

مقایسه برخی سازوکارهای حفاظت نوری برگهای بهاره و زمستانه گیاه یاس در شرایط تنش خشکی

قادر حبیبی

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۳۰

چکیده

در این پژوهش، تأثیر اعمال تنش آبی ۲۵ روزه بر خصوصیات فیزیولوژیکی برگهای بهاره و زمستانه گیاه یاس (*Jasminum fruticans* L.) مورد مطالعه قرار گرفت. در فصل بهار، سنجش پارامترهای مربوط به رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیسم فنلی، تفاوت‌های آشکاری را بین برگهای زمستانه و بهاره مشخص کرد. مقادیر کلروفیل b، کاروتنوئید، فنل کل، فلاونوئید و محتوی نسبی آب (RWC) و همچنین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در برگهای زمستانه نسبت به برگهای بهاره افزایش معنی‌دار نشان دادند و توانایی برگهای زمستانه جهت فروکش غیرفتوشیمیایی انرژی نوری در فتوسیستمها را بالا بردند. اگرچه خشکی تغییر معنی‌داری در پارامترهای فوق ایجاد نکرد. خشکی باعث افزایش متابولیت‌های اکسیدان شامل مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در برگهای بهاره شد. پارامتر بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) از شرایط خشکی متأثر نشد ولی پارامتر شاخص کارایی فتوسیستم (PI_{abs}) در برگهای بهاره در پاسخ به خشکی کاهش یافت. همچنین تغییرات منحنی فلورسانس کلروفیل (OJIP) در برگهای زمستانه متفاوت از برگهای بهاره بود. بنابراین به نظر می‌رسد که دستگاه فتوسنتزی برگهای زمستانه نسبت به برگهای بهاره در پاسخ به خشکی مناسب عمل کرد و دلیل عدم کاهش PI_{abs} در برگهای زمستانه در پاسخ به خشکی با نقش کاروتنوئیدها و فنلها (به‌عنوان جاذب‌های نوری) در حفاظت فتوسیستمها مرتبط بود.

واژه‌های کلیدی: فلورسانس کلروفیل، *Jasminum fruticans*، شاخص کارایی فتوسیستم، فنیل آلانین آمونیالیز، تنش آبی

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۷۸۲۸۰۵۵، پست الکترونیکی: gader.habibi@gmail.com

مقدمه

اکسیدکربن اتمسفر، تولید ماده خشک در گیاهان تحت تنش خشکی افت می‌کند (۷). همچنین، تنش خشکی تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) را القاء می‌کند. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، باعث تحریک تجزیه پروتئین ها و لیپیدها شده و منجر به تخریب غشاهای می‌گردد. گیاهان برای مقابله با این اثرات مضر، صاحب یک سیستم دفاعی با کارایی بالا هستند که رادیکال‌های آزاد را از بین برده یا خنثی می‌کند. این سیستم دفاعی شامل راهکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم‌های این سیستم دفاعی

به دنبال تغییرات اقلیمی در بخش‌های قابل توجهی از کره زمین، خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید ماده خشک و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد (۱۹ و ۲۰). تنش خشکی باعث کاهش شاخص گشوده‌گی روزنه‌ها، سرعت تعرق و فتوسنتز خالص می‌شود. هرچند کاهش سطح تعرق (برگ‌ها) و افزایش وزن، طول و تعداد انشعابات ریشه از روش‌های افزایش سازگاری با شرایط خشکی در گیاهان محسوب می‌شوند (۲۷ و ۲۸) و موجب کاهش اتلاف آب می‌شوند، ولی با کاهش دسترسی به دی

سبز هستند. با شروع فصل بهار و گرم شدن هوا، برگهای بهاره جدید در کنار برگهای زمستانه رشد می‌کنند که نسبت به برگهای زمستانه دارای سطح وسیعی هستند. مهمترین فرضیه تحقیق این بود که با توجه به مورفولوژی و قطر غیریکسان برگهای زمستانه و بهاره، انتظار می‌رفت این برگها از نظر محتوی متابولیت‌های اکسیدانت و آنتی اکسیدانت، متابولیسم فنلی، و رنگیزه‌های فتوستزی نیز متفاوت باشند و در نتیجه بخاطر تفاوت در ظرفیت فتوستزی، پاسخ این دو نوع برگ به تنش خشکی نیز متفاوت باشد. در نتیجه جهت تعیین قابل قبول بودن فرضیه فوق، این تحقیق بر روی برگهای مختلف گیاه یاس در فصل بهار در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

مواد و روشها

کشت گیاهان و اعمال تیمارها: پایه‌های جوان با طول تقریبی ۲۲ سانتی‌متر که از گیاه مادر منشعب شده بودند، جداسازی و در مزرعه‌ای در اطراف شهرستان میاندوآب (استان آذربایجان غربی) در بهار سال ۱۳۹۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار کشت شدند. این منطقه در طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۶ دقیقه شرقی و در عرض ۳۶ درجه و ۵۸ دقیقه شمالی در وسط جلگه‌های منتهی به دریاچه ارومیه با ارتفاع ۱۳۱۴ متر از سطح دریا قرار دارد. متوسط بارندگی در این منطقه ۲۷۵ میلی‌متر و رطوبت نسبی ۶۱/۴ درصد بود. بافت خاک مزرعه لوم سیلتی بود. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

پس از گذران فصل تابستان، پاییز و زمستان، و ظاهر شدن برگهای بهاره در کنار برگهای زمستانه، گیاهان به مدت ۲۵ روز تحت تیمار خشکی (توقف آبیاری و رسیدن به ۴۰ درصد ظرفیت مزرعه) قرار گرفتند و سپس بلافاصله گیاهان برداشت شدند. سنجش رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها بر روی نمونه‌های تازه برداشت شده و یا نگهداری شده در ازت مایع انجام شد.

