مقایسه کمی و کیفی آنزیم های آنتی اکسیدانی در بخش های مختلف میوه چهار رقم از مرکبات در استرسهای دمایی پایین

زهرا خسروی لرگانی، دکتر منصور افشار محمدیان، دکتر رضا حسن ساجدی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان

گونه های مختلف مرکبات می توانند در شرایط آب وهوایی متنوعی از آب وهوای استوایی گرم و مرطوب تا آب وهوای گرمسیری با اپتیمم دمایی بین۳۰- ۲۲درجه سانتیگراد رشد کنند. با توجه به حساسیت زیاد مرکبات به دماهای پایین و تقارن فصل برداشت میوه با ایام سرد سال، تحقیق بیشتر روی خصوصیات فیزیولوژیکی این گیاه برای افزایش تحمل به دماهای پایین، ضروری است.از آن جایی که تحت شرایط تنش، توانایی طبیعی گیاه برای حذف رادیکالهای سیژنی دچار نقص می شود، یکی از مکانیسم های سازگاری با تنش ها، افزایش سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی نظیر پراکسیداز جهت مقابله با استرس اکسیداتیو می باشد.در این تحقیق، اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز در بخش های مختلف میوه شامل آب میوه(juice)، بخش رنگی خارجی پوست (flavedo)و بخش سفید درونی پوست (albedo) چهار رقم از مرکبات به نامهای پرتقال محلی، پرتقال خونی، نارنگی انشو و لیموترش مازندرانی در شرایط کنترل و تحت استرس های دمایی ۳، ۰، ۳- و ٦- درجه سانتیگراد انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داده که در برابر تنش های دمایی پایین عکس العمل ارقام مذکور بسیار متفاوت است.براساس نتایج، با افزایش استرس سرما در تمام بخشهای میوه ارقام مذکور، میزان آنزیم پراکسیداز افزایش یافت. همچنین میزان حضور این آنزیم در بخش flavedo از سایر بخش های میوه، در تمام ارقام بیشتر بود.بیشترین فعالیت آنزیمی در بخشهای flavedo و albedo لیمو ترش مازندرانی و در بخش juice انشو دیده شده است.اندازه گیری سایر آنزیمها مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و تیروزیناز در حال انجام است.

مقدمه

جمعیت جهان با نرخ رشد قابل توجهی در حال افزایش می باشد، از طرف دیگر تولید غذا به علت اثر تنش های مختلف کاهش می یابد. بنابراین پایین آوردن میزان این خسارتها و یافتن ارقام متحمل تر دغدغه همه کشورهای جهان است (۱). بسیاری از گونه های مرکبات مخصوصا آن گروهی که بومی آب وهوای گرم هستند، علائمی از خسارت را زمانیکه با دماهای پایین تراز ۱۵ درجه سانتیگراد مواجه می شوند، نشان می دهند. اثر نامطلوب مهم سرمازدگی خسارت شدید به غشای سلولهای گیاهی است. کاهش دما تا صفر درجه سانتیگراد سیالیت غشای زیستی را کاهش می دهد. میزان سیالیت غشا تحت تاثیر مقدار نسبی اسیدهای چرب غیر اشباع قرار دارد. گیاهان حساس به سرمازدگی معمولا مقادیر بیشتری از اسیدهای چرب اشباع را در غشا دارند و بنابراین از چنین غشاهای در دماهای بالاتر عبور مواد از غشا بهتر و سریعتر صورت می گیرد. گونه های مقاوم به سرمازدگی، برعکس، مقادیر بیشتری از اسیدهای چرب غیراشباع داشته و بنابراین در دماهای پایین تر نیز تبادل مواد از خلال چنین غشاهایی مختل نمی شود(۲). علاوه بر سیالیت غشای

