اثر سرما روی تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در برگ چای شمال ایران

ریحانه سریری[۱*]، عادله رئوفی ماسوله[۲] و غلامرضا بخشی خانیکی[۲]

دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۲/ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه گیلان، رشت
[۲]گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه پیام نور شرق تهران، تهران
[*]مسئول مکاتبات:sariri@guilan.ac.ir

چکیده. هدف این تحقیق بررسی چگونگی ایجاد پروتئین ضدیخ (AFP)، تغییرات فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در تیمارهای دمایی (۲۰، صفر، ۲-، ۵- و۸-) و مقدار پراکسیداسیون لیپیدی در برگ‌های چای شمال ایران است. گیاهچه‌های هشت تا ده برگی چای با مقاومت سرمایی متوسط از چند مزرعه چای لاهیجان تهیه شدند و در گلدان‌های حاوی ماسه و پرلیت ضد عفونی و به نسبت ۱: ۴ کاشته شدند. سپس حدود ده روز در اتاق رشد آزمایشگاه در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و طول روز ۱۶ ساعت با شدت نوری برابر حدود ۱۶۰۰ لوکس نگهداری شدند. از محلول هوگلند، برای آبیاری و تغذیه گیاهچه‌ها و از کود آهن (نیم‌گرم در لیتر) به شکل اسپری استفاده شد. تنش سرمایی به‌تدریج و طی برنامه مشخص دماهای صفر، ۲- و ۵- و ۸- درجهٔ سانتی‌گراد اعمال شد و گیاهچه‌ها برای مراحل بعدی مهیا شدند. سپس بررسی ایجاد پروتئین ضدیخ و تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان براساس روش‌های مربوط انجام گرفت. نتایج نشان داد که در اثر اعمال دماهای زیر صفر پروتئین ضدیخ با وزن مولکولی حدود ۲۰ کیلو دالتون در برگ‌های چای شمال کشور برای مقابله با استرس ناشی از یخ زدگی تولید شد. هم‌چنین با کاهش دما فعالیت آنزیم‌های SOD، APX و CAT در برگ چای افزایش یافت. فعالیت SOD تا دمای ۸- درجهٔ سانتی‌گراد افزایش داشتند درحالی‌که فعالیت APX و CAT تا دمای ۵- درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. ازطرفی، مقدار مالون دی آلدئید MDA، فاکتور نشان‌دهندهٔ میزان پراکسیداسیون لیپیدی، افزایشی اندک در اثر کاهش دما نشان داد. براساس نتایج مزبور می‌توان جمع‌بندی کرد که برگ‌های همیشه سبز گیاه چای با ایجاد پروتئین ضدیخ خاص و افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی تنش‌های سرمایی را به‌خوبی تحمل می‌کند.

واژه‌های کلیدی. استرس سرمایی، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداسیون لیپیدی، پروتئین ضدیخ، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز

The effect of cold temperature on oxidative damage and activity of oxidative enzymes in tea leaves from northern Iran

Reyhaneh Sariri[1*], Adeleh Raeofi Masooleh[2] and Gholam Reza Bakhshi Khaniki[2]

Received 12.05.2015/ Accepted 05.03.2016

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Department of Biology, Tehran Shargh Branch, Payam Nour University, Tehran, Iran
[*]Correspondent author**:** sariri@guilan.ac.ir

Abstract. Tea was planted in Lahijan by Kashefalsataneh in 1930. The main concern about important commercial plants such as tea is the formation of ice crystals in low temperatures. This can damage the live cells leading to lowering the quality of the plant and eventually its death. Formation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress is the result of various environmental stresses leading to freezing. Investigating the variations in any of these factors could help to understand the mechanism of freeze resistance in ever-green plants. The aim of the present research was to investigate lipid peroxidation, the presence of antifreeze protein and variations in the activity of some antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidize (APX) and catalyse (CAT) in tea leaves subjected to 20, 0, -2, -5 and -8°C in tea leaves from the north of Iran. The results showed formation of an antifreeze protein with MW of about 20 KD in response to cold stress. It was also found that the activity of SOD, APX and CAT increased in tea leaves due to cold stress. The activity of SOD increased down to -8°C. APX and CAT increased their activity down to -5°C. On the other hand, the lipid per oxidation factor, MDA, was also elevated in response to the cold stress.

Keywords. antifreeze protein, ascorbate peroxidase, cold stress, catalyse, lipid per oxidation superoxide dismutase

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

مقدمه

لینه نخستین‌بار سال ۱۷۳۵ میلادی در جلد اول کتاب طبقه‌بندی گیاهان، نام علمی چای را *Thea sinensis* نامید. او، بعدها در جلد دوم کتابش از چای با عنوان *Camellia sinensis* نام برد. برگ‌های بالغ چای به رنگ سبز درخشان، چرمی‌شکل و نرم و دارای طولی متغیر از ۵ تا ۲۰ سانتی‌متر هستند (McFarlane & McFarlane, 2004). گل‌ها منفرد یا به صورت دسته‌های ۲ تا ۴ تایی قرار می‌گیرند. گل‌ها خوشبو هستند و ۳-۲/۵ سانتی‌متر قطر دارند، گلبرگ‌های سفید و پرچم‌هایی زرد دارند و خود عقیم‌اند.

برگ سبز چای حاوی پلی‌فنل‌ها، ترپنوئیدها و گروهی از متابولیت‌های ثانویه است که دارای خاصیت آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانتی هستند. علاوه‌بر پلی‌فنل‌هایی چون کتچین‌ها و فلاوونوئیدها، ترکیبات شیمیایی دیگری مانند کافئین تئوبرومین، تئوفیلین، پلی‌ساکاریدها، آمینواسیدها، لیپیدها، ویتامین C، آلومینیوم و منگنز نیز در *Camellia sinensis* وجود دارند (Graham, 1992).

بسیاری از گونه‌های گیاهی، به‌ویژه گونه‌های مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، وقتی در دماهای بالاتر از نقطهٔ یخ‌زدگی بافت ولی پایین‌تر از ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌گیرند، صدمه می‌بینند و دچار سرمازدگی می‌شوند (Almeida *et al.*, 1999). علائم مختلف فنوتیپی در پاسخ به تنش سرمایی شامل کاهش سطح برگ، پژمردگی، کلروز برگ و نکروزه شدن است و علاوه‌بر آن سرمازدگی شدیداً از نمو زایشی گیاهان جلوگیری می‌کند. یکی از پیامدهای مهم سرمازدگی، صدمه شدید به غشا است که این نوع صدمه بیشتر به خشکی و ازدست‌رفتن آب گیاه منجر می‌شود. گیاهان حساس به سرمازدگی معمولاً مقدار بیشتری از اسیدهای چرب اشباع در غشا دارند و بنابراین، عبور مواد از غشا در دمای تغییر فاز بالاتری صورت می‌گیرد. درمقابل، گونه‌های مقاوم به سرمازدگی مقدار بیشتری اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی دارند و دمای تغییر فازشان پایین‌تر است (Burke *et al.*, 1976). درک سازوکار سرمازدگی و اثر مخرب آن بر گیاه می‌تواند تا حد زیادی زمینه انتخاب، تحقیق و توسعه گیاهان مقاوم در مقابل به سرما را فراهم آورد (García-Varela & Fermín, 2003).

