تاریخ چاپ تابستان ۱۳۹۲

بررسی تأثیر دمای پایین روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بخش فلاودو میوه پنج رقم از مرکبات

*منصور افشار محمدیان؛ دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
بهروز گلعین؛ موسسه تحقیقات مرکبات کشور (رامسر)،
زهرا خسروی لرگانی؛ دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

چکیده

مرکبات از محصولات گرمسیری و نیمه گرمسیری است. مشکل اصلی پرورش مرکبات در آب و هوای نیمه گرمسیری، خطر سرما و یخبندان است. با توجه به تقارن فصل برداشت میوه مرکبات با ایام سرد سال، تحقیق بیش‌تر روی اثرات فیزیولوژیکی آسیب‌های سرمایی تنش دمای پایین این گیاه ضروری است. در این تحقیق بخش فلاودو میوه پنج رقم مرکبات شامل پرتقال خونی، لیموترش مازندرانی، پرتقال والنسیا، نارنگی انشو و پرتقال محلی از شمال کشور به‌منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) در دمای کنترل (°C۱۵~) و تیمارهای دمایی ۳، ۰، ۳- و ۶- درجهٔ سانتی‌گراد در دو مرحلهٔ قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل میوه ارزیابی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم SOD نسبت به سایر آنزیم‌ها در بافت فلاودوی همهٔ ارقام تحت تأثیر سرما بیش‌تر بود که می‌تواند نشان‌دهندهٔ این باشد که آنزیم SOD اولین خط دفاعی میوه‌ها است. در بافت فلاودوی پرتقال خونی در هر دو مرحله رسیدگی کامل و قبل از رسیدگی، فعالیت CAT در همهٔ تیمارهای دمایی بیش‌تر بود. ارقام نارنگی انشو و پرتقال محلی به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم APX را در هر دو مرحله برداشت دارا بودند. در ضمن، در ارقام نارنگی انشو، پرتقال خونی و لیمو ترش مازندرانی با کاهش دما، افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم POD دیده شد.

مقدمه

تولید مرکبات در مناطق مختلف جهان و مقدار زیاد تولید آن موجب شده که این محصول در جهان از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار باشد. بر مبنای گزارش آمارنامهٔ جهاد کشاورزی (۱۳۸۹)، سطح زیر کشت مرکبات در ایران ۲۹۰ هزار هکتار برآورد شده است. میزان تولید انواع مرکبات در این سال، ۴/۰۲ میلیون تن و میانگین عمل‌کرد باغ‌های مرکبات کشور ۱۶/۹ تن در هکتار بوده است [۱]. پتانسیل ژنتیکی گیاه به ژنوتیپ و محیط وابسته است. بنا بر این، برهم‌کنش ژنوتیپ و محیط تعیین‌کنندهٔ میزان تولیدات گیاهی است. به‌همین سبب درک

واژه‌های کلیدی: سرمازدگی، سوپر اکسید دیس موتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز
دریافت ۹۰/۱۲/۱ پذیرش ۹۱/۱۰/۵
*نویسنده مسئول afshar@guilan.ac.ir

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

و دریافت تنش و به‌دنبال آن تغییرات فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی به‌طور وسیعی به عواملی مثل ژنوتیپ، سطح رشد و نمو و شدت تنش‌ها بستگی دارد [۲]، [۳].

یکی از عوامل اساسی در بیولوژی گیاهان، دمای بهینه رشد است. هر گونه گیاهی در یک دامنهٔ دمایی ویژه حداکثر رشد و عمل‌کرد مطلوب را دارد و هر گونه انحراف از آن، به‌ویژه کاهش دما از حد بحرانی موجب بروز تنش و کاهش رشد رویشی و زایشی می‌شود. بسیاری از گیاهان مخصوصاً آن گروهی که بومی آب و هوای گرم هستند، علائمی از خسارت را موقعی که با دماهای کم (۱۵-۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد) مواجه می‌شوند، نشان می‌دهند [۴]، [۵]. گونه‌های مرکبات نسبت به دمای ۲- درجهٔ سانتی‌گراد و کم‌تر آسیب‌پذیر هستند. در دمای ۸- تا ۹- درجهٔ سانتی‌گراد شاخه‌ها خشک می‌شوند و در دمای ۱۰- درجهٔ سانتی‌گراد، تمام بخش‌های درخت بر اثر سرما از بین می‌رود. گل‌ها و میوه‌های جوان حساسیت زیادتری به یخبندان دارند و در یخبندان‌های کوتاه مدت دچار ریزش می‌شوند. به‌علاوه بافت و اندام‌های مختلف مرکبات در مواجه با یخبندان، مقاومت یا حساسیت یکسانی نشان نمی‌دهند. درشرایط کنترل شده، بافت‌های جوان (گل‌ها) حساس‌ترین و بافت‌های چوبی مقاوم‌ترین بافت در برابر یخبندان هستند [۱].

گیاهان از مولکول اکسیژن به‌عنوان گیرندهٔ نهایی الکترون استفاده می‌کنند. در نتیجه احیای O_2، حدواسطهای خیلی فعال و گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)[۱] نیز تولید می‌شوند [۶]. ROS شکل‌های ویژه‌ای از اکسیژن اتمسفری شامل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل است که طی مراحل اکسیداتیو طبیعی در سلول مثل تنفس، فتوسنتز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو تولید می‌شوند، اما غلظت‌شان در طول پیری، پاسخ‌های خیلی حساس به حملات میکروارگانیسم‌ها، گیاه‌خواری و قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌یابد. دمای پایین، تنش اکسیداتیو را بر گیاه تحمیل می‌کند و تجمع ROS را به دنبال دارد [۷]، [۸].

به منظور تعیین مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی، توانایی جمع‌آوری اثرات موادی سمی مثل اکسیژن فعال، حائز اهمیت است. از آن جایی که تحت شرایط تنش مانند دمای اندک، توانایی طبیعی گیاه برای حذف رادیکال‌های اکسیژنی دچار نقص می‌شود، دو سیستم دفاعی در برابر تجمع وسیع ROS وجود دارد: آنزیمی و غیرآنزیمی. سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی شامل آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی (بتاکاروتن، لیکوپن و...) و محلول در آب (اسید آسکوربیک، گلوتاتیون و...) است. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[۲]، کاتالاز (CAT)[۳]، پراکسیداز (POD)[۴]، آسکوربات پراکسیداز (APX)[۵] و... است که با افزایش سطح آن‌ها برای مقابله با تنش اکسیداتیو، توازن احیایی سلول حفظ می‌شود [۹]، [۱۰].