شامل سوپراکسید دیس موتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، دهیدروآسکوربات رودوکتاز (DHAR) و گلوکاتیون رودوکتاز (GR) است. سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربیک اسید (ASA)، گلوکاتیون، آلفاتوکوفرول (ویتامین E) و کاروتنوئیدها می‌باشد (۱۴).

همان‌طور که گفته شد فتوستز از جمله فرایندهایی است که به شدت تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد (۴). با افزایش شدت خشکی، ظرفیت زنجیره انتقال الکترونی تکمیل شده و احتمال تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد. خشکی می‌تواند با آسیب رساندن به مرکز تولید اکسیژن و تجزیه اجزاء پلی پپتیدی فتوسیستم II در نهایت منجر به غیرفعال شدن PSII شود (۲۱ و ۳۵). این تغییر با تحریک تولید ROS باعث ممانعت نوری و بروز آسیب اکسیداتیو در اجزای داخلی سلول‌ها می‌شود (۳). گیاهان برای جلوگیری از آسیب رسیدن به فتوسیستم II، سازوکارهایی تحت عنوان سازوکارهای حفاظت نوری را اتخاذ می‌کنند که از جمله آنها می‌توان به حرکت برگ و کلروپلاست، انباشت فنل در اپیدرم برگ به منظور جذب پرتو فرابنفش، فعال سازی سیستم دفاع آنتی اکسیدانت آنزیمی و غیرآنزیمی (مثل انباشت کاروتنوئید، گلوکاتیون و غیره...)، افزایش عملکرد مکانیسم خاموش شدگی غیرفتوشیمیایی فلورسانس کلروفل در طی انتقال الکترون و تنفس نوری اشاره کرد (۳۰).

پاسخ به خشکی و سازگاری در گونه‌های مختلف براساس سازوکارهای مختلفی انجام می‌گیرد و در برخی گیاهان، حتی برگهای مختلف یک گیاه پاسخهای متفاوتی به خشکی می‌دهند که با مورفولوژی آن برگها در ارتباط است (۱۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که پاسخ گونه‌های مختلف گیاه یاس نسبت به خشکی، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۰). از طرف دیگر پس از گذران فصل زمستان، گیاه یاس برگهایی دارد که دچار خزان نشده و

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

عمق خاک	بافت خاک	ظرفیت مزرعه	اسیدیته	هدایت الکتریکی	آهن	منگنز	روی
Depth (cm)	Soil texture	FC (%)	pH	EC (dS. m ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
0-50	لوم سیلتی	20.5	7.5	1.75	9.24	6.21	0.93

(فلوئورسانس پایه) و F_m (فلوئورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی فلوئورسانس از تست JIP بهره گرفته شد. تست JIP داده‌های ثبت شده اولیه توسط دستگاه فلوئورسانس سنج را به پارامترهای بیوفیزیکی تبدیل می‌کند و کمیت مراحل جریان انرژی را طی فتوسیستم II تعیین می‌کند. در این دستگاه برای تولید منحنی فلوئورسانس OJIP (O-J-I-P rise)، از نور قرمز با طول موج ۶۲۷ نانومتر و شدت ۳۵۰۰ میکرومول/مترمربع/ثانیه (برای اطمینان از رسیدن به پیک F_m) استفاده می‌شود. شاخص‌های زیر در اندازه‌گیری‌های فلوئورسانس اولیه مورد استفاده قرار گرفته است: شدت فلوئورسانس بیشینه (F_m)، شدت فلوئورسانس در ۵۰ میکروثانیه (به عنوان F_0 در نظر گرفته می‌شود)، شدت فلوئورسانس در ۳۰۰ میکروثانیه ($F_{300\mu s}$)، نسبت فلوئورسانس متغیر (V) و شدت فلوئورسانس در ۲ میلی‌ثانیه (مرحله J) که نشانگر F_v است. سپس محاسبات لازم برای بدست آوردن سایر پارامترها از جمله شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) و بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) انجام شد (۲۸ و ۲۹).

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز: فعالیت فنیل آلانین آمونیالایز (PAL) مطابق روش زوکر (۳۶) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ابتدا عصاره آنزیمی در بافر ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم با pH=۷/۸ و حاوی اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) با غلظت ۲ میلی‌مولار، ۱۸ میلی‌مولار مرکاپتواتانول و ۰/۱ درصد تریتون X-100 استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شده و رو شناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم

اندازه‌گیری مقدار نسبی آب (RWC) و شاخص LMA: مقدار نسبی آب برگ‌ها با استفاده از وزن تر (F_w)، وزن خشک (D_w) و وزن اشباع (S_w) و براساس رابطه $RWC=100 \times (F_w - D_w) / (S_w - D_w)$ که توسط لارا و همکارانش (۲۲) ارائه شده است، بدست آمد. پس از اندازه‌گیری وزن خشک و سطح برگ‌ها، شاخص LMA براساس وزن خشک برگ در واحد سطح ($g DW/m^2$) محاسبه شد.