بوته چای معمولاً به عنوان گیاه همیشه‌سبز حساس به سرما طبقه‌بندی و توانایی آنها برای بقا در دماهای پایین به اندازه درختان معتدله، که برخی تحمل دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر را دارند نمی‌رسد. ازطرفی، تولید همیشگی و مقدار زیاد گیاه چای تأیید کنندهٔ توانایی آن برای بقا در شرایط یخبندان است. اغلب گونه‌های چای در دمای یخبندان ۲/۲- درجهٔ سانتی‌گراد و پایین‌تر آسیب‌پذیر هستند ولی بعضی از انواع تجاری این گیاه در نواحی با خطر یخزدگی فوق‌العاده زیاد در سراسر دنیا پرورش داده می‌شوند (Almeida *et al.*, 1999).

براساس رفتار درمقابل یخزدگی دو دسته بافت چوبی وجود دارد: اولین دسته با حفظ آب سلولی در حالت فراسرد یا تعادل فوق پایدار از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این نوع واکنش در مقابل یخزدگی، اجتناب از یخزدگی یا فراسردشدن نامیده می‌شود (George & Burke, 1984). دومین دسته با ازدست‌دادن آب سلولی تشکیل یخ در داخل سلول را به خارج سلول انتقال می‌دهند. این نوع واکنش درمقابل یخزدگی، مقاومت یا تحمل یخزدگی نامیده می‌شود (Cattivelli, 2011).

در چای، حفاظت سرمایی ازطریق اجتناب از سرمای غیرفعال و فعال یا فراسرمایی است. براساس مشاهدات در طی یخبندان‌های طبیعی، برگ‌های چای در گروه مقاوم به سرما طبقه‌بندی می‌شود و اکثر گونه‌های چای روییده در حدود ۸- درجهٔ سانتی‌گراد پدیده فراسرد شدن را نشان می‌دهند (George & Burke, 1984). ازطرفی، مهم‌ترین فرضیه در باب صدمه‌های ناشی از استرس سرمایی، فرضیه‌ای به نام لیونز- رایزن در زمینه تغییر فاز چربی‌های غشا است (Lynch & Steponkus, 1987). براساس این فرضیه اولین حس‌کننده حرارتی در سلول سیالیت لیپیدهای غشایی و نخستین اتفاق در سلول حساس به

سرما هنگام قرارگرفتن، تغییر حالت در نظم مولکولی توده چربی‌های غشایی است.

افزایش مقدار و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپراکسید دیسموتاز (McKersie *et al.*, 1993)، کاتالاز (Prasad, 1997; Sala & Lafuente, 1999) پراکسیداز (El-hilali *et al.*, 2003) و پلی‌فنل‌اکسیداز نیز از سازوکارهای مهم سازگاری با سرما هستند (Nguyen *et al.*, 2003).

مواد و روش‌ها

پرورش گیاهچه‌های چای

در اسفند ۱۳۹۲ گیاهچه‌های هشت تا ده برگی گیاه چای با مقاومت سرمایی متوسط از چند مزرعه چای لاهیجان تهیه شدند. قبل از کاشت گلدان‌ها، ماسه و پرلیت به مدت ۳۰ دقیقه با فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در دستگاه اتوکلاو ضدعفونی شد و سپس گیاهچه‌ها در مخلوط ماسه و پرلیت به نسبت ۱: ۴ کاشته شدند. برای اینکه گیاهچه‌ها که در دمای معمولی کاشته شده بودند دچار شوک یا استرس سرمایی یا دیگر ناسازگاری‌های ناشی از انتقال و تعویض محل رشد نشوند، حدود ۱۰ روز در اتاق رشد آزمایشگاه در دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و طول روز ۱۶ ساعت با شدت نوری برابر حدود ۱۶۰۰ لوکس (۳۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه) نگهداری شدند. ازآنجایی‌که گیاهچه‌ها در خاک سبک کاشته شده بودند و این خاک نیز قابلیت نگهداری آب را برای تغذیه گیاهچه‌ها نداشت، از محلول هوگلند (به‌ازای هر لیتر ماکرو یک میلی‌لیتر میکرو) برای آبیاری و تغذیه گیاهچه‌ها و از کود آهن (نیم‌گرم در لیتر) به صورت محلول-پاشی استفاده شد.

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵، منو و دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin, BSA) اتانول، متانول، استیک اسید، بتامرکاپتواتانول، اتیلن‌دی آمین‌تتراستیک اسید (EDTA)، پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، هیدروژن پراکسید، آسکوربیک اسید (ASA)، متیونین (Met)، نیتروتترازولیوم کلرید آبی (NBT)، ریبوفلاوین، تری کلرواستیک اسید(TCA)، افسفریک اسید، گلوتارآلدئید، سدیم استات، سدیم تیوسولفات، نیترات نقره، فرمالدئید، سدیم کربنات، اکریل آمید، بیس اکریل آمید، تریس باز، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، کلریدریک اسید (HCl)، گلایسین (Gly)، گلیسرول، برومو فنل بلو(BFB)، آمونیم پر سولفات و TEMED از نمایندگی‌های شرکت‌های Merck ، Sigma و Fluka تهیه شدند.

دستگاه‌های ژرمیناتور، اسکپتروفتومتر، pH متر، دستگاه انکوباتور ویژه سرمادهی، الکتروفورز، سانتریفیوژ یخچال‌دار، دستگاه اتوکلاو، کروماتوگرافی مایع برای جداسازی سریع پروتئین (FPLC)، فیتوترون و دیگر لوازم ضروری در آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی و دیگر آزمایشگاه‌های دانشگاه گیلان مورد استفاده قرار گرفتند.

ایجاد تنش سرمایی

گیاهچه‌های هشت تا ده برگی به دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد و طول روز ۱۷ ساعت منتقل شدند و طی ۳ روز دمای دستگاه از ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد تا ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ و۳ درجهٔ سانتی‌گراد کاهش یافت تا گیاهان با دماهای زیر صفر به‌تدریج سازگار شوند. طول دورهٔ روشنایی در دمای پایین‌تر از ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای جلوگیری از اکسیداسیون نوری به ۸ ساعت تقلیل یافت. سپس گیاهچه‌ها به دستگاه انکوباتور ویژه سرمادهی منتقل شدند ودمای دستگاه طی ۳ ساعت به صفر درجه سانتی‌گراد رسید و حدود ۲۴ ساعت در این دما باقی ماند. در این مرحله، تعدادی ازگیاهچه‌ها از دمای صفر خارج شدند و برای جلوگیری از تغییر ناگهانی دما ابتدا برای ۸ ساعت در یخچال ۴ تا ۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و بعد به فیتوترون ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد بود منتقل شدند. پس‌از حدود ۶ تا ۷ ساعت در این دما به درجهٔ حرارت اتاق، حدود ۲۰ تا ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافتند تا برای عمل استخراج آماده

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

شوند. دیگر تیمارهای سرمایی نیز در ۲- و ۵- و ۸- درجه سانتیگراد مشابه فوق اعمال و گیاهچه‌ها برای مراحل بعدی مهیا شدند.

