

## اثر پروپیل گالات بر کارایی فتوسیستم II در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* با استفاده از اندازه‌گیری فلورسنس کلروفیل *a*

علیرضا عینعلی<sup>۱</sup>، منصور شریعتی<sup>۲\*</sup> و مرضیه پائیزی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۳

### چکیده

در این پژوهش اثر پروپیل گالات که از فعالیت اکسیداز انتهایی پلاستید دخیل در تنفس کلروپلاستی جلوگیری می‌کند، بر کارایی فتوسیستم II در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* با استفاده از اندازه‌گیری کینتیک فلورسنس کلروفیل *a* مطالعه شده است. تیمار کشت‌های جلبکی با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات نشان داد که کارایی فتوسیستم II تا غلظت‌های ۱ میلی‌مولار افزایش یافته و از فرایند تنفس کلروپلاستی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار پروپیل گالات جلوگیری می‌شود. با وجود این، هیچ تأثیر منفی معنی‌داری در روند انتقال الکترون فتوسیستم II مشاهده نشد. شدت فلورسنس کلروفیل *a* در جلبک *D. salina* تیمار شده با ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات به شدت کاهش پیدا کرده و به یک سطح تقریباً صاف می‌رسد. چنین کاهش در میزان  $F_v/F_o$  (پارامتر متناسب با فعالیت کمپلکس تجزیه‌کننده آب)،  $\Phi_{P_0}$  (کارایی عملکرد کوانتومی فتوشیمیایی اولیه) و  $\Phi_{E_0}$  (میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون) نیز مشاهده می‌شود. البته افزایش شدت فلورسنس در سطح  $K$  (۳۰۰ میکرو ثانیه) نیز با کاهش ایجاد شده در این شاخص‌ها هماهنگ می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که کاهش کارایی فتوسیستم II در حضور غلظت ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات از تأثیر این ممانعت‌کننده بر کمپلکس تجزیه‌کننده آب در سمت دهنده فتوسیستم II ناشی می‌شود. بنابراین، می‌توان پروپیل گالات را به‌عنوان یک ممانعت‌کننده اختصاصی فتوسیستم II علاوه بر نقش آن در ممانعت‌کنندگی تنفس کلروپلاستی در نظر گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** پروپیل گالات، فلورسنس کلروفیل *a*، فتوسیستم II، کمپلکس تجزیه‌کننده آب، *Dunaliella salina*

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۲، پست الکترونیکی: mansour\_shariati@yahoo.com

### مقدمه

به‌عنوان ممانعت‌کننده اختصاصی اکسیداز انتهایی پلاستید به‌عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، آثار زیستی وسیعی را در گیاهان سبب می‌شود (۷، ۱۳، ۲۷، ۳۰، ۴۳). این ترکیب از فسفریلاسیون پروتئین‌های کلروفیل *a* و *b* کمپلکس‌های جمع‌آوری‌کننده نور جلوگیری می‌کند. همچنین، از تجزیه پروتئین D1 تحت تابش نور شدید نیز ممانعت بعمل می‌آورد (۱۷-۱۳، ۱۷). این ترکیب به‌طور گسترده‌ای در مطالعات فتوسنتزی

به‌عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، آثار زیستی وسیعی را در گیاهان سبب می‌شود (۷، ۱۳، ۲۷، ۳۰، ۴۳). این ترکیب از فسفریلاسیون پروتئین‌های کلروفیل *a* و *b* کمپلکس‌های جمع‌آوری‌کننده نور جلوگیری می‌کند. همچنین، از تجزیه پروتئین D1 تحت تابش نور شدید نیز ممانعت بعمل می‌آورد (۱۷-۱۳، ۱۷). این ترکیب به‌طور گسترده‌ای در مطالعات فتوسنتزی

متابولیسمی استفاده می‌شود (۳، ۱۰). اغلب مطالعات انجام شده در مورد اثر پروپیل گالات بر روند انتقال الکترون فتوسیستم II در زمینه ممانعت از تنفس کلروپلاستی در گیاهان عالی بوده و گزارش‌های اندکی در مورد این اثر در جلبک‌های سبز وجود دارد. گذشته از این، اثر مستقیم غلظت‌های مختلف پروپیل گالات بر ساختار و عملکرد فتوسیستم II و همچنین روند رشد در گیاهان تاکنون بررسی نشده است. از این‌رو در این تحقیق سعی می‌گردد با استفاده از آنالیز چند مرحله‌ای افزایش فلورسنس کلروفیل  $a$  (OJIP)، این اثر بر روند انتقال الکترون فتوسیستم II و رشد سوسپانسیون‌های جلبکی مشخص شود. همچنین جایگاه عمل پروپیل گالات در زنجیره انتقال الکترون فتوستتزی مورد بحث قرار می‌گیرد.

### مواد و روشها

**منابع تأمین و کشت جلبک:** جلبک *Dunaliella salina* سویه UTEX 200 مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون کشت جلبک دانشگاه تگزاس آمریکا تهیه شد. تهیه محیط کشت مایع با غلظت ۱ مولار NaCl، بر اساس روش‌های یاد شده در منابع قبلی انجام شد (۳۲). عمل انتقال سلول‌های جلبکی از مخزن‌های جلبکی به محیط کشت مایع در داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری اتوکلاو شده و در شرایط کاملاً استریل انجام شد. کشت‌های جلبکی در اتاق کشت و در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و شدت نور ۷۰ میکرو مول فوتون بر مترمربع بر ثانیه به مدت ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی بر روی دستگاه شیکر به صورت مداوم و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. زمانی که کشت‌های جلبکی به مرحله نمایی رشد رسیدند، توسط غلظت‌های مختلف پروپیل گالات تیمار شدند.

