

اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در بافت های رویشی و زایشی رز رقم Black Magic تحت تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید

میترا اعلایی، مصباح بابالار، روح انگیز نادری، محسن کافی

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز

این پژوهش با هدف پی بردن به تأثیر مه افشانی سالیسیلیک اسید در مرحله قبل از برداشت در بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی و به تاخیر انداختن پیری در رزه های شاخه بریده رقم Black Magic انجام گرفت. غلظت های ۲۰۰-۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بر بوته های رز پرورش یافته در گلخانه مه افشانی شدند و فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در برگ ها و گلبرگ ها در مراحل مختلف نمو ارزیابی شد. فعالیت کاتالاز و پراکسیداز و روند پیری بطور مثبت تحت تأثیر سالیسیلیک اسید قرار گرفت. اساساً، فعالیت کاتالاز در برگها و گلبرگ ها با گسترش مرحله نمو کاهش یافت و کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله پیری گلبرگ مشاهده شد. سالیسیلیک اسید موجب تاخیر در کاهش فعالیت کاتالاز طی پیری در برگها و گلبرگ ها در مقایسه با نمونه های کنترل گردید. بر خلاف کاتالاز، فعالیت پراکسیداز در برگها و گلبرگ ها طی نمو افزایش یافت. نتایج نشان داد که پیری در گلهای تیمار شده با سالیسیلیک اسید در نتیجه بهبود ظرفیت جاروب کردن گونه های اکسیژن فعال (ROS) مرتبط با فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز به تاخیر افتاد.

کلمات کلیدی: پیری، کاتالاز، پراکسیداز، جاروب کردن گونه های اکسیژن فعال، ظرفیت آنتی اکسیدانی

مقدمه

از دست رفتن کیفیت شاخه ها، برگها یا بخش های گل منجر به عدم پذیرش گلهای شاخه بریده در بازارهای محلی و بین المللی می گردد. از دست رفتن بازار پسندی گلهای شاخه بریده در نتیجه عوامل مختلف طی مراحل قبل و پس از برداشت است. به منظور ارزیابی فاکتورهای موثر بر طول عمر گل های شاخه بریده و شیوه های بهبود عمر انبارمانی آنها باید در ابتدا دریابیم فاکتورهای مختلف قبل و پس از برداشت چگونه و از طریق چه مکانیسم هایی کیفیت گل های شاخه بریده را کاهش می دهند؟ بارزترین مشکلی که در ارتباط با گلهای شاخه بریده وجود دارد پیری سریع اندام ها پس از جدا شدن است. وقوع پیری اساس ژنتیکی داشته و در تعامل متقابل با فاکتورهای درونی و محیطی نیز قرار دارد (Buchanan-Wollaston et al., 2003). علاوه بر تغییر در خصوصیات غشاء و زوال سلامت آن همراه با افزایش سن (Suttle and Kende; 1980)، ایجاد گونه های اکسیژن فعال (ROS) نیز از جمله دیگر عوامل مهمی هستند که روند پیری را سرعت می بخشند (et al., 1981). رادیکال های آزاد، با حمله به غشای سلولی و بروز فعل و انفعالات تخریبی گوناگون سبب تحریک آن و از بین رفتن عملکرد انتخابی و هوشمند سلولها می شوند که در نهایت مرگ را به دنبال خواهد داشت مگر اینکه به طریقی خنثی شوند. عمر پس از برداشت گلهای شاخه بریده می تواند تحت تأثیر عوامل و ترکیباتی که رادیکال های آزاد را خنثی می کنند یا موجب نقص در مکانیسم تولید آن می شوند بهبود یابد (Baker et al., 1985). مشخص شده است که الگوی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و ارتقای ظرفیت آنتی اکسیدان سلولها یک عامل بسیار مهم در کنترل روند فرایندهای پیری است (Hurng and Kao, 1994; Ye et al., 2000). لذا، در این تحقیق بررسی خواهیم کرد که کاربرد اسید سالیسیلیک به صورت مه افشانی بر روی بوته های رز در مرحله داشت (قبل از برداشت) چه تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی خواهد داشت و آیا این ترکیب می تواند موجب افزایش عمر ماندگاری گلهای رز پس از برداشت گردد؟

