بررسی تأثیر توأم اسید آسکوربیک و سرما بر فعالیت بعضی از آنزیم های آنتی اکسیدانی در دانهال های لیمو آب شیراز

هادی شهیدی پور اکبری (۱)، رضا فتوحی قزوینی (۲) و وهب جعفریان (۲)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ۲- استاد علوم باغبانی و ۳- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشگاه گیلان

چکیده

خصوصیت مشترک تنش های محیطی(سرما)، تولید رادیکال های فعال اکسیژن و افزایش آن ها در بافتهای گیاهی است. در مطالعه حاضر، در طرح کاملاً تصادفی و بصورت فاکتوریل با تیمار تنش سرمایی در چهار سطح (۳°C و ۰°C و ۳°C- و ۶°C- و۹°C-) و تیمار اسید آسکوربیک در چهار سطح (۰/۰۲۵ M AsA و ۰/۰۲ و ۰/۰۱۵ و ۰) و سه تکرار، اثرات سوء سرما در گیاهچه های ۹ برگی لیمو آب شیراز کشت شده در شرایط گلخانه ای بررسی شد. در پژوهش حاضر سطوح مالون دی آلدهید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدها)، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پروتئین کل، محتوای رطوبت نسبی برگ، نشت یونی برگ در سه مرحله قبل از آزمایش، دماهای یخ زدگی و پس از بهبودی اندازه گیری شد. اسیدآسکوربیک با اثر حفاظتی بر ترکیبات غشایی سبب کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها و نشت مواد از غشا در زمان بهبودی گردید. سرما همراه با کاهش نسبتاً جزئی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ریشه، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ و ریشه را بطور قابل ملاحظه ای کاهش داد. محلول پاشی اسیدآسکوربیک در گیاهچه ها در طی دوره سازگاری(سه نوبت در روز) قبل از اعمال تیمار سرمایی، سبب افزایش فعالیت کل آنزیم آسکوربات پراکسیداز در این گیاهچه ها شد. گیاهچه هایی که قبل از آزمایش با اسیدآسکوربیک محلول پاشی شدند بدلیل فعالیت بیشتر آنزیم آسکوربات پراکسیداز، در دماهای یخ زدگی توانایی بیشتری برای تبدیل رادیکال های فعال اکسیژن از جمله پراکسیدهیدروژن را دارا می باشند. به علاوه گیاهچه های محلول پاشی شده با اسیدآسکوربیک وزن تر و درصد رطوبت نسبی را در سطح نسبتاً بالایی حفظ می کنند.

مقدمه

لایم مکزیکی یا لیموآب شیراز یکی از گونه‌های حساس به سرما در بین مرکبات است [۱]. خصوصیت مشترک عوامل تنش‌زای محیطی، تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و افزایش آن‌ها در بافت‌های گیاهی است. رشد و نمو عادی گیاه در شرایط تنش به گریز از خسارت اکسیداتیو، تبدیل رادیکال‌های اکسیژن به ترکیبات غیرسمی یا با سمیت کمتر است [۲]. گیاهان حاوی غلظت‌های بالای آنتی‌اکسیدان‌ها مقاومت قابل توجهی به تخریب اکسیداتیو ناشی از انواع اکسیژن فعال نشان می‌دهند [۱].

افزایش سطوح سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات‌پراکسیداز در گیاهان مقاوم به سرما مانع آسیبهای فتودینامیکی شد، زیرا ممکن است سطوح سوپراکسید، مواد اکسیدشده تک‌اکسیژنه و پراکسیدهیدروژن در بافت سرمازده افزایش یابد. سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن اکسیدکننده‌های قوی هستند و در گیاهان لیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع را پراکسید کرده، سبب خسارت برگشت ناپذیر غشا می‌شوند [۲].

