زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره نوزدهم، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۱۴۱-۱۵۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۷/۲۰

« مقاله کوتاه »

بررسی برخی صفات بیوشیمیایی نهال‌های دو ساله لیموآب شیراز (*Citrus aurantifolia* L. var. Mexican lime) در برابر تنش دمای پایین پس از تیمار با گلایسین بتائین

شایان احمدیان، رضا فتوحی قزوینی *، محمود قاسم‌نژاد و ایوب ملااحمد نالوسی
گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

گلایسین بتائین یکی از مهم‌ترین ترکیبات محلول سازگار (compatible solute) است که جایگزین آب آزاد سلول شده، ضمن ایفای نقش آنتی‌اکسیدانی، وظیفه حفاظت از پروتئین‌ها و غشا را نیز دارد. وجود آن در برخی گیاهان سبب افزایش مقاومت به تنش‌های مختلف غیرزیستی مانند تنش دمای پایین می‌شود. در بررسی حاضر، تأثیر کاربرد خارجی گلایسین بتائین در تنش دمای پایین روی نهال‌های دوساله لیموآب شیراز به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار شامل ۵ سطح گلایسین بتائین (صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی مولار) و ۵ سطح تنش دمایی (۶-، ۴-، ۲-، ۰، ۲ درجه سانتیگراد) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تیمارهای ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین در مقایسه با سایر غلظت‌ها، به طور معنی‌داری بر میزان فعالیت پراکسیداز طی تنش سرمایی به غیر از دمای ۲ درجه سانتیگراد، مؤثر است. همچنین تیمار ۱۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین به طور معنی‌داری میزان پروتئین کل بافت‌های برگ را طی تنش سرمایی افزایش داد. با این وجود، غلظت‌های مختلف گلایسین بتائین روی صفات لیپید پراکسیداسیون، نشت یونی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تأثیر معنی‌داری نداشتند. به نظر می‌رسد این ترکیب در حفاظت پروتئین‌ها و از جمله پراکسیدازها مؤثر بوده است ولی عدم تغییر سوپراکسید دیسموتاز در همه تیمارهای سرمایی با گلایسین بتائین احتمالاً به دوره و شدت کم تنش مربوط باشد. به علاوه، گلایسین بتائین در نهال‌های لیموآب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش نداد و نقش آن در حفاظت غشا در این آزمایش تأیید نشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنش سرمایی، گلایسین بتائین، لیموآب شیراز

ایران یکی از کشورهای مهم تولید کننده مرکبات در دنیاست که سالانه بیش از ۳/۵ میلیون تن انواع مرکبات را تولید می‌کند. مرکبات جزو محصولات گرمسیر و نیمه گرمسیر بوده، حساس به تنش دمای

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: r_fotouhi@guilan.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۳۱۶۶۹۰۲۷۴