سنجش رنگیزه‌های برگ: جهت سنجش مقدار رنگیزه‌ها، نمونه‌های گیاهی با آب دو بار تقطیر شستشو شده و بر روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها در داخل ورقه آلومینیومی قرار گرفته و در ازت مایع تا زمان سنجش نگهداری شدند. استخراج ماده مورد نظر با استفاده از استون بر روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها به وسیله اسپکتروفتومتر، بعد از ۲۴ ساعت استخراج در استون ۱۰۰ درصد تعیین شد. جذب در ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت کلروفیل a ، b و کل طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد (۲۳).

$$Chl a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$Chl b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$Total\ carotenoids = 1000 A_{470} - 2.270 Chl a - 81.4 Chl b / 227$$

سنجش پارامترهای فلوئورسانس کلروفیل و تست JIP: جهت تعیین فلوئورسانس کلروفیل، از دستگاه فلوئورسانس سنج (PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, PE 32 1JL, England) استفاده شد. پارامترهای فلوئورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش یافته با تاریکی (به مدت حداقل ۲۰ دقیقه) شامل F_0

بورات (pH=8/8) و ۵ میلی مولار L-فنیل آلانین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه به منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۲۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم براساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای تولید یک نانومول سینامیک اسید محاسبه شد.

سنجش فنل کل: از آنجایی که بیشترین ترکیبات فنلی گیاهان از نوع پلی‌فنل‌ها می‌باشد، از روش معرف فنلی فولین سیوکالتو (۲۴) برای سنجش فنل کل استفاده شد. برای این منظور ۵ گرم بافت تر برگ جداسازی شده و پس از پودر شدن توسط هاون در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد و با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف گردید. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین با ۲۵ میکرولیتر عصاره و ۵۰۰ میکرولیتر محلول آبی کربنات سدیم ۲۰ درصد مخلوط شد. نمونه‌های شاهد فاقد عصاره بودند. پس از قرار دادن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه جذب آنها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت فنل کل براساس منحنی استاندارد اسید گالیک به دست آمد. برای هر عصاره این سنجش ۴ بار تکرار شد و میانگین فنل کل موجود در عصاره تیمارها به صورت میلی گرم اسید گالیک در گرم بافت بیان شد.

سنجش فلاونوئیدها: برای سنجش غلظت فلاونوئیدها، ۵ گرم بافت تر برگ در متانول حاوی آلومینیوم کلراید دو درصد استخراج شده و پس از سانتریفوژ، روشناور برداشته شده و جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر تا ۱۶ میلی گرم در لیتر) به عنوان استاندارد استفاده گردید و غلظت فلاونوئیدها براساس واحد میلی گرم کوئرستین بر یک گرم وزن تر برگ محاسبه شد (۲۷).

سنجش فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با استفاده از روشهای توصیف شده پیشین ما (۱۶) سنجش شدند. فعالیت آنزیم سوپراکسید

دیس موتاز (SOD) مطابق روش جیاناپولیتیس و رایس (۱۳) و براساس درصد ممانعت از احیاء NBT به ترکیب ارغوانی رنگ دی فورمازان بوسیله رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) حاصل از فتولیز ریپوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش سایمون و همکارانش (۲۷) و براساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز از طریق تست گایاکول و تبدیل آن به تترایاکول به انجام رسید. نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۱۰ میلی مولار و pH=7 استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. سنجش فعالیت آنزیم در بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۱۰ میلی مولار حاوی ۵ میلی مولار H_2O_2 و ۴ میلی مولار از گایاکول به انجام رسید. واکنش با افزودن عصاره آنزیمی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شده و جذب نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم براساس ضریب خاموشی تترایاکول برحسب واحد میکرومولار تترایاکول بر میلی گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (۱۵).

اندازه‌گیری متابولیت‌ها: سنجش مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها براساس روش بومیناتان و دوران (۶) صورت گرفت. عصاره برگ در محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشناور با محلول ۲۰ درصد از تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتریک اسید در لوله آزمایش باهم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به سرعت در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. هم‌زمان با عصاره‌های برگ محلول‌های استاندارد در

و بهاره گیاه یاس نشان داد که برگ‌های زمستانه نسبت به برگ‌های بهاره دارای مقادیر بیشتری کلروفیل b و کاروتنوئید می‌باشند. تیمار خشکی تأثیر معنی‌داری بر محتوی کلروفیل a و b و کاروتنوئید نداشت (شکل ۱). مقایسه محتوی نسبی آب (RWC) برگ‌های گیاه یاس نشان داد که مقدار RWC در برگ‌های بهاره نسبت به زمستانه در شرایط پرآبی بیشتر است. هرچند با اعمال خشکی RWC در برگ‌های زمستانه تغییر معنی‌داری نشان نداد ولی این پارامتر در شرایط خشکی در برگ‌های بهاره کاهش معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). بررسی تغییرات شاخص LMA (وزن خشک برگ در واحد سطح) نشان داد که برگ‌های بهاره نسبت به برگ‌های زمستانه دارای LMA کمتری هستند. اعمال خشکی تغییری در LMA برگ‌های بهاره و زمستانه نسبت به شرایط شاهد ایجاد نکرد.

مقایسه متابولیسم فنلی در برگ‌های زمستانه و بهاره گیاه یاس نشان داد که به‌طور کلی برگ‌های زمستانه مقادیر بالایی فنل کل و فلاونوئید در مقایسه با برگ‌های بهاره دارند، افزایش مقدار فنل کل و فلاونوئید در برگ‌های زمستانه با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) همراه بود. هرچند اعمال خشکی تغییر معنی‌داری در مقادیر فنل کل و فلاونوئید همچنین فعالیت آنزیم PAL ایجاد نکرد (شکل ۲).

