تاثیر دما بر فعالیت آنزیم Beta-CAS و متابولیسم سیانید در ارقام سیب فوجی و عباسی مشهد

مسعود زاده باقری (۱)، یونس مستوفی (۲) و مصطفی مصطفوی (۳)

۱- عضو هیات علمی دانشگاه ازاد اسلامی واحد شیراز، ۲- عضو هیات علمی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران،
۳- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

چکیده

سیانید یک ماده مشترک (Co-product) با بیوسنتز اتیلن در گیاهان آلی از مسیر ACC محسوب می‌شود. در برخی حالات فیزیولوژیکی از قبیل رسیدن میوه، پیری گل، غرقاب، خشکی، آلودگی پاتوژنی، اوزون، اشعه ماوراء بنفش و سرمازدگی اتیلن به میزان بیشتری تولید می‌شود. سیانید یک یون مضر و خطرناک جهت زندگی محسوب می‌شود و با ایجاد ترکیبات پایدار با عناصری مانند آهن و منیزیم می‌تواند فعالیت آنزیم‌ها را مختل سازد و بدین ترتیب، بافت را از انجام تنفس، تثبیت کربن و احیای نیترات ناتوان می‌سازد. تعدادی از گیاهان قادر به تولید سیانید هستند و تا کنون بیش از ۲۰۰۰ گونه سیانوژنیک شناسایی شده‌اند. در گیاهان آلی آنزیم Beta-CAS جهت متابولیزه کردن سیانید کاربرد دارد. به منظور بررسی متابولیسم سیانید و ارتباط ان با بیوسنتز اتیلن در ۲رقم سیب فوجی (Fuji) و عباسی مشهد(Abbasi Mashhad)، آزمایشی به صورت کرت های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک های کامل تصادفی در تکرارهای متفاوت به اجرا در آمد. صفات کمی و کیفی شامل تولید اتیلن، میزان سیانید، ارزیابی فعالیت انزیم Beta-CAS، در سطوح مختلف دما (4+,2+ ,0 ,2-) مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت انزیم Beta–CAS با روش رنگ سنجی(clorometric) و براساس میزان H2S تولید شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق، ما دریافتیم بافتی که دارای بالاترین فعالیت آنزیم Beta-CAS باشد، بیشترین میزان تولید اتیلن را دارد. ارتباط مناسبی بین بیوسنتز اتیلن، تولید سیانید و فعالیت آنزیم Beta-CAS مبرهن بود و این موضوع مشخص می کند که اتیلن می‌تواند ظرفیت متابولیزه شدن سیانید را بالا ببرد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه علوم باغبانی واقع در مجتمع مجهز آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در سال ۸۶-۱۳۸۵ انجام شده، از دو رقم سیب ایرانی و خارجی عباسی مشهد و فوجی جهت لحاظ کردن تیمارها استفاده گردید. رقم فوجی (***Malus domestica* Borkh.**, CV. Fuji) به عنوان یکی از ارقام تجاری و مهم سیب محسوب می‌شود و از تلاقی دو رقم **(Red Delicious × Ralls Janet)** به دست آمده است(۲) و رقم عباسی مشهد نیز یکی از ارقام دیررس سیب در کشور محسوب می‌گردد. سیب فوجی از منطقه دماوند و ۱۷۰ روز بعد از تمام گل و سیب عباسی مشهد از منطقه خور نیشابور برداشت و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. میوه ها به صورت تصادفی به چهار قسمت مجزا تقسیم و در چهار دما شامل ۲-، صفر، ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه‌های معمولی با طوبت نسبی ۲±۸۵ به مدت ۴ ماه نگهداری شدند. در تمام مدت به صورت روزانه و بعضا هفتگی دمای انبار و دیگر مسایل آن

