تأثیر محلول‌پاشی برگی پوتریسین و پرولین بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پوست و گوشت میوه دو گونه مرکبات در پاسخ به تنش دمای پایین

سهیلا محمدرضاخانی[1]*، جعفر حاجی‌لو[2] و فرخنده رضانژاد[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۴- تاریخ پذیرش: ۴/۱۱ /۱۳۹۷)

چکیده

گونه‌های مختلف مرکبات به دماهای پایین حساس می‌باشند. امروزه از تنظیم کننده‌های رشد به منظور کاهش اثرات منفی تنش‌ها استفاده می‌گردد. در این پژوهش، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در پوست و گوشت میوه دو گونه مرکبات تیمار شده با غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین تحت دماهای کم بررسی شد. بدین منظور، شاخه‌های درختان مورد آزمایش، ۲۴ ساعت قبل از قرارگیری در معرض دماهای کم با اسید آمینه پرولین با غلظت‌های ۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار و پوتریسین با غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار محلول‌پاشی و سپس شاخه‌های میوه‌های تیمار شده به مدت سه ساعت در معرض دماهای ۱+، ۱- و ۳- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نتایج پژوهش بیانگر آن بود که در دو گونه مرکبات (نارنگی کارا و پرتقال والنسیا) کاهش دما درمیوه‌های بدون تیمار (شاهد)، سبب کاهش میزان قندهای احیاکننده و افزایش میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و قندهای محلول پوست و گوشت میوه‌های نارنگی و پرتقال شد. تیمار میوه ها با غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین افزایش معنی‌داری در میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و قندهای محلول نسبت به نمونه های شاهد نشان داد و بالاترین میزان این شاخص، در تیمار ۲۰ میلی‌مولار پرولین و ۱۰ میلی‌مولار پوترسین مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: تنش دمای کم، فلاونوئید، قندهای احیا کننده، گونه‌های مرکبات، گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن

۱- دانشجوی دکتری میوه‌کاری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان
* پست الکترونیک: smohammadrezakhani@yahoo.com

مقدمه

وقوع یخبندان، هر چند سال یکبار در ایران و بسیاری از کشورهای مرکبات‌خیز، آسیب‌های سنگین به باغ‌های مرکبات وارد می‌کند. مرکبات جزو محصولات گرمسیر و نیمه‌گرمسیر و حساس به تنش دمای پایین هستند (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵). تنش دمای کم با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک باعث عدم تعادل متابولیسمی، کاهش رشد، عملکرد و در بعضی موارد مرگ گیاهان حساس می‌گردد (جعفری و همکاران، ۱۳۸۶). هر گونه گیاهی در یک دامنه دمایی ویژه حداکثر رشد و عملکرد را دارند و خارج از این محدوده دمایی منجر به کاهش رشد رویشی و زایشی می‌شود (لینچ[1]، ۱۹۹۰). میزان مقاومت به تنش دمای کم در بین ارقام مرکبات متفاوت می‌باشد، حتی در یک رقم بین اندام‌های مختلف مثل برگ، گل، ساقه و میوه تفاوت‌هایی وجود دارد. بطوریکه حد بحرانی دما برای گل ۱±۱، میوه و برگ ۱±۲- و برای ساقه در حدود ۱±۴- درجه سانتی‌گراد می‌باشد که البته میزان مقاومت با توجه به ژنوتیپ، سن و اندام گیاهی تحت تنش متفاوت می‌باشد.

در تنش دمای کم به دلیل تولید انواع گونه‌های واکنشگر اکسیژن در محیط سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو وجود دارد (مولا[2] و همکاران، ۲۰۰۶). عموماً گیاهان از طریق فعال سازی متابولیت‌های آنتی اکسیدانی (فنل، کاروتنوئیدها) سازگاری خویش به تنش دمای کم را افزایش می‌دهند (چن[3] و همکاران، ۲۰۰۶). ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌گردند اما تنش‌های زنده یا غیر زنده مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهد (وین[4] و همکاران، ۲۰۰۸). با توجه به نقش ترکیبات فنلی در کاهش یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها، از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی و یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداسیون و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (کسوری[5] و همکاران، ۲۰۰۷). فلاونوئیدها نیز آنتی‌اکسیدان‌های قدرتمندی هستند که می‌توانند با یک پراکسیداز خاص در واکوئول یا دیواره سلول، پراسید هیدروژن را تجزیه نمایند (یاماساکی[6] و همکاران، ۱۹۹۷). سازگاری به تنش سرما در نتیجه مکانیزم‌های پیچیده بیوشیمیایی است که منجر به افزایش تجمع قندهای محلول، افزایش مکانیزم‌های ضد اکسیداسیون، تغییر در ترکیبات لیپیدی غشاء و مانند آن است (پویریر[7] و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین قندها نقش مهمی در فرآیند اسمزی یا حفاظت از ماکرومولکول‌های خاص در هنگام از دست دادن آب دارند (اسکریبر[8] و همکاران، ۲۰۱۳). گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی از جمله دمای کم با ذخیره مواد تنظیم‌کننده اسمزی، مقاومت خود را به دمای کم افزایش می‌دهند. پرولین، بعنوان یک اسمولیت طبیعی با تنظیم کردن پتانسیل اسمزی، نقش مهمی در جلوگیری از هدر رفتن آب درون سلولی در شرایط تنش ایفاد می‌کند. پرولین نقش متنوعی تحت شرایط تنش مانند تثبیت پروتئین، غشا و ساختارهای سلولی و محافظت از اعمال سلولی توسط از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارد (روسنز[9] و همکاران، ۲۰۰۲). پلی‌آمین‌ها نقش موثری در سازگاری گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده دارند. پلی‌آمین‌ها از طریق جذب رادیکال‌های آزاد، ثبات و پایداری پروتئین‌ها و غشاها در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌ها نقش دارند (کلارک و فیری[10]، ۲۰۰۲).