**تیمار کشتهای جلبکی با غلظت‌های مختلف پروپیل گالات:** زمانی که جلبک‌ها در مرحله نمایی رشد بودند، محلول پروپیل گالات در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی مولار تهیه و به داخل ارلن‌ها اضافه شد. قبل از اضافه

تغییرات ایجاد شده توسط این ممانعت‌کننده به راحتی از طریق اندازه‌گیری‌های فلورسنس کلروفیل  $a$  قابل بررسی است.

بررسی فلورسنس کلروفیل  $a$  ابزاری مفید برای مطالعه فرایندهای انتقال الکترون فتوسیستم II است (۱۵، ۱۸، ۲۱، ۳۶، ۳۷). به طوری که بلافاصله پس از تابش نور به یک نمونه فتوستتزی سازگار شده با تاریکی، شدت فلورسنس در مدت ۲ میلی‌ثانیه به علت احیای پذیرنده اولیه فتوسیستم II ( $Q_A$ ) از یک سطح پایه (سطح O یا  $F_0$ ) به یک سطح بالاتر (سطح J یا  $F_J$ ) افزایش می‌یابد. افزایش سطح J به سطح I (یا  $F_I$ ) در مدت تقریبی ۳۰ میلی‌ثانیه و به علت پر شدن مخزن پلاستوکینون رخ می‌دهد. در نهایت، سطح فلورسنس از  $F_I$  به سطح بیشینه (سطح P یا  $F_m$ ) رسیده که این حالت نشان‌دهنده تجمع الکترون‌ها در سمت پذیرنده فتوسیستم I می‌باشد (۳۷، ۳۹). کارایی فتوسیستم II بر اساس آزمون JIP و توسط مجموعه‌ای از شاخص‌های ساختاری و کاربردی حاصل از افزایش چند مرحله‌ای سطح فلورسنس کلروفیل تعیین می‌گردد (۳۴، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۴۰). آزمون JIP بر مبنای تئوری جریان انرژی در غشاهای زیستی، بدون کوچک‌ترین آسیبی به موجود زنده و با استفاده از تغییرات حاصل از کینتیک فلورسنس کلروفیل  $a$ ، هر گونه تغییر در دستگاه فتوستتزی را نشان می‌دهد. به همین علت این روش به صورت گسترده در بررسی رفتار دستگاه فتوستتزی به‌ویژه فتوسیستم II کاربرد دارد (۱، ۲۲، ۲۵، ۴۱).

*Dunaliella*، یک جلبک سبز تک سلولی فاقد دیواره بوده، قابلیت انعطاف‌پذیری فراوانی دارد و به دلیل دارا بودن کلروپلاست مشابه با گیاهان عالی، سرعت رشد بالا، کشت مداوم و آسان و همچنین قابلیت منحصر به فرد در ارائه پاسخ‌های بیوشیمیایی مناسب به انواع تنش‌های فیزیولوژیکی و سایر ترکیبات شیمیایی به‌عنوان یک سیستم مدل برای مطالعات فتوستتزی، جذب و انتقال و فرایندهای

تا ۱۰۰۰ میلی‌ثانیه با استفاده از دستگاه Handy PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, UK)، با تابش یک پالس نور شدید (۳۵۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه) در یک اتاقک کاملاً تاریک اندازه‌گیری شد. شدت فلورسنس در ۵۰ میکروثانیه به‌عنوان سطح  $F_0$  و شدت فلورسنس حداکثر به‌عنوان سطح  $F_m$  P در نظر گرفته شد (۳۶، ۳۷). تغییرات شدت فلورسنس القا شده توسط پروپیل گالات در ۳۰۰ میکروثانیه (سطح K) از طریق نرمال سازی مقادیر سیگنال فلورسنس بین سطوح O و J بر اساس فرمول زیر و با استفاده از اختلاف سیگنال بین نمونه‌های شاهد و تیمار شده با مقادیر مختلف ممانعت‌کننده تعیین شد (۲۸).

$$W_{OI} = (F_I - F_0) / (F_I - F_0)$$

که در این فرمول،  $W_{OI}$  برابر مقادیر سیگنال فلورسنس نرمال شده بین سطوح O و J،  $F_0$  شدت فلورسنس در ۵۰ میکروثانیه،  $F_I$  شدت فلورسنس در ۲ میلی‌ثانیه و  $F_I$  شدت فلورسنس در فاصله زمانی بین ۵۰ میکروثانیه و ۲ میلی‌ثانیه پس از تابش پالس نور شدید می‌باشد. در نهایت اطلاعات به‌دست آمده از نشر فلورسنس توسط آزمون JIP و با استفاده از نرم‌افزار Labrotory of BiolyzerHP3 (Bioenergetics, University of Geneva, Switzerland) آنالیز شدند (۳۶). شاخص‌های حاصل از آزمون JIP مورد استفاده در این پژوهش و توصیف آنها در جدول ۱ آمده است.