مورد بررسی و کنترل قرار میگرفت. اندازه‌گیری مربوط به صفات اتیلن و سیانید در ۳ زمان قبل از انبار، ۲ ماه پس از انبار و ۴ ماه پس از انبار انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری گاز اتیلن از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) مدل SHIMADZU-GC-8IT استفاده شد. ابتدا وزن و حجم نمونه اندازه‌گیری شد، به مدت یک ساعت نمونه در یک ظرف کاملا مسدود با گنجایش ۷۰۰ سی‌سی قرار داده شد، سپس با یک سوزن دو طرفه محتویات گازی ظرف از طریق سپتوم به ونوژکت های خلاءدار منتقل و با استفاده از سرنگ، یک سی‌سی گاز جهت آنالیز اتیلن به دستگاه تزریق شد. جهت اندازه‌گیری سیانید، تکه‌های بافت سیب به وزن ۲ گرم به مدت ۲ ساعت در محلول کلرید کلسیم ۲ درصد خیسانده شد، سپس نمونه‌ها در یک ظرف ۱۰ سی‌سی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر سود ۰/۱ نرمال در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسیداستیک یک مولار، یک سی‌سی سوکسینامید ۰/۲۵ درصد در ان-کلروسوکسینامید ۰/۰۲۵ درصد و در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر باربیتوریک‌اسید ۳ درصد در پیریدین ۳۰ درصد اضافه گردید. محلول به دست آمده به خوبی تکان داده می‌شود و بعد از ۱۰ دقیقه میزان جذب رنگ تولید شده توسط اسپکتروفتومتر مدل Cary50 در ۵۸۰ نانومتر قرایت شد. برای رسم منحنی استاندارد از سیانید پتاسیم استفاده شد (۲۱و۲۳). جهت اندازه‌گیری آنزیم Beta-CAS ابتدا تکه‌های بافت گوشت سیب با وزن ۲۵ گرم در هاون ریزریز و له شد و سپس دو برابر وزن نمونه، یعنی ۵۰ سی‌سی محلول Tris-HCl با pH=۸/۵ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار اضافه گردید، سانتریفیوژ صورت گرفت. سپس ۰/۵ سی‌سی از عصاره تهیه شده در یک لوله آزمایش دارای سپتوم ریخته شد و ۴ سی‌سی سوبسترای تازه آماده شده به آن افزوده شد. بعد از به هم زدن و قرار دادن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، یک سی‌سی از محلول به دست آمده را در یک تیوپ ۱/۵سی‌سی ریخته و توسط سپتوم ۱/ سی‌سی از ماده N,N-Dimethyl-s-phenylene diamine sulfate ۰/۰۲ نرمال جهت توقف واکنش اضافه و در نهایت، ۰/۱ سی‌سی از ماده ۰/۰۳ مولار کلرید آهن که در اسید کلریدریک ۱/۲ نرمال حل شده بود، اضافه گردید. بعد از تشکیل رنگ، شدت جذب در ۶۵۰ نانومتر قرایت شد. از ماده Na_2S جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد (۱۷-۱۸-۱۹و ۲۰).

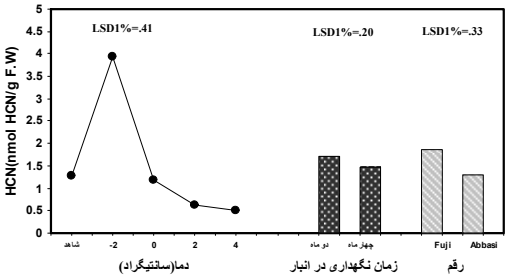
نتایج و بحث

جدول (۱)- تجزیه واریانس سیانید، اتیلن و آنزیم Beta-CAS در دوره انبارداری

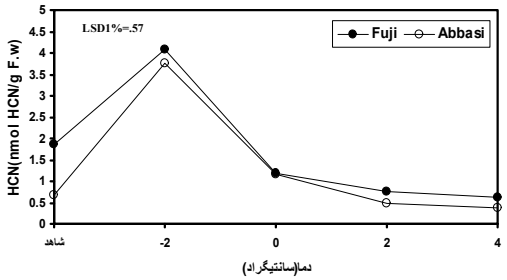
منبع	سیانید		اتیلن		Beta-CAS	
تغییرات	df	MS	df	MS	df	MS
Rep	۳	۰/۹۳۴**	۳	۰/۰۹۶^{ns}	۳	۱۴۷/۳۰۸^{ns}
دمای انبار	۴	۲۰/۹۶۸**	۴	۸/۹۶۹**	۴	۳۷۸۸۰/۵۱۲**
رقم	۱	۱/۹۷۳**	۱	۹/۶۹۰**	۱	۱۹۱۵۱۴/۹۸۲**
رقم × دمای انبار	۴	۰/۶۵۲*	۴	۰/۸۱۷**	۴	۴۷۶۷/۴۵۳**
خطا	۱۸	۰/۱۵۹	۲۵	۰/۱۶۹	۲۶	۲۸۲/۶۰۴
زمان نگهداری در انبار	۱	۰/۸۶۴**	۱	۰/۱۹۴^{ns}	۱	۱۳۶۵/۵۲۵*
دمای انبار × زمان نگهداری در انبار	۴	۰/۰۸۸^{ns}	۴	۰/۱۰۴^{ns}	۴	۲۳۳۲/۶۲۶**
رقم × زمان نگهداری در انبار	۱	۰/۱۵۰^{ns}	۱	۰/۰۶۷^{ns}	۱	۹۱۹/۸۱۱^{ns}
رقم × دمای انبار × زمان نگهداری در انبار	۴	۰/۰۴۰^{ns}	۴	۰/۱۴۱^{ns}	۴	۴۷۴/۳۴۰^{ns}
خطا	۲۰	۰/۰۷۱	۲۸	۰/۱۰۱	۲۵	۳۱۲/۶۲۲
کل	۶۰		۷۵		۷۳	
CV	۱۷/۵		۱۲/۹		۹/۲	