اندازه‌گیری مقدار پراکسیداسیون لیپیدی

با توجه به اینکه مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌منزلهٔ محصول دوم پراکسیداسیون لیپیدی، با تیوبار بیتوریک اسید (TBA) واکنش می‌دهد، این سنجش با استفاده از TBA و تری کلرواستیک اسید (TCA) انجام شد (Liu *et al.*, 2009). برای تهیهٔ محلول بافر استوک، به طور هم‌زمان ۰/۵ گرم TBA در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲۰ گرم TCA در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. سپس دو محلول با هم مخلوط شدند و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ۶۰۰ میکرولیتر از استوک بافر، حجم مساوی از ۲/۵ درصد (TBA) و ۶/۵ درصد (TCA) با ۶۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم مخلوط و ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرارگرفتند. بلافاصله در حمام ظرف یخ قرار داده شد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۰۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ جذب محلول رویی ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شدند.

پراکسیداسیون لیپیدی برحسب (µM MDA/gr) از رابطهٔ $\left(\frac{A_{532}-A_{600}}{155mM^{-1}cm^{-1}}\times 1000\right)$ محاسبه شد.

رسوب‌دهی پروتئین‌ها

حدود ۱ گرم از برگ‌های سبز و تازه به کمک نیتروژن مایع ساییده شد. حدود ۶۰ درصد از نمونه‌ها برای انجام روش تشخیص پروتئین و ۴۰ درصد نیز برای سنجش آنزیمی استفاده شدند. ۵۰۰ میکرومول (نیم میلی‌لیتر) از بافر مورد نظر (بافر آنزیمی یا بافر تشخیص پروتئینی) روی عصارهٔ برگی داخل میکروتیوپ اضافه شد و در سانتریفیوژ یخچال‌دار و دمای صفر درجهٔ سانتی‌گراد با دور ۱۴۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با دقت برداشته شد و بعد از انتقال به میکروتیوپ‌های دیگر دوباره سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

تهیهٔ بافر فسفات جهت استخراج

برای استخراج پروتئین از بافر فسفات ۲۰ میلی مولار pH=7 استفاده شد و برای تهیهٔ بافر آنزیمی، ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر مذکور با ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (۰/۱ میلی‌مولار) و ۲ گرم پلی‌وینیل پیرولیدن (PVP) مخلوط و pH آن روی ۷ تنظیم شد. بافر تشخیص پروتئین نیز از انحلال ۰/۳۲ گرم بتامرکاپتواتانول در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار و تنظیم pH محلول روی ۷ به دست آمد.

تعیین پروتئین کل عصاره به روش برادفورد

در این سنجش، اتصال کوماسی بریلیانت بلو به پروتئین در محیط اسیدی، تغییر در طول موج جذب حداکثر (λmax) رنگ از ۴۶۵ به ۵۹۵ نانومتر را ایجاد می‌کند. به این ترتیب جذب در ۵۹۵ نانومتر با غلظت پروتئین رابطه مستقیم دارد. مقدار کل پروتئین در هر نمونه ازطریق اندازه‌گیری جذ ب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر و با توجه به جذب استاندارد آلبومین سرم (BSA) گاوی محاسبه شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز

برای بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش (Bunkelmamm & Trelease, 1996) با اندکی تغییر استفاده شد. در عمل، ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با ۲۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میکرومولار مخلوط و pH آن در ۷ تنظیم شد و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار به آنها اضافه شد. برای بلانک نیز ۹۵۰ میکرولیتر بافر آنزیمی و ۵۰ میکرولیتر از استوک پراکسید هیدروژن ریخته شد و در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت. از طرفی، ۹۳۰ میکرولیتر بافر آنزیمی با ۵۰ میکرولیتر استوک پراکسید هیدروژن و ۲۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم در کووت کوارتز نمونه مخلوط و جذب در ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

سنجش فعالیت کاتالاز

برای سنجش فعالیت کاتالاز از سوبسترای پراکسید هیدروژن ۲۰ میلی‌مولار، بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۱ میکرومولار طبق روش (Maehly & Chance, 1954) استفاده شد. بعد از مخلوط کردن مواد لازم، تغییرات جذب نمونه درمقابل بلانک در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

برای سنجش فعالیت این آنزیم از روش شرح‌داده‌شده با تغییرات مناسب استفاده شد (Alscher *et al.*, 2002). برای این عمل، ۰/۱ میلی لیتر EDTA ۰/۱ میکرومولار، ۰/۲ میلی‌لیتر میتونین ۱۳ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیترکلرید نیتروتترا زولیوم آبی(NBT) ۷۵ میکرومولار و ۰/۲ میلی‌لیتر ریبوفلاوین ۲ میکرومولار مخلوط شدند و با معرف‌های بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.8) به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر رسانیده شدند و در دمای اتاق حدود ۱۲ دقیقه انکوبه شدند. سپس جذب نمونه‌ها درمقابل بلانک در طول موج ۵۶۰ نانومتر در زمان صفر و فواصل زمانی یک دقیقه‌ای تا ۱۲ دقیقه اندازه‌گیری شد.

تعیین فعالیت ویژه آنزیمی

برای تعیین فعالیت ویژه آنزیم‌ها از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{Specific Activity (unit/mg)} = \frac{Total\ activity}{Total\ protein}$$

فعالیت کل آنزیم از تفاوت جذب در دقیقه و در طول موج ۵۰۵ نانومتر (ΔA505/min) و میزان پروتئین کل برحسب میلی‌گرم آنزیم در میلی‌لیتر مخلوط واکنش (mg protein/ml reaction mix) محاسبه شد.

تخلیص پروتئین ضدیخ

برای این عمل از کروماتوگرافی اختصاصی پروتئین‌ها (fast protein liquid chromatography) استفاده شد. در عمل، کروماتوگرافی FPLC با استفاده از دو ستون دی‌اتیل آمینو اتیل (DEAE) و Q- Sepharose به‌عنوان تبادل‌کننده‌های آنیونی و برای الکتروفورز از روش سدیم دودسیل سوافات ژل الکتروفورز، SDS-PAGE ناپیوسته استفاده شد. جهت تخلیص پروتئین، حدود ۲- ۱ میلی‌لیتر از عصارهٔ سلولی استخراج‌شده از برگ‌های چای با استفاده از یک سرنگ به دستگاه FPLC تزریق شد و بعد از دادن برنامه مورد نظر به دستگاه، نمونه‌ها با اعمال برنامه توسط دستگاه در میکروتیوپ‌ها جمع‌آوری شدند. درنهایت، برای تأیید خلوص، عمل الکتروفورز به روش (SDS-PAGE) انجام گرفت.

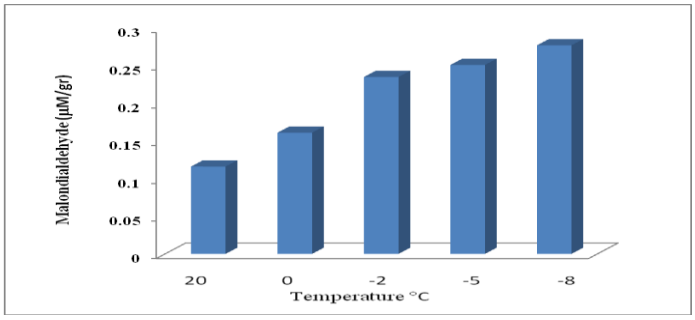
پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورز

عمل الکتروفورز عمودی با استفاده از ژل بالایی ۵ درصد و ژل پایینی ۱۲/۵ درصد و در دستگاه الکتروفورز شرکت پایا پژوهش انجام گرفت. ژل‌های حاصل با دو روش نیترات نقره و کوماسی بریلیانت بلو رنگ‌آمیزی شدند و از محلول رنگ‌زدا برای ازبین‌بردن رنگ زمینه ژل استفاده شد.