پایین هستند. گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی مناسبی احتیاج دارند و خارج شدن از این محدوده یک تنش محسوب می شود. قرارگیری گیاهان حساس به سرما در معرض دماهای پایین به تغییرات فیزیولوژیکی در گیاه منجر می‌شود (Seppanen, 2000). در دمای پایین احتمال تشکیل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در اثر عدم تعادل بین دریافت نور و فتوسنتز افزایش می یابد. در گیاهان مقاوم به تنش سرما تشکیل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن کنترل شده و تعدیل می گردد. همچنین کاهش دما در حضور نور خطر اکسیداسیون نوری را به علت عدم توان استفاده لازم از نور افزایش می‌دهد (Allen and Ort, 2001). دمای پایین فعالیت آنزیم‌ها از جمله فعالیت آنزیم روبیسکو را کاهش می‌دهد (Guo and Cao, 1999). همچنین، در دمای پایین کارآیی انتقال انرژی به مرکز فتوسیستم II کاهش می‌یابد و کلروفیل سه تایی تشکیل می گردد که می تواند با انتقال الکترون به اکسیژن، رادیکال فعال اکسیژن تولید کند (Flexas *et al*., 1999؛ Havaux and Niyogi, 1999). گزارش‌ها نشان می‌دهد که گیاهان برای پیشگیری از آثار ثانویه سرما به چندین روش عمل می کنند و هدف همه آنها حفاظت از مراکز واکنش است (Jin *et al*., 2003). همچنین گیاهان مقاوم به سرما مانند اسفناج با داشتن سیستم آنتی اکسیدانی قوی در شرایط سرما قادر به ادامه حیات هستند (Allen and Ort, 2001). در برخی از گیاهان که می‌توانند به سرما سازگار شوند، تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان باعث خنثی کردن و از بین بردن رادیکال‌های آزاد تولید شده در هنگام تنش می‌شود (Kiara and Roy, 1999). این گیاهان با استفاده از آنزیم‌هایی نظیر: سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) توانایی کاهش گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن را دارند (Gabor *et al*., 2001). در بسیاری از گیاهان مقاوم به تنش، مواد سازگار محلول مانند گلایسین بتائین (GB) تولید می‌شود که از گیاه در مقابل تنش محافظت می کند (Storey and Wallker, 1999؛ Hasegawa *et al*., 2000). تحت شرایط تنش، GB می‌تواند از فعالیت فتوسنتزی شامل آنزیم‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها و غشاهای لیپیدی تیلاکوئید و جریان الکترون در مجموعه فتوسیستم II محافظت کند (Chen and Murata, 2008؛ Makela *et al*., 1998). Reddy و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که گیاهان توت‌فرنگی تیمار شده با GB در دمای ۱۷- درجه سانتیگراد نسبت به گیاهان شاهد (دمای ۵/۸- درجه سانتیگراد) مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. همچنین، مشخص شده است که GB در برابر سرما از غشا تیلاکوئیدی محافظت می کند (Reddy *et al*., 2004). محلول‌پاشی برگی گیاهان آرابیدوپسیس با GB، دمای یخ‌زدگی را از ۳/۱- به ۴/۵- کاهش داد (WeiBing and Rajashekar, 2001). در پژوهشی دیگر، Anjum و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که تیمار گیاهان ذرت تحت تنش خشکی با GB فعالیت آنزیم های SOD، POD و CAT را افزایش داد و از این راه سبب افزایش مقاومت به خشکی شده است. همچنین Makela و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که تیمار GB با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مقاومت دو رقم سیب‌زمینی در برابر تنش سرما را افزایش داد. لیموآب شیراز از حساس ترین گونه های

مرکبات در برابر سرما محسوب می‌شود (Baghbanha *et al.*, 2007). با توجه به ویژگی‌های ترکیب سازگار GB، تأثیر غلظت های مختلف این ماده بر روی برخی ویژگی های بیوشیمیایی نهال های دو ساله لیموآب شیراز طی تنش دمای پایین بررسی شد.