زیستی، استرس سرما، تولید گونه های فعال اکسیژنی را نیز سبب می شود. تحت شرایط تنش، توانایی طبیعی گیاه برای هضم رادیکالهای اکسیژن دچار نقص می شود. یکی از مکانیسمهای سازگاری باتنش، افزایش سطح آنزیمهای آنتی اکسیدانی مثل پراکسیداز (POD) است.افزایش پراکسیداز در سرما می تواند به مکانیسم دفاعی میوه در برابر استرس اکسیداتیو مربوط می باشد. پراکسیدازهضم رادیکالهای آزادراتحت شرایط سرمازدگی افزایش داده و نقش مهمی درحفاظت سلول از پراکسید هیدروژن و کاهش خسارتهای مربوط به تنش دارد(۳).

مواد و روشها

برای انجام این پژوهش از میوه های چهار رقم مرکبات به نامهای پرتقال محلی، پرتقال خونی، نارنگی انشو، لیموترش مازندرانی برداشت شده از موسسه تحقیقات مرکبات رامسر استفاده شد. به منظور انجام تیمار سرمایی، میوه ها به دستگاه انکوباتور ویژه سرما دهی (Test chamber) منتقل شدند. تیمارهای دمایی به ترتیب در۳، ۰، ۳-، ٦- درجه سانتیگراد انجام شد. دمای نمونه کنترلی بتدریج و در طول مدت ۲۰ ساعت به دمای ۳ درجه سانتیگراد رسید و به مدت ۱۰ ساعت در این دما باقی ماند. برای اعمال تیمارهای دمایی، عبور از هر دما به دمای پایین تر در ۲ ساعت طی شد و سپس ماندگاری در هر دما بمدت ۱۰ ساعت انجام شد. بعد ازتیمار سرمایی، بخشهای میوه شامل آب میوه(juice)، بخش رنگی خارجی پوست(flavedo)، بخش سفید درونی پوست(albedo)جداسازی شد و جهت جلوگیری از تجزیه آنزیمی از نیتروژن مایع استفاده شد و نمونه ها بلافاصله به فریزر ۷۰ - منتقل شدند.به منظور استخراج و اندازه گیری آنزیم پراکسیداز، نیم گرم از بافت را در نیتروژن مایع کاملا هموژنیزه کرده و به میکروتیوپ منتقل گردید و سپس با افزودن یک میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات با PH=7.2 به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱٤۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتیگراد ساتنریفیوژ شدند. بعد از اتمام سانتریفیوژ عصاره رویی با استفاده از سمپلر برداشته شد و به میکروتیوپ های دیگر منتقل شد. میکروتیوپ های حاوی عصاره در تمامی مراحل در داخل ظرف یخ نگهداری شدند. برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از سوبستراهای گایاکول و H_2O_2 استفاده شد و سپس جذب نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۷۰ نانومتر قرائت شد.

جهت تعیین فعالیت ویژه آنزیمی، از روش بردفورد استفاده شد. برای سنجش غلظت پروتئین، محلول پروتئینی استاندارد، سرم آلبومین گاوی در غلظتهای مختلف تهیه شد. بعد از آماده سازی لوله ها به تعداد مورد نیاز و اضافه کردن محلول بردفورد به آنها، به هر یک از لوله ها به ترتیب ۵۰ میکرولیتر از محلولهای استاندارد و سوپرناتانت اضافه شد و به مدت ۳۰-۲۵ ثانیه ورتکس شد. جذب نمونه ها در فاصله زمانی حداقل ۵ دقیقه و حداکثر ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد را با توجه به جذب پروتئینهای استاندارد رسم کرده و از روی معادله خط بدست آمده، غلظت پروتئین در نمونه ها محاسبه شد.