مواد و روش ها

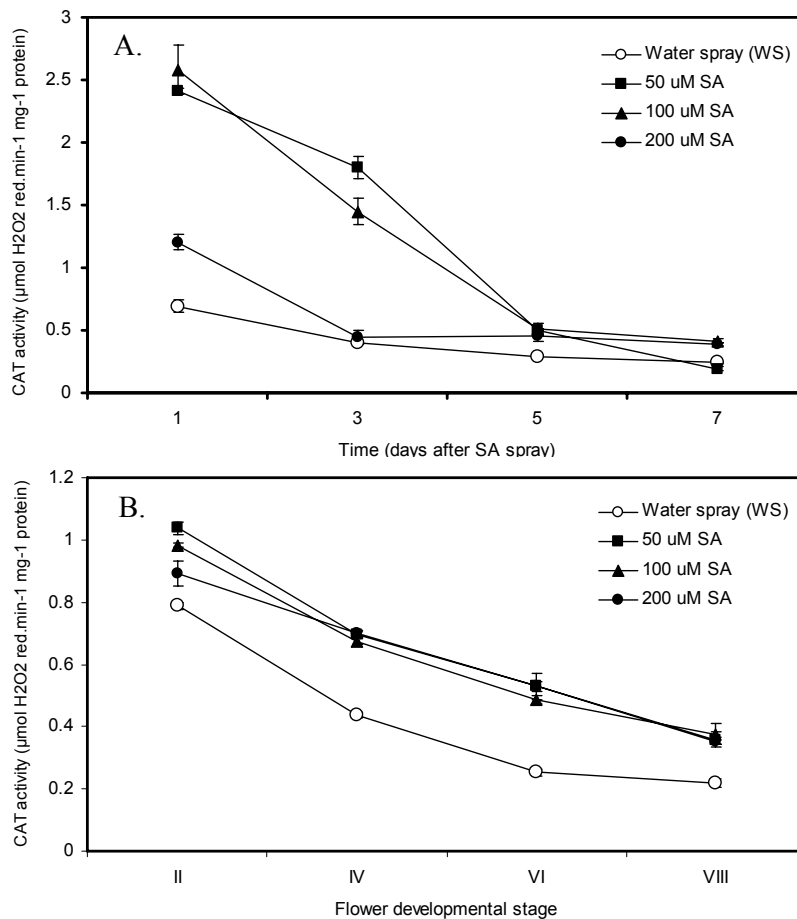
غلظت های ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ ماکرومولار سالیسیلیک اسید و صفر (آب مقطر + الکل) در قالب طرح کاملاً تصادفی بر بوته های ریشه دار رز رقم **Black Magic** مه افشانی شدند. در فواصل زمانی ۲۴ ساعت تا ۷ روز پس از مه افشانی از بافت های رویشی و گلها در مراحل مختلف نمو (II-VIII) نمونه گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش (Aebi, 1984) و فعالیت پراکسیداز به روش (Chance and Meahli, 1995) با کمی تغییرات ارزیابی شد. ۰/۵ گرم برگ یا گلبرگ کاملاً پودر شده و ۵ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات پتاسیم pH=۷ به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون حاصل در دمای °C ۴، روشن‌آور برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز برداشت شد. مخلوط واکنش اندازه گیری فعالیت کاتالاز شامل سه میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده و ۱۲/۵ میکرولیتر پراکسید هیدرژن بود. بلافاصله پس از اضافه کردن هر یک از این اجزا در کووت اسپکتروفوتومتر، کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در دمای °C ۲۵ بررسی و قرائت شد. در نهایت میزان پراکسید هیدرژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه شد. مخلوط واکنش اندازه گیری فعالیت پراکسیداز شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات، ۵۰ میلی مولار، ۱۰ میلی مولار گویاکول، ۱۵ میلی مولار پراکسید هیدرژن و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره آنزیمی، بلافاصله افزایش جذب در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد. سپس میزان تراگوایاکول تشکیل شده با استفاده از ضریب خاموشی $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد. پروتئین کل توسط روش (Bradford, 1976) اندازه گیری شد.