برای رسم منحنی فلورسانس از تست JIP بهره گرفته شد. تست JIP داده‌های ثبت شده اولیه توسط دستگاه فلورسانس سنج را به پارامترهای بیوفیزیکی تبدیل می‌کند و کمیت مراحل جریان انرژی را طی فتوسیستم II تعیین می‌کند. بررسی تغییرات منحنی فلورسانس OJIP (شکل ۳: محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان بر اساس میکروثانیه) در گیاه یاس در شرایط شاهد نشان داد که به‌طور کلی شدت فلورسانس در برگ‌های زمستانه بیشتر است. شدت فلورسانس در فاز J در

محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱۳،۳- ترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرارگرفت. در نهایت غلظت مالون دی آلدئید نمونه‌ها برحسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد. غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) براساس روش توصیف شده توسط حبیبی و حاجی بلند (۱۵) سنجش شد. محلول استخراج برگ‌ها محلول‌تری کلرواستیک اسید (۱/۰ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتیفریژ شده و روشنای مورد استفاده قرارگرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۱۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و یک مولار یدید پتاسیم اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی به‌منظور انجام واکنش قرارگرفت. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر براساس منحنی استاندارد H_2O_2 در محدوده صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

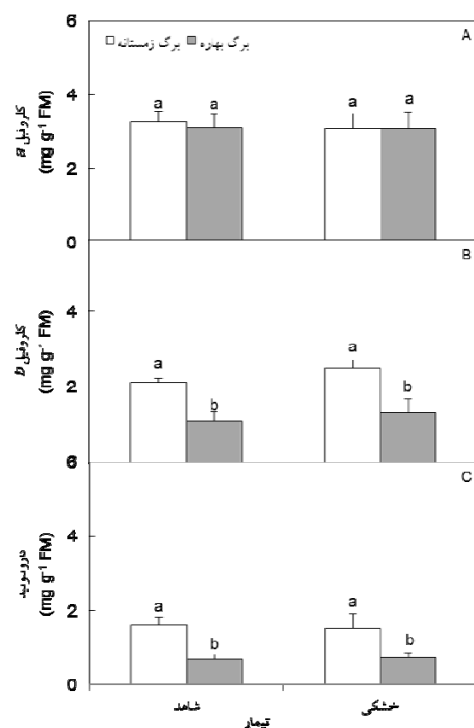
اندازه‌گیری پروتئین کل: عصاره پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۵۰ میلی مولار و pH=۶/۸ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتیفریژ شد. از روشنای حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش برادفورد (۸) استفاده به عمل آمد.

بررسی آماری نتایج: آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی طرح‌ریزی و به اجرا درآمد. هر تیمار دارای ۴ تکرار مستقل بود. میانگین و انحراف معیار (SD) داده‌ها و همچنین رسم نمودارها بوسیله نرم‌افزار Excel 2007 به انجام رسید. برای گروه‌بندی میانگین‌ها نیز از نرم‌افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $P \leq 0.05$ استفاده شد.

نتایج

مقایسه محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ‌های زمستانه

دو پارامتر محتوی نسبی آب و کارایی فتوسیستم‌ها در برگ‌های زمستانه پس از اعمال خشکی کاهش معنی‌دار نشان ندادند. به نظر می‌رسد برگ‌های زمستانه با حفظ محتوی آب خود در شرایط خشکی توانستند از افت شاخص کارایی فتوسیستم‌ها ممانعت کنند. در حالیکه خشکی باعث کاهش معنی‌دار محتوی نسبی آب و در نتیجه کاهش کارایی فتوسیستم‌ها در برگ‌های بهاره گردید.



شکل ۱- تأثیر اعمال خشکی بر مقدار رنگیزه‌های فتوستزی در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس در طول فصل بهار. تفاوت بین اعداد مربوط به ستون‌ها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

بررسی تغییرات منحنی فلورسانس در برگ‌های زمستانه و بهاره نشان داد که شدت فلورسانس در فاز J در برگ‌های زمستانه افزایش یافته است. افزایش شدت فلورسانس در فاز J با کاهش ذخایر کوئینون A احیاء (QAH2) و پلاستوکوئینون احیاء (PQH2) مرتبط می‌باشد (۱۶).

برگ‌های زمستانه نسبت به برگ‌های بهاره افزایش نشان داد (شکل ۳).

اعمال خشکی باعث تغییرات عمده‌ای در شکل منحنی فلورسانس OJIP هم در برگ‌های زمستانه و هم در برگ‌های بهاره شد. بررسی تغییرات منحنی فلورسانس در شرایط خشکی نشان داد که شدت فلورسانس در فاز IP کاهش چشمگیری یافته است و منحنی فلورسانس نسبت به حالت شاهد شکل مسطحی پیدا کرده است. بررسی پارامترهای شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) و بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) در برگ‌های زمستانه و برگ‌های بهاره نشان داد که هرچند مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های زمستانه گیاه یاس تفاوت معنی‌داری در مقایسه با برگ‌های بهاره نشان نداد ولی شاخص کارایی برگ‌های بهاره در مقایسه با برگ‌های زمستانه بسیار بالا بود (شکل ۴). با اعمال تیمار خشکی شاخص کارایی فتوسیستم‌های برگ‌های بهاره کاهش معنی‌دار نشان داد ولی شاخص کارایی فتوسیستم‌های برگ‌های زمستانه تغییر نیافت.