پلی‌آمین‌ها می‌توانند در پاسخ به تنش‌هایی مانند دمای کم یا زیاد، تنش شوری و آب تغییر کنند (لیو[11] و همکاران، ۲۰۰۶). نقش تنظیم‌کنندگی پلی‌آمین‌ها در ارتباط با تنش‌ها، استحکام غشاهای سلولی و بازداری از فعالیت آنزیم‌های هیدرولتیکی، می‌باشد (ابو-کپاوو[12] و همکاران، ۲۰۰۲). پلی‌آمین‌ها نقش مثبتی را در واکنش دفاعی گیاهان

1. Lynch
2. Molla
3. Chen
4. Wen
5. Ksouri
6. Yamasaki
7. Poirier
8. Schreiber
9. Roosens
10. Clarke and Ferre
11. Liu
12. Abu-Kpawoh

در برابر تنش‌ها بر عهده دارند (پراب هاواتی و رجام[1]، ۲۰۰۷). تنش‌ها موجب افزایش پلی‌آمین‌ها درونی شده و در گیاهان مقاوم به تنش سرما میزان پلی‌آمین‌های درونی نسبت به گونه حساس به سرما بیشتر می‌باشد (هی[2] و همکاران، ۲۰۰۲). گزارش کرده‌اند که پلی‌آمین‌ها بعنوان آنتی‌اکسیدانت از خسارت اکسیداتیو در اجزای سلولی مانند غشاء سلول، اسیدهای نوکلئیک و از اسیدهای چرب غیراشباع محافظت می‌کنند (شین[3] و همکاران، ۲۰۰۰). این مولکول‌های چند کاتیونی باعث تثبیت غشای سلولی می‌شوند، بنابراین تغییر در نفوذناپذیری و از بین رفتن سیالیت غشا را به حداقل می‌رساند. پلی‌آمین‌ها با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد در حفظ غشا از تنش‌های اکسیداتیو موثر هستند (شین و همکاران، ۲۰۰۰). پلی‌آمین‌ها به‌عنوان آنتی اکسیدانت از خسارت اکسیداتیو در اجزای سلولی مانند غشاء سلول، اسیدهای نوکلئیک و از اسیدهای چرب غیراشباع محافظت می‌کنند (شین و همکاران، ۲۰۰۰).

هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر محلول‌پاشی برگی پوتریسین و پرولین بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پوست و گوشت میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا در پاسخ به تنش دمای کم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۵ در یک باغ تجاری در شهرستان جیرفت انجام گردید و تأثیر تنش سرما روی میوه‌های دو گونه مرکبات (نارنگی کارا و پرتقال والنسیا) در مرحله بلوغ فیزیولوژیکی بررسی شد. به این منظور، شاخه‌های درختان مورد آزمایش، ۲۴ ساعت قبل از قرار گرفتن در معرض دماهای کم، با اسید آمینه پرولین با غلظت‌های ۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار و پوتریسین با غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار محلول‌پاشی و سپس شاخه‌های حاوی میوه‌های تیمار شده از درختان جدا و درون محلول ساکارز ۱۵ درصد قرار گرفتند و سپس به مدت سه ساعت در معرض دماهای ۱، ۱- و ۳- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پوست و گوشت میوه‌های تیمار شده و شاهد بصورت جداگانه در نیتروژن مایع تثبیت و به منظور آنالیزهای بعدی در دمای ۸۰- نگهداری شدند. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار، که برای هر تکرار یک شاخه حاوی ۳ عدد میوه انتخاب گردید.

مطالعات بیوشیمیایی

ترکیبات فنلی کل

نیم گرم از بافت گیاهی در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. نمونه ها ترجیحاً در تاریکی نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰×g سانتریفوژ شدند و از محلول رویی برای سنجش پلی‌فنل‌ها استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر از معرف فولین و ۲ میلی لیتر آب مخلوط گردید و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به مخلوط اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از این مدت جذب رنگ آبی تولید شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت فنل‌ها از منحنی استاندارد اسید گالیک استفاده شد (گاوو[4] و همکاران، ۲۰۰۰).

فلاونوییدها

اندازه‌گیری فلاوونوییدها به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از روش کریزک[5] و همکاران (۱۹۹۸) انجام گرفت. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاه در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (الکل اتیلیک و اسید استیک گلاسیال به نسبت حجمی۱:۹۹) ساییده شده و پس از سانتریفوژ عصاره به‌مدت ده دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب در طول موج‌های ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم در گرم بیان گردید.

قندهای احیاکننده

برای اندازه‌گیری مقدار قندهای احیاکننده از روش سوموگی[6]

1. Prabhavathi and Rajam
2. He
3. Shen
4. Gao
5. Krizek
6. Somogy

(۱۹۵۲) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از اندام هوایی گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سائیده شد. سپس محتوای هاون به بشر کوچکی منتقل گردید و روی اجاق برقی قرار داده شد تا حرارت ببینند. به محض اینکه به نقطه جوش رسید، حرارت قطع شد و محتوای بشر به کمک کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید و عصاره گیاهی به دست آمد. مقدار دو میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های تهیه شده به لوله آزمایش منتقل شد و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول سولفات مس به آنها، سر لوله‌ها با پنبه بسته شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبگرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در این مرحله $Cu2^{+}$ توسط آلدئید مونوساکارید احیا شده به Cu_2O تبدیل می‌شود و انتهای لوله آزمایش رنگ قرمز آجری مشاهده می‌شود. پس از آنکه لوله‌ها سرد شدند، دو میلی‌لیتر محلول فسفومولیبد یک اسید به آنها اضافه شد و پس از چند لحظه رنگ آبی پدیدار گردید. لوله‌های آزمایش به شدت تکان داده شدند تا این رنگ به طور یکنواخت درون لوله آزمایش منتشر گردد. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیاکننده محاسبه گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار قندهای احیا کننده بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردیدند.