نهال‌های دو ساله از استان فارس تهیه و به دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان منتقل شدند. گیاهان پس از انتقال به گلدان‌ها در بستر مخلوطی با نسبت حجمی۳:۱:۱ از خاک سطحی، خاکبرگ و ماسه قرار گرفتند. نهال‌ها به مدت ۸ هفته در گلخانه و در دمای۲۳ درجه سانتیگراد در شب و ۲۸ درجه سانتیگراد در روز تحت شرایط نور طبیعی قرار گرفتند تا به خوبی رشد کنند. نهال ها در مراحل ابتدایی انتقال، هر دو روز یک بار و در مراحل بعدی هر ۴ روز یک بار با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. پس از رشد و استقرار نهال‌ها طی ۸ هفته، نهال‌ها با غلظت‌های مختلف گلایسین بتائین (GB) (صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار) دو بار با فاصله زمانی ۱۵ ساعت محلول‌پاشی برگی شدند. تیمار برگی در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵±۸۰ درصد صورت گرفت. پس از ناپدید شدن قطرات GB از سطح برگ، گیاهان به وسیله دستگاه انکوباتور قابل برنامه‌ریزی با رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و نور بسیار کم در معرض تنش دمایی قرار گرفتند. به منظور سازگاری، نهال‌ها ابتدا به مدت یک هفته در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. طی ۱۲ ساعت دما به ۱۰ درجه کاهش یافت و ۱۲ ساعت در آن دما باقی ماند. سپس، دما طی ۱۲ ساعت به ۶ درجه کاهش یافت و ۱۲ ساعت در آن دما باقی ماند. در ادامه، طی ۱۲ ساعت دما ۲ درجه کاهش یافت و ۱۲ ساعت در آن دما باقی ماند. تنش دمای پایین در دماهای ۲، ۰، ۲-، ۴- و ۶- درجه سانتیگراد انجام گرفت. قبل از قرار دادن گلدان‌ها در اتاقک رشد و همچنین قبل از ورود به دمای زیر صفر نهال ها آبیاری شدند تا تحت تنش خشکی قرار نگیرند. نهال‌ها پس از قرار گرفتن در معرض تنش، به‌تدریج به دمای اتاق انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در این دما نگهداری شدند. سپس، نمونه‌گیری از برگ‌ها برای اندازه‌گیری صفات مختلف شامل فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداسیون لیپید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، پروتئین کل و نشت الکترولیتی انجام شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم POD از روش Lin و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. در این روش از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۴۵ میلی‌مولار و گایاکول ۲۲۵ میلی‌مولار استفاده گردید. جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD در مخلوط واکنش به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر و دارای بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته=۷)، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، NBT، ریبوفلاوین و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیم انجام گردید. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Itd T80+UV/VIS, PG Instruments, UK) اندازه‌گیری شد (Giannopolitis and Rise, 1977).

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها از روش Heath و Packer (۱۹۶۸) بر مبنای اندازه گیری غلظت MDA استفاده شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ لیموآب شیراز

از طریق خاصیت خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) تعیین گردید (Brand-Williams *et al*., 1995).

برای اندازه گیری میزان پروتئین کل ۰/۱ گرم بافت برگ به وسیله نیتروژن مایع آسیاب گردید و به آن بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار شامل ۱ میلی‌مولار $EDTA\ Na_2$ و ۲ درصد PVPP (w/v) همگن شد. غلظت پروتئین کل با روش Brand-Williams (۱۹۷۶) و استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

برای تعیین نشت الکترولیتی (EL) سه برگ کاملاً توسعه یافته بالایی از نهال‌ها جدا و از آنها برش‌هایی به قطر ۱ سانتی‌متر تهیه شد، سپس برش‌ها در لوله‌های آزمایشگاهی قرار داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به آنها اضافه شد. لوله‌ها با سرپوش پلاستیکی بسته شد و در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از ۱۲ ساعت هدایت الکتریکی اولیه محیط (EC_1) با استفاده از دستگاه EC سنج مدل Milwaukee Mi 306 اندازه‌گیری شد. پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شدند تا به طور کامل بافت‌ها کشته شوند و همه الکترولیت‌ها آزاد شود. سپس، نمونه‌ها تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خنک شدند و هدایت الکتریکی ثانویه (EC_2) اندازه‌گیری شد و EL با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱ $EL=(EC_1/EC_2)\times100$

نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که فعالیت آنزیم POD با افزایش غلظت GB در سطوح مختلف تنش سرمایی به غیر از دمای ۲ درجه سانتیگراد، به طور معنی‌داری افزایش یافته است (جدول ۱). با این وجود، در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در دمای ۲- درجه سانتیگراد و در غلظت ۱۰ میلی‌مولار GB تفاوت معنی داری با گیاهان شاهد مشاهده نشد. در حالی که میزان فعالیت این آنزیم طی تنش سرما در غلظت های صفر (شاهد) و ۲/۵ میلی‌مولار GB کمتر از سایر غلظت‌ها بود. همچنین، نهال‌های تیمار شده با ۷/۵ و ۱۰ میلی مولار GB بیشترین فعالیت آنزیم POD را نشان دادند. به طور مشابه Demiral و Turkan (۲۰۰۴) نشان دادند که تیمار GB فعالیت آنزیم‌های POD و CAT را در گیاهان برنج تحت تنش شوری افزایش می دهد. این آنزیم‌ها در تصفیه رادیکال‌های تولید شده در تنش شوری و سرما نقش دارند. GB به طور مؤثری ساختار چهارگانه آنزیم‌ها و مجموعه پروتئین‌ها را تثبیت کرده، وضعیت بسیار پایدار غشا را در دماهای غیرفیزیولوژیک حفظ می‌کند (Chen and Murata, 2008). با این وجود، نتایج نشان می دهد که افزایش فعالیت POD نتوانسته است آثار مخرب تنش دمای پایین را کاهش دهد که با نتایج Gülen و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. ولی اثر حفاظتی GB بر آنزیم POD بیشتر بوده است و مانع تخریب آن در دماهای پایین شده است. به نظر می رسد کاهش دما آنزیم POD را زودتر تخریب می‌کند و ترکیب سازگاری مانند GB می‌تواند باعث پایداری آن گردد.

تیمار GB میزان فعالیت SOD را افزایش نداد (جدول ۱). کمترین میزان فعالیت SOD مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌مولار GB در دمای صفر درجه بود. به بیان دیگر، شاید با رویارویی دماهایی زیر صفر آنزیم SOD که از جمله آنزیم‌های تصفیه کننده ROS است توانسته آنیون سوپر اکسید را به پر اکسید هیدروژن تبدیل کند. تصفیه ROS فرآیندی لازم برای بقا و

تولید محصول است. مطابق با نتایج پژوهش حاضر، Hoque و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که کاربرد GB تأثیری بر فعالیت SOD در گیاهان تحت تنش شوری ندارد.

بیشترین میزان پروتئین کل در دماهای ۲ و ۴- درجه سانتیگراد به ترتیب با تیمارهای ۲/۵ و ۱۰ میلی‌مولار GB مشاهده شد (جدول ۱). در دمای ۶- درجه، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۰ و ۵ میلی‌مولار GB مشاهده نشد. در دمای صفر درجه به رغم افزایش میزان پروتئین کل، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۰، ۷/۵ و ۵ میلی‌مولار GB مشاهده نگردید. مطابق با نتایج دست آمده، Yancy (۱۹۹۴) نشان داد که کاربرد GB ساختار چهارگانه مجموعه پروتئینی تحت تنش اسمزی را تثبیت می کند. Mäkela و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که کاربرد GB سبب افزایش میزان کلروفیل، میزان پروتئین کل، میزان و فعالیت روبیسکو در گیاهان گوجه فرنگی تحت تنش خشکی یا شوری شده است. همچنین کاربرد GB از فعالیت زنجیره فتوسیستم II آزاد کننده اکسیژن محافظت می‌کند (Harinasut *et al.*, 1996؛ Feller *et al.*, 2008). با توجه به این که در بررسی حاضر، در دماهای پایین میزان پروتئین حفظ شده است به نظر می‌رسد GB در حفاظت از نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و پایداری آنزیم‌ها مؤثر بوده است.

نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف GB نتوانسته طی تنش سرما ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بالا ببرد. در دمای ۴- درجه سانتیگراد با وجود این که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با تیمار ۱۰ میلی‌مولار GB بیشتر از سایر تیمارها است، تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارهای به کار رفته در این سطح تنش مشاهده نشد. ویتامین C، کارتنوئید، ترکیبات فنلی، کلروفیل، آنزیم های متعدد دیگر از جمله عوامل مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هستند. بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان در دمای ۲- درجه سانتیگراد با تیمارهای صفر و ۲/۵ میلی‌مولار GB مشاهده شد و با افزایش شدت تنش و کاربرد GB در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در ظرفیت آنتی اکسیدانی مشاهده نشد. هر چند که گیاهان تیمار شده با ۲/۵ میلی‌مولار GB در دمای ۶- درجه سانتیگراد، کمترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی را داشتند (جدول ۱). عملکرد GB تاکنون بحث انگیز بوده و به طور کامل شناخته نشده است (Ashraf and Foolad, 2007) برخی گزارش‌ها گویای آن است که این ترکیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی ندارد (Parvaiz and Satyawati, 2008) که با یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. Okuma و همکاران (۲۰۰۴) معتقدند GB تنها یک اسمولیت سازگار است و از گروه اسمولیت‌های سازگار تصفیه‌کننده ROS به محسوب نمی‌شود.