**اندازه‌گیری میزان اکسیژن آزاد شده از فتوسیستم II :** میزان اکسیژن آزاد شده از فتوسیستم II با استفاده از دستگاه پلاروگراف و از طریق یک الکتروود سنجش اکسیژن نوع Clark (Hansatech Ltd, UK) که در محفظه‌ای حاوی سلول‌های جلبکی قرار دارد، اندازه‌گیری شد (۱۱). سوسپانسیون‌های جلبکی در مرحله نمایی رشد از طریق سانتریفیوژ در ۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شده و در بافر واکنش با نسبت ۱:۶ حل شدند. ترکیب بافر واکنش شامل ۰/۲۵ میلی مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۲۵

کردن ممانعت‌کننده، به‌منظور همسان سازی سوسپانسیون‌های جلبکی و یکسان نمودن نقطه ابتدایی منحنی‌های رشدی، محتوای کلیه ارلن‌ها با یکدیگر مخلوط شد. نمونه‌های جلبکی با استفاده از محیط کشت در حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر طوری آماده شدند که تعداد اولیه سلولها در آنها بطور تقریبی  $10^6 \times 5$  سلول بر میلی‌لیتر باشد. کشت‌های جلبکی تیمار شده با پروپیل گالات برای مدت ۹۶ ساعت در اتاق کشت با همان شرایط توصیف شده در بالا قرار گرفتند. کشتهای جلبکی فاقد ممانعت‌کننده به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

**شمارش سلولی، استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌ها:** تعداد سلول‌ها بلافاصله پس از اضافه کردن ممانعت‌کننده و ۹۶ ساعت پس از آن توسط لام هموسایتومتر در سه تکرار شمارش شد و میزان رشد سلولی بر اساس درصد تغییرات تعداد سلول پس از ۹۶ ساعت نسبت به زمان صفر بیان شد. به‌منظور استخراج کلروفیل کل و بتاکاروتن، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی به میکروتیوب منتقل و در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف محلول رویی، به رسوب باقی مانده یک میلی‌لیتر استون ۸۰٪ اضافه و پس از ورتکس شدید، عمل سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه تکرار شد. محلول رویی از میکروتیوب‌ها استخراج و برای اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها بکار رفت. میزان کلروفیل کل از طریق روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (۲). میزان بتاکاروتن با استفاده از ضریب جذب برابر ( $E_{1cm}^{1\%} = 2273$ ) در طول موج ۴۸۰ نانومتر محاسبه شد (۴).

**اندازه‌گیری فلورسنس کلروفیل a :** به‌منظور اندازه‌گیری فلورسنس کلروفیل a در زمان‌های صفر و ۹۶ ساعت پس از اضافه کردن پروپیل گالات، یک میلی‌لیتر از محلول جلبکی به شیشه مخصوص اندازه‌گیری فلورسنس منتقل شد و بعد شیشه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. نشر سریع فلورسنس کلروفیل a از ۱۰ میکروثانیه

نوری برابر با ۴۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه برای انجام آزمایش بکار رفت. مقادیر اکسیژن آزاد شده به صورت نانومول بر میکروگرم کلروفیل در دقیقه بیان گردید.

میلی مولار دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۲ میلی مولار منیزیم کلراید، ۲۵ میلی مولار سدیم بیکربنات و ۱ میلی مولار نمک NaCl و اسیدیته برابر ۷/۵ است. غلظت کلروفیل بافر واکنش طوری تنظیم شد که نمونه مورد آزمایش حاوی ۴۰ میکروگرم کلروفیل بر میلی‌لیتر باشد. شدت

جدول ۱- شاخص‌های بیوفیزیکی حاصل از اندازه‌گیری فلورسنس کلروفیل و آزمون JIP

شاخص	توصیف شاخص
ABS/RC	میزان کل جذب نور توسط کلروفیل‌های آنتن نسبت به مراکز واکنش فعال
F <sub>o</sub>	شدت فلورسنس در ۵۰ μs (مرحله O)
F <sub>K</sub>	شدت فلورسنس در ۳۰۰ μs (مرحله K)
F <sub>J</sub>	شدت فلورسنس در ۲ ms (مرحله J)
F <sub>I</sub>	شدت فلورسنس در ۳۰ ms (مرحله I)
F <sub>m</sub>	پیشینه شدت فلورسنس (مرحله P)
F <sub>v</sub>	فلورسنس متغیر پیشینه (F <sub>v</sub> =F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )
F <sub>v</sub> /F <sub>o</sub>	کارایی کمپلکس تجزیه کننده آب در سمت دهنده فتوسیستم II
Φ <sub>Do</sub>	میزان اتلاف انرژی به صورت انرژی گرمایی
Φ <sub>EO</sub>	میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II
Φ <sub>Po</sub>	میزان عملکرد کوانتومی فتوشیمیایی اولیه

مولار افزایش معنی‌دار و در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری ملاحظه می‌گردد. در حالی که در غلظت ۴ میلی‌مولار ممانعت کننده تقسیم سلولی به طور کامل متوقف می‌گردد.

اضافه کردن ممانعت کننده تا حد ۰/۵ میلی‌مولار باعث افزایش میزان کلروفیل کل و بتاکاروتن می‌شود، در حالی که غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میلی‌مولار ممانعت کننده باعث کاهش تدریجی آن می‌گردند، به طوری که در غلظت ۴ میلی‌مولار، این رنگیزه‌ها به طور کامل از بین می‌روند (شکل ۱-ب و پ).