مواد جامد محلول

برای سنجش کربوهیدرات‌های محلول از روش فالیس[1] (۱۹۵۱) استفاده گردید. از مقدار ۰/۱ گرم اندام هوایی با استفاده از ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه (دو مرحله ۳۰ دقیقه ای) کربوهیدرات های محلول استخراج شدند و عصاره ها با کاغذ صافی صاف شده و سپس الکل آن‌ها تبخیر گردید. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر حل شد. از هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر در یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه گردید. پس از مخلوط شدن، به مدت ۱۷ دقیقه در بن‌ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از سرد شدن جذب آن‌ها در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

آنالیز آماری

پس از اندازه‌گیری صفات و جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با استفاده از نرم‌افزار SAS و به روش دانکن انجام گرفت و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

تنش دمای کم منجر به افزایش میزان فنل در گوشت میوه های نارنگی و پرتقال والنسیا گردید بطوری که با کاهش دما به ۳- درجه سانتی‌گراد، این افزایش بیشتر مشاهده شد. استفاده از پوتریسین و پرولین با غلظت‌های مختلف، سبب افزایش فنل کل شد اما بیشترین میزان در غلظت ۲۰ میلی مولار پرولین و ۱۰ میلی‌مولار پوترسین در گوشت میوه‌های نارنگی و پرتقال والنسیا شده است (شکل۱). همچنین با کاهش دما میزان فنل در پوست میوه هر دو گونه افزایش یافت (شکل۲، A و B). محلول‌پاشی با پوتریسین و پرولین نسبت به نمونه‌های شاهد منجر به افزایش معنی‌دار در سطح ۵ درصد در مقدار فنل شد. همچنین استفاده از این پیش‌تیمارها، با کاهش دما سبب افزایش بیشتر میزان فنل شد و بیشترین افزایش در پیش‌تیمار ۲۰ میلی مولار پرولین و ۱۰ میلی‌مولار پوترسین مشاهده شد (شکل۲، A و B).

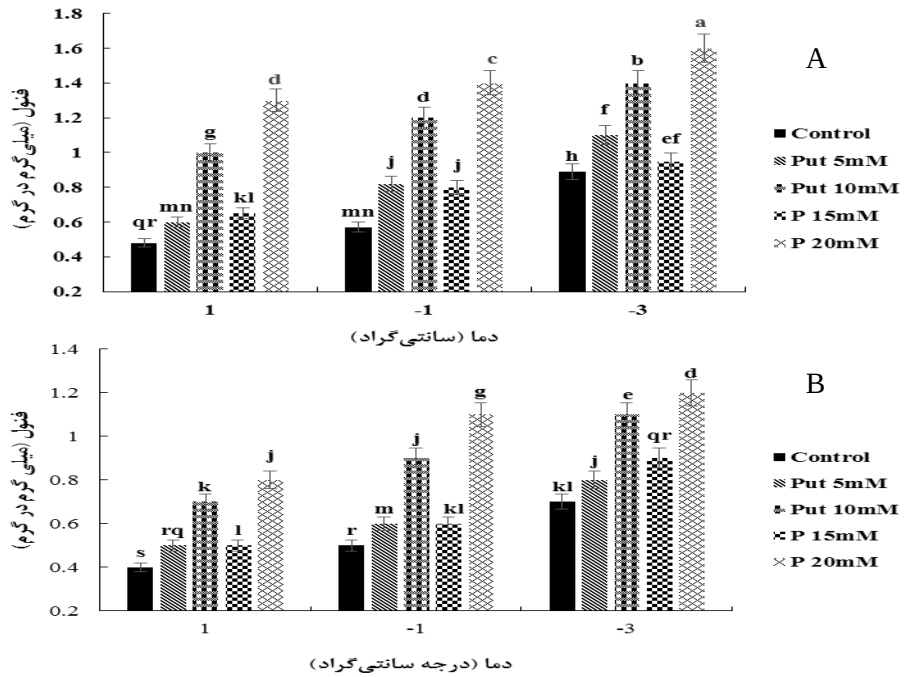
میزان فلاونوییید کل

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با کاهش دما میزان فلاونوئیدها در پوست و گوشت میوه‌های نارنگی و پرتقال افزایش یافته است (شکل‌های ۳و ۴). در هر دما، استفاده از هر دو ماده سبب افزایش میزان فلاونوئیدها شد که بیشترین افزایش در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد و تیمار ۲۰ میلی‌مولار پرولین و ۱۰ میلی‌مولار پوترسین مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۴).

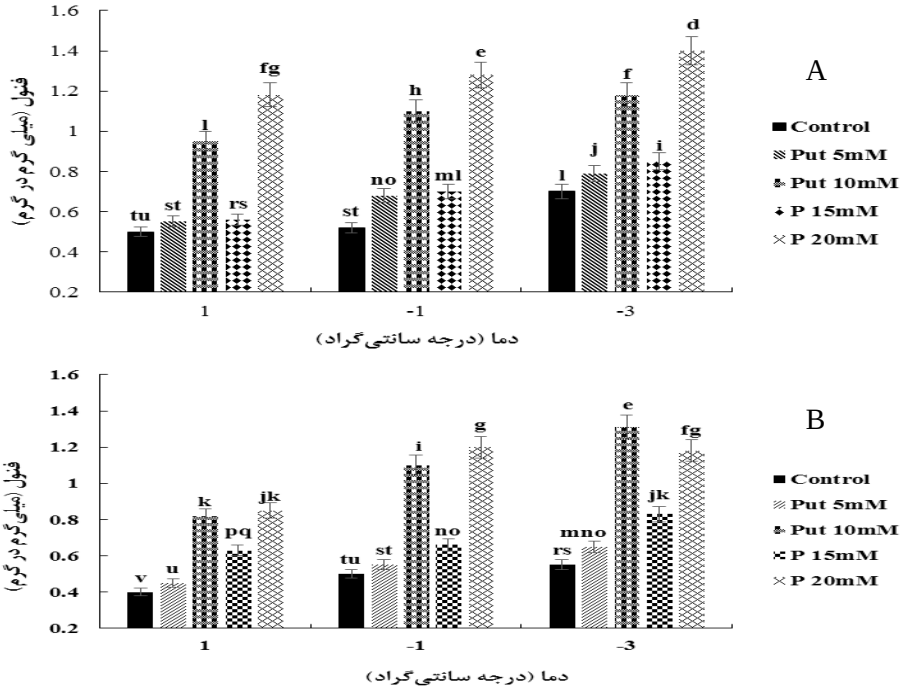
مواد جامد محلول

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تغییرات کربوهیدراتهای محلول در پوست و گوشت میوه‌های شاهد و تیمار شده در هر دو گونه مرکبات در طی دماهای مختلف معنی‌دار بوده

