زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هفتم، بهار ۱۳۹۰، صفحه ۹۷ - ۱۰۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۰۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۱/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۳/۱۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۱/۱۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۲/۱۴

« مقاله کوتاه »

اثر تنش‌های سرمایی بر ایجاد پروتئین ضد یخ و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در دو گونه مرکبات شمال ایران

ریحانه سریری [1*]، مجید گلوانی، رضا فتوحی قزوینی [2] و وهب جعفریان
[1] بخش بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
[2] بخش باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

مرکبات شمال از نظر کیفیت و تطابق با ذائقه ایرانیان از اهمیت کشاورزی و تجاری برخوردارند. بهبود کیفیت این محصولات از اهداف مهم کشاورزان و دانشمندان این رشته است. در پژوهش حاضر، پاسخ دو گونه از مرکبات، نارنج (*Citrus aurantium*) و سیترنج (هیبریدی از پرتقال شیرین و نارنج *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) به تنش سرما از طریق بررسی وجود پروتئین ضد یخ و تغییر پراکسیداسیون لیپیدها در گونه‌های مرکبات مذکور بررسی گردید. نتایج نشان داد هر دو گونه مرکبات مورد بررسی بر اثر اعمال دماهای زیر صفر، پروتئین ضد یخ با وزن مولکولی تقریباً ۲۳ کیلو دالتون تولید نمودند و پراکسیداسیون لیپیدی در هر دو گونه تا حدی افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، گونه‌های اکسیژن فعال، پراکسیداسیون لیپیدی، پروتئین ضد یخ، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز

گیاهان برای تحمل تنش‌های سرمایی به یک دوره سازگاری به سرما نیاز دارند. در نتیجه فرآیند سازگاری با دمای پایین، پروتیئن‌های خاصی در گیاه تولید می‌شود یا میزان آنها افزایش می‌یابد. نقش پروتئین‌های محافظت‌کننده در برابر سرما، حفاظت از پروتئین‌های درون سلولی و غشا در طی فرآیند انجماد- ذوب است (Zhang *et at*., 2006). به علاوه، برخی انواع پروتئین خارج سلولی نیز در طی سازگاری سرمایی در گیاه ایجاد شده، تجمع می‌یابند (Antikainen and Griffith, 1996). پروتئین‌های تغییر دهنده دیواره سلولی، پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی که گیاهان را در مقابل عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کند و پروتئین‌های ضد انجماد یا ضد یخ (Antifreeze proteins, AFPs) توسط موجوداتی که در آب و هوای سرد زندگی می‌کنند، برای تحمل سرما و

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: sariri@guilan.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۳۱۳۲۳۳۶۴۷