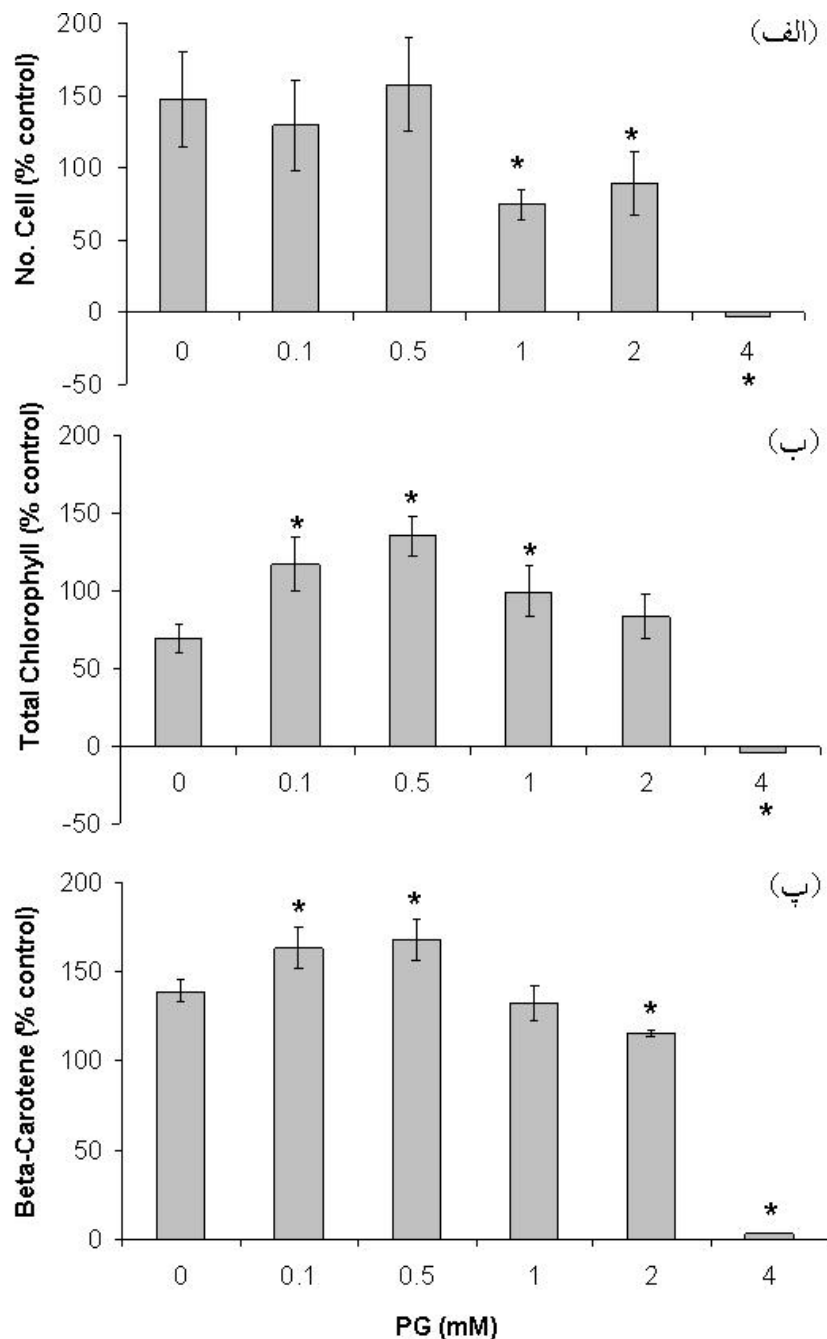
اثر پروپیل گالات بر شدت فلورسنس کلروفیل *a*: اثر پروپیل گالات بر روند انتقال الکترون فتوسیستم II در زمانهای صفر و ۹۶ ساعت پس از تیمار سلول‌های جلبک با غلظت‌های مختلف این ممانعت کننده با استفاده از اندازه‌گیری نشر سریع فلورسنس کلروفیل (O-J-I-P) در

تجزیه و تحلیل آماری: همه آزمایشها در سه تکرار مستقل برای هر تیمار انجام شد. میانگین و انحراف معیار (Standard deviation ±SD) برای هر تیمار اندازه‌گیری و اختلاف آماری معنی‌دار بین نمونه‌های شاهد و تیمار شده با پروپیل گالات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون Holm-Sidak در سطح ۰/۰۵ (P < 0.05) تعیین شد.