نتایج نشان داد که با کاهش دما، بر میزان پراکسیداسیون لیپید افزوده شد ولی غلظت‌های مختلف GB اثر معنی‌داری بر کاهش پراکسیداسیون لیپید در سطوح دمایی نداشتند (جدول ۱).Hoque و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که تیمار GB سلول‌های توتون کشت شده تحت تنش شوری تأثیری بر میزان مالون دی آلدیید نداشت. در صورتی که Demiral و Turkan (۲۰۰۶) گزارش کردند که سطح پراکسیداسیون لیپید در گیاهان حساس و مقاوم به شوری گیاهچه های برنج در شرایط تنش شور، با تیمار GB کاهش یافت. این نتایج بیانگر آن است که آثار متفاوت GB می‌تواند به

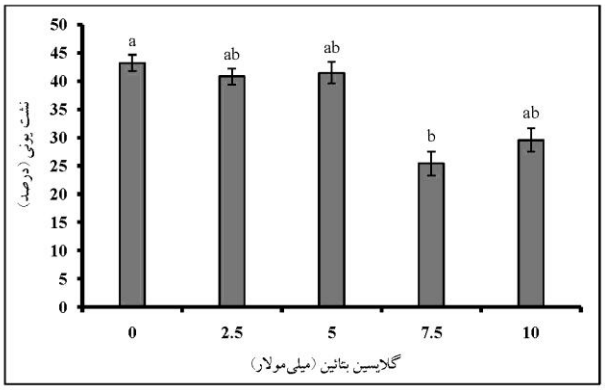
ژنوتیپ مربوط باشد. یا آن که GB نتوانسته از غشا به خوبی محافظت کند به رغم آن که گزارش‌هایی وجود دارد که از مولکول‌های بزرگ و برخی اجزای سلول محافظت می‌کند. از سوی دیگر نتوانسته نقش آنتی‌اکسیدانی برای حفظ غشا داشته باشد (Parvaiz and Satyawati, 2008).

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در برگ‌های لیموآب شیراز تحت سطوح مختلف تنش سرمایی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی است.