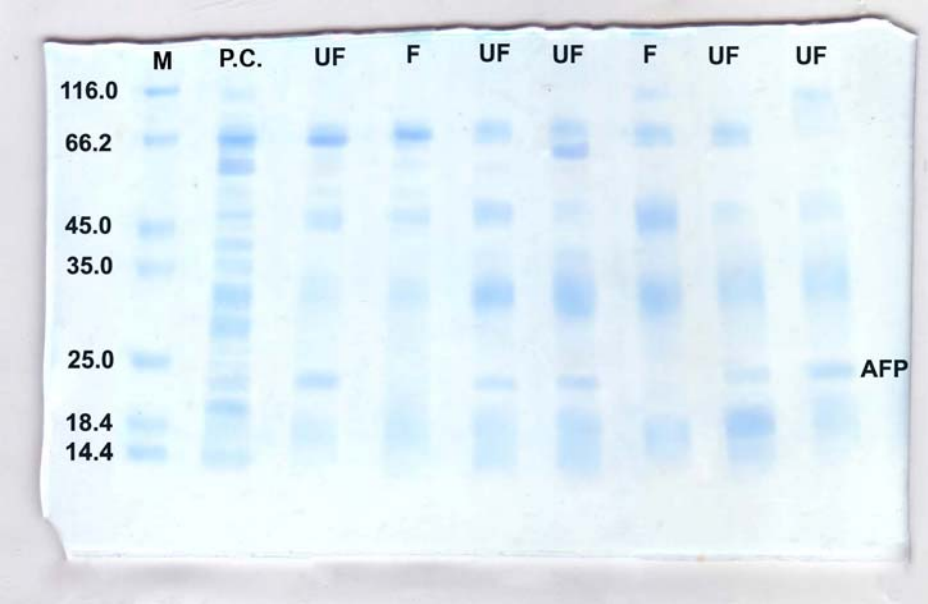
اجتناب از انجماد تولید می‌شوند. پروتئین‌های اخیر با اتصال به بلور یخ از تشکیل آن ممانعت می‌کنند. این پروتئین‌ها درگستره وسیعی از گونه‌های مناطق سرد مانند موش صحرایی (Włostowski *et al.*, 2008) و گیاهان (Zykova *et al.*, 2000) یافت شده‌اند. تنوع گونه‌هایی که این پروتئین‌ها را تولید می‌کنند، به همراه گوناگونی موجود که در خود این پروتئین‌ها، باعث پدیدآمدن طیف وسیعی از پروتئین‌های ضد یخ در اندازه‌ها و عملکردهای مختلف شده است (DeVries, 1986). پروتئین‌های ضد یخ از مسیرهای گوناگون مانند کاهش دمای انجماد، تعدیل یا ممانعت از رشد بلورهای یخ، جلوگیری از تبلور مجدد و محافظت غشایی سلول در برابر آسیب ناشی از سرما، موجودات زنده را در مقابل سرما محافظت می‌نمایند. مکانیسم عمل این پروتئین‌ها از طریق اثر بر رشد کریستال یخ در حال حاضر نیز مورد مطالعه است (Griffith and Antikainen, 1996). یکی از مهمترین آثار و آسیب‌های تنش‌های سرمایی، وقوع عمل پراکسیداسیون در چربی‌های غشایی است (Bahar *et al.*, 2005). پراکسیداسیون چربی‌ها فرآیندی است که در آن رادیکال‌های آزاد، الکترون را از لیپیدهای غشایی پلاسمایی دریافت کرده، از این طریق به سلول آسیب می‌رسانند. به دلیل اهمیت و فراوانی گونه‌های مختلف مرکبات در شمال ایران و ارتباط پروتئین ضد یخ با مقاومت به سرما و لزوم یافتن مسیری جدید برای بهبود و افزایش بهره‌وری، این تحقیق با هدف بررسی وجود AFPs و پراکسیداسیون چربی‌های غشایی در برگ انواع مرکبات انجام گرفت.

به همین جهت، برای اعمال تنش سرما، گیاهچه‌های ۱۰-۲۰ سانتی‌متری دو گونه از مرکبات، نارنج (*Citrus aurantium*) و سیترنج (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) از مؤسسه تحقیقات مرکبات در رامسر تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه در مخلوط ماسه و پرلیت به نسبت ۴:۱ کشت گردیدند. سپس گیاهان به دستگاه ژرميناتور با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد، رطوبت ۷۵٪ و طول روز ۱۶ ساعت منتقل شدند. دما طی دوره‌های ۲ ساعتی از ۲۰ درجه سانتیگراد به ترتیب به ۱۵، ۱۰، ۵ و ۳ درجه سانتیگراد کاهش یافته، در هر یک از این دماها به مدت ۲۴ ساعت ثابت ماند تا گیاهچه‌ها برای اعمال دماهای زیر صفر به تدریج سازگار شوند. سپس دماهای صفر، ۳-، ۶- و ۹- روی گیاهچه‌ها اعمال شد. برگ هر دو گونه در هاون با نیتروژن مایع ساییده شد تا کاملاً هموژنیزه شود. برگ‌های هموژنیزه بلافاصله توزین و به میکروتیوب منتقل گردیدند. سپس بافر فسفات و بتا مرکاپتو اتانول به میکروتیوب اضافه و در سانتریفوژ یخچال‌دار در صفر درجه سانتیگراد با ۱۴۰۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل و مجدداً سانتریفیوژ و محلول رویی برداشته شد (Rehman, 2009). کروماتوگرافی مایع پروتئین با سرعت بالا (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) و سپس پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ناپیوسته برای تخلیص استفاده شد. پس از تزریق عصاره سلولی برگ مرکبات به دستگاه FPLC قسمت‌های جدا شده توسط کروماتوگرافی در میکروتیوب جمع شده، با توجه به پیک‌های کروماتوگرام، برای تأیید خلوص الکتروفورز انجام گرفت (DeVries, 1986). سنجش پراکسیداسیون چربی‌ها بر اساس واکنش مالون دی آلدئید (MDA)، به عنوان محصول دوم پراکسیداسیون لیپیدها، با تیوباربیتوریک اسید (TBA) در حضور تری کلرو استیک اسید (TCA) انجام شد. روش Liu برای پراکسیداسیون

