تنش اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سه رقم انگور تحت دمای پایین

شیماالسادات بهشتی روی*، مهدی قبولی، روح‌الله کریمی
دپارتمان به زراعی و به نژادی، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر
*نویسنده مسئول: shima_beheshti@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه تغییرات غلظت پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، پراکسید هیدروژن به‌عنوان نشانگرهای زیستی تخریب غشا و تنش اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پر اکسیداز سه رقم انگور *Vitis Vinifera* L. شامل بی‌دانه قرمز(متحمل به سرما)، بی‌دانه سفید (نیمه متحمل به سرما) و فلیم سیدلس(حساس به سرما) تحت شرایط تنش سرما در یک محفظه سرمادهی قابل برنامه‌ریزی مطالعه گردیده است. بعد از رسیدن گیاه به مرحله به‌طور متوسط ۱۵ برگی بوته‌های انگور تحت تنش سرمای ۴،۰ و۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و با گیاهان شاهد که در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند مقایسه شدند. بر اساس نتایج اختلاف معنی‌داری بین ارقام ازنظر صفات اندازه‌گیری شده مشاهده شد. افزایش قابل‌توجهی در میزان مالون دی آلدهید و غلظت پر اکسید هیدروژن با کاهش دما از ۴ تا ۴- درجه سانتی‌گراد در تمام رقم‌های انگور مشاهده گردید. در رقم بی‌دانه قرمز مقدار مالون دی آلدهید و پراکسید هیدروژن در اثر قرارگیری در معرض تنش سرما نسبت به دو رقم دیگر بی‌دانه سفید و فلیم سیدلس کمتر بود. در شرایط دمای صفر درجه سانتی‌گراد رقم بی‌دانه قرمز بیشترین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را داشت، به‌گونه‌ای که مقدار آن تقریباً دو برابر مقدار سایر ارقام بود. در کل در رقم متحمل به سرما تنش اکسایشی کمتری مشاهده شد که با فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده شده در این رقم تحت تنش سرما همبستگی داشت.

***کلمات کلیدی:* فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تنش سرما، محفظه سرما دهی، مالون دی آلدهید، انگور.**

مقدمه

دمای پایین یکی از تنش‌های مهم غیر زیستی است که اثر قابل توجهی بر محصول و بقای انگور می‌گذارد. یکی از روش‌های عملی برای اجتناب از خسارت سرما انتخاب و کشت ارقامی از انگور است که دارای مقاومت به سرمای بیشتری باشند (Karimi, 2017). کاهش طول روز در اواخر تابستان و سپس دماهای پایین و غیر منجمد کننده زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد موجب تطابق به سرما می‌گردند. در اثر این پدیده در ارقام انگور، مجموعه‌ای از تغییرات متابولیک رخ می‌دهد که موجب ایجاد توانایی مقابله با تنش دماهای پایین می‌گردد. تغییرات پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، پراکسید هیدروژن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از جمله مهم‌ترین عوامل متابولیک دفاعی در برابر تنش دمای پایین هستند که در فرایند تطابق به سرما به وجود می‌آیند. ظرفیت مقاومت به سرمای انواع گونه‌ها و ارقام درختان میوه، به علت اختلاف در زمینه‌های ژنتیکی متفاوت است (Ershadi et al., 2016). یکی از راهکارهای بهبود پاسخ درختان میوه به شرایط دمای پایین، استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. در نواحی آب و هوایی معتدل، انتخاب رقم مناسب دارای توانایی مقابله با تنش‌های محیطی گوناگون از اهمیت بسیاری در جهت کاهش مسائل مربوط به تاکستان‌ها و کاهش هزینه‌ها برخوردار است. بنابراین شناسایی مکانیزم‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و پاسخ‌های ارقام مختلف انگور به‌عنوان یک گیاه درختی مدل، تحت شرایط تنش دمای پایین می‌تواند موجب درک بهتر و ایجاد توانایی برای فرایند غربال‌گری به منظور انتخاب ارقام مقاوم گردد. هدف این پژوهش ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سه رقم انگور (*Vitis*

(*vinifera* L.) شامل بی‌دانه قرمز(متحمل به سرما)، بی‌دانه سفید (نیمه متحمل به سرما) و فلیم سیدلس(حساس به سرما) در معرض چهار رژیم دمایی (۰،۴،۲۴و۴-) در شرایط کنترل شده است.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های یک‌ساله سه رقم انگور شامل بی‌دانه سفید، بی‌دانه قرمز و فلیم سیدلس در گلدان‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری در گلخانه به مدت ۴ ماه تا ظهور ۱۵ برگ کامل رشد داده شدند. در این مطالعه ترکیب سه رقم انگور شامل بی‌دانه قرمز، بی‌دانه سفید و فلیم سیدلس که در مقاومت به سرما باهم متفاوت‌اند و چهار رژیم دمایی(۰،۴،۲۴و۴-) بر پراکسیداسیون لیپید، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ‌های انگور اندازه‌گیری شد. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار بود.