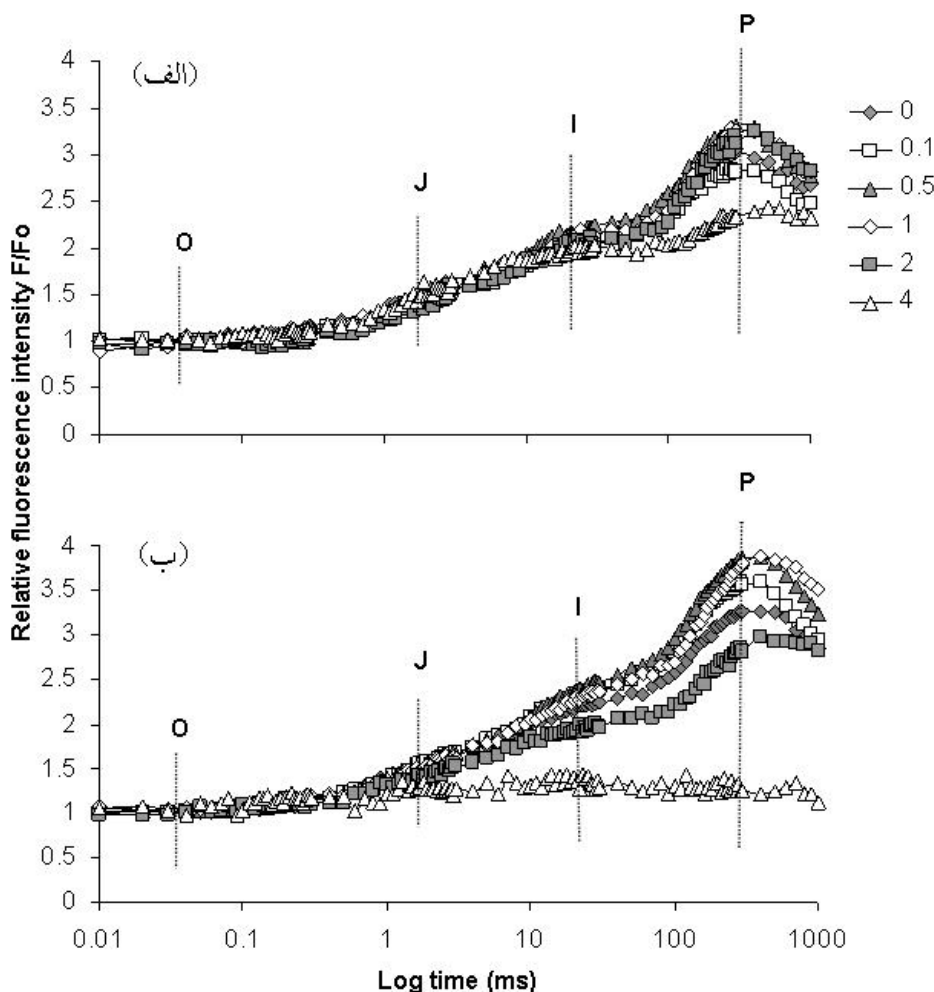
## نتایج

اثر پروپیل گالات بر رشد سلولی و میزان رنگیزه‌ها: اثر پروپیل گالات بر میزان رشد سلول در شکل ۱-الف نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می‌گردد، پس از گذشت ۹۶ ساعت از اضافه کردن ممانعت کننده به سوسپانسیون‌های جلبکی، در بیشتر موارد تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد. در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار ممانعت کننده، تفاوت معنی‌داری نسبت به غلظت صفر ممانعت کننده (شاهد) ملاحظه نمی‌شود. با این حال در غلظت ۰/۵ میلی-

شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود شدت فلورسنس پس از ۹۶ ساعت در حضور غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار ممانعت‌کننده دارای بالاترین سطوح I و P در مقایسه با شاهد هستند. کشت‌های تیمار شده با غلظت ۲ میلی‌مولار ممانعت‌کننده شیب صعودی فلورسنس پایین‌تری نسبت به شاهد نشان می‌دهند. کینتیک فلورسنس در تیمار با غلظت ۴ میلی‌مولار به شدت کاهش یافته و به سطح تقریباً یکنواختی می‌رسد.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف پروپیل گالات بر درصد تغییرات: (الف) تعداد سلول، (ب) غلظت کلروفیل کل و (پ) میزان بتاکاروتن ۹۶ ساعت پس از تیمار با ممانعت‌کننده. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد. علامت ستاره نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر مختلف و شاهد (غلظت صفر ممانعت‌کننده) می‌باشد.



شکل ۲- اثر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات بر کینتیک OJIP فلورسنس کلروفیل *a*. (الف) زمان صفر، (ب) ۹۶ ساعت پس از تیمار با ممانعت‌کننده

فتوستتزی می‌باشد (شکل ۴). همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌شود، غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار پروپیل گالات تأثیر معنی‌داری بر کاهش میزان اکسیژن فتوستتزی ندارند؛ در حالی که غلظت‌های بیشتر از ۰/۵ میلی‌مولار سبب کاهش معنی‌دار آن شده، به طوری که در حضور غلظت ۴ میلی‌مولار، تولید اکسیژن فتوستتزی متوقف می‌شود.

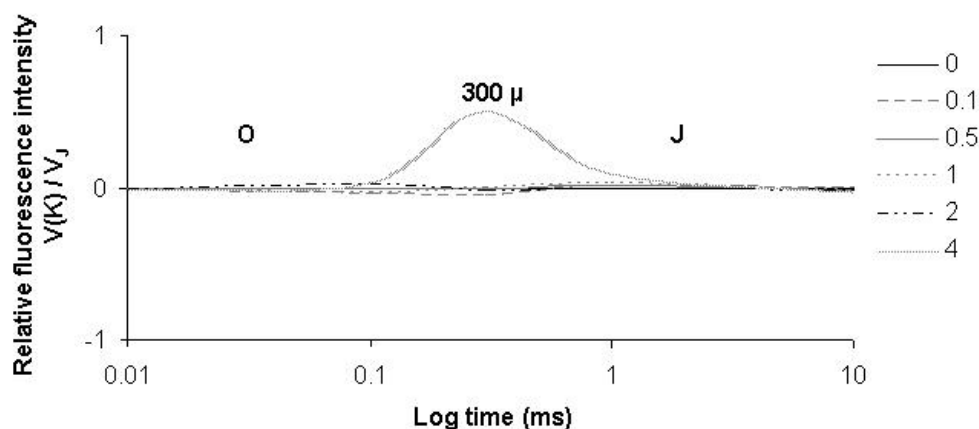
بررسی تغییرات جریان الکترون فتوسیستم II در حضور پروپیل گالات: افزایش میزان پروپیل گالات تا غلظت ۱ میلی‌مولار باعث افزایش تدریجی میزان  $F_v/F_o$  که

آنالیز شدت فلورسنس بین سطوح O و J ( $W_{OJ}$ ) که بیانگر شدت فلورسنس کلروفیل *a* در سطح K ( $F_{300\mu s}$ ) می‌باشد (شکل ۳) نشان‌دهنده افزایش شدید شدت فلورسنس در ۳۰۰ میکروثانیه در تیمار با غلظت ۴ میلی‌مولار ممانعت‌کننده است.