تفاوتی از نظر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بین برگ‌های زمستانه و بهاره مشاهده نشد (شکل ۵). هرچند با اعمال خشکی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیس موتاز و کاتالاز تغییر نیافت ولی کمبود آب فعالیت آنزیم پراکسیداز را در برگ‌های زمستانه و بهاره افزایش داد. مقدار MDA و H_2O_2 در برگ‌های زمستانه بسیار بیشتر از برگ‌های بهاره بود (شکل ۶). البته با اعمال خشکی مقدار MDA و H_2O_2 برگ‌های بهاره در مقایسه با حالت شاهد افزایش نشان داد و از آنجایی که مقدار MDA شاخص پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد افزایش این متابولیت نشانگر تنش اکسیداتیو در شرایط خشکی در برگ‌های بهاره بود.

بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت کمپلکس فتولیز آب در فتوسیستم II با محتوی نسبی آب برگ‌ها همبستگی دارد (۱۸). در این تحقیق، هر

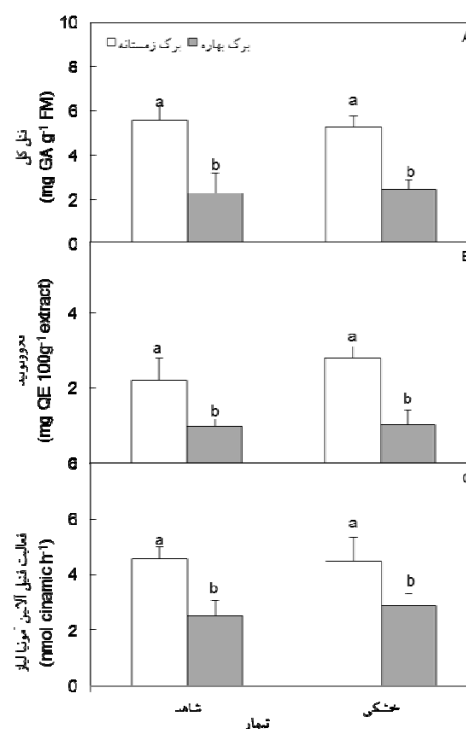
جدول ۲- تأثیر اعمال خشکی بر محتوی نسبی آب (RWC) و تغییرات شاخص LMA (وزن خشک برگ در واحد سطح) در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس در طول فصل بهار. تفاوت بین اعداد مربوط به هر پارامتر که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

تیمار		RWC (%)	LMA (g DW/m ²)
شاهد	برگ زمستانه	75±3 ^b	151±10 ^a
	برگ بهاره	84±3 ^a	120±14 ^b
خشکی	برگ زمستانه	73±2 ^b	159±11 ^a
	برگ بهاره	76±4 ^b	125±9 ^b

همکاران (۳۳) در تطابق بود. کاهش فاز IP که با کاهش شدت فلورسانس بیشینه (F_m) در ارتباط می‌باشد نشان دهنده‌ی غیرفعال شدن پروتئین‌ها در ساختار فتوسیستم II می‌باشد (۱۸) که در همه برگ‌های گیاه یاس در پاسخ به خشکی مشاهده شد.

شاخص F_v/F_m یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین مقاومت به انواع تنش‌ها از جمله پاتوژن‌ها (۲۶)، خشکی و سرما (۱۲) و دما (۳۴) می‌باشد. سنجش F_v/F_m برگ‌های گیاه یاس نشان داد که این پارامتر در پاسخ به خشکی تغییری نشان نداد. هرچند شاخص PI_{abs} در برگ‌های بهاره در پاسخ به خشکی کاهش معنی‌دار نشان داد. این یافته با نتایج تحقیق Brestic و Zivcak (۹) که نشان دادند پارامتر PI_{abs} در مقایسه با پارامتر F_v/F_m به تنش خشکی حساس‌تر است، در انطباق می‌باشد. پارامتر PI_{abs} یک پارامتر کمپلکس است که با ظرفیت فتوسنتزی و میزان تثبیت دی اکسیدکربن در برگ‌ها همبستگی دارد (۳۳). مقدار بالای پارامتر PI_{abs} در برگ‌های بهاره نسبت به برگ‌های زمستانه نشان داد که شاید ظرفیت فتوسنتزی و سرعت تثبیت دی اکسیدکربن در برگ‌های بهاره بیشتر است.

از سازوکارهای مهم حفاظت نوری در گیاهان، فعال شدن سیستم جاروب کننده مولکول‌های ROS (۳۲) و انباشت جاذب‌های نوری در اپیدرم برگ‌ها از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشد (۳۱). در این پژوهش، فعالیت آنزیم PAL، مقادیر فنل کل و فلاونوئید در برگ‌های زمستانه

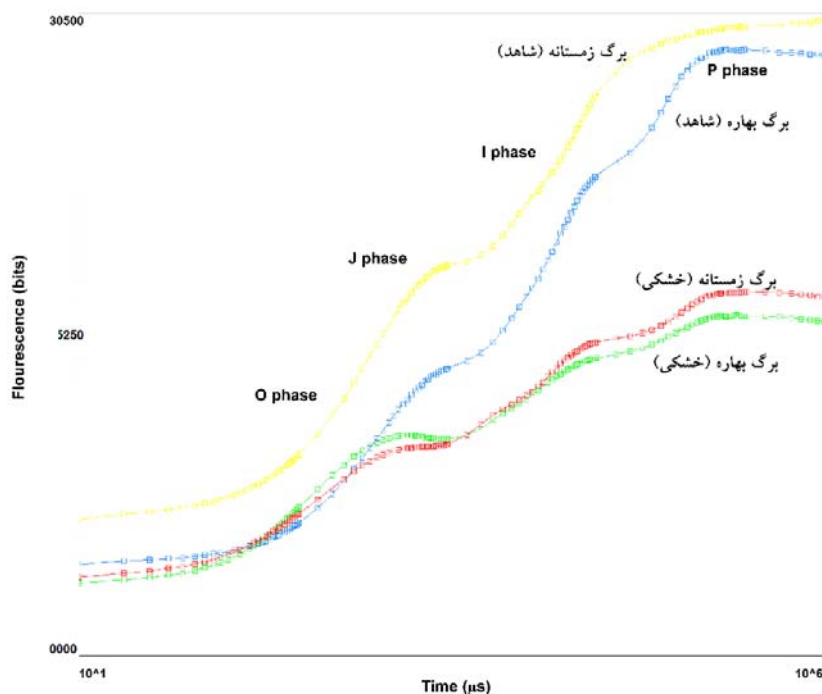


شکل ۲- تأثیر اعمال خشکی بر مقدار فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس در طول فصل بهار. تفاوت بین اعداد مربوط به ستون‌ها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

