تأثیر تیمار پرولین بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و افزایش عمر پس از برداشت گل شاخه بریده مریم (*Polianthes tuberosa* L.)

سجاد علی پور[1]، همایون فرهمند[1] و فاطمه نصیبی[3*]

[1]گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، [2]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳)

چکیده:

گل مریم یکی از مهم ترین گلهای شاخه بریدنی جهان و ایران است که افزایش عمر پس از برداشت آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این پژوهش از پرولین به عنوان ترکیب آنتی اکسیدان در غلظت های صفر (شاهد)، ۱ و ۱۰ میکرومولار استفاده و اثر این ترکیب بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و عمر پس از برداشت گل شاخه بریده مریم بررسی گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. نتایج اثر معنی دار پرولین را در هر دو غلظت برعمر گلجایی گل مریم نشان داد. درصد گلچه های باز در هر دو غلظت پرولین افزایش نشان داد. یافته ها کاهش معنی دار درصد گلچه پژمرده را در هر دو غلظت پرولین نسبت به شاهد را نشان داد. درصد ریزش گل نیز در تمام گل های تیمار شده با پرولین بسیار کمتر از گل های شاهد بود. بر اساس نتایج حاصل، پرولین در هر دو غلظت باعث کاهش هدررفت آب و نشت یونی گردید و غلظت ۱۰ میکرومولار بیشترین تأثیر را داشت. در گل هایی که با این ترکیب تیمار شده بودند، فعالیت آنزیم های گایاکول پراکسیداز ، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز افزایش یافت اما، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز کاهش یافت. بنابراین به نظر می رسد که پرولین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز عمر پس از برداشت گل مریم را افزایش داده است.

واژگان کلیدی: آنزیم های آنتی اکسیدان، پرولین، ریزش گل، عمر گلجایی.

مقدمه:

گل مریم (*Polianthes tuberosa*. L) یکی از گیاهان سوخوار زینتی است و از گل های بریده مهم در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است (Huang and Kao, 2005). جنس *Polianthes* متعلق به تیره Agavaceae ، بومی مکزیک و دارای ۱۲ گونه می باشد (Naz *et al.*, 2012). در ایران از گل مریم عمدتاً به عنوان گل بریده استفاده می شود. گل مریم به طور وسیع در بسیاری از نواحی ایران کشت می گردد (Jowkar and Salehi, 2006). این گل یکی از منابع اولیه مهم در صنایع عطرسازی است و در کشورهایی مانند هندوستان، فرانسه و مکزیک سطح زیر کشت گسترده ای را دارا می باشد. این گیاه دارای گل هایی باخوشه های بلند است. گل مریم در زمان های گذشته در میان اقشار مردم به عنوان گلی مقدس شناخته شده بود که نه تنها از عطر آن استفاده می کردند، بلکه از اثرات مثبت روانی آن نیز بهره بسیار می بردند (حسن زاده نعیمی،۱۳۸۷). مشابه بسیاری از گل های خوشه ای، گلهای مریم هنگام برداشت دارای تعداد محدودی گلچه های باز می باشند. بنابراین، طول عمر پس از برداشت و باز شدن گلچه های باقیمانده در خوشه گل از اهمیت زیادی برخوردار است

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: nasibi2002@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

و ترکیباتی که بتوانند فرآیند پیری را کند کرده و باز شدن گلچه ها را تحریک کنند، از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت هستند. از لحاظ تغییرات متابولیک، پیری در نتیجه انجام فرآیندهای اکسیداتیو ناشی از تولید گونه های فعال اکسیژن اتفاق می افتد(Ohe *et al*., 2005). انواع گونه های اکسیژن فعال بر خلاف اکسیژن اتمسفری از میل ترکیبی بسیار زیادی برای واکنش با تمامی ماکرو مولکول های زیستی سلول برخوردارند، به طوری که این ترکیبات با پروتئین ها، لیپید ها، کربوهیدرات ها و اسید های نوکلئیک سلول وارد واکنش شده و سبب تخریب پروتئین ها و غیر فعال شدن آنزیم ها، آسیب به غشاها و تجزیه پلی ساکاریدها می گردند (Mittler, 2002). سلول های گیاهی برای مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال، از یک سری مکانیزم های دفاعی برخوردارند که آن ها را قادر می سازد تا با جمع آوری انواع اکسیژن فعال و احیای آن ها به آب از آسیب به ساختارهای اساسی سلول پیشگیری نمایند. مکانیزم های دفاعی سلول شامل آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی (مانند آسکوربات، گلوتاتیون، توکوفرول، کاروتنوئیدها) وآنزیم های آنتی اکسیدان (مانند سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) می باشد (Esfandiari *et al*., 2008).

پرولین یک اسید آمینه ی با استحکام و ساختاراستثنایی است که هم به صورت آزاد و هم در ساختار پروتئین ها وجود دارد. نقش پرولین به عنوان اسمولیت، ربایندە ی گونه های فعال اکسیژن (آنتی اکسیدان غیرآنزیمی) و تثبیت کننده ی ساختار پروتئین ها گزارش شده است و به همین دلیل قادر است سلول ها را از آسیب های وارد شده به وسیله ی تنش حفظ کند (Szabados and Savoure, 2009).