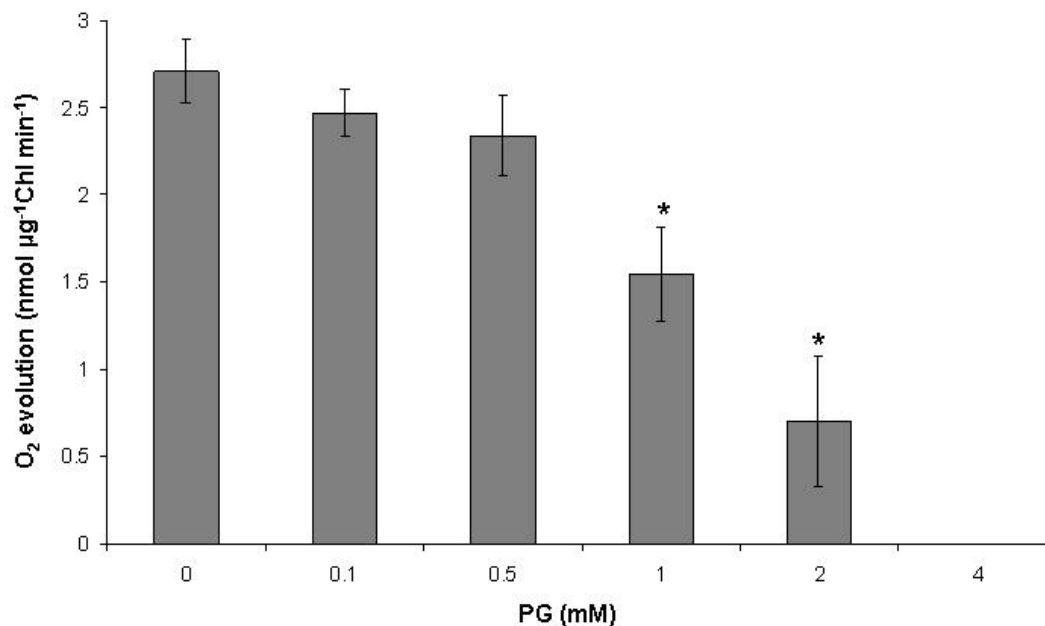
اثر پروپیل گالات بر میزان اکسیژن آزاد شده از فتوسیستم II: بررسی میزان اکسیژن آزاد شده در حضور غلظت‌های مختلف پروپیل گالات نشان‌دهنده اثر ممانعت‌کنندگی این ترکیب بر میزان تولید اکسیژن

میلی‌مولار ممانعت کننده به شدت کاهش پیدا می‌کند (شکل ۵). همچنین غلظت‌های ۰/۱ تا ۲ میلی‌مولار پروپیل گالات تأثیری بر  $\Phi_{D_0}$  (میزان اتلاف انرژی) و نسبت ABS/RC (میزان کل جذب نور توسط کلروفیل‌های آنتن نسبت به مراکز واکنش فعال) ندارد. به طوری که تنها غلظت ۴ میلی‌مولار ممانعت کننده باعث افزایش شدید این شاخص‌ها در مقایسه با شاهد می‌شود (شکل ۶).

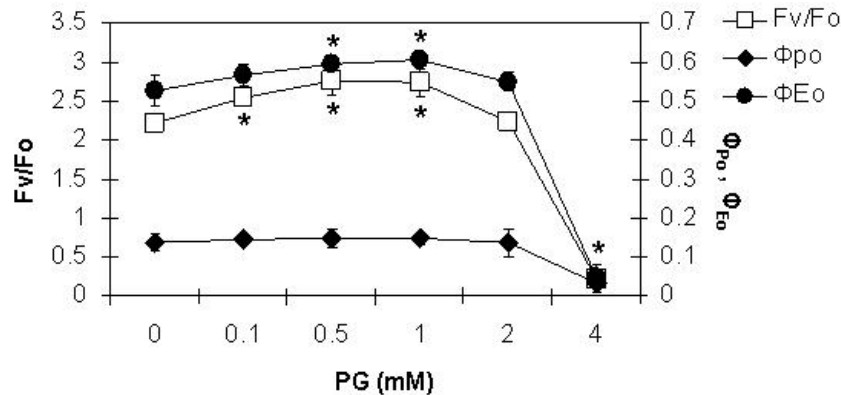
شاخص مرتبط با فعالیت کمپلکس تجزیه کننده آب در سمت‌دهنده فتوسیستم II است (۲۰، ۲۹)، می‌شود. این افزایش در  $\Phi_{E_0}$  (میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II) نیز مشاهده می‌شود. در حالی که این غلظت‌ها تأثیر معنی‌داری بر میزان شاخص  $\Phi_{P_0}$  (کارایی عملکرد کوانتومی فتوشیمیایی اولیه) نداشته است. با وجود این، تمامی این شاخص‌ها در حضور غلظت ۴



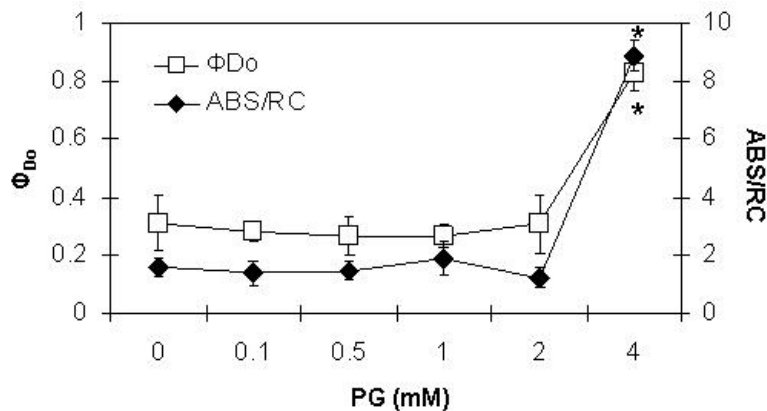
شکل ۳- اثر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات بر شدت فلورسنس کلروفیل *a* در سطح *K*. مقادیر نسبت به شاهد (غلظت صفر ممانعت کننده) نرمال شده‌اند.