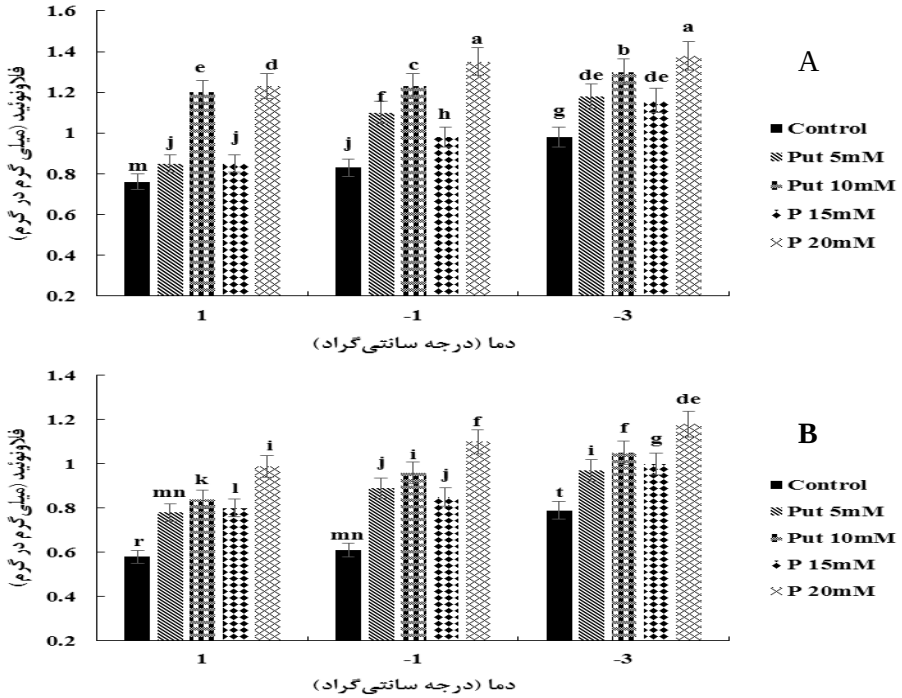
1. Fales



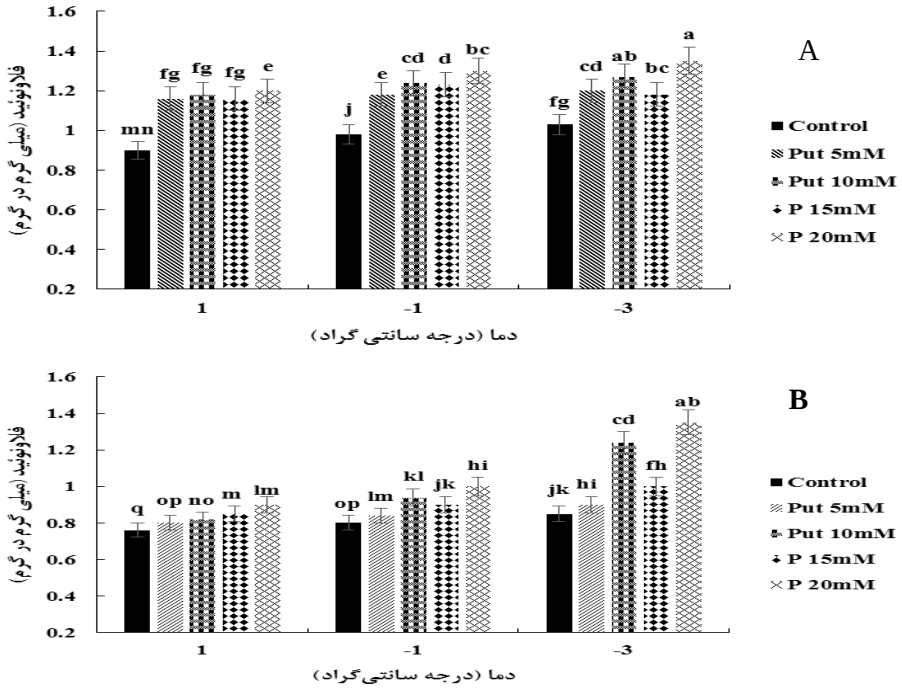
شکل۱- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان فنل کل در گوشت میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: نارنگی، B: پرتقال والنسیا. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان فنل کل در پوست میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: نارنگی، B: پرتقال والنسیا. Control: شاهد. Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان فلاونوئید گوشت میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: نارنگی، B: پرتقال والنسیا. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل۴- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان فلاونوئید در پوست میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: نارنگی، B: پرتقال والنسیا. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