در گیاهان در شرایط طبیعی پرولین کمتر از ۵ درصد از کل منابع آمینو اسید های آزاد را تشکیل می دهد این در حالی است که در شرایط تنش ۸۰ درصد کل آمینو اسیدها را شامل می شود (Aspinal and Paleg, 1981). مطالعات گسترده روی گیاهان تراریخت و جهش یافته نشان دهنده ی این است که متابولیزم پرولین، تأثیرات پیچیده ای روی نمو و پاسخ های تنشی گیاه دارد و تجمع پرولین برای تحمل شرایط محیطی ناسازگار مهم می باشد (Miller *et al*., 2009).

همچنین در تحقیقات گذشته پیشنهاد شده است که ممکن است پرولین به عنوان یک مولکول سیگنال در بهبودی بعد از تنش نقش داشته باشد (Oono *et al*., 2003). در مطالعه روی گل رز شاخه بریده نشان داده شد که پرولین تنش اکسیداتیو را در این گلها کاهش داده و پیری گلبرگ ها را به تاخیر انداخته است (Kumar *et al*., 2010). اثر اسید آمینه پرولین بر افزایش عمر گلجایی گل نرگس (*Narcissus tazetta* L. cv. shahla) پیش تر نیز گزارش شده است (علی پور و همکاران، ۱۳۹۲). اطلاعات اندکی در مورد اثر پرولین بر افزایش عمر گلجایی و میزان باز شدن گل در گل های خوشه ای مانند مریم در دست است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر پرولین بر عمر گلجایی و ارتباط آن با برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل آنزیم های آنتی اکسیدان در گل های شاخه بریده مریم بود. از آنجایی که اثر آنتی اکسیدانی این ترکیب در برخی مطالعات گزارش شده است، در این بررسی نقش این ترکیب در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از پیری نیز از طریق اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها:

در این مطالعه ابتدا گل های هم اندازه و مشابه مریم خریداری گردید. شاخه تمام گل ها در زیر آب باز برش و طول ساقه در تمام گل ها تقریباً، ۵۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. همچنین در شروع آزمایش به طور میانگین هر شاخه گل ۲-۳ گلچه باز داشت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. برای هر تکرار ۲ شاخه و در مجموع برای هر تیمار ٦ شاخه گل که از نظر تعداد گل نزدیک به هم بودند در نظر گرفته شد. این شاخه های گل در درون ظروف پلاستیک دارای ۵۰۰ میلی لیتر از محلول های۱ و۱۰ میکرومولار پرولین قرار گرفت (این غلظت ها در آزمایش مقدماتی بهینه شده اند، بدین صورت که چندین غلظت با توجه به بررسی منابع انتخاب و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

گلهای شاخه بریده مریم طی چند مرحله با غلظت های پیشنهادی تیمار و در نهایت غلظت های ۱ و ۱۰ میکرومولار انتخاب شدند). آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. پس از ٦ روز زمانی که گلهای شاهد پژمرده شدند، تعداد گلچه های باز، گلچه پژمرده و میزان ریزش گلچه ها محاسبه گردید. در روز ششم (پایان عمر گلجایی شاهد) از هر تیمار سه تکرار برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های مورد نظر برداشته شد. بقیه شاخه ها تا پایان عمر گلجایی آن ها در محلول باقی ماندند. پایان عمر گلجایی زمانی در نظر گرفته شد که گلبرگ های گل پژمرده و ارزش بازارپسندی خود را از دست دادند. لازم به ذکر است که شاخه گل ها در طول آزمایش در محیطی با نور متوسط، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دمای ۱۵ تا ۱۸ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند و در این دوره محلول ها عوض نشدند. تمام خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی بجز عمر گلجایی در پایان روز ششم اندازه گیری گردید تا تیمارها در این زمان قابل مقایسه باشند.

اندازه گیری تغییرات وزنی شاخه های گل: برای سنجش تغییرات وزنی، وزن گل ها در سه دوره روز اول آزمایش، روز سوم و روز ششم که همان روز پایان عمر گلجایی شاهد بود اندزه گیری و سپس کاهش وزن تیمارها بر حسب درصد به ثبت رسید. یعنی وزن اولیه گلها ۱۰۰درصد لحاظ شد و میزان اختلاف وزن روز اول و روز آخر آزمایش (روز ششم) به عنوان درصد کاهش وزن لحاظ گردید. اندازه گیری روز سوم تنها به منظور بررسی روند کاهشی وزن در طول آزمایش بود.

اندازه گیری درصد گلچه باز، گلچه پژمرده و ریزش گلچه ها: در ابتدای آزمایش تمام گلچه های هر شاخه گل به صورت جداگانه شمارش و تا پایان آزمایش تعداد گلچه ها باز شمارش و بر حسب درصد محاسبه گردید. بدین صورت که تعداد گلچه کل ۱۰۰ درصد محاسبه و میزان گلچه های باز شده از کل محاسبه و بر حسب درصد ثبت گردید. درصد گلچه پژمرده و ریزش گلچه ها نیز براساس تعداد کل گلچه ها محاسبه و برحسب درصد بیان گردید.