تنش سرمایی معضلی است که بر تولید مرکبات اثر گذاشته و بازارهای جهانی این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مساله یخبندان هر چند سال یکبار در بسیاری از کشورها، آسیب‌های سنگینی به باغ‌های مرکبات وارد می‌کند. در ایران نیز در چند دهه گذشته با فواصل هر ۱۰-۵ سال، باغ‌های مرکبات شمال و جنوب کشور دچار صدمات سرمازدگی شده‌اند [۱].

۱. Reactive oxygen species ۲. Superoxide dismutase ۳. Catalase ۴. Peroxidase
۵. Ascorbate peroxidase

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

درطول دورهٔ سرما، تغییرات عمدهٔ فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیکی رخ می‌دهد. رابطهٔ ویژه‌ای میان پروتئین‌های تحریک شده به‌وسیلهٔ سرما با میزان بقای گیاهان تحت تنش سرمازدگی وجود دارد. این موضوع کمک می‌کند تا بتوان با حداکثر نمودن بیان قابلیت‌های ارثی و ژنتیکی، میزان تحمل به سرما را افزایش داد. بر اساس گزارش موجود، افزایش یک تا دو درجهٔ سانتی‌گراد دما در تحمل مقاومت دمایی ارقام تجاری موجود، خسارت‌های وارده به درختان میوه را حداقل ۲۰-۱۰ درصد در نواحی مستعد به یخبندان کاهش خواهد داد. از آن‌جایی که از مهم‌ترین مکانیسم‌های گیاهان برای افزایش توان مقابله با دماهای اندک، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است و با توجه به حساسیت مرکبات به دماهای پایین و تقارن فصل برداشت میوه با ایام سرد سال، در این پژوهش سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز ، آسکوربات پراکسیداز ، کاتالاز و پراکسیداز در میوه ۵ رقم از مرکبات در تیمارهای دمایی ۳، ۰، ۳- و ٦- درجهٔ سانتی‌گراد، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

الف- مواد گیاهی و تیمار سرمادهی

نمونه‌برداری از باغ تحت کنترل مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور (رامسر) انجام شد. برای انجام این پژوهش از میوه‌های پنج رقم مرکبات شامل پرتقال محلی سیاورز[۱]، پرتقال خونی سانگینلا[۲]، نارنگی انشو[۳]، لیموترش مازندرانی[٤] و پرتقال فراست والنسیا[٥] استفاده شد. نمونه‌برداری در دو مرحله شامل قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل میوه بر اساس استاندارد رسیدگی مرکبات انجام شد.

به منظور انجام تیمار سرمایی، همه میوه‌ها بجز نمونه‌های کنترل ($\sim$۱٥C°)، به دستگاه انکوباتور ویژه سرمادهی منتقل شدند. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق در تیمارهای دمایی ۳، ۰، ۳- و ٦- درجه سانتی‌گراد انجام شد. دمای نمونه بتدریج و در طول مدت ۲۰ ساعت به دمای ۳ درجه سانتیگراد رسید و حدود ۱۰ ساعت در این دما باقی ماند. سپس نمونه برداری انجام شد. برای اعمال سایر تیمارهای دمایی، عبور از هر دما به دمای پایین تر طی ۲ ساعت و ماندگاری در هر دما بمدت ۱۰ ساعت انجام شد. یعنی نمونه برداری در دمای صفر درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت بعد از نمونه برداری در دمای ۳ درجه سانتیگراد صورت گرفت. بعد از تیمار سرمایی، بخش فلاودو میوه‌ها جداسازی شدند و بلافاصله با استفاده از نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان استخراج در فریزر ۸۰ - نگهداری شدند.

ب- استخراج آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی

به‌منظور استخراج عصاره سلولی برای سنجش آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیس موتاز و پراکسیداز، نیم گرم از بخش فلاودو میوه هر رقم به‌صورت جداگانه با نیتروژن مایع به‌خوبی پودر شد.

۱. *Citrus sinensis* cv. local siavaraz ۲. *C. sinensis* cv. sanguinelli ۳. *C. unshiu*
۴. cv. local lemon ۵. *C. sinensis* cv. frost valencia

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

با توجه به نوع آنزیم‌های بررسی شده، دو نوع بافر استخراج آنزیمی تهیه شد. یک میلی‌لیتر از بافر مذکور را به عصارهٔ تهیه شده در داخل میکروتیوب اضافه کرده، در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد با دور rpm ١٤٠٠٠ به‌مدت ١٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی با دقت به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و به مدت ٥ دقیقه به‌روش قبلی مجداً سانتریفیوژ شدند. محلول رویی را برداشته و به میکروتیوب‌های دیگری منتقل و در فریزر ٨٠- درجهٔ سانتی‌گراد برای انجام ادامه مراحل، ذخیره شدند.

١. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

برای استخراج SOD در ٤ درجهٔ سانتی‌گراد از بافر پتاسیم فسفات ٥٠ میلی‌مولار با pH ٧ شامل EDTA ٠/٥ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت SOD طبق روش جیاننوپلیتیس و ریس[1] (١٩٧٧) و از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ٥٦٠ نانومتر اندازه‌گیری شد [١١].

٢. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)

برای بررسی فعالیت POD از طول موج ٤٧٠ نانومتر طبق روش کالیر و همکاران[2] (١٩٨٤) استفاده شد [١٢]. بافر استخراج برای این آنزیم در ٤ درجهٔ سانتی‌گراد، بافر پتاسیم فسفات ٥٠ میلی‌مولار با pH ٧ شامل EDTA ٠/٥ میلی‌مولار بود.

٣. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

به‌منظور تعیین فعالیت APX از روش ناکانو و اسدا[3] (١٩٨٩) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٢٩٠ نانومتر انجام شد [١٣]. برای تهیهٔ محلول رویی آنزیمی از فلاودو میوه، از بافر پتاسیم فسفات ٥٠ میلی‌مولار شامل EDTA ١ میلی‌مولار و PVPP ٢ درصد استفاده شد.

٤. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

برای استخراج CAT در ٤ درجهٔ سانتی‌گراد از بافر پتاسیم فسفات ٥٠ میلی‌مولار شامل EDTA ١ میلی‌مولار و PVPP ٢ درصد، استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در طول موج٢٤٠ نانومتر طبق روش چانس و مهلی[4] (١٩٥٥) تعیین شد [١٤].