نتایج

پراکسیداسیون لیپیدی

شکل ۱ تغییرات مقدار مالون دی‌آلدئید را برحسب (µM MDA/gr) در دماهای معمولی و تنشی برگ‌های چای نشان می‌دهد. به‌طوری‌که ملاحظه می‌شود، این محصول پراکسیداسیون لیپیدی با کاهش دما افزایش یافته است. نتایج بیان می‌کنند که مقدار پراکسیداسیون لیپیدی تا دمای صفر درجه سانتی‌گرادکمتر است زیرا تا این دما هر سه آنزیم آنتی‌اکسیدان فعالیت دارند، اما در دماهای زیرصفر به علت فعال‌بودن فقط یک آنزیم و عدم فعالیت آنزیم‌های دیگر میزان LP بالاست. به این ترتیب، بیشترین میزان MDA در ۸- درجهٔ سانتی‌گراد و در حدود ۰/۲۷۷ میکرومول بر گرم است (شکل ۱).

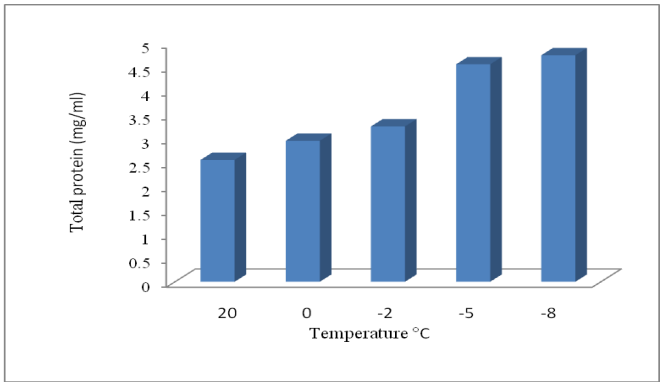


شکل ۱- تغییرات مقدار مالون دی آلدئید در دماهای مختلف. تفاوت معنی‌دار بین مقدار مالون دی‌آلدئید در دماهای بالای صفر با زیر صفر مشاهده شد.

Fig. 1. Variations in malone dialdehyde at various temperatures. Significant differences were observed between concentrations of MDA at temperatures below and above zero degree of centigrade.

اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین در عصارهٔ برگ چای

شکل ۲ نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین کل را نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که در این نمودار مشخص است، مقدار کل پروتئین‌های برگ چای برحسب (mg/ml) نیز با کاهش درجهٔ حرارت افزایش نشان داد و بیشترین آن در ۸- درجهٔ سانتی‌گراد و برابر با ۴/۷۵ (mg/ml) بود. گفتنی است که این مقادیر برای محاسبهٔ فعالیت ویژه همه آنزیم‌های تحت بررسی یکسان در نظر گرفته شدند (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات مقدار کل پروتئین‌ها در عصارهٔ برگ‌های چای. تفاوت معنی‌دار بین مقدار پروتئین در دماهای مختلف مشاهده نشد.

Fig. 2. Variations of total protein in tea leaf extracts at various temperatures. No significant difference was observed.

سنجش فعالیت آنزیمی

از طرف دیگر، برای بررسی عملکرد آنزیمی گیاه در اثر تنش سرمایی، فعالیت بیولوژیکی و فعالیت ویژه برخی آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانت ازجمله کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز نیز تحت اثر تیمارهای دمایی (۲۰، صفر، ۲-، ۶- و۸-) در عصارهٔ برگ‌های چای اندازه‌گیری و مقایسه شدند (جدول ۱).

فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز با توجه به تغییرات جذب و ازطریق فرمول زیر محاسبه شد:

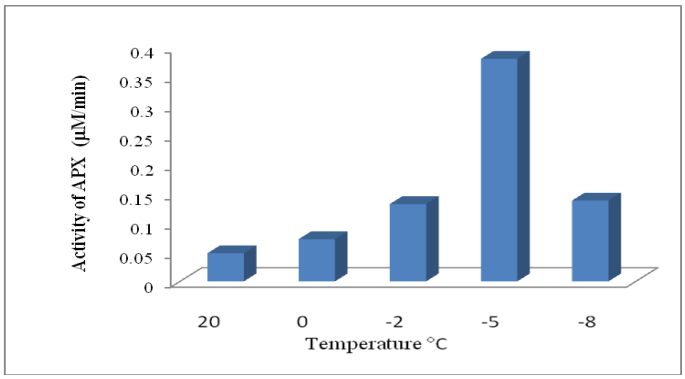
[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

تفاوت جذب در دقیقه در طول موج ۵۰۵ نانومتر (ΔA505/min)

از طرفی، مقدار کل پروتئین در محلول استخراج‌شده برگ‌های چای باتوسط روش برادفورد اندازه‌گیری شده بود و مقدار آن با کاهش دما افزایش نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده برای فعالیت کل نیز همراه با فعالیت ویژه هر سه آنزیم در جدول ۱ آورده شده‌اند.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های چای نشان داد که فعالیت این آنزیم با کاهش دما افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که فعالیت تا دمای ۵- درجهٔ سانتی‌گراد به‌تدریج افزایش پیدا می‌کند و در این دما با ۰/ ۳۸۰ میکرومول بر دقیقه بیشترین فعالیت را دارد (شکل ۳).



شکل ۳- فعالیت بیولوژیکی آسکوربات پراکسیداز در عصارهٔ برگ چای در دماهای مختلف. تفاوت معنی‌دار بین فعالیت آنزیم در ۵- درجهٔ سانتی‌گراد با دیگر دماها مشاهده شد.

Fig. 3. Biological activity of Ascorbate peroxidase in tea leaf extracts at different temperatures. A significant difference was observed between -5°C and other temperatures.

جدول ۱- اثر دما بر فعالیت کل و فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات‌پراکسیداز.

Table 1. The effect of temperature on total and specific activity of catalase, superoxide dismutase and Ascorbate peroxidase.