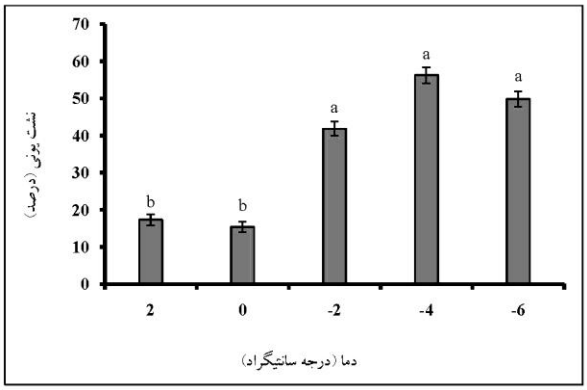
سطوح تنش سرما (درجه سانتیگراد)	غلظت گلایسین بتائین (میلی‌مولار)	پروتئین کل (میلی‌گرم/ گرم وزن تر)	سوپراکسیددیسموتاز (میکرومول/ گرم وزن تر در دقیقه)	پراکسیداز (میکرومول/ گرم وزن تر در دقیقه)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPHsc %)	پراکسیداسیون لیپید (نانومول/ گرم وزن تر)
	۰	۸۶/۸۶ defg*	۲۵۳/٤ ab	۳/۱۰ ab	۱٦/٦ ab	۱۹/۰ bc
	۲/۵	۱٤٤/۹۵ a	۲۸۲/۷ ab	۳/۹٤ a	۲۳/۷ ab	۲۱/٤ abc
۲	۵	۱۱۲/۹۸ bcd	۲۵۷/۳ ab	۳/۲۷ ab	۱٦/۷ ab	۱۷/۲ bc
	۷/۵	۷۹/۱۷ defg	۲٦۹/۰ ab	۳/٦۳ ab	۲۰/۹ ab	۲۲/۲ abc
	۱۰	۱۱۰/۰۷ bcd	۳۱۱/٤ a	۳/۳۲ ab	۱۷/۰ ab	۱۷/۵ bc
	۰	۵۹/۷٦ jk	۲٤۰/۹ ab	۱/۹٤ c	۲۳/۷ ab	۲۰/۰ abc
	۲/۵	٦۵/۰٤ jk	۲٦۸/۰ ab	۱/۳۰ c	۱۸/٤ ab	۱۸/۵ bc
۰	۵	۷٤/۷۸ ijk	۲٤۳/۲ ab	۱/٤۷ c	۲٦/۰ ab	۲۰/۹ abc
	۷/۵	۷۲/٦۸ ghijk	۳۲۲/۷ a	۲/۱۷ ab	۲۰/۹ ab	۱٦/٤ c
	۱۰	۹۸/۳۵ defg	۱٦۹/۱ b	۳/٤۱ ab	۱۸/۱ ab	۱۹/٤ abc
	۰	٤۸/٦۲ k	۲۳٤/۳ ab	۱/۵۹ c	۲۷/۰ a	۲۲/٤ abc
	۲/۵	۹۳/۳۷ cdef	۲۲٦//۲ ab	۱/۳۵ c	۲۲/۷ ab	۱۹/٦ abc
-۲	۵	٦۵/۹۱ efghij	۲۳۹/۸ ab	۳/۵۷ ab	۲۷/۱ ab	۲۱/٤ abc
	۷/۵	۹۹/۵۸ cde	۲۸۸/۸ ab	۳/۳٦ ab	۲٤/٦ ab	۲۲/٤ abc
	۱۰	۸۰/٤۷ defghi	۲٤۳/۲ ab	۱/٦۹ c	۲۱/۷ ab	۲۱/٤ abc
	۰	۷٤/۱۳ efghij	۲۳۸/۹ ab	۱/۵۰ c	۱۸/۲ ab	۲۲/٤ abc
	۲/۵	۵٦/٤۱ hijk	۲۳۳/۵ ab	۱/٦۹ c	۲۲/۵ ab	۲۳/۸ abc
-۴	۵	۷۳/۱۱ efghij	۲۲۳/٦ ab	۱/۷۷ c	۲۱/۳ ab	۲۰/٦ abc
	۷/۵	۸۳/٤۸ fghijk	۳۱۵/٦ a	۳/۲۱ ab	۲۰/۵ ab	۲۷/۰ a
	۱۰	۱۳۷/٤۹ ab	۲۹۲/۹ ab	۲/۹٤ b	۲٦/۹ ab	۲٤/۳ ab
	۰	۸۱/٤٦ defghi	۲٤۹/۲ ab	۱/۸۲ c	۲۳/۹ ab	۲۲/۸ abc
	۲/۵	٦۰/۹۹ ghijk	۳۰۷/٤ a	۱/۷۱ c	۱٤/٤ b	۲۱/۷ abc
-۶	۵	۱۰۲/۲۳ cde	۲۰۲/۳ ab	۳/٤۰ ab	۲۲/۵ ab	۲۳/٦ abc
	۷/۵	۸۱/۱۵ defg	۳۲٦/۰ a	۳/٤٦ ab	۱٦/۵ ab	۲۲/٤ abc
	۱۰	۱۲۳/۸۲ abc	۲۸۲/۵ ab	۳/۳۷ ab	۱٦/۸ ab	۲٤/۸ ab