ج. مطالعات آماری

مراحل مختلف آزمایش با ٣ تکرار انجام شد و سپس تجزیه‌های آماری مربوط با استفاده از آزمون دانکن در SPSS انجام شد و نمودارهای مربوط به تغییرات در برنامهٔ اکسل ٢٠٠٧رسم شد.

---

١. Giannoplitis and Ries ٢. Kalir *et al.* ٣. Nakano and Asada ٤. Chance and Maehly

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

نتایج و بحث

الف. تنش سرمایی

تنش‌های محیطی اصلی‌ترین عامل محدودکنندهٔ تولیدات گیاهی هستند. مکانیسم‌های مقاومتی مختلفی بر اساس تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با آسیب سرمایی پیشنهاد شده است [۱۵]. شواهد زیادی وجود دارد که نشان‌دهندهٔ این است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عوامل اصلی در جلوگیری از تنش اکسیداتیو در گیاهان هستند از جمله: الف) به‌طور عمومی فعالیت یک یا تعداد بیش‌تری از آنزیم‌ها در گیاهانی که در معرض شرایط تنش قرار دارند، افزایش می‌یابد که این امر با افزایش مقاومت به تنش آن‌ها در ارتباط است. ب) پیش تیمار گیاهان در یکی از این تنش‌ها می‌تواند مقاومت به تنش‌های مختلف را افزایش دهد. پ) فرآیند مقاومت گیاهان در برابر ROS، افزایش سطح یک یا تعداد بیش‌تری از این آنزیم‌ها است [۱۶]. این شواهد نشان می‌دهد که تنش‌های محیطی می‌تواند تحریک سیستم‌های جمع‌آوری ROS گیاهی را افزایش دهد و این افزایش به‌طور کلی می‌تواند حفاظت در برابر تنش را فراهم کند. اما به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی کافی نباشد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد گیاهان مقاوم به سرما در طول دوره سرما، آنتی‌اکسیدان‌های بیش‌تر و یا ROS کم‌تری نسبت به‌گونه‌های حساس به سرما تولید می‌کنند [۱۷]، [۱۸].

ب. سنجش فعالیت آنزیمی

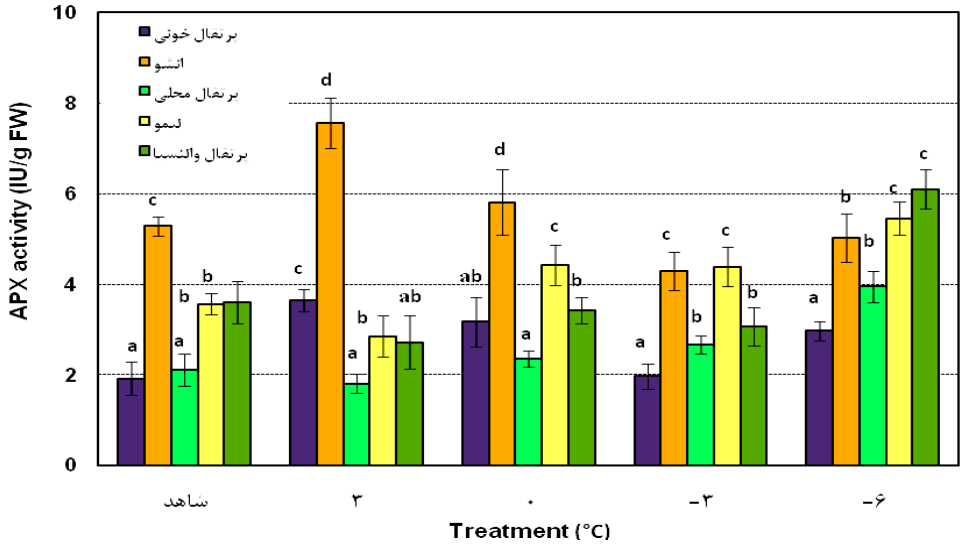
۱. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بافت فلاودو مربوط به ۵ رقم از میوه مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، ۰، ۳- و ۶- درجهٔ سانتی‌گراد) در زمان قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل بررسی شد. در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم با توجه به نوع رقم و تیمار دمایی متفاوت بود. پرتقال خونی و نارنگی انشو از لحاظ میزان فعالیت آنزیم APX در مرحلهٔ قبل از رسیدگی عکس‌العمل یک‌سانی نسبت به تیمارهای سرمایی نشان دادند، به‌طوری‌که با کاهش دما تا $3^{\circ}C$، افزایش میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد و با کاهش دما تا $3^{\circ}C$- فعالیت کاهش یافت و در $6^{\circ}C$- میزان فعالیت تقریباً برابر با فعالیت آن در $0^{\circ}C$ بود. از آن‌جاکه نشانه‌های آسیب سرمایی در دماهای کم‌تر از $12^{\circ}C$ اتفاق می‌افتد، کاهش فعالیت آنزیم می‌تواند سبب افزایش این علائم شود. افزایش میزان فعالیت آنزیم در تیمار $6^{\circ}C$- در دو رقم مذکور نشان‌دهندهٔ نوعی سازگاری به دمای پایین است. در پرتقال محلی با کاهش دما، افزایش میزان فعالیت آنزیم APX دیده شد. در دو رقم لیمو ترش و پرتقال والنسیا، دماهای کم‌تر از $3^{\circ}C$ افزایش میزان فعالیت این آنزیم را به‌همراه داشت، یعنی با کاهش هر چه بیش‌تر دما، توانایی میوه‌های مذکور نیز برای جمع‌آوری رادیکال‌های تولیدی بیش‌تر شد (شکل ۱). با اعمال تیمارهای دمایی مختلف در زمان رسیدگی کامل، حداکثر فعالیت آنزیم APX در لیمو ترش مازندرانی در $3^{\circ}C$، پرتقال خونی، نارنگی انشو و پرتقال محلی در $0^{\circ}C$ و پرتقال والنسیا در $3^{\circ}C$- مشاهده شد (شکل ۲).

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

APX آنزیم کلیدی برای تجزیهٔ پراکسید هیدروژن است. بر اساس گزارش‌های، جمع آوری H_2O_2 از کلروپلاست یا سیتوزول، می‌تواند سطح تنش‌های اکسیداتیو را کاهش دهد [۱۹]. در مقایسهٔ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های حساس به سرمای ذرت و گونه‌های مقاوم آن، فعالیت APX و SOD در گونه‌های مقاوم، دو برابر گزارش شده است [۲۰]. اهمیت نقش آنزیم APX در ارتباط با افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو در بسیاری از گیاهان دیگر نیز گزارش شده است [۲۱].