آنزیم	دما (C)	مقدار کل پروتئین (mg/ml)	فعالیت (µmol/min)	فعالیت ویژه (µmol/min/mg)
کاتالاز	۲۰	۲/۵۵	۳/۶۲	۱/۴۱
	۰	۲/۹۵	۶/۱۷	۲/۰۹
	-۲	۳/۲۵	۷/۲۸	۲/۲۴
	-۵	۴/۵۵	۱۱/۲۵	۲/۴۷
	-۸	۴/۷۵	۷/۱۱	۱/۴۹
آسکوربات پراکسیداز	۲۰	۲/۵۵	۰/۰۴۸	۰/۰۱۸
	۰	۲/۹۵	۰/۰۷۲	۰/۰۲۴
	-۲	۳/۲۵	۰/۱۳۲	۰/۰۴۰
	-۵	۴/۵۵	۰/۳۸۰	۰/۰۸۳
	-۸	۴/۷۴	۰/۱۳۸	۰/۰۲۱
سوپر اکسید دیسموتاز	۲۰	۲/۵۵	۰/۵۵	۰/۲۱۵
	۰	۲/۹۵	۱/۴۴	۰/۴۸۸
	-۲	۳/۲۵	۱/۸۵	۰/۵۶۹
	-۵	۴/۵۵	۳/۲۱	۰/۷۰۵
	-۸	۴/۷۴	۴/۳۵	۰/۹۱۷

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

فعالیت کاتالاز

بررسی نتایج فعالیت کاتالاز نشان داد که فعالیت آنزیم پیش گفته در عصاره برگ چای در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار و برابر با ۱۱/۲۵میکرومول بر دقیقه است (جدول ۱).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به دوآنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز که بیشترین فعالیتشان تا ۵- درجهٔ سانتی-گراد بود، فعالیت زیادی از خود نشان داد. بررسی‌ها نشان داد که فعالیت این آنزیم در برگ چای با کاهش دما به‌تدریج افزایش یافت ودر ۸- درجهٔ سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را از خود نشان داد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ چای در دمای ۸- درجهٔ سانتی‌گراد برابر با ۴/۳۵ میکرومول بر دقیقه به دست آمد (جدول ۱).

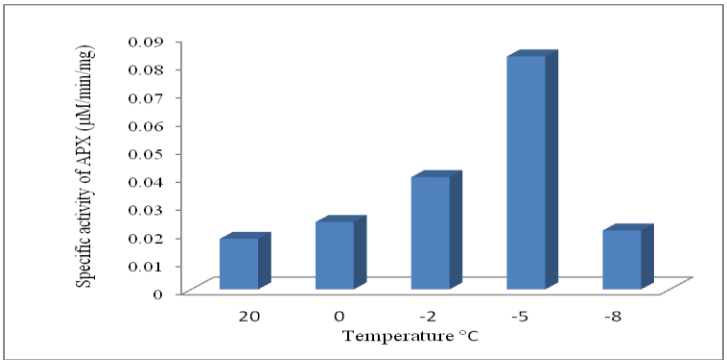
فعالیت ویژهٔ آنزیم‌ها

محاسبه فعالیت ویژه در هر مورد با استفاده از فرمول ذیل و دانستن فعالیت کل آنزیم مورد نظر و نیز مقدار کل پروتئین در عصاره برگ‌های چای انجام گرفت.

$$\text{Specific Activity (unit/mg)} = \frac{Total\ activity}{Total\ protein}$$

فعالیت ویژهٔ آسکوربات پراکسیداز

نتایج نشان دادند که فعالیت ویژهٔ این آنزیم نیز همانند فعالیت آن با کاهش دما افزایش می‌یابد. فعالیت ویژهٔ این آنزیم در برگ‌های چای با کاهش دما تا دمای ۵- درجهٔ سانتی‌گراد به‌تدریج افزایش یافت و در این دما برابر با ۰/۰۸۳ (µmol/min/mg) را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- تغییرات فعالیت ویژه آسکوربات‌پراکسیداز با دما. تفاوت معنی‌دار بین فعالیت آنزیم در ۵- درجهٔ سانتی‌گراد و دیگر دماها مشاهده شد.

Fig. 4. Variations of specific activity of Ascorbate peroxidase according to temperature. A significant difference was observed between -5°C and other temperatures.

فعالیت ویژه کاتالاز

نتایج سنجش فعالیت ویژه کاتالاز در برگ چای نشان دادند که همانند آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، با کاهش دما فعالیت ویژه آنزیم افزایش می‌یابد.

براساس نتایج، کاتالاز برگ چای بیشترین فعالیت ویژه را در دمای ۵- درجهٔ سانتی‌گراد نشان داد که مساوی با ۲/۴۷ (µmol/min/mg) است (جدول ۱).

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

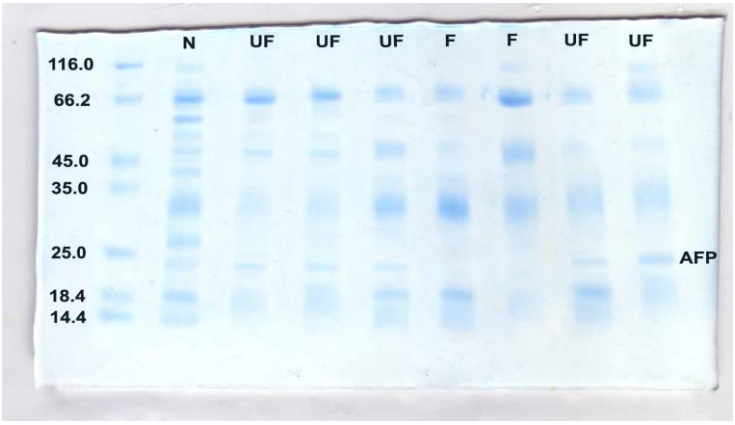
فعالیت مخصوص سوپراکسیددیسموتاز

در آزمایش‌های قبلی برای بررسی فعالیت آنزیمی، مشخص شد که سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌های چای در مقایسه با دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز در دمای پایین‌تری (۸- درجه سانتی‌گراد) فعالیت از خود نشان می‌دهد. ازطرفی، بررسی نتایج سنجش فعالیت ویژه این آنزیم اثبات‌کننده این واقعیت بود که فعالیت ویژه این آنزیم نیز با کاهش دما به‌تدریج افزایش می‌یابد و در دمای ۸- درجهٔ سانتی‌گراد به بیشترین مقدار خود می‌رسد. بر اساس نتایج حاصل از این بخش، فعالیت ویژه این آنزیم در برگ‌های چای در دمای ۸- درجهٔ سانتی‌گراد برابر با ۰/۹۱۷ (µmol/min/mg) می‌شود (جدول ۱).

پروتئین ضدیخ

علاوه‌برسنجش فعالیت آنزیم‌های درگیر در فعالیت ضد یخی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در برگ‌های چای لاهیجان، وجود پروتئین ضد یخ غیرآنزیمی نیز در آنها ردیابی و توجیه شد. نتایج این بررسی نشان داد که بعد از چندین‌بار تخلیص AFP با استفاده از ستون DEAE کروماتوگرافی FPLC عصاره‌های تهیه‌شده از برگ‌های چای، برخلاف بقیه، بعد از قرارگرفتن در فریزر به‌مدت چندین ساعت و حتی چندین روز یخ نمی‌زنند. برای اطمینان، تعدادی از نمونه‌های یخ‌زده و نزده را روی ژل الکتروفورز بردیم و بعد از رنگ‌آمیزی مشخص شد که نمونه‌های مقاوم درمقابل یخ‌زدگی در حدود ۲۴ کیلو دالتون باندی را می‌دهند که این باند در نمونه‌های یخ زده مشاهده نمی‌شود.

ژل الکتروفورز مربوط به عصارهٔ برگ‌های چای رنگ‌آمیزی‌شده توسط دو روش نیترات نقره و کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد. شکل ۵، ستون ۲ (نزدیک مارکر) مربوط به عصارهٔ برگ چای قبل از FPLC است. همچنان‌که ملاحظه می‌شود، این ستون وجود تعدادی پروتئین را نشان می‌دهد که به دلیل عدم تخلیص حاوی تعداد باندهای زیادی است. ستون‌های ۳ تا ۹ مربوط به عصاره‌های برگ‌های چای بعد ازFPLC است. ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۸ و ۹ مربوط به نمونه‌های یخ‌نزده و ستون‌های ۶ و ۷ نیز مربوط نمونه‌های یخ زده هستند. در این شکل نشان داده شده است که نمونه‌های یخ‌نزده تقریباً در ناحیه ۲۴ کیلو دالتون دارای باندی هستند که این باند در نمونه‌های یخ‌زده دیده نمی‌شود.