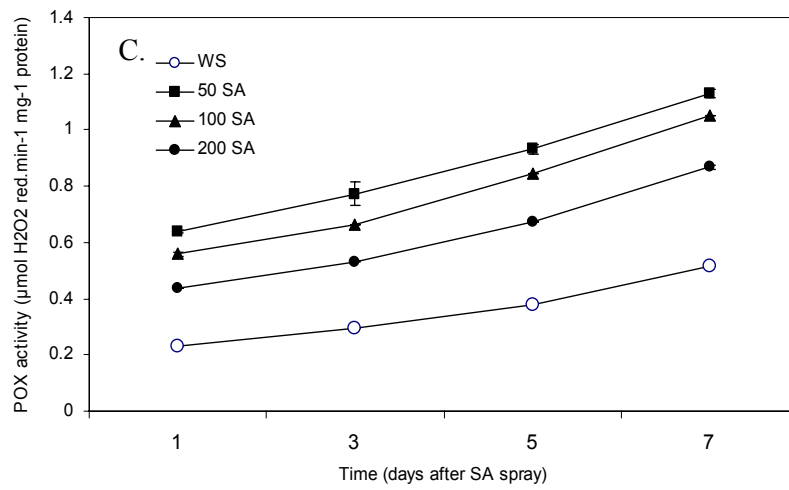
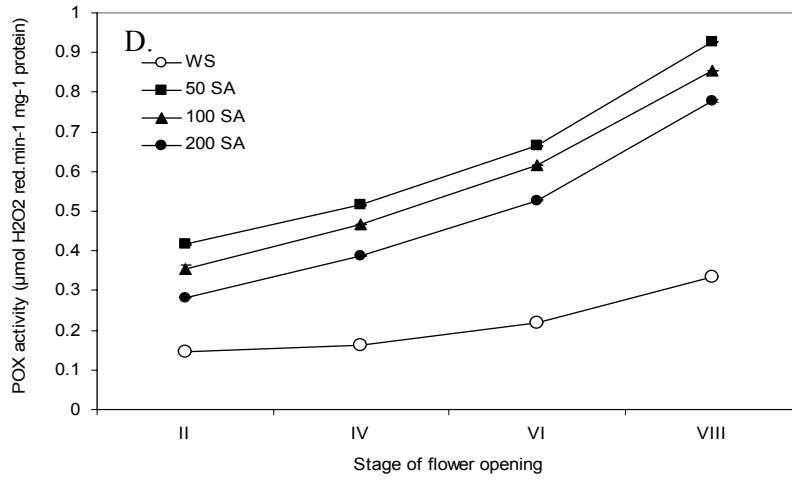
نتایج و بحث