اندازه گیری درصد نشت یونی: درصد نشت یونی براساس روش Siram و همکاران (1997) محاسبه شد. برای اندازه گیری این شاخص در روز برداشت نمونه ها (روز ششم) دو گروه نمونه آماده شدند، در هر گروه ۰/۱ گرم از بافت گلبرگ در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده شد. برای اطمینان از نتایج آزمایش تمام لوله ها قبلاً با اسید و آب مقطر شستشو داده شدند. لوله های گروه اول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۰°C حمام آبگرم قرار داده شده و سپس هدایت الکتریکی (EC) آن توسط دستگاه EC متر مدل Metrohm خوانده شد (C_1). لوله های گروه دوم به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰°C قرار داده شدند و سپس هدایت الکتریکی آن ها نیز اندازه گیری شد (C_2). نشت یونی براساس رابطه زیر اندازه گیری شد:

$$\text{درصد نشت یونی} = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$$

C_1 = هدایت الکتریکی اولیه C_2 = هدایت الکتریکی ثانویه

تهیه عصاره پروتئینی: ۵۰۰ میلی گرم از گلبرگ تازه در ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.5) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP)۱ درصد و EDTA یک میلی مولار بود، ساییده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. سپس عصاره ها به مدت ۲۰ دقیقه در g× ۵۰۰۰و در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم ها استفاده گردید (Gapinska *et al.*, 2008).

سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از پیش ماده گایاگول اندازه گیری شد. در این روش ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش، حاوی ۲/۷۷ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار(pH=7) ، ۱۰۰میکرولیتر آب اکسیژنه ۱درصد،۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲ درصد و ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ٤۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری شد (Plewa *et al.*, 1991). یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول گایاکول را در مدت ۱ دقیقه اکسید کند. مقدار تتراگایاکول تولید شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل $۲۵/۵ mM^{-1} Cm^{-1}$ محاسبه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

گردید.

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت این آنزیم بر اساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه گیری شد. در این روش مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = ۷)، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، آب اکسیژنه ۰/۱ میلی مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آسکوربات بر اساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش در جذب، در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه اندازه گیری شد. برای محاسبه واحد آنزیمی از ضریب خاموشی معادل $Cm^{-1}mM^{-1}$ ۲/۸ استفاده شد. یک واحد آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول آسکوربیک اسید را در مدت ۱ دقیقه اکسید کند.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲٤۰ نانومتر صورت گرفت (Dhindsa *et al.*, 1981). بر اساس این روش مخلوط واکنش (۳میلی لیتر) شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7)، آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با افزودن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش، واکنش شروع و کاهش در جذب آب اکسیژنه در مدت ۳۰ ثانیه در طول موج ۲٤۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که یک میلی مول آب اکسیژنه را در مدت یک دقیقه تجزیه کند. چون میزان فعالیت آنزیم بر اساس غلظت آب اکسیژنه تجزیه شده محاسبه شد، غلظت آب اکسیژنه مصرف شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل $Cm^{-1}mM^{-1}$ ٤۰ محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز (PPO): فعالیت این آنزیم بر اساس روش Nicoli و همکاران (1991) اندازه گیری شد. در این روش از پیروگالل به عنوان پیش ماده آنزیم استفاده شد. در این واکنش مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتربافر پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7)، ۲۰۰میکرولیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیترعصاره آنزیمی بود. جذب نمونه ها در طول موج ٤۲۰ نانومتر و بعد از ۳ دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش برادفورد) محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL): فعالیت این آنزیم بر اساس واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید اندازه گیری شد. در این روش ۱ میلی لیتر بافر استخراج ۰/۵ میلی لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/٤ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر کلریدریک اسید ٦ مولار متوقف شد و جذب نمونه ها در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه گیری گردید (Dcunha *et al.*, 1996). برای محاسبه سینامیک اسید تولید شده از منحنی استاندارد سینامیک اسید استفاده شد.

سنجش مقدار پروتئین کل: برای محاسبه واحدهای آنزیمی بر اساس واحد پروتئینی غلظت پروتئین نمونه ها اندازه گیری گردید. برای سنجش غلظت پروتئین، به لوله های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر معرف بیوره ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی افزوده شد و سریعاً با هم زن برقی مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین محاسبه گردید (Bradford, 1976).

تجزیه و تحلیل آماری: داده های پژوهش، با استفاده از نرم افزار SAS آنالیز شد و میانگین‌ها باآزمونچند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج:

اثر غلظت های مختلف پرولین بر عمر گلجایی گل های مریم: نتایج حاصل از مقایسه گیاهان تیمار شده با پرولین و گیاهان شاهد که پرولین دریافت نکرده بودند نشان داد که پرولین در غلظت های ۱ و ۱۰ میکرومولار عمر گلجایی را نسبت به شاهد افزایش داده است. بالاترین عمر گلجایی (۹ روز)، در تیمار پرولین۱۰ میکرومولار مشاهده شد که در مقایسه با شاهد، ۲/۵ روز افزایش یافت (جدول ۱).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

جدول ۱- اثر پرولین روی عمر گلجایی،درصد گلچه باز، پژمردگی، ریزش گلچه،کاهش وزن و نشت یونی گل مریم.