شکل ۵- ژل پلی‌اکریل‌آمید عصارهٔ برگ‌های چای رنگ‌آمیزی‌شده با کوماسی بریلیانت بلو با استفاده از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل FPLC. (F= Frozen, UF= Unfrozen).

Fig. 5. Polyacryl amide gel stained with comassi brilliant blue using diethyl amino ethyl column in FPLC (F= Frozen, UF= Unfrozen).

عمل تخلیص پروتئین AFP ازطریق کروماتوگرافی FPLC، علاوه‌بر ستون DEAE، با ستون Q- Sepharose نیز انجام گرفت. در این مرحله برای بررسی و اطمینان بیشتر فقط نمونه-های یخ‌نزده مربوط به عصاره‌های تخلیص‌شده با Sepharose Q- روی ژل الکتروفورز برده شد. نتایج نشان دادند که در ژل الکتروفورز مربوط به نمونه‌های یخ‌نزده عصاره برگ چای همه ستون‌ها در ناحیه مشابه یعنی حدود ۲۴-۲۳ کیلودالتون باند مشخص دارند که تأیید کنندهٔ وجود پروتئین خاص ضدیخ در آنهاست که در نمونه‌های یخ‌زده نشان دیده نمی‌شود.

بحث

بدیهی است که مقاومت گیاه چای جهت سالم‌ماندن در دماهای پایین تا حد گیاهان منطقه معتدل، که برخی قادر به تحمل دمای تا ۴۰- درجهٔ سانتی‌گراد یا پایین‌تر نیز هستند، نمی‌رسد (Almeida *et al.*, 1999). درهرحال، فراوانی وجود چای در شمال کشور و دوام چندین ساله آن در موقعیت‌های مختلف آب و هوایی توانایی آنها را برای بقا در مقابل استرس‌های مختلف و ازجمله یخبندان تأیید می‌کند. اغلب صدمه‌های ناشی از یخبندان به گیاهان، در اثر تشکیل یخ در دماهای پایین است. بلورهای یخ در گیاهان از فضای آپوپلاستی شروع می‌شود، چون غلظت پایین‌تری از مواد محلول دارد. تشکیل یخ در آپوپلاست یک شیب فشار بخار را بین آپوپلاست و سلول‌های اطراف ایجاد می‌کند. آب سیتوپلاسمی منجمدنشده به طرف شیب پایین از سیتوزول به آپوپلاست حرکت می‌کند که به بزرگ‌شدن کریستال‌های یخ موجود منجر می‌شود و سبب فشار مکانیکی روی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی و گسیختگی سلول می‌شود (Yelenosky, 1985).

ایجاد دمای ویژه که در اثر تغییر ناگهانی آب و هوا پیش می-آید، مانند کاهش دما تا حد فوق سرد موجب می‌شود که گیاهان بسیار حساس و آسیب‌پذیر شوند. معمولاً تکثیر و پرورش ارقام مقاوم به سرمای گیاهان ازطریق روش‌های اصلاحی یا دستکاری ژنتیکی امکان محافظت طولانی‌مدت را درمقابل سرما فراهم می‌کند. براساس مشاهدات علمی و عملی در طی یخبندان‌های طبیعی، برگ‌های گیاهان همیشه‌سبز مانند مرکبات یا چای در رده مقاوم به سرما طبقه‌بندی می‌شود. طی بررسی‌هایی که در مطالعات دیگران انجام دادیم مدارکی دال بر مقاومت سرمایی در گیاه چای ملاحظه نشد. به‌نظر می‌رسد که تحقیق حاضر اولین مورد در باب مقاومت سرمایی این گیاه و ایجاد پروتئین ضدیخ باشد که سازوکار آن به تحقیقات بیشتر در آینده نیاز دارد. درهرحال، گزارش شده است که برخی گیاهان با برگ‌های سبز زمستانی مانند اکثر گونه‌های مرکبات در دمای ۱۰- درجهٔ سانتی‌گراد پدیده فراسردشدن را از خود نشان می‌دهند (Yelenosky & Guy, 1982).

ازآنجایی‌که گیاهان دارای مکان ثابت هستند، چنانچه تحمل تنش‌های محیطی مثل شوری، خشکی، سرمازدگی، یخ‌زدگی در آنها وجود نداشته باشند، خیلی‌زود از بین می‌روند. اگرچه ممکن است ماهیت فیزیکی و فیزیولوژیکی این تنش‌ها با هم متفاوت باشد، می‌توان گفت تقریباً همه سازوکارهای مقاومت در مقابل تنش یک رشته واکنش‌های مشابه در گیاه را موجب می‌شوند که ناشی از تحریک بعضی ژن‌های گیاهی است. به عبارت دیگر، یک سلسله علائم بیولوژیکی پیچیده در سازگاری گیاه به این شرایط محیطی نامساعد وجود دارد (Lang *et al.*, 2005).

در تحقیقات مشابه با تحقیق حاضر بیان شده است که اغلب گیاهان، به‌خصوص گونه‌های مقاوم، برای حفاظت سلول‌ها و بافت‌های خود از استرس‌های اکسیداتیو متابولیت‌های ثانویه متعددی تولید می‌کنند. برای مثال، در تأیید نتایج ما، ترکیبات ایجاد شده در اثر تنش‌های سرمایی شامل قندها، آمینواسیدها، پروتئین‌های ضدیخ، مواد آنتی‌اکسیدانت مثل آسکوربات، گلوتاتیون، β‌کاروتن، α-توکوفرول و آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت ازجمله سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) گزارش شده‌اند (Gilmour & Thomashow, 1991). بررسی برخی از این ترکیبات در تحقیق ما نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

SOD، CAT و APX در برگ‌های چای در تیمارهای دمایی پایین تغییرات درخور توجهی داشتند. از طرفی، نتایج پژوهش حاضر تأیید کنندهٔ این واقعیت است که آسیب ناشی از استرس سرمایی موجب تخریب ساختمان بسیاری از لیپیدهای غشایی شد و نتیجه این تخریب با افزایش مقدار محصول شیمیایی اکسیداسیون لیپیدها یعنی مالون دی آلدئید به تأیید رسید.

به‌این ترتیب می‌توان گفت که توانایی گیاه هنگام هر نوع استرس برای پراکنده‌ساختن انرژی اضافی و خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد دچار اختلال می‌شود و جهت افزایش مقاومت و تحمل این‌گونه استرس‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی خود را به‌سرعت افزایش می‌دهند.

