

## « مقاله کوتاه »

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

ریحانه سریری<sup>۱\*</sup>، مجید گلوانی، رضا فتوحی قزوینی<sup>۲</sup> و وهب جعفریان

<sup>۱</sup> بخش بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

<sup>۲</sup> 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

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

گیاهان برای تحمل تنش‌های سرمایی به یک دوره سازگاری به سرما نیاز دارند. در نتیجه فرآیند سازگاری با دمای پایین، پروتئین‌های 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 al., 2006). به علاوه، برخی انواع پروتئین

(*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 ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد، رطوبت ۷۵٪ و طول روز ۱۶ ساعت منتقل شدند. دما طی دوره‌های ۲ ساعته 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 سانتریفوژ 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 تیوباربیئوریک اسید (TBA) در حضور تری کلرو استیک اسید (TCA) انجام شد. روش Liu برای پراکسیداسیون

اجتناب از انجماد تولید می‌شوند. پروتئین‌های اخیر با اتصال به بلور یخ از تشکیل آن ممانعت می‌کنند. این پروتئین‌ها در گستره وسیعی از گونه‌های مناطق سرد مانند موش صحرائی (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 پدید آمدن 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.

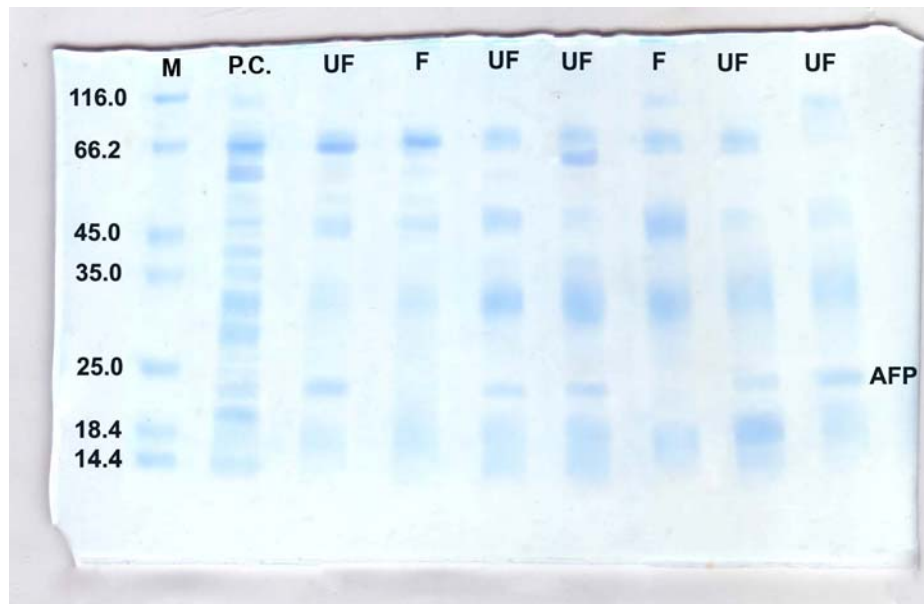
به همین جهت، برای اعمال تنش سرما، گیاهچه‌های ۱۰-۲۰ سانتی‌متری دو گونه از مرکبات، نارنج (*Citrus aurantium*) و سیترنج (*Citrus sinensis* x

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 نرزه را روی ژل الکتروفورز برده، مشخص شد که نمونه‌های یخ زده در ناحیه تقریباً ۲۳ کیلو دالتون باندی را تشکیل می‌دهند که این باند در نمونه‌های یخ زده مشاهده نمی‌شود (شکل ۱).

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

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

$A_{600}$  و  $A_{532}$  جذب نمونه در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و عدد ۱۵۵ ضریب جذب مولی MDA بر حسب  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Heath and Packer, 1968) هستند. نتیجه به صورت  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FW}$  نشان داده شده است. بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق بر روی دو گونه نارنج و سیترونج نشان دادند که AFPs بر اثر قرار گرفتن در دماهای زیر صفر در



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

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

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

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 دی‌اکسید کربن (CO<sub>2</sub>) به مقدار کمتری صورت می‌گیرد (McKersie, 1991). بنابراین، ممکن است اکسیژن به شکل اکسیژن‌های فعال، از جمله سوپراکسید و ترکیبات اکسید شده تک اکسیژن 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 سیترونج 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 دی‌ان‌ها و تری‌ان‌های کونژوگه) در کنار بررسی MDA می‌تواند توجیه نتایج را بهبود بخشد (Blokhina et al., 1999).

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 سیترونج 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

## منابع

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

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

- 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 reoxygenation. *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, bitter-sweet 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., Kadioğlu, 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<sup>+</sup>-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 \*<sup>1</sup>, Majid Galvani, Reza Fotouhi Ghazvini <sup>2</sup> and Vahab Jafarian**<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Natural Sciences University of Guilan, Rasht, Iran<sup>2</sup> 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 people. 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°C.

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

---

\* Correspong Author: sariri@guilan.ac.ir