پرولین(میکرومولار)	عمرگلجایی (روز)	گلچه باز (درصد)	گلچه پژمرده (درصد)	ریزش گلچه (درصد)	کاهش وزن (درصد)	نشت یونی (درصد)
صفر	٦/٦٦ b	١٩/٩ b	١٩/٦٣ a	١٣/٣٣ a	٢٠/٢ a	٨٧/٣ a
١	٨/٦٦ a	٢٧/٣ a	١٤/٩ b	٧/٦٣ b	١٣ b	٥١ b
١٠	٩ a	٣٠/٤ a	٨/٧٣ c	٣/٨٣ c	٨/٨ c	٤٥ c

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظرآزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P \leq ۰/۰۵$ تفاوت معنی‌داری ندارد.

اثر غلظت های مختلف پرولین بر درصد گلچه باز، گلچه پژمرده و ریزش گل های مریم: مطالعه حاضر نشان داد درصد گلچه های باز در هر دو غلظت پرولین افزایش نشان داد به طوری که ۳۷ و ۵۲ درصد افزایش در گلچه های باز نسبت به شاهد به ترتیب در غلظت ۱ و ۱۰ میکرومولار به دست آمد. یافته ها نشان داد درصد گلچه پژمرده با افزایش غلظت پرولین به طور معنی داری کاهش یافت و در غلظت ۱۰ میکرومولار پرولین کاهش ۲ برابری نسبت به شاهد دیده شد. درصد ریزش گل در تمام گل هایی که در محلول های حاوی پرولین بودند بسیار کمتر از گل های شاهد بود. تیمار با پرولین ریزش گل را از حدود ۱۳ درصد در گیاهان شاهد به ۷-۳ درصد در گل های تیمار شده با پرولین رساند. کمترین میزان ریزش گلچه در تیمار پرولین۱۰ میکرومولار دیده شد که نسبت به شاهد کاهشی ٤ برابری نشان داد (جدول ۱).

اثر غلظت های مختلف پرولین بر درصد کاهش وزن: تمام گل های تیمار شده با پرولین کاهش وزن کمتری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند و کمترین مقدار کاهش وزن در تیمار ۱۰ میکرومولار پرولین به دست آمد (جدول ۱).

اثر غلظت های مختلف پرولین بر میزان نشت یونی گل های مریم: یافته ها به روشنی نشان داد پرولین در هر دو غلظت به کار رفته باعث حفظ پایداری غشا و کاهش نشت یون ها از سلول شد. کمترین میزان نشت یونی در غلظت ۱۰میکرومولار به دست آمد که باعث کاهش ۹٤ درصدی نشت یونی نسبت به شاهد گردید (جدول ۱).

اثر غلظت های مختلف پرولین بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان: اندازه گیری فعالیت آنزیم **گایاکول پراکسیداز** نشان داد که تیمار گل ها با پرولین باعث افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد گردید. البته اثر پرولین۱ میکرومولار بیشتر از ۱۰ میکرومولار بود به طوری که فعالیت این آنزیم آنتی اکسیدان را ۲/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۱).

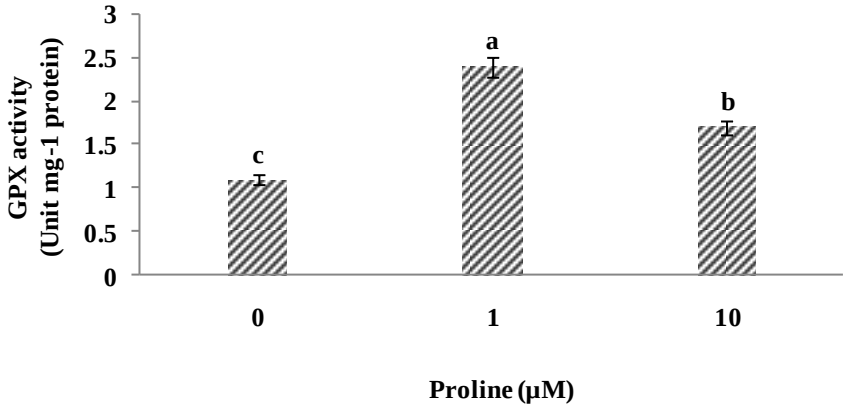
یافته ها نشان داد پرولین در هر دو غلظت باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گردید که این افزایش در غلظت بالاتر پرولین بیشتر بود، به طوری که در غلظت ۱۰ میکرومولار، فعالیت این آنزیم بیش از ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۲). البته پرولین در غلظت ۱ میکرومولار هم به میزان ۲۹ درصد فعالیت این آنزیم را در مقایسه با شاهد افزایش داد اما میزان افزایش آن ها کمتر از غلظت ۱۰ میکرومولار این ترکیب بود.

پرولین در دو غلظت به کار برده شده فعالیت آنزیم **کاتالاز** را نسبت به شاهد افزایش داد که این افزایش در غلظت بالاتر بیشتر بود به طوری که در غلظت ۱۰ میکرومولار این ترکیب افزایش حدود ۲ برابری در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل ۳).