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز در برگ و گلبرگ رز در نتیجه مه افشانی سالیسیلیک اسید به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد تحت تاثیر قرار گرفت. روند فعالیت آنزیم کاتالاز در همه تیمارها از روز اول تا روز هفتم پس از مه افشانی کاهشی بود. با این حال، فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ های تیمار شده با سالیسیلیک اسید صرفنظر از غلظت آنها در مقایسه با گیاهان شاهد (WS) به طور معنی داری ($P < 0.01$) بالاتر بود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگها، در زمان ۲۴ ساعت بعد از مه افشانی با سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در این زمان ماکزیمم فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای ۱۰۰ ماکرومولار و ۵۰ ماکرومولار سالیسیلیک اسید و به ترتیب به میزان ۲/۵۸ و ۲/۴۱ ($\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ red.min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) دیده شد. نکته بسیار شایان توجه این بود که تیمار با سالیسیلیک اسید صرفنظر از غلظت، موجب تاخیر در کاهش میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با نمونه های شاهد (WS) گردید (شکل ۱- A). فعالیت کاتالاز در گلبرگ ها در مراحل II، IV، VI و VIII نمو گل ارزیابی شد. فعالیت کاتالاز در گلهای مه افشانی شده با سالیسیلیک اسید در تمامی مراحل نمو بیشتر از تیمار شاهد بود. بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در مرحله II نمو مشاهده شد (شکل ۱- B). روند فعالیت کاتالاز از مرحله II تا VIII کاهشی بود (شکل ۱- B). در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ ماکرومولار سالیسیلیک اسید علاوه بر اینکه فعالیت آنزیم کاتالاز بیش از تیمار شاهد بود، با این حال روند کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز از مرحله II تا مرحله VIII بسیار کندتر از تیمار شاهد بود. کاربرد سالیسیلیک اسید موجب القای یک فاز تاخیری در کاهش فعالیت آنزیم در مراحل نمو گلها گردید. فعالیت پراکسیداز در برگ های تیمار شده با سالیسیلیک اسید صرفنظر از غلظت آنها در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی داری ($P < 0.01$) بالاتر بود. روند فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایشی بود. کمترین و بیشترین فعالیت آنزیم به ترتیب ۲۴ ساعت و هفت روز پس از مه افشانی سالیسیلیک اسید مشاهده گردید (شکل ۱- C). بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز به ترتیب در تیمارهای ۵۰ ماکرومولار و ۱۰۰ ماکرومولار سالیسیلیک اسید و هفت روز پس از مه افشانی دیده شد (شکل ۱- C). در برگ

گیاهان شاهد (WS) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۲۴ ساعت پس از مه افشانی در پائین ترین حد خود و به میزان $0/23$ ($\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ red.min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) قرار داشت و حتی بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در غیاب سالیسیلیک اسید (تیمار شاهد)، از پائین ترین میزان فعالیت آن در برگ های تیمار شده با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید کمتر بود. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگها بیشتر از میزان فعالیت آنزیم در گلبرگ ها بود. فعالیت پراکسیداز در گلبرگ های رزه های مه افشانی شده با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در تمامی مراحل نمویی به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود. در تمامی تیمارها از جمله گیاهان شاهد بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در مرحله VIII نمو گل مشاهده شد (شکل ۱-D). روند فعالیت آنزیم پراکسیداز در همه تیمارها از مرحله II به مرحله VIII (مرحله پیری گلها) روند افزایشی نشان داد (شکل ۱-D). بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در گلبرگها به ترتیب در تیمارهای ۵۰ میکرومولار و ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در مرحله VIII دیده شد.

یکی از مهمترین اثرات سالیسیلیک اسید بر روی شاخساره های رز تغییر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بود. آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، گلوکاتیون ردوکتاز و کاتالاز مهمترین اجزای سیستم های جاروب کردن گونه های اکسیژن فعال هستند (Bowler et al., 1992; Feng et al., 2004).





شکل ۱- فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در برگ و گلبرگ رز رقم **Black Magic** پس از تیمار با غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید

**Changes in antioxidant enzymes in vegetative and reproductive tissues of *Rosa hybrida*
L. Black Magic**

M. Alaey^{a*}, M. Babalar^a, R. Naderi^a, M. Kafi^a

^a *Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences and engineering, University of Tehran, Karaj, Iran*

ABSTRACT

This study was conducted to determine whether application of salicylic acid (SA) at pre-harvest could improve antioxidant capacity and delay senescence in cut rose flowers variety 'Black Magic'. Aqueous solutions of 50-200 μ M salicylic acid were sprayed on roses grown in a greenhouse and CAT and POX activity were determined in leaves and petals at different stages. CAT and POX activity and thereby senescence were positively affected by SA treatment. Generally, CAT activity in leaves and intact flowers decreases after spray and during the flower bud development with the lowest activity present at petal senescence. SA retarded the decrease of CAT activity during senescence both in flowers and leaves compared to the water control. Adversely, POX activity increased in both leaves and petals during development. Results shown that senescence delayed in SA treated flowers due to improving the reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity related to CAT and POX activity.

Keywords: Senescence; Catalase; Peroxidase; ROS scavenging; Antioxidant capacity