نتایج و بحث

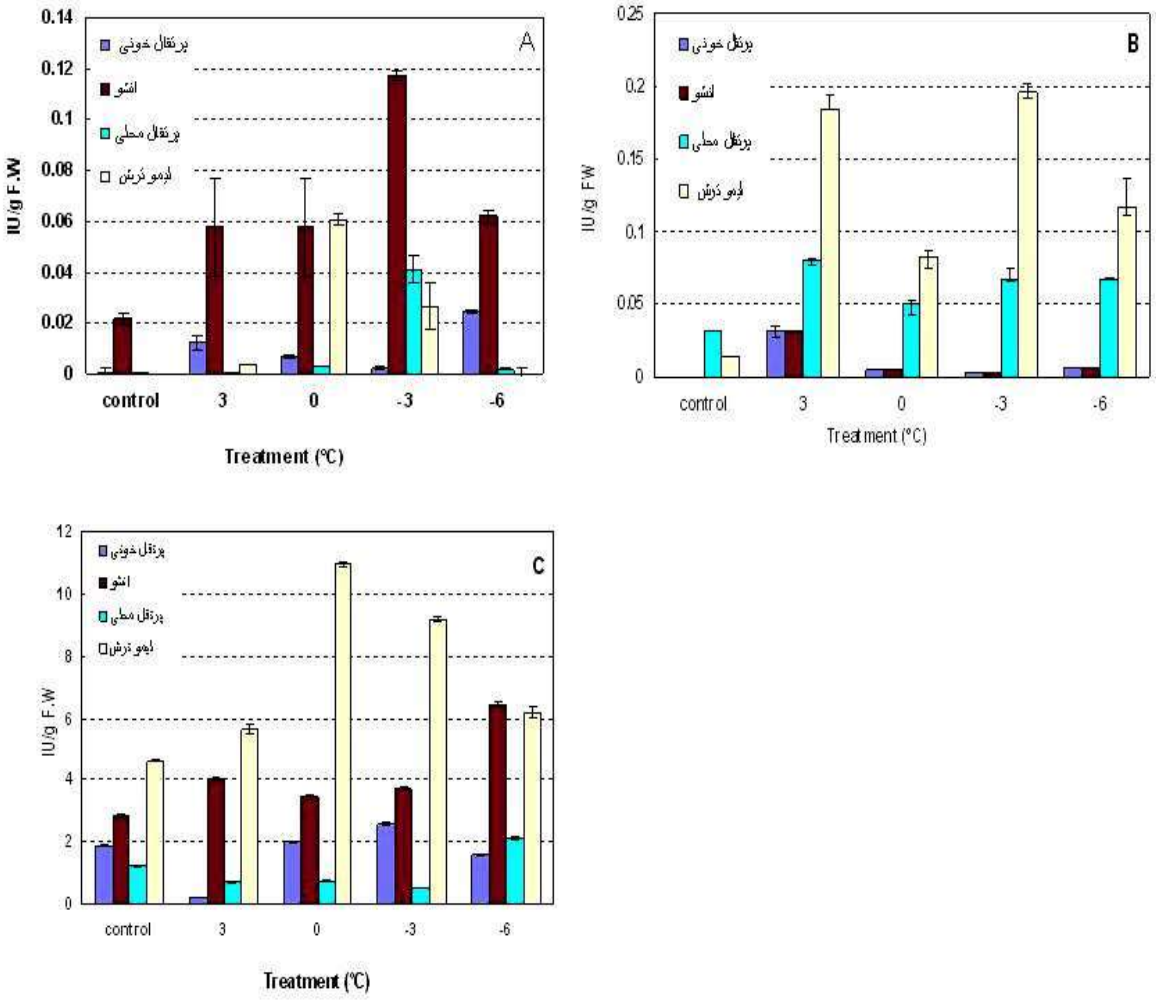
یکی از ویژگیهای متمایز کننده گیاهان از سایر موجودات پرسلولی، عدم تحرک و تغییر مکان آنها است. بنابراین اگر تحمل به تنش های محیطی مثل سرما، خشکی، شوری و غیره را نداشته باشند، از بین می روند. یک شبکه سیگنالی

پیچیده در سازگاری گیاه به این شرایط محیطی نامساعد وجود دارد. بررسی های فیزیولوژیکی نشان داده است که گیاهان با مکانیسم خاصی از تنش های دمای پایین حفاظت می شوند. بسیاری از گیاهان برای حفاظت سلول و کاهش خسارت ناشی از تنش دمای پایین آنزیم های اکسید کننده، مثل پراکسیداز ها را تولید می کنند(۳).