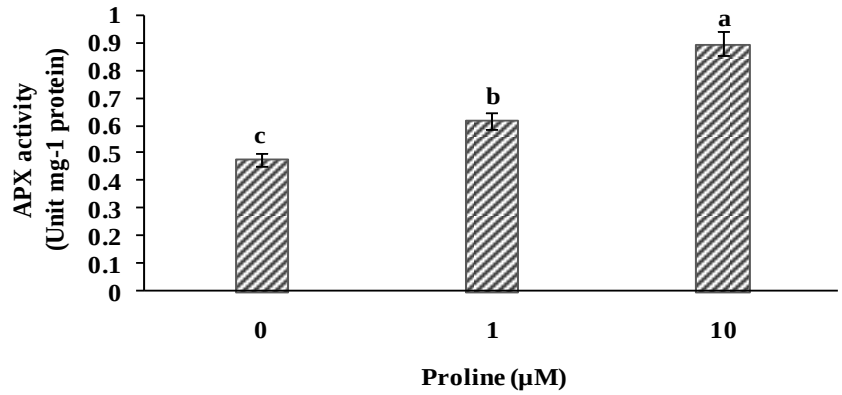
اثر غلظت های مختلف پرولین بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز (PPO): نتایج نشان داد، آنزیم PPO بالاترین میزان فعالیت را در گلهای شاهد داشت و با افزایش غلظت پرولین، فعالیت این آنزیم روند کاهشی داشت. این ترکیب در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

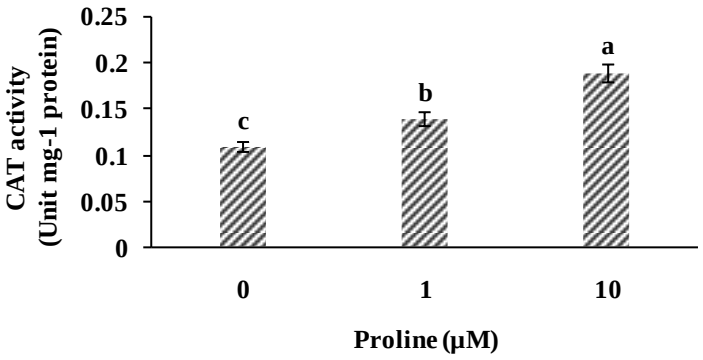
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف پرولین بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گل مریم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq0.05$ است.



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف پرولین بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گل مریم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq0.05$ است.



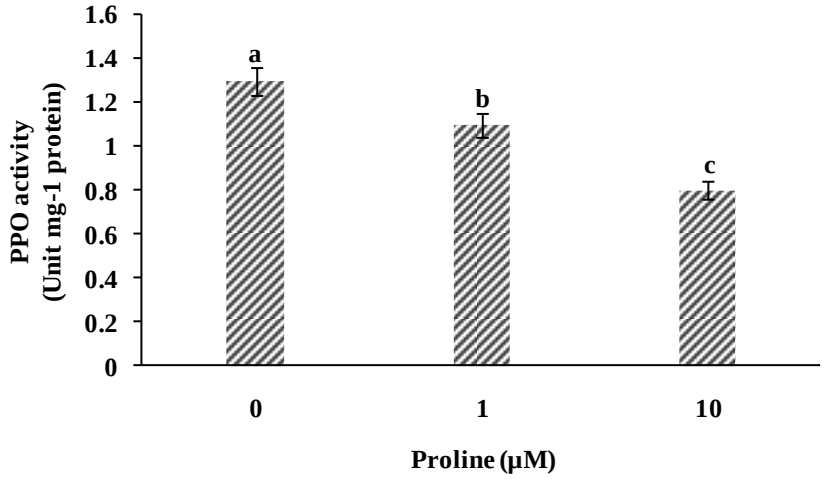
شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف پرولین بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گل مریم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq0.05$ است.

۱ و ۱۰ میکرومولار به ترتیب باعث کاهش ۲۲ و ۵۵ درصدی فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد شد (شکل ٤).

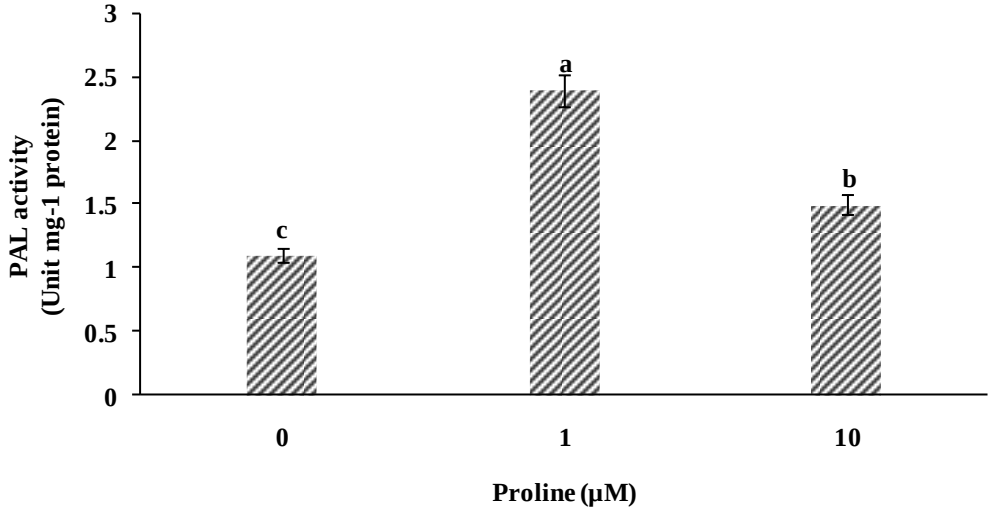
اثر غلظت های مختلف ترکیبات آنتی اکسیدان بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL): در گل های تیمار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]



شکل ٤- تاثیر غلظت‌های مختلف پرولین بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در گل مریم. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq0.05$ است.