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

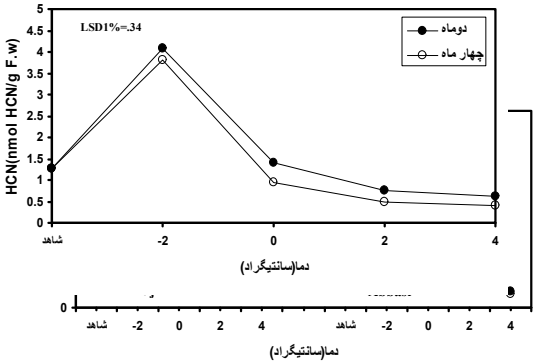
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



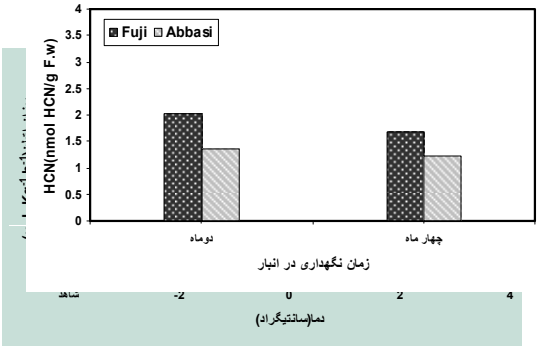
نمودار (۱)- نمایش اثر ساده دما، رقم و زمان بر سیانید در دوره انبارداری



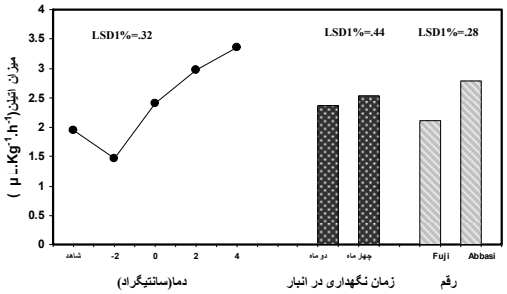
نمودار (۲)- اثر متقابل دما و رقم بر سیانید در دوره انبارداری



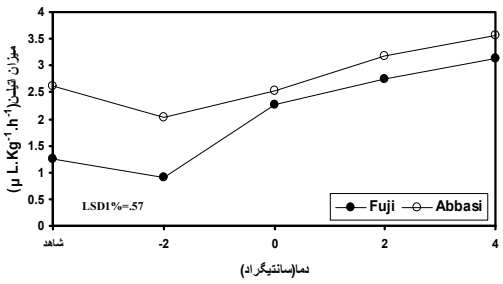
نمودار (۳)- اثر متقابل دما و زمان بر سیانید در دوره انبارداری



نمودار (۵)- اثر سه گانه دما، رقم و زمان بر سیانید در



نمودار (۶)- نمایش اثر ساده دما، رقم و زمان بر اتیلن در دوره انبارداری



نمودار (۷)- اثر متقابل دما و رقم بر اتیلن در دوره انبارداری

نمودار (۸)- اثر متقابل دما و زمان بر اتیلن در دوره انبارداری

Temperature Effects on Activity of Beta-Cyanoalanine Synthase and Cyanide metabolism in two Apple cultivars FUJI and ABBASI MASHHAD

Abstract

Cyanide is a Co-product of ethylene biosynthesis in higher plants via the ACC pathway. In certain physiological forms, such as fruit ripening, flower senescence, flooding, drought, pathogen infection, ozone, UV radiation and chilling, ethylene biosynthesis is greatly induced. Cyanid is a harmful ion, hazardous to life, which forms a very stable complex with the active site metal (e.g., Fe and Mg) in enzymes, thereby inhibiting vital functions, in cells such as respiration, carbon fixation, and nitrate reduction. Many plants have the ability to produce HCN; more than 2,000 species have been demonstrated to be cyanogenic. In higher plants the key enzyme to detoxify HCN is L-3-cyanoala ninsynthase (EC.4.4.1.9). In order to analyze cyanid metabolism in relation to ethylene biosynthesis in two apple cultivar (fuji and Abbasi Mashhad) a factorial experiment was conducted in split-plot arranged based on randomized complete block design with diffrent replication.the quantitative and qualitative characteristics evaluated including ethylene production "cyanid metabolism and activity of Beta –CAS in four level of temperature(-2،0،+2،+4).Beta-CAS synthase enzyme can be assessed by measuring colorimetrically the sulfide that is formed during the reaction between HCN and L. cysteine. In the following study it was observed that the tissue with the highest Beta-CAS enzyme activity has the most ethylene production level.Links between ethylene and cyanide biosynthesis and cyanide metabolism was clear.this shows that ethylene can increase cyanide metabolization capacity.