با توجه به نتایج حاصله، مشخص شد که تیمارهای سرمایی متفاوت روی ارقام مختلف، به صورت معنی داری تاثیر متفاوتی دارد. هم چنین بخشهای مختلف هر میوه، نسبت به تیمارهای سرمایی، رفتار بسیار متفاوتی را نشان می دهند. در تمام ارقام بررسی شده بخشهایalbedo و juice به نسبت flavedo فعالیت کمتری از آنزیم پراکسیداز را نشان می دهند. همانطوریکه در نمودارA نشان داده شده، بخش juice میوه انشو بیشترین فعالیت POD را دارد، در حالیکه بر اساس نمودارهای B و C بخشهای albedo وflavedo لیموترش مازندرانی بیشترین فعالیت POD را نشان می دهند. براین اساس علیرغم اینکه پوست نارنگی انشودر دماهای پایین دچار آسیب سرمایی می شود، آب میوه آن بدلیل افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز، دماهای پایین بویژه تا ۳- درجه سانتیگراد را بخوبی تحمل می کند، اما لیموترش مازندرانی وضعیتی برعکس انشو دارد، یعنی پوستی مقاوم به سرما و آب میوه حساس به سرما دارد که این امر نیز به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در بخشهای albedo وflavedo لیموترش مازندرانی برمی گردد.

منابع:

1) Shilpi Mahajan, Narendra Tuteja (2005) ; Cold, salinity and drought stresses: An overview
2) Yan-Ping Guo, Hui-Fen Zhou, Liang-Cheng Zhang(2006); Photosynthetic characteristics and protective mechanismsagainst photooxidation during high temperature stress
3) Okkes, Atıcıa, Barbaros Nalbantog˘ lub,(2003); Antifreeze proteins in higher plants



نمودار۱: میزان فعالیت آنزیمی POD در بخش های مختلف ٤ رقم مرکبات. A: juice B: albedo C: flavedo

Quantitative and qualitative comparison of antioxidant activity in different part of four varieties of citrus fruit under low temperature stress

Zahra Khosravi Largani, Dr. Mansour Afshar Mohammadian, Dr. Reza Hasan Sajedi
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan

Abstract
Citrus species can grow in various climatic conditions, ranging from hot-humid equatorial to warm-subtropical climates. The optimum temperature to approach optimum growth of citrus species is from 22˚C to 30˚C. Regarding the sensitivity of citrus fruit to low temperature and the conjunction of the fruit harvest season with low temperature, physiological investigation to enhance resistance to low temperatures is so important. Since stress decrease natural ability of plant for scavenging of oxygen radicals, one of adaptation mechanisms facing various stresses is

increasing the level of antioxidant enzymes such as peroxides to prevent oxidative stress. This study aimed to measure the quantity and quality of peroxides activity in different fruit section including flavedo, albedo and juice of four varieties of citrus fruit named Local orange, Blood orange, Unshiu mandarin, Mazandrn lime under different low temperature stresses including 3, 0, -3 and -6 ˚C . So far the results showed that the above varieties had different reflection against low temperature stresses. According to the results, cold stress increased peroxides activity in whole sections of the fruit. Also peroxides activity in flavedo was more than other sections of the fruit in all investigated varieties. Flavedo and albedo in Mazandrn lime and juice in Unshiu mandarin had the most peroxides activity compared with other sections of the fruit. The activity of other enzymes including SOD, CAT, APOX, TYR is under investigation.