با توجه به نتایج این تحقیق، در مرحلهٔ قبل از رسیدگی، دو رقم پرتقال والنسیا و لیمو ترش برای ارتقاء میزان فعالیت آنزیم نیازمند زمان کافی هستند، یعنی بعد از طی یک دورهٔ سرمایی ۳۰ ساعته، افزایش فعالیت آنزیم در میوه شروع می‌شود و در ٦٦ ساعت بعد از شروع تیمارهای سرمایی اولیه به حداکثر فعالیت خود می‌رسد، در حالی‌که در ارقام پرتقال خونی و نارنگی انشو، بعد از ۳۰ ساعت سرمادهی، حداکثر فعالیت آنزیم APX دیده شد و در پرتقال محلی با شروع دورهٔ سرما، افزایش فعالیت این آنزیم نیز مشاهده شد و بعد از طی یک دورهٔ سرمایی ٦٦ ساعته، بیشترین میزان فعالیت آنزیم APX حاصل شد. اطلاعات به‌دست آمده تا کنون، بیانگر وجود رابطهٔ مستقیم بین میزان فعالیت آنزیم APX و حفاظت نسبت به تنش‌های اکسیداتیو مانند دماهای اندک است.



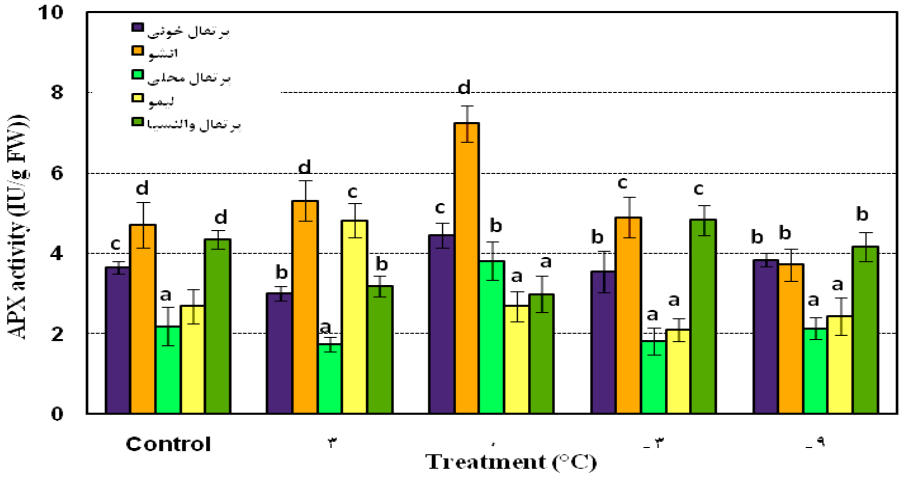
شکل ۱. مقایسهٔ فعالیت آنزیم APX بافت فلاودو میوه ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان قبل از رسیدگی تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)

۲- فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

تغییرات فعالیت آنزیم CAT در بافت فلاودو مربوط به ۵ رقم از میوه مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، ۰، ۳- و ۶- درجهٔ سانتی‌گراد) بررسی شد. کاهش دما در مرحلهٔ قبل از رسیدگی، افزایش فعالیت آنزیم CAT را در بافت فلاودوی ارقام نارنگی انشو و پرتقال خونی به‌همراه داشت و هر دو رقم در دمای ٦°C- حداکثر فعالیت آنزیمی را از خود نشان دادند (شکل ۳). روند افزایشی فعالیت این آنزیم به‌دنبال کاهش دما، در برداشت دوم

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

(رسیدگی کامل) نیز در رقم پرتقال خونی دیده شد. البته میزان فعالیت آنزیم در دمای کنترل و سایر تیمارهای دمایی به‌جز دمای $-٦^{\circ}C$، در مرحلهٔ رسیدگی کامل، بیش‌تر بود. این مشاهده می‌تواند دلیلی بر مقاومت بیش‌تر این رقم در مرحلهٔ رسیدگی کامل در برابر تنش دمای پایین باشد. در نارنگی انشو اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم در دماهای $٣^{\circ}C$، $٠^{\circ}C$ و $-٣^{\circ}C$ در مرحلهٔ رسیدگی کامل مشاهده نشد و رقم انشو در دماهای مذکور، بیش‌ترین فعالیت آنزیم CAT را نشان داد، اما در دمای $-٦^{\circ}C$ کاهش فعالیت آنزیم مشهود بود. این امر می‌تواند حاکی از این باشد که در این رقم، بعد از طی یک دورهٔ سرمایی ٦٦ ساعته، میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. پرتقال محلی در $٠^{\circ}C$ و لیمو ترش و پرتقال والنسیا در $٣^{\circ}C$ بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم را مرحلهٔ رسیدگی کامل نشان دادند (شکل ٤).



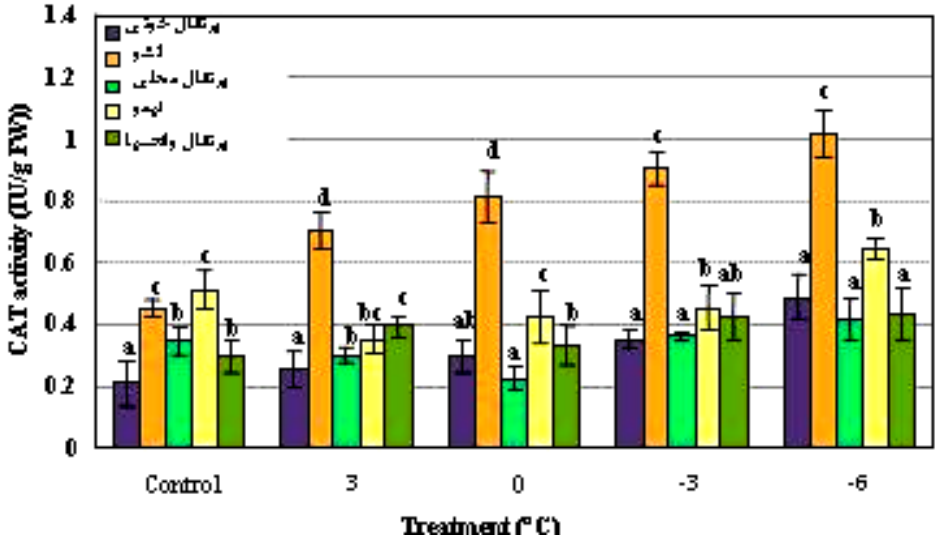
شکل ٢. مقایسهٔ فعالیت آنزیم APX بافت فلاودو میوه ٥ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان رسیدگی کامل
تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است ($P<٠/٠٥$)

کاتالاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم در پراکسیزوم‌ها است که H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کند [٢٢]. در بررسی‌هایی که روی میوه‌های نارنگی نگه‌داری شده در دمای $٢^{\circ}C$ انجام شد، فعالیت آنزیم SOD در هر دو رقم نارنگی حساس و مقاوم به سرما افزایش یافت. در میوهٔ نارنگی حساس به سرما، فعالیت آنزیم SOD اندکی افزایش و فعالیت آنزیم CAT کاهش یافت و اثرات آسیب سرمایی ظاهر شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که رادیکال‌های سوپراکسید به خوبی جمع‌آوری می‌شوند، اما توانایی بافت فلاودو در حذف H_2O_2 القا شده به‌وسیلهٔ سرما، در ارقام حساس به سرما، کاهش می‌یابد. در ارقام مقاوم به سرما، فعالیت این آنزیم در مدت نگه‌داری در دمای $٢^{\circ}C$، افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده جمع‌آوری مطلوب H_2O_2 است، بنا بر این از تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و آسیب‌های پوست میوه القا شده به‌وسیلهٔ سرما جلوگیری می‌کند [٢٣].

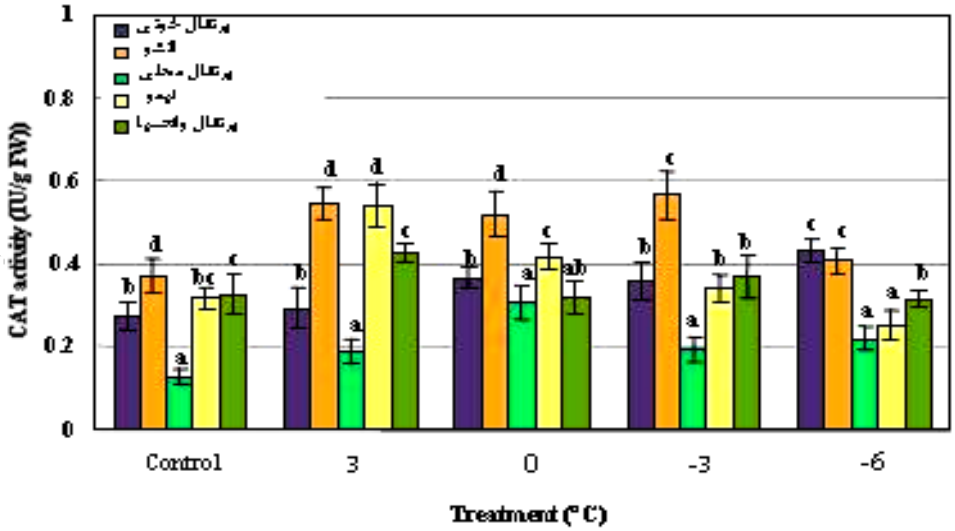
با توجه به این که میوه‌ها در مراحل مختلف رسیدگی فعالیت آنزیمی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند، تفاوت میزان حساسیت به سرمای میوه‌ها در مراحل مختلف بلوغ در نارنگی گزارش شده است [٢٤]. نکته قابل توجه در نتایج حاصل از این تحقیق این بود که در ارقام پرتقال محلی و انشو، برخلاف ارقام دیگر میزان فعالیت

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

آنزیم CAT تقریباً در تمام تیمارهای انجام شده، در مرحلهٔ رسیدگی کامل نسبت به مرحلهٔ قبل از رسیدگی کم‌تر بود. با مقایسهٔ بین فعالیت آنزیم در تمام ارقام در مرحلهٔ رسیدگی، زیاد بودن میزان فعالیت آنزیم در نارنگی انشو کاملاً مشهود بود. پژوهش‌های قبلی پیشنهاد می‌کند که CAT می‌تواند یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی مهم باشد که در مکانیسم‌های دفاعی میوه نارنگی در برابر شرایط سرمایی مشارکت کند و لکه‌های سرمایی روی بافت فلاودو را کاهش می‌دهد [۲۵]. نتایج حاصل از این بررسی نیز موافق با این پیشنهاد است.



شکل ۳. مقایسهٔ فعالیت آنزیم CAT بافت فلاودو میوه ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان قبل از رسیدگی
تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)



شکل ۴. مقایسهٔ فعالیت آنزیم CAT بافت فلاودو میوه ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان رسیدگی کامل
تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)

۳. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

تغییرات مربوط به فعالیت آنزیم SOD در بافت فلاودو مربوط به ۵ رقم از میوه مرکبات در تیمارهای سرمایی (۳، ۰، ۳- و ۶- درجهٔ سانتی‌گراد) در زمان قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل در شکل‌های ۵ و ۶