کاهش ذخایر QA2 و PQH2 احتمالاً نشان می‌دهد که جریان انتقال الکترون در ناقل‌های پایین‌دست در برگ‌های زمستانه بلوکه شده است (۲۹ و ۳۳). با اعمال خشکی، منحنی فلورسانس برگ‌های زمستانه و بهاره شکل مسطحی را نشان دادند و شدت فلورسانس در فاز IP کاهش شدیدی را نشان داد. کاهش شدت فلورسانس در فاز IP تحت تأثیر خشکی در این تحقیق با یافته‌های وان هیدن و

علت در شرایط خشکی، بالا بودن محتوی ترکیبات فنلی برگ‌های زمستانه به‌عنوان سازوکارهای حفاظت نوری از افت شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) جلوگیری کرد. در حالیکه شاخص کارایی فتوسیستم‌های برگ‌های بهاره در شرایط خشکی کاهش معنی‌داری نشان داد.

نسبت به برگ‌های بهاره افزایش نشان داد. شاید دلیل بالا بودن مقادیر فنل در برگ‌های زمستانه این است که این برگ‌ها در طی فصل سرد برای جلوگیری از مهار نوری فتوسیستم‌ها، مقادیر فنل‌ها را افزایش داده‌اند و این توانایی و سازگاری را تا بهار سال بعد حفظ کرده‌اند. به همین

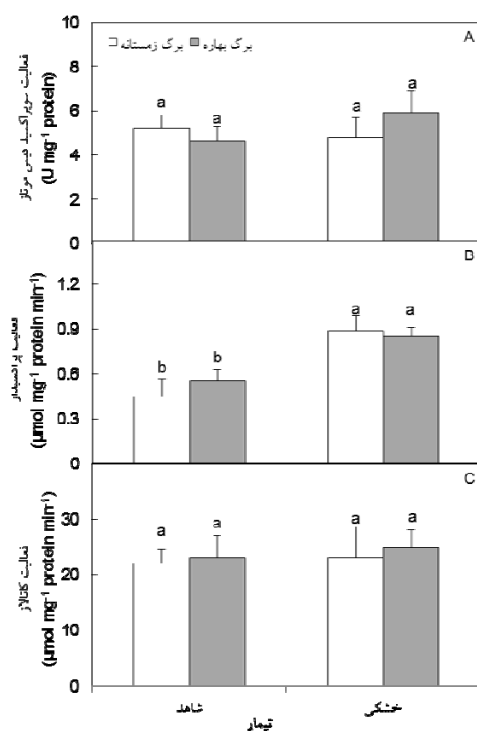


شکل ۳- تغییرات منحنی فلورسانس OJIP (محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان براساس میکروثانیه است) در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس که به مدت ۲۵ روز در شرایط خشکی قرار گرفتند. برای تولید منحنی فلورسانس OJIP، از نور قرمز با طول موج ۶۲۷ نانومتر و شدت ۳۵۰۰ میکرومول/مترمربع/ثانیه (برای اطمینان از رسیدن به پیک F_m) استفاده شد.

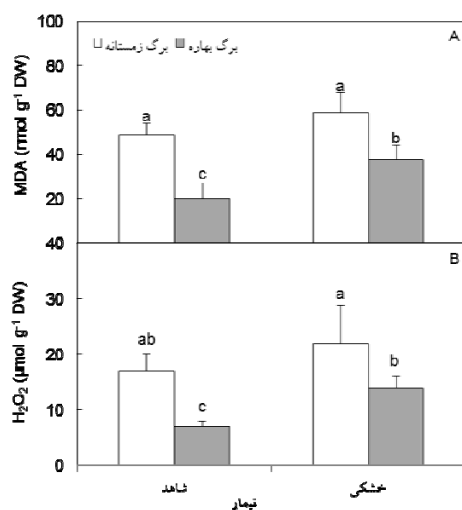
کاروتنوئیدها و کلروفیل b در گیاه ماروبوم ولگار همبستگی دارد، در توافق است.