شکل ٥- تاثیر غلظت‌های مختلف پرولین بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در گل مریم. داده ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq0.05$ است.

شده با پرولین، فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد روند افزایشی نشان داد که این افزایش فعالیت در پرولین ۱ میکرومولار بیش از ۲ برابر و در غلظت ۱۰ میکرومولار ۵۰ درصد نسبت به شاهد بود (شکل ۵).

بحث:

پیری پس از برداشت، یکی از محدودیت های نگهداری گل های شاخه بریده است و تلاش های زیادی برای افزایش عمر پس از برداشت گل های شاخه بریده انجام شده است. کند کردن فرآیند پیری و افزایش عمر گلجایی گل های شاخه بریده، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این مسئله باعث افزایش زمان بازارپسندی گل ها گردیده و از لحاظ اقتصادی بسیار اهمیت دارد. در مطالعات متعدد، گزارش شده است که هورمون های گیاهی در تنظیم پیری گلها شرکت می کنند و تغییر در سطوح این ترکیبات به عنوان یک پیام تنظیم کننده در پدیده پیری عمل کرده و ممکن است آن را به تاخیر بیندازد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

(Serek *et al.*,1994, Singh *et al.*, 2008, Emongor, 2004). فرآیند پیری، نتیجه یک سری تغییرات فیزیولوژیک و متابولیکی است که سرانجام به مرگ سلول، اندام و یا موجود زنده می انجامد. از لحاظ تغییرات متابولیک، پیری در نتیجه انجام فرآیندهای اکسیداتیو ناشی از تولید گونه های فعال اکسیژن رخ می دهد (Ohe *et al.*, 2005). انواع گونه های اکسیژن فعال بر خلاف اکسیژن اتمسفری، از میل ترکیبی بسیار زیادی برای واکنش با تمامی ماکرو مولکول های زیستی سلول برخوردارند، به طوری که این ترکیبات با پروتئین ها، لیپید ها، کربوهیدرات ها و اسید های نوکلئیک سلول وارد واکنش شده و سبب تخریب پروتئین ها و غیر فعال شدن آنزیم ها، آسیب به غشاها، و تجزیه پلی ساکاریدها می گردند (Mittler, 2002). سلول های گیاهی برای مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال، از یک سری مکانیزم های دفاعی برخوردارند که آن ها را قادر می سازد تا با جمع آوری انواع اکسیژن فعال و احیای آن ها به آب از آسیب به ساختارهای اساسی سلول پیشگیری نماید. گزارش شده است که در گل ها، پیری گلبرگ با تولید پیوسته و سریع رادیکال های آزاد مرتبط است زیرا در این شرایط متابولیسم سلول مختل شده و تعادل بین تولید و حذف رادیکال های آزاد بهم می خورد (Kumar *et al.*, 2010). استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان که بتوانند سلول را در برابر این فرآیند حفاظت کنند، به افزایش عمر سلول ها می انجامد. آنزیم های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از جمله آنزیم های آنتی اکسیدان مهم در سلول هستند که نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال های آزاد اکسیژن دارند (نصیبی و همکاران، ۱۳۸۹). پرولین علاوه بر این که در ساختار پروتئین ها شرکت می کند، به عنوان یک ترکیب تنظیم کننده اسمزی و رباینده رادیکال اکسیژن نیز عمل می کند و به همین دلیل مقدار آن در اکثر تنش های غیر زیستی در گیاه افزایش می یابد (Szabados and Savoure, 2009). مکانیزم هایی که پرولین آسیب های رادیکال های آزاد را کاهش می دهد، شامل خاموش کردن فیزیولوژیکی سیگنال های اکسیژن و واکنش شیمیایی با رادیکال های هیدروکسیل است (Alia *et al.*, 2001). همچنین، پرولین پتانسیل یونیزاسیون پایینی دارد و بدین گونه قادرهست به آسانی یک کمپلکس انتقال دهنده بار الکتریکی برگشت پذیر با سیگنال های اکسیژن تشکیل دهد و روی خاموش کردن یا دفع کردن گونه های واکنش پذیر اکسیژن موثر باشد.(Alia *et al.*, 2001). نتایج این آزمایش نشان داد که پرولین در غلظت های ۱ و ۱۰ میکرومولار باعث افزایش عمر گلجایی گل های شاخه بریده مریم نسبت به گل های شاهد شد. علی پور و همکاران (۱۳۹۲) گزارش کردند استفاده از پرولین عمر گلجایی گل نرگس را افزایش داد. در مطالعه ای دیگر کاربرد پرولین باعث بهبود عمر پس از برداشت گل رز گردید (Kumar *et al.*, 2010). نتایج نشان داد که پرولین علاوه بر افزایش عمر گلجایی، باعث باز شدن گل ها، جلوگیری از پژمردگی آن ها و کاهش ریزش گلچه ها گردید. البته در بین غلظت های به کار برده شده غلظت بالاتر این ترکیب اثرات بیشتری نشان داد. با توجه به نقش اتیلن در کاهش بازشدن گلچه ها (Serek *et al.*, 1994)، پژمردگی آن ها (Kumar *et al.*, 2010) و ریزش (Kofranek and Halevy, 1976) می توان بیان کرد این اسید آمینه به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان علاوه بر ربایش گونه های فعال اکسیژن (Szabados and Savoure, 2009) ممکن است مقدار یا اثر اتیلن را نیز کاهش داده و باعث افزایش عمر پس از برداشت گل مریم شود. البته برای قطعی شدن این نظر اندازه گیری اتیلن لازم است که در این پژوهش اندازه گیری نگردید لذا این اثر به صورت احتمال بیان می شود که لازم است در تحقیقات آینده به طور واضح مورد بررسی قرار گیرد. به طور کلی، در این پژوهش مشخص شد که تیمار گل های شاخه بریده مریم با پرولین تقریبا در تمام پارامتر های مربوط به پیری تأثیر مثبت داشته است. طول عمر گل بریده به طور عمده بستگی به حفظ روابط آبی دارد، که به هم خوردن این روابط آبی، منجر به عدم باز شدن گل، پژمرده گی زودرس گلبرگ وخم شدن ساقه گل می شود (Yamada *et al.*, 2007). نتایج نشان داد پرولین در غلظت های به کار رفته، از دست دادن آب شاخه گل را کاهش داده زیرا گل های تیمار شده با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