با افزایش غلظت GB میزان نشت یونی کاهش یافت ولی تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های GB مشاهده نشد. همچنین، بیشترین میزان نشت یونی در گیاهان شاهد به دست آمد (شکل ۱). با افزایش شدت تنش بر میزان نشت یونی افزوده شده است. اگر چه میزان نشت یونی در دمای ۴- درجه سانتیگراد بیشترین میزان است، با این وجود، با سطوح دیگر تنش یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲). نشت الکترولیتی شاخص فیزیولوژیکی مناسبی برای ارزیابی میزان مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی است. Moshtaghi و همکاران (۲۰۰۹) با کاربرد GB روی دو ژنوتیپ نخود متحمل و حساس به تنش دمای پایین مشاهده کردند که نشت یونی در گیاهان متحمل کاهش یافت ولی در گیاهان حساس کاربرد GB بر کاهش میزان EC تأثیری نداشته است.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که GB برحفظ و پایداری برخی پروتئین‌ها مانند پراکسیدازها و پروتئین کل مؤثر بوده است. میزان سوپراکسیددیسموتاز تغییرات معنی‌داری با کاهش دما یا تیمار با GB نداشت. همچنین تیمار این ترکیب سازگار باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشد. شاید به همین دلیل در جلوگیری از پراکسیده شدن لیپید غشا چندان تأثیری نداشت. ولی ممکن است بر حفظ و پایداری کلروفیل، سایر آنتی‌اکسیدان‌ها یا آنزیم روبیسکو تأثیر داشته باشد.



شکل ۱- میزان نشت یونی در برگ‌های لیموآب شیراز تیمار شده با غلظت‌های مختلف GB



شکل ۲- میزان نشت یونی در برگ‌های لیموآب شیراز تحت سطوح مختلف دمای پایین

منابع

Allen, D. J. and Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science 6(1):36-41.

Anjum A. S., Saleem, F. M., Wang, L., Bilal, F. M. and Saeed, A. (2012) Protective role of glycinebetaine in maize against drought-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of antioxidative system. Australian Journal of Crop Science 6(4):576-583.

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Baghbanha, M. R., Fotouhi Ghazvini, R., Hatamzadeh, A. and Heydari, M. (2007) Effect of salicylic acid on freezing tolerance of Mexican lime seedlings (*Citrus aurantifolia* L.). Iranian Journal of Horticultural Sience and Technology 8(3): 185-198 (in Persian).

Brand-Williams, M. M. (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science Technology 28(1): 25-30.

Chen, T. H. H. and Murata, N. (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants: review. Trends in Plant Science 13(9): 499-505.

Demiral, T. and Turkan, I. (2004) Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?. Journal of Plant Physiology 161: 1089-1100.

Demiral, T. and Turkan, I. (2006) Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. Environmental and Experimental Botany 56: 72-79.

Feller, U., Anders, I. and Demirevska, K. (2008) Degradation of rubisco and other chloroplast proteins under abiotic stress. General and Applied Plant Physiology 34(1-2): 5-18.

Flexas, J., Badger, M., Chow, W. S., Medrano, H. and Osmond, C. B. (1999) Analysis of the relative increase in photosynthetic O_2 uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and water stress. Plant Physiology 121: 675-684.

Gabor, K., Ballmoos, P. V. and Brunold, C. (2001) Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling induced injury. Plant Physiology 127: 1147-1156.

Giannopolitis, C. N. and Rise, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Gülen, H., Çetinkaya, M., Kadıoğlu, M., Kesici, A. and Eriş, A. (2008) Peroxidase activity and lipid peroxidation in strawberry (fragaria X ananassa) plants under low temperature. Journal of Biology Environment Science 2(6): 95-100.

Guo, Y. H. and Cao, K. F. (1999) Effect of night chilling on photosynthesis of two coffee species grown under different irradiances. Horticultural Science and Biotechnology 79(5): 713-716.

Harinasut, P., Tsutsui, K., Takabe, T., Nomura, M. and Kishitani, S. (1996) Exogenous glycine betaine accumulation and increased salt tolerance in rice seedlings. Bioscience Biotechnology Biochemistry 60: 366-368.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 463-499.

Havaux, M. and Niyogi, K. K. (1999) The violaxanthin cycle protects from photooxidative damage by more than ohe mechanism. Plant Biology 96: 8762-8767.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stochiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hoque, M. A., Okuma, A. E., Akhter Banu, M. N., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y. (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. Journal of Plant Physiology, 164: 553-561.