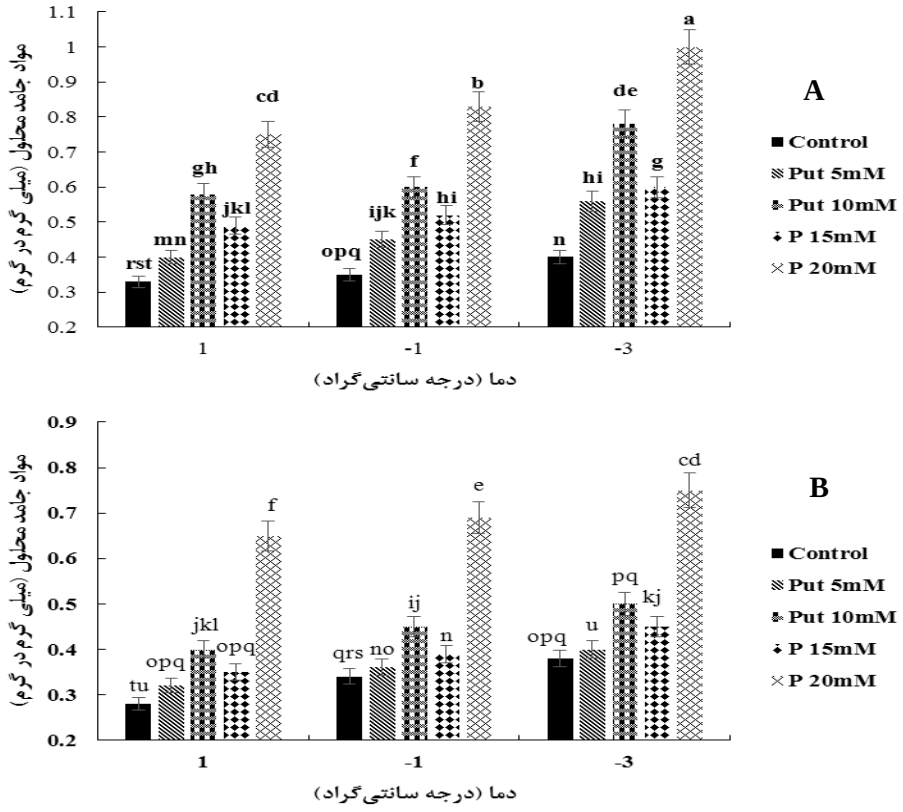
است. این در حالی است که کاربرد غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین منجر به افزایش قابل توجهی در میزان کربوهیدرات در گوشت میوه های نارنگی و پرتقال والنسیا نسبت به نمونه‌های شاهد در دماهای مختلف شد (شکل۵، A و B)، بطوریکه بیشترین میزان کربوهیدرات‌ها در گوشت میوهای نارنگی و پرتقال والنسیا تیمار شده با پرولین ۲۰ میلی‌مولار و ۱۰ میلی‌مولار پوترسین در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید (شکل۵، A و B).

نتایج حاصل از سنجش مقدار قندهای محلول در شکل ۶ نشان داد که تنش دمای کم باعث افزایش مقدار قند در پوست میوه نارنگی و پرتقال والنسیا تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد شد (شکل۶، A و B). کاربرد تیمار پوتریسین و پرولین اثر معنی‌داری بر مقدار مواد جامد محلول در پوست و گوشت میوه‌های پرتقال والنسیا داشته است.

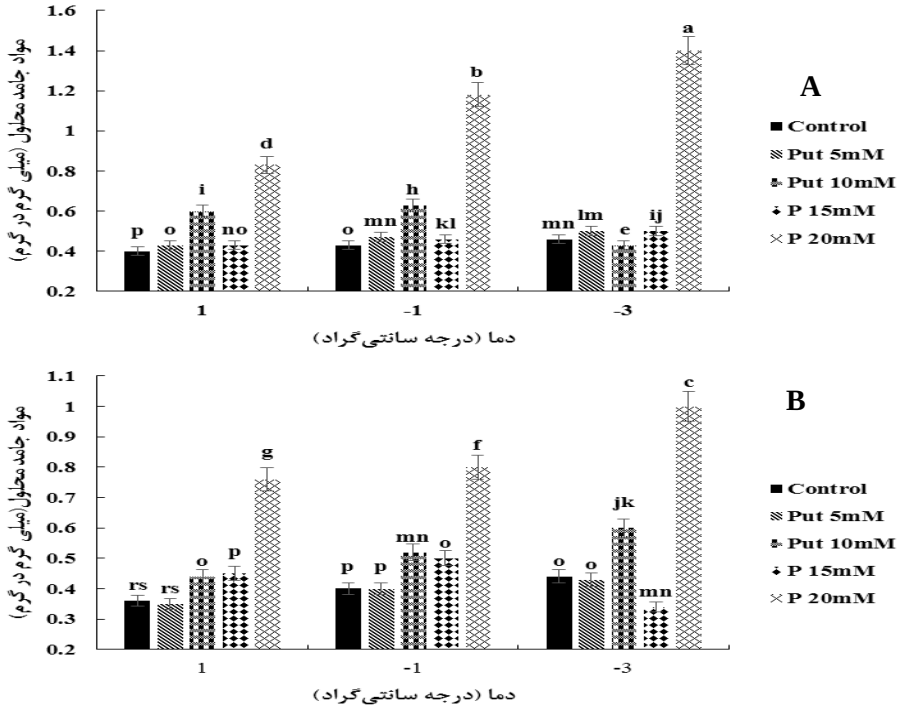
میزان قندهای احیا

در اندازه‌گیری مقدار قندهای احیاکننده مشاهده شد که با کاهش دما میزان قندهای احیا در گوشت هر دو گونه در میوه‌های شاهد و هم تیمارشده کاهش یافته است (شکل ۷) اما در هر دما، تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف پرولین و پوتریسین منجر به افزایش میزان قندهای احیا در پوست و گوشت میوه‌های نارنگی شده است. این افزایش در کاربرد تیمار ۲۰ میلی مولار پرولین و ۱۰ میلی‌مولار پوترسین بیشترین بود (شکل ۷).

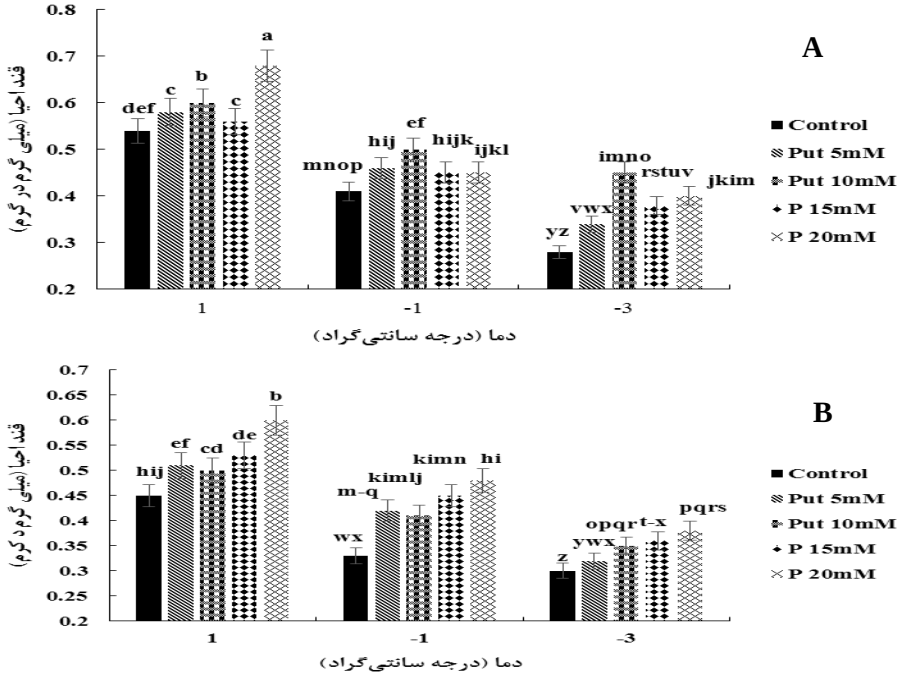
با توجه به شکل ۸ تیمار پوتریسین و پرولین باعث افزایش میزان قندهای احیاکننده در پوست میوه‌های نارنگی و پرتقال والنسیا در دماهای مختلف شده است. این در حالی است که کاهش دما منجر به کاهش در میزان قندهای احیا شده است (شکل ۸).