لیپیدی انجام و از طریق فرمول (۱) مقدار پراکسیداسیون محاسبه گردید (Liu *et al*., 1997).

$$\frac{A_{532} - A_{600}}{155 mM^{-1} cm^{-1}}$$ فرمول (۱)

A_{532} و A_{600} جذب نمونه در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و عدد ۱۵۵ ضریب جذب مولی MDA بر حسب $mM^{-1}cm^{-1}$ (Heath and Packer, 1968) هستند. نتیجه به صورت $\mu mol\ g^{-1}FW$ نشان داده شده است. بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق بر روی دو گونه نارنج و سیترنج نشان دادند که AFPs بر اثر قرار گرفتن در دماهای زیر صفر در این دو گونه از مرکبات تولید می‌شوند. پس از چندین بار تخلیص AFP با استفاده از کروماتوگرافی FPLC مشخص شد که بعضی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از FPLC بر خلاف بقیه با قرار گرفتن در فریزر به مدت چندین ساعت دچار انجماد نمی‌شوند. برای اطمینان، تعدادی از نمونه‌های یخ زده و نزده را روی ژل الکتروفورز برده، مشخص شد که نمونه‌های یخ نزده در ناحیه تقریباً ۲۳ کیلو دالتون باندی را تشکیل می‌دهند که این باند در نمونه‌های یخ زده مشاهده نمی‌شود (شکل ۱).



شکل ۱ – ژل اکریل آمید سیترنج *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*. از چپ به راست ستون اول: M) مارکر وزن مولکولی پروتئین؛ ستون دوم: P.C) عصاره سیترنج قبل از FPLC و ستون‌های بعد فراکشن‌های جمع‌آوری شده (F= frozen و UF= unfrozen) پس از FPLC با استفاده از ستون دی اتیل آمینو اتیل. ستون‌های مربوط به نمونه‌های یخ زده و نزده حاصل از آزمایش‌های تکراری برای تأیید هستند.

به طوری که در این شکل ملاحظه می‌شود، در همه نمونه‌های مقاوم به یخ‌زدگی (Unfrozen, UF) پروتئینی با وزن مولکولی ۲۲–۲۴ کیلو دالتون ظاهر شده که در نمونه سالم وجود ندارد. این پروتئین می‌تواند نوعی خاص از پروتئین‌های ضد یخ باشد که بر اثر تنش سرمایی در گیاه ایجاد شده است. احتمال داده می‌شود که این باند مربوط به حضور پروتئین ضد یخ در نمونه باشد. شایان ذکر است که نمونه نارنج (*Citrus aurantium*) ژل اکریل آمید مشابهی داشت (نشان داده نشده است)، همچنین مشخص شد که با اعمال دماهای زیر صفر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نیز