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

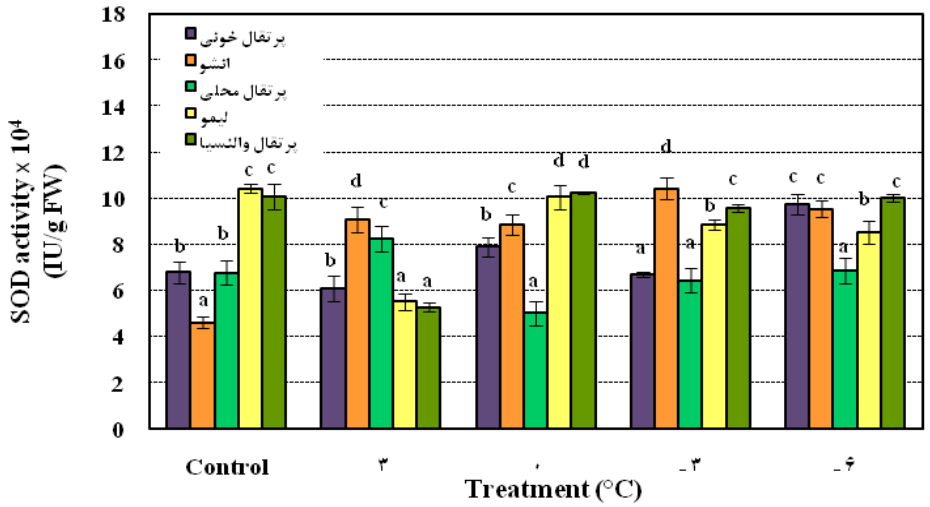
نمایش داده شده است. پرتقال خونی، لیمو ترش و پرتقال والنسیا کم‌ترین مقدار فعالیت آنزیم را در ۳°C نشان دادند و سپس روند فعالیت آنزیم افزایشی است و در دمای کنترل، کم‌ترین مقدار فعالیت آنزیم مربوط به انشو بود که در اثر تیمارهای دمایی، میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت (شکل ۵). چنان‌که در شکل ۶ نمایش داده شده است، در ارقام لیمو ترش و والنسیا، تیمارهای سرمایی تأثیر چندانی در میزان فعالیت این آنزیم ندارد، ولی در سایر ارقام رابطهٔ معنی‌داری بین دما و مقدار فعالیت آنزیم حاکم است، به این صورت که کاهش اولیهٔ دما از حالت کنترل، افزایش فعالیت آنزیم را به‌همراه دارد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که به‌طورکلی میزان فعالیت آنزیم SOD در بافت فلاودوی میوه تمام ارقام در مرحلهٔ رسیدگی کامل نسبت به مرحلهٔ قبل از رسیدگی در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تحت تیمار سرمایی، بیش‌تر بود. نکتهٔ جالب توجهی که در ارقام لیمو ترش و پرتقال والنسیا مشاهده شد این است که اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم SOD در بافت فلاودوی دو رقم مذکور در مرحلهٔ رسیدگی کامل، در ۵ دمای اندازه‌گیری شده دیده نشد و این امر حاکی از عمل‌کرد مناسب این آنزیم در جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید در تمام تیمارهای دمایی و هم‌چنین دمای کنترل است. با مقایسهٔ بین ارقام در مرحلهٔ رسیدگی کامل، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم SOD در دمای کنترل و سایر تیمارهای دمایی انجام شده، در لیمو ترش دیده شد. پرتقال خونی در این مرحله از برداشت، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیمی بافت فلاودو را در تیمار ۳°C دارا است و با کاهش دما، کاهش فعالیت دیده شد و این روند کاهشی تا دمای ۳°C- ادامه یافت، اما در دمای ۶°C- میزان فعالیت آنزیم SOD به مقدار اولیهٔ خود، یعنی در حالت کنترل برمی‌گردد. این مشاهده می‌تواند حاکی از سازگاری این رقم بعد از یک دوره سرمادهی ۶۶ ساعته باشد. در بافت فلاودوی نارنگی انشو در مرحلهٔ رسیدگی کامل، بین میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونهٔ کنترل و تیمار ۳°C اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و روند افزایشی تا ۰°C دیده شد. یعنی بعد از ۴۲ ساعت سرمادهی، میزان فعالیت آنزیمی به بیش‌ترین مقدار خود رسید و در سایر تیمارهای دمایی (زیر صفر درجهٔ سانتی‌گراد)، کاهش فعالیت در حد نمونه‌های کنترل دیده شد.

آنزیم SOD اولین خط دفاعی در برابر آسیب‌های ناشی از تولید ROS است و جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید به‌وسیلهٔ این آنزیم، اصلی‌ترین مرحلهٔ مقاومتی در برابر تیمارهای سرمایی است [۲۶]. تغییرات فعالیت SOD در گیاهان با مقاومت سرمایی مرتبط است و دمای پایین به‌طور محسوسی فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. فعالیت بیش‌تر آنزیم SOD در اسفناج و گندم سازگار به سرما نسبت به گیاهان غیرسازگار در دمای پایین گزارش شده است [۲۷].

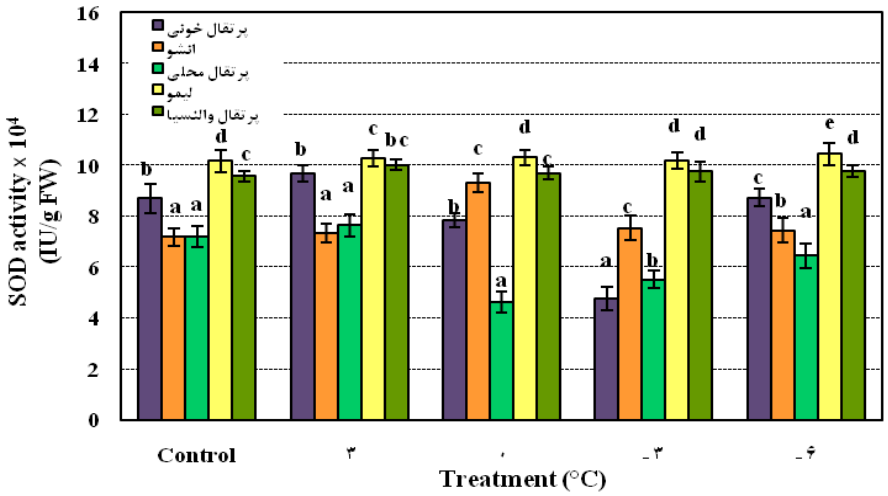
از آن‌جاکه میزان فعالیت آنزیم SOD در ارقام نارنگی انشو، پرتقال محلی، پرتقال والنسیا، پرتقال خونی و لیمو ترش در مرحلهٔ رسیدگی کامل نسبت به مرحله قبل از رسیدگی بالاتر است، می‌توان نتیجه گرفت که در ارقام مذکور در مرحلهٔ رسیدگی کامل، سیستم جمع‌آوری رادیکال‌های سوپراکسید در بافت فلاودو، کارآمدتر

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

است. از این رو ممکن است اثرات آسیب سرمایی در پوست که از خاصیت تجاری میوه می‌کاهد، در بافت فلاودو در مرحلهٔ رسیدگی کامل ظاهر نشود، اما در مرحلهٔ قبل از رسیدگی میوه، این اثرات دیده شود. به‌همین دلیل در معرفی نمونه‌ای به‌عنوان میوه مقاوم یا حساس به سرما، علاوه بر مهم بودن فصل برداشت و زمان مواجهه با دمای کم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیم SOD در پوست میوه مرکبات، نیز مهم است.