شکل ۴- میزان آزاد شدن اکسیژن فتوسنتزی در سلول‌های *D. salina* در معرض غلظت‌های مختلف پروپیل گالات. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد. علامت ستاره نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر مختلف و شاهد (غلظت صفر ممانعت کننده) می‌باشد.



شکل ۵- تغییرات  $Fv/Fo$ ،  $\Phi_{Po}$  و  $\Phi_{Eo}$  در کشت‌های جلبکی تیمار شده با غلظت‌های مختلف پروپیل گالات مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد. علامت ستاره نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر مختلف و شاهد (غلظت صفر ممانعت کننده) می‌باشد.



شکل ۶- تغییرات  $\Phi_{Do}$  و  $ABS/RC$  در کشت‌های جلبکی تیمار شده با غلظت‌های مختلف پروپیل گالات مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد. علامت ستاره بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر مختلف و شاهد (غلظت صفر ممانعت کننده) می‌باشد.

## بحث

P بالاتری در مقایسه با شاهد دارند. بالاتر بودن سطح I نشان‌دهنده مخزن پلاستوکینون احیاء و تجمع بیشتر اولین پذیرنده الکترون ( $Q_A^-$ ) در حضور پروپیل گالات است (۳۷). این رویداد می‌تواند بیانگر توقف فرایند تنفس کلروپلاستی در نتیجه ممانعت از اکسیداز انتهایی پلاستید (PTOX) توسط پروپیل گالات باشد. از طرفی، زمانی که تولید اکسیژن آزاد شده از فتوسیستم II با استفاده از روش پلاروگراف تعیین می‌گردد، یک همبستگی منفی بین کاهش تدریجی در میزان آزاد شدن اکسیژن با افزایش غلظت ممانعت کننده مشاهده می‌شود. به هر حال غلظت ممانعت کننده تا حد ۲ میلی‌مولار تأثیر منفی بر فعالیت کمپلکس

همانند گزارش‌های پیشین در مورد گیاهان عالی، جلبک‌های سبز و سیانوباکتری‌ها مبنی بر افزایش چند مرحله‌ای فلورسنس سلول‌های سازگار شده با تاریکی (۱، ۲۵، ۳۹)، سلول‌های جلبک *Dunaliella* نیز یک افزایش چند مرحله‌ای فلورسنس را پس از قرار گرفتن در تاریکی از خود نشان می‌دهند (شکل ۲). شدت فلورسنس کلروفیل a در مراحل مختلف صعود (O-J-I-P) بیانگر میزان احیاء  $Q_A$ ،  $Q_B$  و مخزن پلاستوکینون است (۱۸، ۲۴). بررسی شدت فلورسنس نشان داد که سلول‌های جلبکی تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱ میلی‌مولار پروپیل گالات سطوح I و



تعداد مراکز واکنش فعال است (نتایج نشان داده نشده است). تجمع مراکز واکنش غیرفعال، با افزایش اتلاف انرژی جذب شده به صورت گرما (شکل ۶) همراه است. از سوی دیگر کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب به‌عنوان حساس‌ترین بخش در زنجیره انتقال الکترون فتوستتزی محسوب می‌شود (۲۰). کاهش در فعالیت این بخش از آسیب به سیستم انتقال الکترون فتوستتزی ناشی می‌شود (۲۹). همچنین، نتایج نشان داد که تغییرات در هر دو شاخص  $F_v/F_o$  و  $\Phi_{po}$  با افزایش شدت فلورسنس در ۳۰۰ میکروثانیه (سطح K) هماهنگ است (شکل ۳). افزایش در شدت فلورسنس در محدوده ۳۰۰ میکروثانیه نشان‌دهنده اثر ممانعت‌کنندگی در سیستم تجزیه‌کننده آب در سمت دهنده فتوسیستم II می‌باشد (۱۲، ۳۵). بنابراین می‌توان چنین تصور کرد که کاهش کارایی فتوسیستم II از ممانعت ایجاد شده توسط غلظت ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات بر کمپلکس تجزیه‌کننده آب ناشی می‌شود.

تیمار سلول‌های جلبکی با غلظت‌های تا ۰/۵ میلی‌مولار پروپیل گالات اثر مثبتی هم بر فتوستتزی و هم بر شاخص‌های فیزیولوژیک مانند رشد سلول و میزان رنگیزه‌ها دارد. مطالعات روی گیاه آراییدوپسیس نشان داد که پروپیل گالات در غلظت‌های پایین می‌تواند سبب افزایش عملکرد کواتومی فتوسیستم II شود (۲۶). همچنین سایر مطالعات روی اثر پروپیل گالات بر روند انتقال الکترون فتوستتزی بیان‌کننده نقش این ممانعت‌کننده در غلظت‌های پایین در ممانعت از تجزیه پروتئین D1 است (۱۲، ۳۳). این امر نشان می‌دهد که ممانعت‌کننده تنفس کلروپلاستی در این محدوده غلظت می‌تواند به‌عنوان یک محافظت‌کننده از سیستم فتوستتزی عمل کند. با توجه به توقف رشد سلول در کشت‌های تیمار شده با غلظت ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات (شکل ۱)، می‌توان چنین نتیجه گرفت که ممانعت از فعالیت فتوسیستم II در این شرایط می‌تواند ناشی از اثر ممانعت نوری ایجاد شده در حضور غلظت بالای پروپیل گالات باشد. مطالعات گذشته نیز نشان داده‌اند که ممانعت