اتفاق می‌افتد. نتایج حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نشان دادند که این پدیده در هر دو گونه با کاهش دما، افزایش می‌یابد. شیب این افزایش در گونه نارنج بسیار بیشتر از نوع هیبریدی سیترنج بود که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این گونه در مقابل تنش سرمایی است. پروتئین‌های ضد یخ (AFPs) در موجودات مقاوم به انجماد، از قبیل ماهی، حشرات، باکتری‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. از جمله گیاهانی که در آنها AFP تولید می‌شود، می‌توان به گندم زمستانی (Zykova *et al*., 2000)، انگور (Zhang *et al*., 2006) هلو و مرکبات اشاره کرد (Hara *et al*., 2004). تحقیقات نشان داده‌اند که در گونه‌های مرکبات تحت تنش سرما، یک سری از mRNA های مخصوص (Thomashow, 1999) و برخی از پلی‌پپتیدها تجمع می‌یابند (DeVries, 1986). mRNA نوع CUCOR19 که محصول ترجمه آن شبیه یکی از پروتئین‌های دهیدرین پونسیروس است و از خود فعالیت ضد یخی نشان می‌دهد، در *Citru unshiu* طی آزمایشی کلون و مشخص گردید که پروتئین مزبور در برگ‌های این درخت پس از اعمال سرما تجمع می‌یابد (Hara, *et al*., 2001). برخی از پروتئین‌های ویژه از نواحی آپوپلاست گندم زمستانی پس از قرارگیری این گیاه در معرض دمای سرد جداسازی و خالص شدند (Zykova *et al*., 2000). این بررسی‌ها تأیید کننده نتایج تحقیق حاضر در مورد ایجاد نوعی پروتئین ضد یخ در تنش‌های سرمایی است. لازم به توضیح است که فعالیت پروتئین‌های ضد یخ (AFPs) به وسیله روش بررسی مورفولوژی بلورهای یخ در حضور AFP نیز اندازه‌گیری می‌شود. در این روش، شکل بلورهای یخ به غلظت AFP و فعالیت ویژه آن بستگی دارد (Duman, 1994). تحقیقات نشان داده که ممکن است شدت تنفس در اثر سرما بالا رود؛ با افزایش تنفس، جذب اکسیژن در ساعات اولیه سرما بسیار بالا می‌رود، در حالی که خروج دی اکسید کربن (CO_2) به مقدار کمتری صورت می‌گیرد (McKersie, 1991). بنابراین، ممکن است اکسیژن به شکل اکسیژن‌های فعال، از جمله سوپراکسید و ترکیبات اکسید شده تک اکسیژنه در بافت سرمازده تبدیل شود. به علاوه، مقادیر گونه‌های فعال اکسیژن، از جمله پراکسیدها در طی چرخه انجماد-ذوب افزایش یافته، این عوامل نیز باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (Gülen *et al*., 2008). بر اساس یافته‌های این تحقیق، غلظت MDA، محصول پراکسیداسیون لیپیدها، در دماهای پایین افزایش نشان می‌دهد که تأیید کننده اثر سرما در افزایش پراکسیداسیون لیپیدهاست. مقدار MDA حاصل از این تحقیق (۰/۱۴۸ و ۰/۱۳۵ میکرومول به ازای گرم وزن نمونه تازه به ترتیب برای نارنج و سیترنج در ۶- درجه سانتیگراد، کمتر از نتایج گزارش شده برای *Vaccinium myrtillus* است (۶۰-۸۰ میکرومول/گرم) (Taulavuori *et al*., 2001) که مؤید ایجاد پروتئین ضد یخ در این دو گونه مرکبات و افزایش مقاومت در مقابل پراکسیداسیون لیپیدهاست. اندازهگیری سایر ترکیبات (از قبیل دی ان ها و تری ان های کونژوگه) در کنار بررسی MDA می‌تواند توجیه نتایج را بهبود بخشد (Blokhina *et al*., 1999).