شکل ۵. مقایسهٔ فعالیت آنزیم SOD بافت فلاودو میوه ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان قبل از رسیدگی
تفاوت های معنی دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)



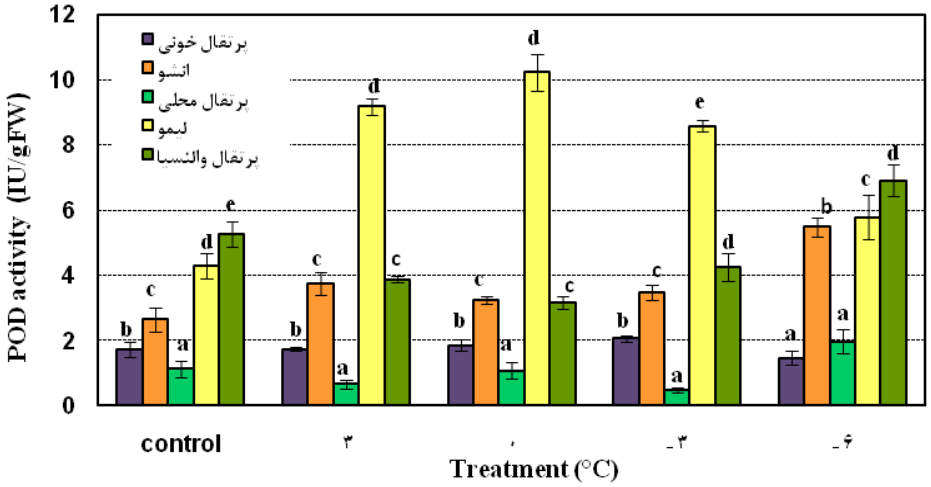
شکل ۶. مقایسهٔ فعالیت آنزیم SOD بافت فلاودو میوه ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان رسیدگی کامل
تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)

۴. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)

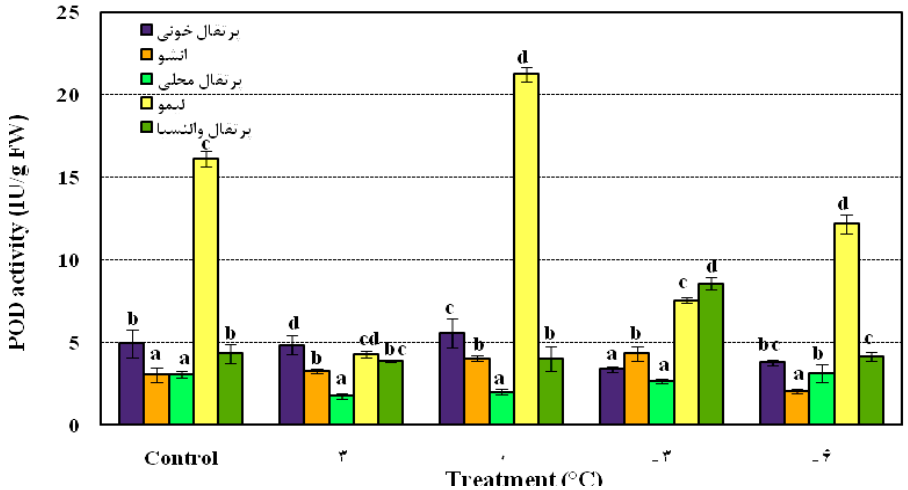
تغییرات مربوط به فعالیت آنزیم POD در بافت فلاودو مربوط به ۵ رقم از میوه مرکبات در تیمارهای سرمایی مختلف در زمان قبل از رسیدگی و رسیدگی کامل در شکل‌های ۷ و ۸ نمایش داده شده است. در ارقام نارنگی انشو، پرتقال خونی و لیمو ترش در مرحلهٔ قبل از رسیدگی در بافت فلاودو با کاهش دما، افزایش فعالیت آنزیم POD دیده شد. پرتقال خونی و لیمو ترش مازندرانی بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم را در ۰°C نشان دادند.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

پرتقال والنسیا و نارنگی انشو بیش‌ترین مقدار فعالیت را در ۳-°C و پرتقال محلی بیش‌ترین مقدار فعالیت را در ۶-°C دارا بودند.



شکل ۷. مقایسهٔ فعالیت آنزیم POD در بافت فلاودو ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان قبل از رسیدگی
تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)



شکل ۸. مقایسهٔ فعالیت آنزیم POD در بافت فلاودو ۵ رقم از مرکبات در هر تیمار در زمان رسیدگی کامل
تفاوت‌های معنی‌دار با حروف مختلف نشان داده شده است (P<۰/۰۵)

تنش‌های محیطی مختلف، موجب تجمع H_2O_2 در بافت‌های گیاهی می‌شوند، از این رو تنظیم سطح H_2O_2 در متابولیسم سلول‌های گیاهی حائز اهمیت است [۲۸]. در سلول‌های گیاهی آنزیم‌هایی مثل POD، APX و CAT مسئول انجام این کار هستند [۲۹]. گزارش شده است که افزایش فعالیت آنزیم POD در پوست میوهٔ نارنگی انشو که به‌مدت ۸ هفته در دمای ۲°C نگه‌داری شدند، به آسیب سلولی در پاسخ به تنش سرمایی مربوط است [۳۰]. این نتایج رابطهٔ بین حساسیت سرمایی این میوه‌ها و القای فعالیت آنزیم POD را در طول مدت انبارمانی، تأیید می‌کند.

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در ارقام نارنگی انشو، پرتقال خونی و لیمو ترش در مرحلهٔ قبل از رسیدگی در بافت فلاودو، با بررسی‌های ذکر شده سازگار است، به این معنی که با کاهش دما، افزایش فعالیت آنزیم

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

POD دیده شد. البته در ارقام پرتقال والنسیا و نارنگی انشو افزایش فعالیت این آنزیم تحت تیمارهای دمایی در برداشت دوم نیز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری نهایی

گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، اغلب حساس به سرما هستند و از آسیب‌های سرمایی (نه یخزدگی) در دماهای ۰ تا ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد رنج می‌برند. ترکیب عمل‌کرد آنزیم‌های SOD، POD، APX و CAT که رادیکال‌های مضر سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را جمع‌آوری می‌کنند، بسیار حائز اهمیت است. توازن بین فعالیت آنزیم‌های مذکور برای بقاء سلول در دوره‌های سرمایی، مهم است [۳۱]. تنش سرما می‌تواند توازن بین تولید ROS و مکانیسم‌های دفاعی را به‌هم بریزد [۱۷]. زیاد بودن میزان فعالیت آنزیم SOD نسبت به سایر آنزیم‌ها در بافت فلاودوی همه ارقام بررسی شده در این تحقیق، نشان‌دهندهٔ این امر است که سلول در اولین خط دفاعی خود بسیار کارآمد ظاهر می‌شود و می‌توان این طور نتیجه گرفت که اختلاف ارقام در میزان مقاومت آن‌ها به دمای کم به فعالیت سایر آنزیم‌ها مربوط است و از آن‌جاکه CAT در غلظت‌های زیاد H_2O_2 وارد عمل می‌شود، نسبت به APX و POD از اهمیت بیش‌تری برخوردار است. نمونه‌های پرتقال خونی در دمای کنترل و نمونه‌هایی که تحت تیمار سرمایی ۳، ۰ و $3^{\circ}C$- قرار گرفتند، در مرحلهٔ رسیدگی کامل نسبت به مرحلهٔ قبل از رسیدگی، فعالیت بیش‌تری از CAT را نشان دادند که این نتیجه می‌تواند دلیلی بر مقاوم بودن این رقم در مرحلهٔ رسیدگی کامل باشد. اما در انشو و پرتقال محلی در مرحلهٔ قبل از رسیدگی، فعالیت CAT بیش‌تر است.

منابع

۱. ب. عدولی، بهروز گلعین، *مرکبات (داشت)*، انتشارات نوین پویا (۱۳۹۰) ص. ۱۷۲ و ۱۶۰.

2. D. T. Tingey, D. M. Olszyk, A. A. Herstrom and E. H. Lee, "Effects of ozone on crops, In: McKee, D.J. (ed.), Tropospheric Ozone, Human Health and Agricultural Impacts", Lewis Publishers, Boca Raton (1993) 175-206.
3. L. Plaza, I. Crespo, S. Teresa, B. Ancos, C. Moreno, M. Muoz, M. Cano, "Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage", Food Chemistry, 124 (2011) 646-651.
4. D. V. Lynch. "Chilling injury in plant: the relevance of membrane lipids. In: Katterman, F. (ed.). Enviromental Injury to Plants", Academic press, New York. (1990) 17-34.
5. Q. S. Wu, "Mycorrhizal efficacy of trifoliate orange seedlingson alleviating temperature stress", Plant Soil Environ, 56 (2011) 459-464.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

6. B. Halliwell, "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life", Plant Physiol, 141 (2006) 312-322.

7. H. Knight, M. R. Knight, "Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk", Trends in Plant Sci., 6 (2001) 262-267.

8. C. Hoyle, J. Santos, "Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia", International Food Research Journal, 17 (2010) 937-946.

9. C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, "Superoxide dismutase and stress tolerance", Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 43 (1992) 83-116.

10. H. Yang, H. Li, L. Rao, G. Long, G. Shi and G. Peng, "Effects of exogenous ABA on antioxidant enzymes in detached citrus leaves treated by rapid freezing", African J of Biotechnology 10 (2011) 9779- 9785.

11. C. N. Giannoplitis, S. K. Ries, "Superoxide dismutase: I. Oc- currence in higher plants", Plant Physiol, 59 (1977) 309-314.

12. A. Kalir, G. Ornri and A. Poljakoff-Mayber, "Peroxidase and catalase activity in leaves of Halimione Portulacoides exposed to salinity", Plant Physiol, 62 (1984) 238-244.

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

14. B. Chance, A. C. Maehly, "Assay of catalases and peroxidase", Meth., Enzymol, 2 (1955) 764-775.

15. I. Oncel, Y. Keles, A. S. Ustun, "Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings", Environ, Pollut, 107(2000) 315-320.

16. J. Gressel, E. Galun, "Genetic controls of photooxidant tolerante in Plants", In: Foyer, P. (ed.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems Mullineaux and eds. CRC Press, Boca Raton, FL (1994) 237-273.

17. D. M. Hodges, G. E. Lester, K. D. Munro and P. M. A. Toivonen, "Oxidative stress: importance for postharvest quality, HortScience, 39 (2004) 924-929.

18. R. Polinati, A. Faller, E. Fialho, "The effect of freezing at −18℃ and −70℃ with and without ascorbic acid on the stability of antioxidant in extracts of apple and orange fruits", International J. Food Science & Technology, 45 (2010) 1814-1820.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]

19. F. Canovas, M. Acosta, "Kinetic study of the inactivation of ascorbat peroxidase by hydrogen peroxide", Biochem J. ,2 (2000) 321-328.

20. L. S. Jankhe, M. R. Hull and S. P. Long, "Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in Zea mays and Zea diploperennis", Plant Cell Environ. 14 (1991) 97-104.

21. D. H. Lee, C. B. Lee, "Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays", Plant Sci. 159(2000) 75-85.

22. I. Fridivich, "Superoxide dismutases: An adaptation to a paramagnetic gas", J. Biolo. Chem. (1989) 7761-7764.

23. J.M. Sala, "Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits", Postharvest Biol. Technol, 13 (1998) 255-261

24. M. Lafuente, M. A. Martinez-Téllez and L. Zacarias, "Abscisic acid in the response of Fortune mandarin to chilling, Effect of maturity and high temperature conditioning", J. Sci. Food Agr., 73 (1997) 494-502.

25. J. M. Sala, M. T. Lafuente, "Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling", Postharvest Biol, Technol, 20 (2000) 81-89.

26. R. Mittler, "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance", Trends Plant Sci. 7(2002) 405-410.

27. S. Schoner, G. H. Krause, "Protective systems against active oxygen species in spinich: Reponse to cold acclimation in excess light", Planta. 180 (1990) 383-389.

28. G. G. Yannarelli, S. M. Gallego and M. L. Tomaro, "Effect of UV-B radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons", Environ, Exp. Botany, 56 (2006) 174-181.

29. H. Attila, E. Sara and H. Gabor, "Comparative studies of H2O2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress", Plant Sci.,160 (2001) 085-1093.

30. M. H. Li, "Peroxidase and superoxide dismutase activities in fig leaves in response to ambient air pollution in a subtropical city", Arch. Environ, Contam. Toxicol, 45 (2003) 168-176.

31. J. M. Sala, M. T. Lafuente, "Antioxidant enzymes activities and rind staining in 'Naveline' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning", Postharvest Biol. Technol. 31 (2004) 277-285.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-03]