Jin, E. S., Yokthongwattana, K., Polle, J. E. W. and Melis, A. (2003) Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and in *Dunaliella salina*. Plant Physiology 132: 325-364.

Kiara, D. V. and Roy, D. N. (1999) Oxidative stress and antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. Environmental Reviews 7: 31-51.

Lin, Z. L., Chen, Y. Z. and Zhang, W. (1996) Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. isolation, purification and some properties. Process Biochemistry 31(5): 443-448.

Makela, P., Jokinen, K., Kontturi, M., Peltonen-Sainio, P., Pehu, E. and Somersalo, S. (1998) Foliar application of glycinebetaine a novel product from sugar beet as an approach to increase tomato yield. Industrial Crops and Products 7: 139-148.

Mäkela, P., Kärkkäinen, J. and Somersalo, S. (2000) Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content and Rubisco activities in tomato grown under drought or salinity. Biology Plant 43: 471-475.

Makela, P., Peltonen-Sainio, P., Jokinen, K., Pehu, E., Setala, E., Hinkkanen, R. and Somersalo, S. (1996) Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. Plant Science 21: 221-230.

Moshtaghi, N., Bagheri, A., Nezami, A. and Moshtaghi, S. (2009) Investigation of betaine spray on freezing tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in controlled conditions. Iranian Journal of Field Crops Research 7(2): 647-656 (in Persian).

Okuma, E., Murakami, Y., Shimoishi, Y., Tada, M. and Murata, Y. (2004) Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. Soil Science and Plant Nutrition 50: 1301-1305.

Parvaiz, A. and Satyawati, S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants- a review. Plant, Soil and Environment 54: 89-99.

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology 161: 1189-1202.

Seppanen, M. M. (2000) Characterize of freezing tolerance in *Solanum commersonii* (dun.) with special reference of the relationship between and oxidative stress. MSc thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

Storey, R. and Wallker, R. R. (1999) Citrus and salinity. Scientia Horticulturae 78: 39-81.

WeiBing, X. and Rajashekar, C. B. (2001) Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany 46: 21-28.

Yancy, P. H. (1994) Compatible and counteracting solutes. In: Cellular and molecular physiology of cell volume regulation (Ed. Strange, K.) 81-109. CRC Press, London.

Study of biochemical traits of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L. var. Mexican lime) to low temperature after treatment by glycine betaine

Shayan Ahmadiyan, Reza Fotouhi Ghazvini *, Mahmood Ghasemnezhad and Ayoub Molaahmad Nalousi

Department of Horticultural, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

Abstract

Glycine betaine (GB) is an important compatible solute that acts as a substitute for water molecules release protein and membrane protection and also acts as active oxygen scavengers. In some plants, accumulation of this compound causes resistance to various stresses such as low temperature. In this experiment, the effect of exogenous application of GB and low temperature stress was investigated on Mexican lime in factorial experiment based on complete randomized design with three replications. Glycine betaine was applied at five levels (0, 2.5, 5, 7.5 and 100 mM) and also plants were subjected to five temperature treatments (2, 0, -2, -4 and -6°C). Results showed that spraying by 7.5 and 10 mM GB as compared to other concentrations apart from the temperature at 2°C significantly increased the activity of peroxidase (POD) during the stress. Also, 10 mM of GB increased the total protein during the low temperatures in leaf tissues significantly. However, different concentrations of GB had not any clear effact on other characteristics such as lipid peroxidation (MDA), ion leakage (EC), total antioxidant capacity (DPPHsc%) and superoxide dismutase (SOD). It seemed that GB had protected the proteins such as peroxidase. In this study SOD content did not change during treatments that may depended on the low duration of stress. In addition, GB without antioxidant role in Mexican lime, could not protect the membrane from proxidation.

Key words: Antioxidant Enzymes, Cold stress, Glycine betaine, Mexican lime

* Corresponding Author: r.fotouhi@guilan.ac.ir