Food Chemistry*, *112*(4), 874-879.

Olsen, A. Hehn, H. Jugde, R. Slimestad, R. Larbat, F. Bourgaud, C. Lillo, 2010. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3050-hydroxylase, isolated from Solanumlycopersicum, BMC Plant Biol. doi:10.1186/1471-2229-10-21.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G.L., &Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis.*Phytochemical analysis*, *15*(4), 235-240.

R.D. Vierstra, T.R. John, K.L. 1982. Proff, Kaempferol 3-O-galactoside 7-O-rhamnosideis the major green fluorescing compound in the epidermis of Viciafaba, PlantPhysiol. 69: 522e532.

T. Løvdal, K.M. Olsen, R. Slimestad, M. Verheul, C. Lillo. (2010). Synergetic effects ofnitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenoliccompounds and gene expression in leaves of tomato, Phytochemistry71,605e613.

Van der Sluis AA, Dekker M, De Jager A, Jongen WMF. 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effects of cultivar, harvest year, and storage conditions. J Agric Food Chem 49:3606–13.

Wada L, Ou B. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon cranberries. J Agric Food Chem 50:3495–500.

WANG, S. Y., and LIN, H. S. 2000. Antioxidant activity in fruitsand leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agric. Food Chem. 48,140–146.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., &Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, *105*(3), 940-949.

Comparing Antioxidant Activity and Chemical Properties of Wild Blackberry (Rubus sanctus schreb) Genotypes at Different Season

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

Polyphenols have potentially beneficial effects on health including anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial, and antioxidant activity. Antioxidant activity is defined as the ability to reduce free radical formation and scavenge reactive oxygen species (ROS) (Narayana andothers 2001; Liu 2003). However, the antioxidant activity of plant varies considerably. Differences gauged between cultivars may be explained by genotype (Minoggio and others 2002; Howard and others 2003), growing temperature(Perez-Tello and others 2001; Wang and Zheng 2001), growing season, maturity at harvest, environmental stress, and other factors (Rainwater and others 1996; Reverberi and others 2001; Kirakosyan and others 2004).Berry crops, specifically blackberry , are significant sources of polyphenolic compounds in the human diet (Sellappan and others 2002; Zheng and Wang 2003). Blackberries are an important crop but in Iran are not commercially produced. Blackberry the differences in antioxidant capacity or phenolic content in berries adapted to different growing regions have not been thoroughly investigated. Rubus sanctus is a blackberry species which is widely distributed in Iran The aims of this study were to compare phytochemical content of sanctus that cultured in research field at Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran to determine how the antioxidant capacity of the different tissue extracts. This research was conducted during 2015 to 2016. Blackberry species studied, included Sanctus with 4 repeat. Result show that total phenol ranged from 254.66mg/100g dry weight in Aguste, to 193.33mg/100g dry weight in June. Total flavonoid and flavanone and anthocyanin ranged from 166.87, 57.08,82.26mg/100g dry weight in Aguste, to 93.69,50.23,74.71mg/100g dry weight in June. Sanctus exhibit significant differences in phenol, flavonoid, flavanone or antioxidants activity as a consequence of the harvest season. The highest concentration of antioxidants activity was recorded for Aguste and relatively low antioxidants activity levels were recorded for June treatments. blackberry from Sanctus exhibited the highest values for total phenolic and anthocyanin content. We conclude that levels of total flavanone, flavonoid, antioxidant capacity, and polyphenols mainly depended on the climate or the season. antioxidants activity was correlated with total phenols and anthocyanin content.

***Keywords*: antioxidant capacity, anthocyanin, total phenols, Sanctus**