پرولین کاهش وزن کمتری نسبت به نمونه های شاهد نشان دادند (جدول ۱) بنابراین سبب بهبود جذب آب و شادابی ساقه های گل گردیده است. این اثر پرولین چندان دور از انتظار نیست زیرا در منابع متعدد نقش اسمولیتی آن برای حفظ آب در گیاه گزارش شده است (Szabados and Savoure, 2009; Yang *et al.*, 2009). براساس نتایج، مشخص گردید کمترین میزان از دست رفتن آب در تیمار پرولین ۱۰ دیده شد. نتایج نشان داد پرولین در هر دو غلظت به کار برده شده، باعث حفظ پایداری غشای سلولی و کاهش نشت الکترولیت ها شد. پرولین به عنوان ربایندهٔ ی گونه های فعال اکسیژن با حفظ پایداری غشا، سلول ها را از آسیب های وارد شده به وسیله تنش حفظ می کند (Szabados and Savoure, 2009). در این آزمایش برای بررسی نقش پرولین بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و عملکرد آن از طریق این آنزیم ها در افزایش عمر پس از برداشت گل شاخه بریده مریم، فعالیت آنزیم های CAT، GPX و APX در گلبرگ ها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار گل های شاخه بریده با پرولین، باعث افزایش فعالیت هر سه آنزیم در مقایسه با گل های شاهد شد. نقش پرولین در افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در مطالعات قبلی ما نیز مشاهده شده است (علی پور و همکاران، ۱۳۹۲). آنزیم پلی فنل اکسیداز از آنزیم هایی است که مهار فعالیت آن در نگهداری میوه ها و گل ها اهمیت فراوان دارد (Dubravina *et al.*, 2005).تیمار گل های شاخه بریده مریم با پرولین باعث کاهش فعالیت این آنزیم گردید که در این مورد اثر پرولین۱۰ میکرومولار در کاهش فعالیت این آنزیم بیشتر از اثر پرولین۱ میکرومولار بود. از آنجایی که این آنزیم با اکسیداسیون فنل ها، ایجاد پوسیدگی و رنگ قهوه ای در گلبرگ ها و میوه ها می کند، بنابراین کاهش فعالیت این آنزیم نیز می تواند یکی از دلایل افزایش عمر پس از برداشت گل های شاخه بریده مریم تیمار شده با پرولین باشد. آنزیم PAL از دیگر آنزیم های گیاهی است که اگرچه به عنوان آنزیم آنتی اکسیدان شناخته نشده است، اما در بیشتر تنش های گیاهی فعالیت آن افزایش یافته و افزایش فعالیت آن با افزایش مقاومت گیاه به تنش های اکسیداتیو همبستگی مثبت نشان می دهد (Vogt, 2010). در این بررسی فعالیت این آنزیم در گل های شاخه بریده شاهد پایین بوده و تیمار گل ها با پرولین باعث افزایش فعالیت این آنزیم شد.

نتیجه‌گیری کلی:

تیمار گل های شاخه بریده مریم با پرولین عمر گلجایی این گل ها را افزایش داد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان این اسید آمینه را به عنوان یک ترکیب افزودنی به محلول نگهدارنده گل های شاخه بریده پیشنهاد داد. برخلاف برخی ترکیبات مضر و سمی این ترکیب یک اسید آمینه است لذا افزودن آن هیچگونه آثار سمی و مضری برای انسان ها و محیط زیست در پی نخواهد داشت. بهترین غلظت مورد استفاده در گل مریم با در نظر گرفتن تمام پارامترهای اندازه گیری شده در این پژوهش غلظت ۱۰ میکرومولار است هرچند در مورد سایر گل های شاخه بریده باید قبل از کاربرد وسیع، آزمایشات مقدماتی برای بهینه کردن غلظت انجام گیرد.