مواد و روش‌ها

بذور لیموآب شیراز بعد از استخراج از میوه‌ها با هیپوکلریت‌سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردید و پس از ۲٤ ساعت خیساندن در آب کشت شدند. پس از جوانه زنی بذور در بستر ماسه و کوکوپیت (نسبت حجمی ۱:۱) و رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۲-۳ برگی، به گلدان‌هایی با قطر دهانه ۱۳ سانتی متر و بستر ماسه و خاک باغچه و کوکوپیت (نسبت حجمی ۱:۱:۱) سه گیاهچه منتقل شد. گیاهچه‌ها به مدت ۳ ماه (مرحله ۷ تا ۹ برگی) در گلخانه در دمای ۲۰/۳۰°C درجه سانتی گراد (روز/شب) نگهداری و مراقبت شدند. جهت سازگاری به سرما گلدان‌ها به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شدند. دماهای سازگاری برای همه گیاهچه‌ها به ترتیب دماهای ۲۰°C/ ۲۵، ۱۵°C/ ۲۰، ۱۵/۱۰°C، ۱۰/۵°C، ۵/°C۳ (شب/روز) در طی ۵ روز بود. در طی دوره سازگاری روزانه در سه نوبت تیمار اسیدآسکوربیک در سطوح ۰,۰۱۵M، ۰,۰۲M، ۰,۰۲۵M و صفر(آب مقطر برای شاهد) اعمال گردید. گیاهچه‌ها در معرض تیمارهای سرمایی ۳°C، ۰°C، ۳°C-، ٦°C- و ۹°C- به مدت ۲۲ ساعت قرار گرفتند و عبور از هر دما به دمای پایین‌تر تدریجی و طی ۲ ساعت صورت گرفت. گیاهچه‌های شاهد پس از تحمل آخرین دمای سازگاری و نیز گیاهچه-هایی که مواجه با تیمارهای سرمایی شدند، تدریجاً طی ۵ روز به دمای ۲۰°C/ ۲۵ (شب/روز) منتقل شدند.

فعالیت کل آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با اندازه‌گیری توانایی‌اش در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) تعیین شد [۳]. فعالیت کل آنزیم آسکوربات پراکسیداز برطبق روش ناکانو و آسادا در سال ۱۹۸۱ سنجیده می‌شود. برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دی‌الدهید(MDA) و سایرآلدئیدهای تولید شده توسط واکنش با تیوباربیتوریک‌اسید (TBA) اندازه‌گیری شد [۳].

نتایج و بحث

۱- بیشترین کاهش فعالیت آنزیمSOD را از دمای ۳°C تا ۹°C- مشاهده می‌کنیم. در زمان recovery فعالیت کل آنزیم SOD فقط در ریشه به مقدار نسبتاً جزئی کاهش یافته است.

۲- در گیاهان شاهد با کاهش دما از ۲۵°C به ۵°C میزان فعالیت کل آنزیم ASPOX به مقدار نسبتاً جزئی کاهش می-یابد، اما در گیاهان تیمار شده با اسیدآسکوربیک، با کاهش دما از ۲۵°C به ۵°C میزان فعالیت کل آنزیم ASPOX در برگ وریشه با افزایش غلظت ASA افزایش می یابد به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم ASPOX را در تیمار۰/۰۲۵M =ASA در T=3° مشاهده می کنیم. با کاهش دما از ۵°C تا ۹°C- میزان فعالیت کل آنزیم ASPOX در برگ‌ها کاهش می یابد. کاهش فعالیت کل آنزیم ASPOX در دو تیمار۰/۰۲۵M =ASA و ۰/۰۲M=ASA، با توجه به سطح اولیه آنزیم ASPOX در دمای ۵ به اندازه ای بوده است که در دمای ۹°C- سطح آنزیم ASPOX به سطح اولیه این آنزیم در دمای ۲۵°C قبل از انجام آزمایش رسیده است و داشتن این مقدار فعالیت بالای آنزیم ASPOX در دمای ۹°C- بسیار ارزشمند می‌باشد .کاهش فعالیت کل آنزیم ASPOX در تیمار ۰/۰۱۵M=ASA با توجه به فعالیت اولیه آنزیم در ۵، فعالیت آنزیم ASPOX در ۳-، به فعالیت اولیه این آنزیم در دمای ۲۵ قبل از انجام آزمایش رسیده است و با کاهش تا ٦°C- و ۹°C- فعالیت این آنزیم در این تیمار به کمتر از حد مطلوب رسیده و چندان موثر نمی باشد. کاهش فعالیت