شکل۵- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان مواد جامد محلول در گوشت میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: گوشت، B: پوست. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل۶- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان مواد جامد محلول در پوست میوه نارنگی و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: نارنگی، B: پرتقال والنسیا. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

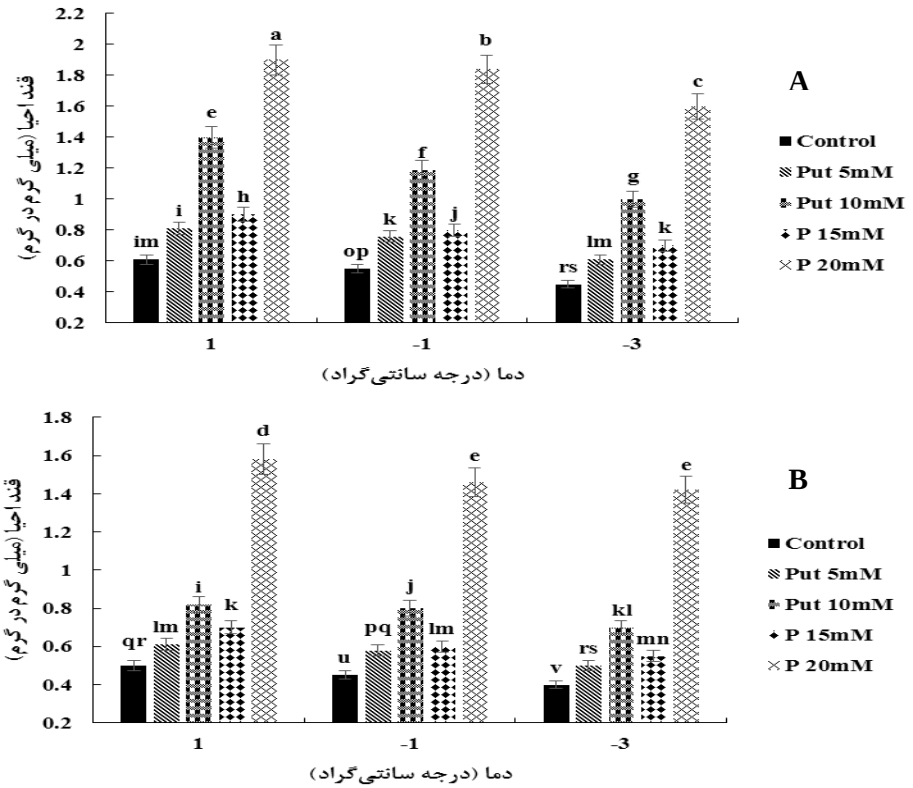


شکل۷- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان قندهای احیا در گوشت میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: نارنگی، B: پرتقال والنسیا. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنش دمای کم بر صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده اثر معنی‌داری داشته است، بطوری‌که تحت تنش دمای کم میزان تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها هم در پوست و گوشت پرتقال رقم والنسیا و نارنگی کارا افزایش یافته است. ترکیبات فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی داشته و توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشند (رازالی[1] و همکاران، ۲۰۰۸). پلی‌فنل‌ها خصوصاً فلاونوئیدها در برابر صدمه های ناشی از سموم و رادیکال‌های آزاد دارای اثر محافظتی می‌باشند (چن و همکاران، ۲۰۰۲). فلاونوئیدها آنتی اکسیدان‌های قدرتمندی هستند که می‌توانند با یک پراکسیداز خاص در واکوئل یا دیواره سلول H_2O_2 را تجزیه نمایند (روسنز و همکاران، ۲۰۰۲). محققین، بیان کرده‌اند در چرخه‌ای که در آن H_2O_2 توسط ترکیبات فنلی از طریق پراکسیداز از جمله گایاکول پراکسیداز از بین می‌روند، ترکیبات فنلی به رادیکال‌های فنوکسیل اکسید می‌شوند که می‌توانند مجددا توسط اسید آسکوربیک احیا شوند. این چرخه هم در آپوپلاست و هم در واکوئل قابل انجام است، زیرا در این مکان‌ها تجمع ترکیبات وجود دارد (عبدل-جلیلی[2]، ۲۰۰۹). به علاوه رادیکال‌های فنوکسیل تولید شده دارای ثبات بالایی بوده و قادر به شکستن زنجیره واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشند (رایس-ایوانس[3]، ۱۹۹۷). در تحقیق حاضر نیز میوه‌های تیمار شده میزان ترکیبات فنلی و فلانوئیدی بیشتری در مقایسه با نمونه‌های شاهد دارشتند.