سرمادهی در دماهای ۴ ºC (دمای سرمای استاندارد)، ۰ ºC(نقطه انجماد) و۴- ºC (دمای انجماد) انجام شد و مدت سرمادهی۴ ساعت بود. در طول این مدت گلدان‌ها به‌منظور محافظت از ریشه‌ها به‌وسیله مقوا و پنبه عایق‌بندی شدند و بقیه بوته‌ها در دمای۲۴ ºC به‌عنوان شرایط کنترل نگهداری شدند (Ershadi et al., 2016). برای اندازه‌گیری تغییرات شاخص‌های فوق‌الذکر در برگ‌های ارقام انگور گلدانی تحت شرایط دمای محیط(۲۴ºC) و تنش دمای پایین (۰،۴و۴- درجه سانتی‌گراد)، نمونه‌هایی از برگ‌های کاملاً رشد یافته از هر بوته انگور گرفته شد و در نیتروژن مایع قبل از قرارگیری در دمای ۸۰- ºC برای آنالیزهای بعدی منجمد گردید. پراکسیداسیون لیپید در قالب غلظت مالون دی آلدهید (MDA) اندازه‌گیری شد (Heath and Packer, 1968) پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) به‌وسیله اسپکتروفتومتر بعد از واکنش با یدیدپتاسیم (KI) اندازه‌گیری شد (Velikova and Loreto 2005). فعالیت کاتالاز با اندازه‌گیری کاهش جذب H_2O_2در طول‌موج ۲۴۰nm تعیین گردید (Bergmeyer, 1970). فعالیت پراکسیداز پس از اکسیداسیون گایاکول به‌وسیله H_2O_2 در طول‌موج ۴۷۰nm اندازه‌گیری شد.(Herzog and Fahimi 1973) . فعالیت آسکوربات پراکسیداز به‌وسیله اندازه‌گیری میزان کاهش جذب در طول‌موج ۲۹۰nm یک دقیقه پس از اکسیداسیون آسکوربات تعیین شد(Nakano and Asada, 1981). فعالیت ویژه هر آنزیم آنتی‌اکسیدانی در واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

نتایج و بحث

سطوح پراکسیداسیون لیپید در برگ‌های انگور در قالب غلظت MDA اندازه‌گیری گردید. افزایش قابل توجهی($P \leq 0.01$) در غلظت MDA در برگ‌ها در اثر تنش سرمایی مشاهده گردید (جدول۱). کمترین مقدار غلظت MDA در رقم بی‌دانه قرمز در مقایسه با سایر ارقام خصوصاً در دماهای ۰ و ۴- مشاهده گردید. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در غلظت‌های MDA بی‌دانه سفید و فلیم سیدلس تحت تیمار سرما به‌جز ۴ ºC- مشاهده نگردید (جدول ۱). حین قرارگیری در معرض تنش سرمایی بین ۴ ºC و ۴- ºC غلظت‌های H_2O_2 برگ‌های تمام ارقام نسبت به گیاه شاهد که در دمای ۲۴ºC نگهداری شده بود، به‌صورت قابل توجهی افزایش یافت(جدول۱). شایان ذکر است که تولید پراکسیدهیدروژن رقم بی‌دانه قرمز در قیاس با سایر ارقام کمتر بود (جدول۱).

بیشترین فعالیت پراکسیداز بعد از تنش سرمایی(۴ تا ۰ درجه سانتی‌گراد) در رقم بی‌دانه قرمز مشاهده شد درحالی‌که در ۴- ºC فعالیت پراکسیداز بی‌دانه سفید بیشتر از رقم‌های دیگر بود (جدول۱). در تیمار صفر درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت پراکسیداز در بی‌دانه قرمز مشاهده شد که فعالیت پر اکسیداز آن ۶۴ درصد بیشتر از رقم فلیم سیدلس بود. بیشترین فعالیت کاتالاز در رقم بی‌دانه قرمز در صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول۱).

جدول ۱- پراکسیداسیون لیپید (مالون دی آلدئید)، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ‌های ارقام مختلف انگور تحت رژیم‌های دماهای مختلف