منابع

Bahar, M., Eun-Joo, A. and Hahn Paek, K. Y. (2005) Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and

Antikainen, M. and Griffith, M. (1997) Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. Plant Physiology 99: 423-432.

lipoxygenase activity in Phalaenopsis. Plant Physiology and Biochemistry 43(3): 213-223.

Blokhina, O. B., Fagerstedt, K. V. and Chirkova, T. V. (1999) Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. Physiologia Plantarum 105: 625-632.

DeVries, A. L. (1986) Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. Methods in Enzymology 127: 293-303.

Duman, J. G. (1994) Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from plant, bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. Biochimica et Biophysica Acta 1206: 129-135.

Griffith, M. and Antikainen, M. (1996) Extracellular ice formation in freezing- tolerant plants. Advanced Low-Temperature Biology 3: 107-139.

Gülen, H., Çetinkaya, C., Kadıoğlu, M., Kesici, M., Cansev, A., Eriş, A. (2008). Peroxidase activity and lipid peroxidation in Strawberry (Fragaria X ananassa) Plants under low temperature. Journal of Biological and Environmental Sciences 2(6): 95-100.

Hara, M., Terashima, S. and Kuboi T. (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. Journal of Plant Physiology 158(10): 1333-1339.

Hara, M., Terashima, S. and Kuboi, T. (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin Plant Physiology and Biochemistry 42(7): 657-662.

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

Liu, J., Yeo, H. C., Doniger, S. J. and Ames, B. N. (1997) Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. Analytical Biochemistry 245: 161-166.

Rehman, Z. Ur. (2006) Citrus peel extract- A natural source of antioxidant. Food Chemistry 99(3): 450-454.

Taulavuori, E., Hellström, E. K., Taulavuori, K. and Laine, K. (2001) Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. Journal of Experimental Botany 52(365): 2375-2380.

Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 571-599.

Włostowski, T., Bonda, E. and Krasowska, A. (2008) Effect of cold on lipid peroxidation in the brown adipose tissue and liver of rats. Journal of Thermal Biology 33(3): 180-184.

Zhang, J. H., Liu, Y. P., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Wang, X. Q. and Huang, W. D. (2006) Changes in membrane-associated H^+-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. Plant Sciences 170(4): 768-777.

Zykova, V. V., Grabelnych, O. I., Antipina, A. I., Koroleva, N. A., Vladimirova, S. V., Kolesnichenko, A. V., Pobezhimova, T. P. and Voinikov, V. K. (2000) Plant stress-related uncoupling protein CSP 310 caused lipid peroxidation in winter wheat mitochondria under chilling stress. Journal of Thermal Biology 25(5): 323-327.

« Short Paper »
The effect of cold temperature stress on antifreeze protein production and lipid peroxidation in two citrus species

Reyhaneh Sariri *[1], Majid Galvani, Reza Fotouhi Ghazvini [2] and Vahab Jafarian

[1] Department of Biology, Faculty of Natural Sciences University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Department of Gardening, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract
Quality wise, most citrus species from North of Iran are appreciated by the Iranian peaple. They, therefore, deserve commercial and research value. To protect their cells and tissues from oxidative damage, most plants produce metabolites such as carbohydrates, amino acids, anti-freeze protein and antioxidants. Determination of lipid peroxidation, and detection of anti-freeze protein were used to explore the mechanism by which a plant could resist to cold stress. In this research, two species of citrus family, citrange (*Citrus sinensis*) and bitter orange (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) were subjected to a range of temperature. Results showed that a protein with molecular weight of 23 KD was produced in both citrus species at temperature below zero degree. On the other hand, lipid peroxidation in both species increased only slightly in response to cold stresses below $0^{\circ C}$.

Key words: Citrus, Reactive oxygen species, Lipid peroxidation, Antifreeze protein, Superoxide dismutase, Catalase, Ascorbate peroxidase

* Correspong Author: sariri@guilan.ac.ir