کاتالاز (CAT)، پراکسیدازها (POX) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) از دسته اکسیدوردکتازها هستند که با سازوکارهای مشابه رادیکال‌های آزاد ناشی از سرمازدگی را مهار می‌کنند. در تحقیقات مشابه پژوهش ما در باب چای، برای گیاهان دیگر مانند یونجه ترانس ژنیک گزارش شده است که بیان cDNA آنزیم Mn-SOD افزایش نشان داده و موجب افزایش تحمل یخ‌زدگی در مراحل اولیه تنش شده است (McKersie *et al.*, 1993). نتایج مطالعه پیش گفته بیان می‌کند که گیاه تحت تأثیر بیان ترانس ژن Mn- SOD، می‌تواند بعد از استرس یخ‌زدگی تا دمای ۱۰- درجهٔ سانتی‌گراد رشد کند، ولی بعد از ۱۶- درجه دیگر قادر به رشد نیست. این پدیده نشان می‌دهد که تا ۱۰- درجهٔ سانتی‌گراد به دلیل بالابودن سطح SOD، مقدار اکسیژن فعال و سوپر اکسید پایین است. درنتیجه، گیاه قادر به رشد است ولی در ۱۶- درجه به علت پایین‌بودن سطح SOD، سطح اکسیژن فعال بالاست و درنتیجه احتمال آسیب افزایش می‌یابد. می‌توان نتیجه گرفت که افزایش فعالیت (SOD) در تحقیق حاضر از طریق نظریه پیش گفته توجیه مناسبی خواهد داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و APX با کاهش دما در برگ‌های چای لاهیجان افزایش می یابد. فعالیت CAT تا دمای ۵- درجهٔ سانتی‌گراد و SOD تا دمای ۸- درجهٔ سانتی‌گراد افزایش یافت. درحالی‌که فعالیت APX تا دمای ۵- درجهٔ سانتی‌گراد افزایش یافت. به این ترتیب، نقش SOD برای تحمل دماهای پایین و یخ‌زدگی در برگ‌های چای لاهیجان بیش از دو آنزیم دیگر است؛ به‌طوری‌که قبلاً ذکر شد، تحقیق مشابهی در باب گیاه چای وجود نداشت و بنابراین، نتایج کار ما در اثر استرس سرمایی ازطریق مقایسه با گیاهان دیگر، به‌خصوص مرکبات، انجام شد.

نتایج تحقیق در باب مرکبات نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های GR، APX و CAT تنها در ارقام مقاوم این دسته گیاهان افزایش نشان می‌دهند (Gilmour & Thomashow, 1991). این نتایج در باب آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت برخی مرکبات می‌تواند تأییدکننده نتایج تحقیق ما در باره گیاه چای باشد. در یک بررسی دیگر مشخص شد که سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در گونه‌های مقاوم برخی مرکبات مانند نارنج و گریپ فروت در اثر اعمال دماهای زیر صفر افزایش می‌یابد (Sala & Lafuente, 1999). طبق نتایج به‌دست آمده در مطالعه، گونه‌های مقاوم نارنج، نارنگی و نسبتاً مقاوم گریپ فروت درمعرض دماهای پایین با افزایش فعالیت ویژه آنزیمی PPO عملاً مقاومت بیشتری دربرابر استرس یخ‌زدگی از خود نشان دادند. این یافته نیز با نتایج تحقیق ما هم‌خوانی دارد و می‌تواند توجیه‌کننده مقاومت بالای برگ‌های چای به استرس سرمایی باشد.

بررسی‌های نظری ما بیان‌کننده این بودند که اغلب مطالعات انجام‌شده در زمینه استرس سرمایی راجع به مرکبات مختلف انجام شده است. این پژوهش گسترده اینترنتی و کتابخانه‌ای ما را بر آن داشت که استرس سرمایی را در مرکبات شمال کشور در تحقیق‌های آینده در نظر قرار دهیم. درهرحال، برای بحث در یافته‌های برگ چای توانستیم از نتایج آنها توجیه مقبول و مفیدی داشته باشیم. به عنوان مثال، El-hilali و همکاران (2003) گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیمPPO میوه‌های نارنگی فورچون، تحت استرس سرمایی افزایش یافت که ارتباط حساسیت به سرمازدگی بافت و انگیزش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی راتأیید می‌کند. حساس یا مقاوم بودن میوه‌های نارنگی فورچون به استرس سرمایی، احتمالاً به فعالیت آنزیم

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

CAT و متابولیسم پراکسید هیدروژن بستگی دارد. این نتایج نیز تأییدکنندهٔ کارهای تحقیقاتی ما در باب مقاومت سرمایی برگ-های چای است. پژوهشگران مزبور بیان کردند که در میوه‌های نارنگی فورچون که استرس سرمایی دیده بودند فعالیت آنزیم CAT افزایش یافت، درصورتی‌که در میوه‌هایی که تحت تأثیر ترکیب آمینو تریازول (3-amino-1,2,4-triazole: AT) (مهارکننده کاتالاز در حضور پراکسید هیدروژن) قرار گرفته بودند، فعالیت CAT کاهش نشان داد (Sala & Lafuente, 1999). علاوه‌بر مرکبات، در دیگر گیاهان نیز افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و حتی لیازها یکی از سازوکارهای دفاعی گیاه برای مقابله با استرس دمای پایین و یخزدگی است. Nguyen و همکاران (2003) گزارش کردند که استرس دمای پایین در نهال‌های موز به افزایش سطح فعالیت آنزیمی فنیل-آلانین آمونیالیاز و PPO منجر شد. فعالیت آنزیم‌های CAT، APX، POX وPPO در گیاهان زیتون تحت استرس خشکی در برگ و ریشه افزایش نشان دادکه با نتایج تحقیق حاضر در باب برگ‌های چای لاهیجان هم‌خوانی دارد (Corpas *et al.*, 2006). در یک پژوهش مشخص شد که در گندم متحمل سرما به‌علت حضور پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock Proteins: HSPs) توانایی سرمازدگی افزایش یافت (Danyluk *et al.*, 1991). در تضاد با نتایج ما، که افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در استرس‌های سرمایی را گزارش کرد، نشان داده شده است که فعالیت SOD در برگ گوجه-فرنگی در اثر استرس دمایی و در تاریکی کاهش می‌یابد (Sabehat *et al.*, 1996). ازطرفی و در تأیید نتایج تحقیق حاضر، Clare و همکارن (1984) نشان دادند که در گیاه مقاوم به سرما *Chlorella Ellipsoidea*، مقدار SOD در استرس سرمایی بالا می‌رود. در مطالعه‌ای که رد باب برنج صورت گرفت، مشخص شد که فعالیت آنزیم CAT در رویان و ریشه برنج که تحت استرس سرمایی قرار گرفتند، افزایش می‌یابد، درحالی‌که در برگ‌ها فعالیت آن کاهش نشان می‌دهد. آنها دریافتند که در گیاهان مقاوم، درصورتی‌که مدت سرما طولانی باشد، آسیب‌های ناشی از سرما زیاد می‌شود ولی CAT می‌تواند در فرآیند ذوب – انجماد فعالیت خود را از سر بگیرد. این نتایج بیان‌کنندهٔ آن هستند که آنزیم CAT یکی از فاکتورهای مهم در جوانه‌زنی دانه‌های برنج است (Saruyama & Tanida, 1995).

در پژوهشی دیگر درباب برگ‌های گیاه جو، که یک دوره دمای زیر صفر را گذرانده بودند، دو آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در اثر استرس یخزدگی افزایش یافتند (Olien & Clark, 1995). این تحقیق نیز در تأیید یافته‌های ما بود و نتایج آن در زمینه افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور در استرس سرمایی هم‌خوانی دارند. درواقع افزایش فعالیت CAT و SOD و حضور ایزوفرم‌های این آنزیم‌ها در فضاهای بین سلولی در برگ جو از مهم‌ترین سازوکارهای افزایش تحمل یخزدگی در این گیاه است.