پارامتر	رقم	-4(°C)	0(°C)	4(°C)	24(°C)
مالون دی آلدئید ($\mu mol\ g^{-1}$ FW)	فلیم سیدلس	5.77± 0.2 a	4.31± 0.1 c	3.57± 0.1 de	2.30± 0.4 g
	بی‌دانه قرمز	4.71±0.4 b	3.42± 0.1e	3.10± 0.2 f	2.10± 0.3 g
	بی‌دانه سفید	4.93±0.3 b	3.91± 0.3 d	3.32±0.2 ef	2.19± 0.5 g
پراکسید هیدروژن ($\mu mol\ g^{-1}$ FW)	فلیم سیدلس	5.40± 0.4 a	4.75± 0.4 ab	2.85± 0.1 d	1.65± 2.2 f
	بی‌دانه قرمز	4.26± 0.3 b	3.64± 0.2 c	2.15± 0.1 e	1.55± 0.9 f
	بی‌دانه سفید	5.07± 0.5 a	4.20± 0.2 b	2.88± 0.2 d	1.61± 0.1 f
فعالیت کاتالاز (Units mg^{-1} protein)	فلیم سیدلس	1.91± 0.2 c	2.52± 0.2 b	1.63± 0.07 d	0.91± 0.5 e
	بی‌دانه قرمز	2.66± 0.2 b	3.65± 0.3 a	1.95± 0.1 c	1.24± 0.4 e
	بی‌دانه سفید	2.51± 0.3 b	1.70± 0.3 cd	1.95± 0.1 c	1.22± 0.4 e
فعالیت پراکسیداز (Units mg^{-1} protein)	فلیم سیدلس	4.30± 0.7 cd	4.57± 0.4 d	5.62± 0.6 c	1.84± 0.3 e
	بی‌دانه قرمز	7.36± 0.7 b	10.45± 1.2 a	8.28± 0.8 b	2.44± 0.4 e
	بی‌دانه سفید	8.79± 0.8 b	5.77± 0.5 c	3.64± 0.8 d	2.19± 0.2 e
فعالیت آسکوربات (Units mg^{-1} protein)	فلیم سیدلس	2.80± 0.3 d	3.19± 0.6 cd	2.78± 0.3 d	0.86± 0.2 f
	بی‌دانه قرمز	5.88± 0.6 a	5.17± 0.5 b	3.52± 0.3 c	1.76± 0.3 e
	بی‌دانه سفید	3.98± 0.4 c	4.99± 0.7 ab	4.68± 0.4 b	1.01± 0.2 f

فعالیت آسکوربات پر اکسیداز در برگ‌های انگور بی‌دانه سفید افزایش قابل توجهی در ۴ ºC در مقایسه با سایر رقم‌ها نشان داد درحالی‌که در ۴- ºC فعالیت آسکوربات پر اکسیداز بی‌دانه قرمز به‌صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر از دو رقم دیگر بی‌دانه سفید و خصوصاً فلیم سیدلس بود (جدول۱). در این پژوهش غلظت‌های MDA و H_2O_2 به‌عنوان بیومارکرهای تنش اکسیداتیو و نشانه‌های خسارت در برگ‌های تمام ارقام در اثر اعمال تنش سرما افزایش یافت. در آنالیزهای مقایسه‌ای غالباً رقم مقاوم به سرمای بی‌دانه قرمز میزان کمتری از MDA و H_2O_2 را نشان داد. در پژوهش حاضر برگ‌های انگور قرار گرفته در معرض تنش سرمایی فعالیت آنزیم‌های مقابله کننده با ROS بیشتری نسبت به برگ‌های شاهد غیر سرمادیده داشتند. این نتایج اثبات می‌کند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های انگور به‌شدت تابع زمینه ژنتیکی (رقم) تحت شرایط دمای پایین است. این جنبه‌ها به‌دقت در گذشته در گونه‌های اصلی درختان میوه بررسی نشده است.

منابع

Bergmeyer, N. 1970. Methoden der Enzymatischen Analyse. Volume 1. AkademieVerlag, Berlin, Germany. 636–647.

Ershadi, A., Karimi, R. and Mahdei, K.N., 2016. Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. Acta Physiol. Plant. 38, 1-10.

Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photo-peroxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189- 198.

Herzog, V., Fahimi, H.D. 1973. Determination of the activity of peroxidase. Anal. Biochem. 55, 554–562.

Karimi, R. 2017. Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines and soluble sugars changes in grapevine. Sci. Hort. 215, 184-194.

Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880.

Velikova, V., Loreto, F. 2005. The relationship between isoprene emission and thermo-tolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery fr1qom a heat stress. Plant Cell Environ. 28, 318–327.

Oxidative Stress and Antioxidant Activity of Three Grapevine Cultivars under Low Temperature

Shima Sadat Beheshti Rooy*, Mehdi Ghabooli, Rouhollah Karimi
Grapevine Production and Genetic Improvement Department, Iranian Grape and Raisin Institute, Malayer University
*Corresponding Author: shima_beheshti@yahoo.com

Abstract

In this research the changes in the concentration of membrane lipid peroxidation and hydrogen peroxide as biological markers of membrane destruction and oxidative stress and antioxidant enzymes activity of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase of three *vitis vinifera* cultivars including 'White Sultana', 'Flame Seedless' and 'Red Sultana' subjected to cold temperature stress in a programmable cooling are investigated. After 15 leaves stage in average, the grapevine plants were subjected to cold stress regimes (4, 0 and -4 ºC) and compared with control plants (24°C). A clear increase in malondialdehyde (MDA), and H2O2 concentrations was observed with decreasing temperature from 4 to -4ºC in all grapevine cultivars. Upon exposure to cold stress, the MDA and H2O2 of 'Red Sultana' were found to be lower compared to 'White Sultana' and 'Flame Seedless'. Under 0°C condition, 'Red Sultana' had the highest peroxidase and catalase activities, which was approximately two-fold higher than those of all other cultivars. In general, lower oxidative reaction was observed in the cold tolerant cultivar, which is correlated to the higher activity of antioxidant enzymes under cold stress in this cultivar.
***Keywords*: Antioxidant activity, Grapevine, Cold stress, Cooling chamber.**