در گیاهان تنش‌های مختلف باعث افزایش تولید مولکول‌های ROS (Reactive oxygen species) از جمله H_2O_2 شده و این مولکول‌ها منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند و باعث ظهور اثرات منفی بر رشد و ساختار گیاه می‌گردند (۱ و ۲). از آن جایی که غشاء اولین بخش از سلول است که تحت تأثیر تنش قرار

عامل دیگری که از افت شاخص کارایی فتوسیستم‌های برگ‌های زمستانه در خشکی ممانعت کرد، بالا بودن محتوی کاروتنوئیدها و کلروفیل b در برگ‌های زمستانه بود. افزایش کاروتنوئیدها با فعال‌سازی چرخه ویولاگزانتین/ژناگزانتین و فروکش غیرفتوشیمیایی باعث تخفیف آسیب‌های ناشی از تنش در گیاهان می‌شوند (۱۱ و ۱۴). یافته‌های این تحقیق با نتایج حبیبی و آجری (۱۴) که نشان دادند شاخص کارایی فتوسیستم‌ها با محتوی

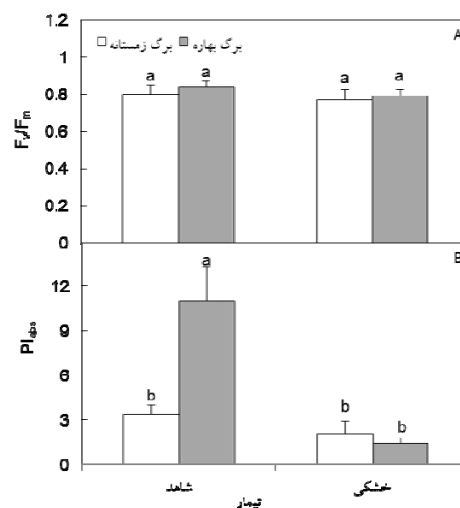


شکل ۵- تأثیر اعمال خشکی بر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس در طول فصل بهار. تفاوت بین اعداد مربوط به ستون‌ها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).



شکل ۶- تأثیر اعمال خشکی بر مقدار پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و مالون دی آلدئید (MDA) در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس در طول فصل بهار. تفاوت بین اعداد مربوط به ستون‌ها که با حروف

می‌گیرد، در این تحقیق برای تعیین آسیب غشاها در شرایط خشکی، مقدار MDA را به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها سنجش کردیم. اعمال خشکی باعث افزایش مقدار MDA و H₂O₂ برگ‌های بهاره شد و افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در شرایط خشکی نشان داد که خشکی اعمال شده در این تحقیق باعث تنش اکسیداتیو در برگ‌های بهاره شده است (۱۷). در مقایسه، شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در برگ‌های زمستانه تغییر معنی‌داری در شرایط خشکی نشان نداد. این نتایج مشخص کرد که برگ‌های زمستانه نسبت به برگ‌های بهاره مقاومت بهتری نسبت به خشکی بروز می‌دهند.



شکل ۷- تأثیر اعمال خشکی بر پارامترهای شاخص کارایی فتوسیستم II (F_v/F_m) و بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (PI_{abs}) در برگ‌های بهاره و زمستانه گیاه یاس در طول فصل بهار. تفاوت بین اعداد مربوط به ستون‌ها که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند معنی دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

مقایسه ویژگی‌های فیزیولوژیکی برگ‌های زمستانه و بهاره مشخص کرد که برگ‌های زمستانه و بهاره از نظر محتوای کلروفیل، فنل، فلاونوئید و انباشت متابولیت‌های اکسیدانت (MDA و H₂O₂) تفاوت محسوسی باهم دارند.

متفاوت نشان داده شده‌اند معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

برگ‌های زمستانه در مقایسه با برگ‌های بهاره مقاومت بیشتری به خشکی نشان دادند و برخلاف برگ‌های بهاره، محتوی نسبی آب و شاخص کارایی فتوسیستم‌ها در برگ‌های زمستانه در پاسخ به خشکی کاهش نشان ندادند. حفظ ظرفیت فتوستیزی و کارایی فتوسیستم‌ها در برگ‌های

منابع

۱. مهدوی، ب.، مدرس ثانوی، س. ع. م.، علیخانی، م. آ. و شریفی، م. ۱۳۹۲. اثر غلظتهای مختلف کیتوزان بر جوانه‌زنی بذر و آنزیمهای آنتی اکسیدانت گلرنگ (*Carthamus tinctorius*). (L) در شرایط تنش کم‌آبی، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۶، شماره ۳، صفحات ۳۶۵-۳۵۲.
۲. ابراهیم‌زاده، م. و ابراهیم‌زاده، ح. ۱۳۹۲. رویانزایی بدنی و آنزیمهای پاداکساینده در بنگ سیاه (*Hyoscyamus niger* L.). مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۶، شماره ۲، صفحات ۱۶۷-۱۵۴.
3. Anjum, S. A., Xie, X., and Wang, L., 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress, African Journal of Agricultural Research 6, PP: 2026-2032.
4. Ashraf, M., and Harris, P. J., 2013. Photosynthesis under stressful environments: an overview. Photosynthetica, 51(2), PP: 163-90.
5. Bandurska, H., and Stroinski, A., 2005. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit, Acta Physiologiae Plantarum 27(3), PP: 379-386.
6. Boominathan, R., and Doran, P. M., 2002. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist 156, PP: 202-205.
7. Boughalleb, F., and Hajlaoui, H., 2011. Physiological and anatomical changes induced by drought in two olive cultivars (cv Zalmati and Chemlali), Acta Physiologiae Plantarum 33, PP: 53-65.
8. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem, 72, PP: 248-254.
9. Brestic, M., and Zivcak, M., 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications, In *Molecular stress physiology of plants* (PP: 87-131). Springer India.
10. Cai, H., Biswas, D. K., Shang, A. Q., Zhao, L. J., and Li, W. D., 2007. Photosynthetic response to water stress and changes in metabolites in *Jasminum sambac*. Photosynthetica, (4), PP: 503-509.
11. Cazzonelli, C. I., and Pogson, B. J., 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants, Trends in Plant Science 15, PP: 266-274.
12. Ehlert, B., and Hinch, D. K., 2008. Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves. Plant Methods 4(1), 12 p.
13. Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K., 1977. Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59, PP: 309-314.
14. Habibi, G., and Ajory, N., 2015. The effect of drought on photosynthetic plasticity in *Marrubium vulgare* plants growing at low and high altitudes. Journal of Plant Research, 128(6), PP: 987-994.
15. Habibi, G., Hajiboland, R., 2012. Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress. Photosynthetica, 50 (4), PP: 508-518.
16. Habibi, G., and Hajiboland, R., 2011. Comparison of water stress and UV radiation effects on the induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (Crassulaceae), Acta Biol Cracov Bot, 53, PP: 7-15.
17. Habibi, G., 2014. Hydrogen Peroxide (H_2O_2) Generation, Scavenging and Signaling in Plants. In: Ahmad P, (eds.), Oxidative Damage to