درنهایت می‌توان اضافه کرد که علاوه‌بر گیاه چای در این تحقیق، از جمله گیاهانی که در آن‌ها AFPها هنگام قرارگرفتن در دماهای سرد تولید می‌شود، می‌توان به گندم زمستانی، انواع جو، کلم، هویج، چاودار و از گیاهان درختی هلو، سپیدار و مرکبات اشاره کرد (Griffith *et al.*, 1997).

نتیجه‌گیری نهایی

چای گیاهی مقاوم و همیشه‌سبز است که در نواحی شمالی کشور ارزش اقتصادی زیادی دارد. این گیاه که درختچه چندین ساله است می‌تواند تنش‌های مختلف را تحمل کند و با فعال-کردن ویژگی‌های مختلف عمر و کیفیت ماندگار داشته باشد. نتایج تحقیق ما نشان دادند که ایجاد پروتئین ضد یخ در برگ-های این گیاه یکی از بارزترین روش‌های مبارزه با استرس سرمایی است. وجود این پروتئین که وزن مولکولی حدود ۲۲ کیلودالتون دارد با بررسی‌های الکتروفورزی به اثبات رسید، ولی برای دریافتن چگونگی ساختمان آن و سازوکار تشکیل آن بررسی‌های گسترده‌تر نیاز است که آن را در ادامه برنامه‌های پژوهشی خود قرار داده‌ایم. از طرفی، سازوکارهای آنزیمی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نیز می‌تواند تا حد زیادی خطرها و آسیب‌های ناشی از کاهش دما را مرتفع کنند.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

در تحقیق حاضر نشان داده شد که ۳ آنزیم مهم آنتی‌اکسیدانتی، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در اثر کاهش دما فعالیت خود را با هدف خنثی کردن و به حداقل رسانیدن آسیب‌های اکسیداتیو افزایش می‌دهند. ازطرفی، نتایج تحقیق ما افزایش مقدار مالون دی‌آلدئید را در تنش‌های سرمایی نشان داد که تأئید کنندهٔ شروع آسیب اکسیداتیو می‌باشد.

References

Almeida, A.S., Cavieres, L.A. and Bravo, L.A. 1999. Freezing resistance of high-elevation plant species is not related to their height or growth-form in the central Chilean Andes. – Environmental and Experimental Botany 69: 273-278.

Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. – Journal of Experimental Botany 53: 1331-1341.

Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – Anal. Biochem. 72: 248-254.

Bunkelmann, J.R. and Trelease, R.N. 1996. Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. – Plant Physiol. 110: 589-598.

Burke, M.J., Gusta, L.V., Quamme, H.A., Weiser, C.J. and Li, P.H. 1976. Freezing and injury in plants. – Annual Reviews in Plant Physiology 27:507-528.

Cattivelli, L. 2011. More cold tolerant plants for warmer world. – Plant Science 180: 1-2.

Clare, D.A., Rabinowitch, H.D. and Fridovich, I. 1984. Superoxide dismutase and chilling injury in *Chlorella ellipsopides.* – Arch. Biochem. Biophys. 231:158-163.

Corpas, F.J., Corpas, F.J., Fernández-Ocaña, A., Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Sandalio, L.M., del Río, L.A. and Barroso, J.B. 2006. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. – Plant Cell Physio. 47: 984-997.

Danyluk, J., Rassart E. and Sarhan, F. 1991. Gene expression during cold and heat shock in wheat. – Biochem. Cell Biol. 69: 383-391.

El-hilali, F., Ati-oubahou, A., Remah, A. and Akhayat, O. 2003. Chilling injury and peroxidase activity changes in fortune mandarine fruit during low temperature storage. – BULG. J Plant Physiol. 29: 44-54.

García-Varela, S. and Fermín, R. 2003. Freezing avoidance mechanisms in juveniles of giant rosette plants of the genus Espeletia. – Acta Oecologica 24: 165-167.

George, M.F. and Burke, M.J. 1984. Super cooling of tissue water to extreme low temperature in overwintering plants. – Trends in Biochemical Sciences 9: 211-214.

Gilmour, S.J. and Thomashow, M.F. 1991. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. – Plant Mol. Biol. 17: 1233-1240.

Graham, H.N. 1992. Green tea composition, consumption, and poly-phenol chemistry. – Preventive Medicine 21: 334-350.

Griffith, M., Antikainen, M., Hon, W.C., Pihakaski-Maunsbach, K., Yu, X.M., Chun, J.U. and Yang, D.S.C. 1997. Antifreeze proteins in winter rye. – Physiologia Plantarum 100: 327-332.

Lang, P.C.K., Zhang, R.C., Ebel Dane, F. and Dozier, W.A. 2005. Identification of cold acclimated genes in leaves of *citeus unshiu*. by mRNA differential display. – Gene 359: 111-118.

Liu, S.C., Lin, J.T., Wang, C.K., Chen, H.Y. and Yang, D.J. 2009.Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinenesis* Sonn.) flowers. – Food Chem. 114: 577-581.

Lynch, D.V. and Steponkus, P.L. 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). – Plant Physiol. 83: 761-767.

Maehly, A.C. and Chance, B. 1954. The assay of catalases and peroxidases. – Methods of Biochemical Analysis 1: 357-424.

McKersie, B.D.M., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S.R., Bowler, C., Inzé, D., D'Halluin, K. and Botterman, J. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). – Plant Physiol. 103: 1155-1163.

Nguyen, T.B.T., Ketsa, S. and Doorn, W.G.V. 2003. Relationship between and the activities of polyphenol oxidase and phenylalnine ammonia-lyase in banana

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]

peel during low temperature storage. – Postharvest Biology and Technology 30:187-193.

Olien, C.R. and Clark, J.L. 1995. Freeze-induced changes in carbohydrates associated with hardiness of barley and rye. – Crop Sci. 35:496-502.

Prasad, T.K. 1997. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. – Plant Physiol. 114:1369-1376.

Sabehat, A., Weiss, D. and Lurie, S. 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. – Plant Physiol. 110: 531-537.

Sala, J.M. and Lafuente, M.T. 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. – J. Agric Food Chem. 47: 2410-2414.

Saruyama, H. and Tanida, M. 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). – Plant Sci. 109: 105-113.

Yelenosky, G. 1985. Cold hardiness in citrus. In: Janick, G. (ed). Horticultural Review. – Timber Press. pp: 201-238.

Yelenosky, G. and Guy, C.L. 1982. Seasonal variations in physiological factors implicated in cold hardiness of citrus trees. – Academic Press New York. pp: 561-573.

*****

Sariri, R., Raeofi Masooleh, A. and Bakhshi Khaniki, G.R. 2016. The effect of cold temperature on oxidative damage and activity of oxidative enzymes in tea leaves from northern Iran. – Nova Biologica Reperta 2: 298-311.

سریری، ر.، رئوفی‌ماسوله، ع. و بخشی‌خانیکی، غ.ر. ۱۳۹۴. اثر سرما روی تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برگ چای شمال ایران. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۲: ۳۱۱-۲۹۸.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.4.6.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.4.298]