پاسخ گیاهان در معرض استرس‌های متفاوت منجر به تولید اسمولیت‌های مانند پرولین می‌شود، میزان تولید پرولین به گونه و میزان تنش بستگی دارد، اسید آمینه پرولین در بسیاری از گیاهان عالی شناسایی شده است و معمولاً در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی، تجمع می‌یابد (ساواهیل و حسن[4]، ۲۰۰۲). پرولین نقش بسیار حیاتی در حفاظت ساختمان سلولی، ماکرومولکول‌ها، مهار رادیکال‌های آزاد و پتانسیل اکسیداسیون سلولی تحت تنش اسمزی بازی می‌کند (پروسل و رویز-لوزانو[5]، ۲۰۰۴). شکستن سریع پرولین بعد از پایان یافتن شرایط تنش، ممکن است خود تأمین کننده عوامل مورد نیاز برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو ATP میتوکندریایی و افزایش ترمیم صدمات ناشی از تنش باشد (هونگ[6] و همکاران، ۲۰۰۰). پرولین بعنوان یک اسمولیت طبیعی با تنظیم کردن پتانسیل اسمزی، نقش مهمی در جلوگیری از هدر رفتن آب درون سلولی در شرایط تنش ایجاد می‌کند. پرولین بنظر می‌رسد نقش متنوعی تحت شرایط تنش مانند تثبیت پروتئین، غشا و ساختارهای سلولی و محافظت از اعمال سلولی توسط از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارد (روسنز و همکاران، ۲۰۰۲). پلی‌آمین‌ها، پلی‌کاتیون‌های آلی با وزن مولکولی پائین و با گروه‌های نیتروژنی خطی هستند که به طور گسترده در موجودات زنده در غلظت بالایی تجمع می‌یابند و در فرآیندهای فیزیولوژیکی متنوع گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارند، میزان پلی‌آمین‌ها در گیاهان به فاکتورهایی، مانند گونه گیاهی، مقاومت یا حساسیت به استرس‌ها، مدت زمان استرس بستگی دارد، اگر چه اثرات متفاوتی بین پلی‌آمین‌ها و گونه‌های گیاهی وجود دارد (کاسوکاب[7] و همکاران، ۲۰۰۴). تنش‌ها موجب افزایش پلی‌آمین‌ها درونی می‌شود، در گیاهان مقاوم به تنش سرما میزان پلی‌آمین‌های درونی نسبت به گونه حساس به سرما بیشتر می‌باشد (هی و همکاران، ۲۰۰۲). گزارش کرده‌اند که پلی‌آمین‌ها بعنوان آنتی‌اکسیدان از خسارت اکسیداتیو در اجزای سلولی مانند غشا سلول، اسید نوکلئیک و از اسیدهای چرب غیراشباع محافظت می‌کنند، این مولکول‌های چندکاتیونی باعث تثبیت غشای سلولی می‌شوند، بنابراین تغییر در نفوذناپذیری و از بین رفتن سیالیت غشا را به حداقل می‌رساند (شین و همکاران، ۲۰۰۰). پوتریسین در درختان مرکبات در طی تنش سرما افزایش پیدا کرده و از بافت‌ها در طی تنش محافظت می‌کنند (مولا و همکاران، ۲۰۰۶). تجمع میزان پرولین بمنظور مقاوم شدن در برابر شرایط تنش سرما در درختان مرکبات افزایش یافته و از تخریب ماکرو مولکول‌ها

1. Razali
2. Abdul-Jaleeli
3. Rice-Evans
4. Sawahel and Hassan
5. Porcel and Ruiz-Lozano
6. Hong
7. Kasukabe



شکل۸- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف پوتریسین و پرولین بر میزان قندهای احیا در پوست میوه نارنگی کارا و پرتقال والنسیا تحت تأثیر دماهای مختلف. A: گوشت، B: پوست. Control: شاهد، Put 5mM: پوتریسین ۵ میلی‌مولار، Put 10mM: پوتریسین ۱۰ میلی‌مولار، P 15mM: پرولین ۱۵ میلی‌مولار، P 20mM: پرولین ۲۰ میلی‌مولار. ستون‌ها با حروف مشترک در هر دو شکل A و B تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

جلوگیری می‌کنند (کوشاد و یلینوسکی[1]، ۱۹۸۷).

قندهای محلول در افزایش مقاومت به سرما دخالت دارند (اریس[2] و همکاران، ۲۰۰۷). گیاهان مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای سازگاری و بهبود تنش‌های محیطی دارند. این سازگاری‌ها شامل تنظیم اسمزی توسط برخی تنظیم کننده‌های اسمزی مثل پتاسیم، قندهای محلول، پرولین و بتائین هستند (مانز و تیستر[3]، ۲۰۰۸). در این پژوهش، میزان مواد جامد محلول در نمونه‌های تیمارشده با بیشترین غلظت تیمارها، نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافته است. اگرچه میزان قندهای احیا با کاهش دما در نمونه‌های شاهد و تیمار شده کاهش یافتند. مواد جامد محلول می‌توانند به عنوان محافظ اسمزی غشاها و پروتئین‌ها عمل کرده و باعث از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن شوند (اورکات[4] و نیلسون، ۲۰۰۰). مواد جامد محلول در کاهش دمای انجماد آب سلولی، تأمین انرژی و محافظت از پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت به سرما نقش مهمی دارند (اتیکی و نعلبنت اوغلو[5]، ۲۰۰۳).

نتیجه‌گیری کلی

تنش سرما یکی از مهمترین فاکتورهای محدودکننده رشد در گیاهان به خصوص مرکبات می‌باشد. تنش سرما منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه خسارت به غشاها و پروتئین‌ها می‌شود. محلول‌پاشی ترکیبات چون پوتریسین و پرولین منجر به افزایش پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه گردیده و باعث افزایش فنل و فلاونوئید و مواد جامد محلول تحت شرایط تنش می‌شود.

1. Kushad and Yelenosky
2. Eris
3. Munns and Tester
4. Orcutt and Nilsen
5. Atici and Nalbantoglu

منابع

جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و احمدی موسوی، ع. ۱۳۸۶. اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها در نهال‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۰ :۲۰۶-۲۱۶.

فتوحی قزوینی، ر. و فتاحی‌مقدم، م.ج. ۱۳۸۵ .پرورش مرکبات در ایران، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه گیلان، ۱۵۰ ص.