منابع:

حسن زاده نعیمی، م. (۱۳۸۷) پرورش و تولید گل شاخه بریده مریم. نشریه وزارت جهاد کشاورزی ٤٦: ٤٥-۱.

علی پور، س.، فرهمند، ه. نصیبی، ف. و کامیاب، ا. (۱۳۹۲) تأثیر ترکیبات آنتی اکسیدان آرژنین، سدیم نیتروپروساید، پوتریسین و پرولین بر روی عمر گلجایی، نشت یونی و فعالیت چند آنزیم گل نرگس شهلای پرپر. مجله علوم و فنون باغبانی ایران ١٤: ١٧-۱.

نصیبی، ف.، منوچهری کلانتری، خ. و یعقوبی، م. م. (۱۳۸۹) مقایسه اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید و آرژنین بر برخی پاسخهای فیزیولوژیکی گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicun esculentum*) تحت تنش کم آبی. مجله

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]

زیست شناسی ایران ٢٤: ٨٤٧-٨٣٣.

Alia, P. and Saradhi, P. (1991) Proline accumulation under heavy metal stress. Journal of Plant Physiology 138: 554-558.

Aspinal, D. and Paleg, G. (1981) Proline accumulation: physiological aspects. In: The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (eds. Paleg, L. G., Aspinall, D.). Pp. 280-295. Academic Press Sydney Australia.

Bradford, M. N. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry 72: 248-254.

Dcunha, G. B., Satyanarayan, V. and Nair, P. M. (1996) Purification of phenylalanine ammonialyase from *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 42:17-20.

Dhindsa, R. S., Plumb-Dhinds, D. and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 32: 93-101.

Dubravina, G.A., Zaytseva, S.M. and Zagoskina, N.V. (2005) Changes in formation and localization of phenolic compounds in the tissues of European and Canadian yew during differentiation *in vitro*. Russian Journal of Plant Physiology 52: 672-678.

Emongor, V. E. (2004) Effects of gibberellic acid on post-harvest quality and vase life of gerbera cut flowers *Gerbera jamesonii*. Agronomy 3: 191-195.

Esfandiari, E., Mahboob, S. A. and Shekari, F. (2008) Destructive effect of active oxygen species, plant defense mechanisms and it's necessary. Agronomy and Plant Breeding Congress. Iran Karaj: 1-22.

Gapinska, M., Sklodowska, M. and Gabara, B. (2008) Effect of short- and long-termsalinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologia Plantarum 30:11-18.

Huang, K. T. and Kao, C. H. (2005) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide. Botanical Bulletin Academic Sin 46: 21–28.

Jowkar, M. M. and Salehi, H. (2006) The effects of different preservative solutions on the vase of cut tuberosa *Polianthes tubrosa* L. cv. Goldorosht-mahalat. Journal of Science, Agriculture and Natural Resource 10: 306-309.

Kumar, N., Pal, M., Singh, A., Kumar Sairam, R. and Srivastava, G. C. (2010) Exogenous proline alleviates oxidative stress and increase vase life in rose (*Rosa hybrida* L. 'Grand Gala'). Scientia Horticulturae 127:79-85.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sciences 7: 405-410.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach choloroplast. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Naz, S., Aslam, F., Ilyas, S., Shahzadi, K. and Tariq, A. (2012) In vitro propagation of tuberosa (*Polianthes tubrosa* L.). Journal of Medicinal Plants Research 6: 4107- 4112.

Nicoli, M. C., Elizable, B. E. Piotti, A. and Lerici, C. R. (1991) Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. Journal of Food Biochemistry 15: 169-184.

Ohe, M., Rapolu, M. Mieda, T. Miyagawa, Y. Yabuta, Y. Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2005) Decline in leaf photooxidative –stress tolerance with age in tobacco. Plant Science 168:1487-1493.

Oono, Y., Seki, M. Nanjo, T. Narusaka, M. Fujita, M. Satoh, R. Satou, M. Sakurai, T. Ishida, J. Akiyama, K. Iida, K. Maruyama, K. Satoh, S. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. Plant Journal 34: 868–887.

Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research 247: 57-64.

Serek, M., Jones, R. B and Reid, M. S. (1994) Role of ethylene in opening and senescence of *Gladiolus* sp. flowers. Journal of American Society Horticultural Sciences119: 1014–1019.

Singh, A., Kumar, J and Kumar, P. (2008) Effects of plant growth regulators and sucrose on post-harvest physiology. Membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. Plant Growth Regulation 55:221-229.

Szabados, L. and Savoure, A. (2009) Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Sciences15: 89-97.

Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis Molecular Plant 3: 2-20.

Yamada, K., Ito, M. Oyama, T. Nakada, M. Maesaka, M. and Yamaki, S. (2007) Analysis of sucrose metabolism during petal growth of cut roses. Postharvest Biology and Technology 43: 174–177.

Yang, S. L., Lan, S. S and Gong, M. (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. Journal of Plant Physiology 166:1694–1699

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.14.3.7]