- Plants: Antioxidant Networks and Signaling. Elsevier, USA, PP: 557-574.
18. Habibi, G., 2017. Physiological, photochemical and ionic responses of sunflower seedlings to exogenous selenium supply under salt stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(10), 213 p.
 19. Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A.T., and Fujita, M., 2012. Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defenses is a key factors. In: Crop stress and its management: Perspectives and strategies (Eds. Bandi, V., Shanker, A.K., Shanker, C. and Mandapaka, M.), (PP: 261-316) Springer, Berlin.
 20. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., and Fujita, M., 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: Ecophysiology and responses of plants under salt stress (Eds. Ahmad, P., Azooz, M.M. and Prasad, M.N.V.) (PP: 25-87) Springer, New York.
 21. Kawakami, K., Umenab, Y., Kamiyab, N., and Shen, J., 2009. Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, PP: 8567-8572.
 22. Lara, M. V., Disante, K. B., Podesta, F. E., Andreo, C., and Drincovich, M. F., 2003. Induction of a Crassulacean acid like metabolism in the C₄ succulent plant, *Portulaca oleracea* L.: physiological and morphological changes are accompanied by specific modifications in phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynth Res*, 77, PP: 241-254.
 23. Lichtenthaler, H. K., and Wellburn, A., R., 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11, PP: 591-592.
 24. Mavi, A., Terzi, Z., and Ozgen, U., 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *Verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae), *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, PP: 702-705.
 25. Prokić, L., and Stikić, R., 2011. Effects of different drought treatments on root and shoot development of the tomato wild type and *flacca* mutant. *Archives of Biological Science Belgrade* 63(4), PP: 1167-1171.
 26. Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., and Berruyer, R., 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9, 17 p.
 27. Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E., and Matkovics, B., 1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*, *Biochem. Physiol, Pflanzen* (BPP), 166, PP: 387-392.
 28. Strasser, B. J., and Strasser, R. J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis, P. (Ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, vol. V. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, PP: 977-980.
 29. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., and Srivastava, A., 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, PP: 321-362.
 30. Takahashi, S., and Badger, M. R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16, PP: 1-10.
 31. Takahashi, D., Kawamura, Y., and Uemura, M., 2016. Cold acclimation is accompanied by complex responses of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 67, PP: 5203-5215.
 32. Telfer, A., 2014. Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of b-Carotene, *Plant Cell Physiology* 55(7), PP: 1216-1223.
 33. Van Heerden, P. D. R., Swanepoel, J. W., and Krüger, G. H. J., 2007. Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C 3-mode CO₂ assimilation. *Environmental and Experimental Botany* 61(2), PP: 124-136.
 34. Xu, H. G., Liu, G. J., Liu, G. T., Yan, B. F., Duan, W., and Wang, L. J., 2014. Comparison of investigation methods of heat injury in grapevine (*Vitis*) and assessment to heat tolerance in different cultivars and species. *BMC Plant Biology* 14, 156 p.
 35. Zhang, L., Zhang, Z., and Gao, H., 2011. Mitochondrial alternative oxidase pathway protects plants against photoinhibition by alleviating inhibition of the repair of

photodamaged PSII through preventing formation of reactive oxygen species in *Rumex* K-1 leaves. *Physiologiae Plantarum* 143, PP: 396-407.

36. Zucker, M., 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light, its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue, *Physiologia Plantarum* 40, PP: 779-784.

Comparison of some photoprotection mechanisms of winter and spring leaves of *Jasminum fruticans* under drought conditions

Habibi, G.,

Dept. of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In this study, the effects of drought on some physiological characteristics of winter and spring leaves of jasmine (*Jasminum fruticans* L.) were examined in plants grown in pots and treated with or without water stress for 25 days. Our results showed significant difference in pigment content and phenolic metabolism between winter and spring leaves of jasmine during spring season. In this study, winter leaves showed the higher Chlb, carotenoids, total phenol, flavonoids as well as phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity, and relative water content (RWC) as compared to spring leaves, indicating winter leaves are sufficient in their capacity for non-photochemical energy dissipation via these mechanisms. However, water stress did not significantly affect these parameters. Drought significantly increased the amount of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) following significant enhancement of peroxidase (POD) activity. However, in winter and spring leaves treated with water stress, decrease in the maximal quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) was not statistically significant. In contrary, spring leaves exhibited a significant decrease in the performance index (PI_{abs}) parameter under drought conditions. Notably, the kinetics of the OJIP chlorophyll fluorescence curve exhibited a quicker difference between winter and spring leaves of jasmine under well watered conditions. Thus, photosynthetic apparatus of winter leaves maintained a higher PI_{abs} during spring season, and showed more tolerance to water stress by dissipating excess light energy by carotenoids; and by screening of photoradiation by phenolic compounds.

Key words: chlorophyll fluorescence, *Jasminum fruticans*, performance index, phenylalanine ammonia lyase, water stress