Abdul-Jaleeli, C., Manivannan., P. Wahid, A. Farooq, M. Jasim, H. Juburi, A. Somasundaram, A. and Panneersel-Vam, R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Journal of Agricultural Biology, 11: 100-105.

Abu-Kpawoh, J.C., Xi, Y.F., Zhang, Y.Z. and Jin, Y.F. 2002. Polyamine accumulation following Hot-water dips influence chilling injury and decay in 'Friar' plum fruit. Food Chemistry Toxicology, 67(7): 2649-2653.

Atici, O. and Nalbantoglu, B. 2003. Antifreeze proteins in higher plants. Phytochemistry, 64: 1187-1196.

Chen, J., Zhu, Z., Hu, T. and Zhu, Y. 2002. Structure activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radicalscavenging effects. Acta Pharmacologica Sinica, 23: 667-72.

Chen, Y., Zhang, M., Chen, T., Zhang, Y. and An, L. 2006. The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina. South African Journal of Botany, 72: 272-279.

Clarke, T.G. and Ferre, P.A. 2002. The Soil Solution Phase. (PP. 419-422). In: Campbell GS, Horton R, Jury WA, Nielson DR, Van Es HM and Wierenge PJ (Eds). Methods of soil analysis part 4 Physical Methods. Soil Science Society of American, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Eris, A., Gulen, H., Barut, E. and Cansev, A. 2007. Annual patterns of total soluble sugars and proteins related to cold- hardiness in olive (*Olea europaea* L.'Gemlik'). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 82: 597-604.

Fales, F.W. 1951. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. Journal Biology Chemistry, 193: 113-124.

Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V. 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthourn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. Journal Agriculture Food Chemistry, 48: 1458-1490

He, L. Nada, K. and Tachibana, S. 2002. Effects of spermidine pretreatment through the roots on growth and photosynthesis of chilled cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 71: 490-498.

Hong, Z., Lakkineni, K. Zhang, Z. and Verma, D.P.S. 2000. Removal of feedback inhibition of 1 - pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiology, 122: 1129-1136.

Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. and Tachibana, S. 2004. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology, 45: 712-722.

Krizek, D.T., Brita, S.J. and Miewcki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient level of solar UV-A and UV-B on growth of cv. New Red Fire lettuce. Physiology Plant, 103: 1-7.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C. and Abdelly, C. 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Physiology Biochemistry, 45: 244-249.

Kushad, M.M. and Yelenosky, G. 1987. Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of *Citrus.* Plant physiology, 84: 692-695.

Liu, J.H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M. and Moriguchi, T. 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. Journal of Experimental Botany, 57: 2589-2599.

Lynch, D.V. 1990. Chilling injury in plant: The relevance of membrane lipids. PP. 17-34. In: Katterman, F. (Ed.), Enviromental Injury to Plants, Academic Press, New York.

Molla, S., Villar-Salvador, P., Garcia-Fayos, P. and Rubira, J.L. 2006. Physiological and transplanting performance of *Quercus ilex* L. (holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. Forest Ecology and Management, 237: 218-226.

Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59: 651-681.

Orcutt, D.M., Nilsen, E.T. and Hale, M.G. 2000 .The physiology of plants under stress: Soil and biotic factors. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.

Poirier, M., Lacointe, A. and Ameglio, T. 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. Tree Physiology, 30: 1555-1569.

Porcel, R. and Ruiz-Lozano, J.M. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. Journal of Experimental Botany, 55: 1743-1750.

Prabhavathi, V.R. and Rajam, M.V. 2007. Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. Plant Biotechnology, 24: 273-282.

Razali, N., Razab, R., Mat Junit, S. and Abdul Aziz, A. 2008. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). Food Chemistry, 111: 38-44.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxiant properties of phenolic compounds. Trends Food Science, 2: 152-159.

Roosens, N.H., Al Bitar, F., Loenders, K., Angenon, G. and Jacobs, M. 2002. Overexpression of ornithine-δ-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. Molecular Breeding, 9: 73-80.

Sawahel, W.A. and Hassan, A.H. 2002. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. Biotechnology Letters, 24: 721-725.

Schreiber, S.G., Hamann, A., Hacke, U.G. and Thomas, B.R. 2013. Sixteen years of winter stress: an assessment of cold hardiness, growth performance and survival of hybrid poplar clones at a boreal planting site. Plant, Cell and Environment, 36: 419-429

Shen, W., Nada, K. and Tachibana, S. 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. Plant Physiology, 124: 431-439.

Somogy, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biochemistry, 195: 19-29.

Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q.H. and Hung, W.D. 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. Plant Growth Regulation, 55(1): 1-10.

Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Ikehara, N. 1997. Flavonoid peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2. Plant Physiology, 115: 1405-1412.

Effect of foliar spray with putrescine and proline on some physiological characteristics of peel and pulp of two *Citrus* species in response to low temperature stress

Soheila Mohammadrezakhani[1]*, Jafar Hajilou[2] and Farkhondeh Rezanejad[3]

(Received: May. 14, 2018 - Accepted: Jul. 2, 2018)

Abstract

Different species of *Citrus* are sensitive to low temperature stress. Today plant growth regulators are used to reduce the negative effects of stress on plants. In this study, physiological and biochemical changes in the peel and pulp of *Citrus* fruits treated with different concentrations of putrescine and proline under low temperatures were investigated. The selected branches were sprayed with putrescine (0, 5 and 10 mM) and proline (0, 15 and 20 mM), 24 hours before exposure to low temperatures. Then, the treated bearing branches were exposed to temperatures of +1, -1 and -3 °C for three hours. Results of the study indicated that in control trees of both *Citrus* species, low temperature decreased the rate of reduction in sugars concentration, while the amounts of phenolic compounds, flavonoids and soluble solids in peel and pulp of both *Citrus* species were increased. The amount of phenolic compounds, flavonoids and soluble solids increased in fruits treated with proline and putrescin compared to control. The highest amounts of these parameters were observed in samples treated with proline at 20 mM and putrescine at 10 mM.

Keywords: *Citrus* species, Flavonoid, Low temperature stress, Reducing sugars, ROSs

1- Ph.D. student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
2- Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
* Corresponding author E-mail: smohammadrezakhani@yahoo.com