کل آنزیم ASPOX در گیاهان شاهد با توجه به فعالیت اولیه بسیار کم این آنزیم در ۵°C در مقایسه با تیمار های ASA بسیار محسوس می باشد. برگ‌های درختان لیموترش محتوای متغییری از اسید آسکوربیک سرتاسر سال دارند. هنگامی که برگ‌ها در دماهای پایین، که صدمه زننده است قرار می‌گیرند، منشأ اسیدآسکوربیک به شدت کاهش می‌یابد، به نحوی که هنگاهی که حدوداً ۷۰ درصد اسیدآسکوربیک را از دست می‌دهند، آسیب به بافت‌ها غیر قابل برگشت می-شود. کاهش اسیدآسکوربیک در نتیجه اکسیداسیون می‌باشد، زیرا که اکسیداسیون در غیاب اکسیژن انجام نمی‌شود. آنالیز محتوای اسیدآسکوربیک می‌تواند به یک آزمایش ساده برای بقا برگ‌ها در دماهای یخزدگی کمک کند [٤].

3- در دمای ۵°C بین تیمارهای(۰,۰۲۵ M AsA و ۰,۰۲ و ۰,۰۱۵ و ۰) از لحاظ Lipid peroxidation تفاوتی وجود ندارد، از ۰°C تا ۹°C- در همه تیمارها به مقدار نسبتاً جزئی Lipid peroxidation افزایش می یابد.

هر قدر گیاه قبل از recovery در تیمار دمایی پایین تری بوده، در زمان recovery نسبت به بقیه تیمار های دمایی Lipid peroxidation بیشتری داشته است. هر قدر غلظت ASA بیشتر بوده در همه تیمارهای دمایی مقدار Lipid peroxidation کمتر بوده است به طوری که تیمار ASA=۰/۰۲۵M کمترین Lipid peroxidation و گیاهان شاهد بیشترین Lipid peroxidation را دارا می باشند. اسیدآسکوربیک با اثر حفاظتی بر ترکیبات غشایی سبب کاهش میزان پراکسیداسیون‌لیپیدها و نشت مواد از غشا گردید.

منابع

[۱] Ashraf, M. and Harris, P. G. C. 2004. Potential Biochemical indicator of salinity tolerance in plants. Plant Science. Article in press.
[۲] Breusegem, F. V. 2002. Enginering stress tolerance in maize. In: oxidative stress in plants (eds: Taylor and Fracis). London and New-York. PP: 191-215.
[۳] Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309–314.
[۴] M. R. Alvarez, M. E. Candela, F. Sabater., 1986. Ascorbic acid content in relation to frost hardiness injury in citrus limon leaves. Cryobiology 23:33, 263-268.

The combined effects of ascorbic acid and cold stress on some antioxidant enzyme activities in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) seedlings

Shahidi[1], H., Fotouhi Ghazvini[1], R. and Jafarian[2], V.
1- MSc. Student, Professor of Horticultural Science and 2- Ph.D. Student of Biochemical, University of Guilan

Abstract

Generation of radicals active oxygen and increase those in plant tissues one of the Common typicality of environmental stresses(cold stress). In this study the greenhouse experiment consisted in a completely randomized design as a factorial arrangement with two factors: Temperature in 5 levels (3˚C, 0˚C, -3˚C, -6˚C, -9˚C) and ascorbic acid in 4 levels (0, 0.015, 0.02, 0.025 M ASA) in three replicates, harmful effect of cold stess was investigated in nine foliage Mexican lime seedling.

According in the present study various parameters such as chlorophyll a, chlorophyll b, leaf water content, protein, malondialdehyde content (indicator lipid peroxidation), leaf electrolyte leakage, superoxide dismutase enzyme activity and ascorbate peroxidase activity were evaluated in three phase include:

1- Before experiment : 25 /20˚C day/night

2- Chilling temperature: 3˚C, 0˚C, -3˚C, -6˚C, -9˚C

3- Recovery temperature: 25˚C

At the time of recovery ascorbic acid due to protection effect on the structure membranes reduced lipid peroxidation content and electrolyte leakage. Cold stress accompany with partially decreases superoxide dismutase enzyme activity in roots, noticeable decreases ascorbate peroxidase activity in root and leaves. Ascorbic acid spray (three time each day) in course of adaptation, before cold stress treatment, induction ascorbate peroxidase activities in seedlings. Seedlings that spray with ascorbic acid, before experiment, because of high ascorbate peroxidase activity, possess high capacity in course of chilling temperature for alteration in radicals oxygen active for example hydrogen peroxide. Additionally seedlings that spray with ascorbic acid, preservation fresh weight and relative water content percent in high levels.