تجزیه‌کننده آب و روند جریان انتقال الکترون فتوسیستم II ندارد (شکل ۵). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که کاهش معنی‌دار میزان اکسیژن آزاد شده از فتوسیستم II در حضور غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار پروپیل گالات به علت ممانعت از جریان الکترونی بین فتوسیستم II و اکسیژن یا در حقیقت ممانعت از عملکرد PTOX دخیل در فرایند تنفس کلروپلاستی باشد. مطالعات پیشین نشان دادند که میزان آزاد شدن اکسیژن فتوستتزی به محض اضافه کردن پروپیل گالات به سلول‌های کلامیدوموناس کاهش می‌یابد (۸، ۹، ۱۴). این کاهش سریع در میزان اکسیژن آزاد شده به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروپیل گالات نیست، زیرا هیچ یک از سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، آلفا توکوفرول و آسکوربات میزان اکسیژن آزاد شده را تغییر نمی‌دهند (۹). این نتایج پیشنهاد می‌کنند که کاهش در میزان آزاد شدن اکسیژن در حضور غلظت‌های تا حد ۲ میلی‌مولار ممانعت‌کننده، بدون تأثیر بر جریان الکترونی، ناشی از ممانعت از تنفس کلروپلاستی است.

کاهش شدید شدت فلورسنس و رسیدن آن به یک سطح تقریباً صاف در حضور غلظت‌های ۴ میلی‌مولار ممانعت‌کننده می‌تواند به علت کاهش ظرفیت فتوسیستم II برای انتقال الکترون از سیستم تجزیه‌کننده آب به سمت فتوسیستم I باشد. مشابه با کاهش شدید شدت فلورسنس در حضور این غلظت، کاهش شدیدی نیز برای  $F_v/F_o$ ، شاخصی متناسب با فعالیت کمپلکس تجزیه‌کننده آب در سمت دهنده فتوسیستم II (۲۰، ۲۹)، کارایی عملکرد کواتومی فتوشیمیایی اولیه ( $\Phi_{po}$ ) و میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II ( $\Phi_{Eo}$ ) مشاهده می‌شود (شکل ۵). همگام با چنین کاهشی، افزایش مشاهده شده در نسبت ABS/RC که ناشی از کاهش در تعداد مراکز واکنش فعال و یا افزایش در تعداد مولکول‌های آنتنی می‌باشد (۳۸)، می‌تواند بیانگر آسیب برگشت‌ناپذیر به فتوسیستم II باشد (۲۰). به هر حال نتایج ما بیانگر کاهش شدید در

کننده در غلظت بالاتر از ۲ میلی‌مولار شناخته شد. بنابراین می‌توان پروپیل گالات را به‌عنوان یک ممانعت‌کننده اختصاصی فتوسیستم II علاوه بر نقش آن در ممانعت‌کنندگی تنفس کلروپلاستی در نظر گرفت.

#### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت مالی در انجام این تحقیق قدردانی می‌گردد. نویسندگان مقاله از دست‌اندرکاران قطب‌تنش‌های گیاهی در دانشگاه اصفهان نیز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

از کمپلکس تجزیه‌کننده آب، حساسیت فتوسیستم II را به ممانعت نوری افزایش می‌دهد (۴۲) و این امر می‌تواند سبب تسریع تجزیه پروتئین D1 شود (۱۹).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان چنین جمع‌بندی نمود که غلظت ۴ میلی‌مولار پروپیل گالات به طور مستقیم بر اجزای فتوسیستم II اثر گذاشته و احتمالاً باعث القای پدیده ممانعت نوری در جلبک *Dunaliella* شده است. همچنین، با در نظر گرفتن نحوه اثر این غلظت از ممانعت‌کننده بر فتوستتوز و رشد سلول‌های جلبکی، سمت دهنده فتوسیستم II به‌عنوان جایگاه عمل ممانعت

#### منابع

- 1- Appenroth, K.J., Stockel, J., Srivastava, A. and Strasser, R.J. 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probe by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environmental Pollution*. 115, 49–64.
- 2- Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24, 1-15.
- 3- Avron, M. and Ben-Amotz, A. 1992. *Dunaliella*, physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press. Boca Raton.
- 4- Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1983. On the factors which determine massive  $\beta$ -Carotene accumulation in the halo-tolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. 72, 593-597.
- 5- Bennoun, P. 1994. Chlororespiration revisited: mitochondrial-plastid interactions in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics*. 1186, 59–66.
- 6- Bennoun, P. 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79, 4352-4356.
- 7- Chaudhuri, A. and Kar, R.K. 2008. Inhibition of seed germination by propyl gallate, a free radical scavenger and recovery of germination by hydrogen peroxide and ethylene in *Vigna Radiata*. *World Journal of Agricultural Science*. 4, 914-921.
- 8- Cournac, L., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Ravenel, J. and Peltier, G. 2002. In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 129, 1921–1928.
- 9- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.M., Kuntz, M. and Peltier, G. 2000. Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 17256–17262.
- 10- Cowan, A.K., Rose, P.D. and Horne, L.G. 1992. *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. *Journal of Experimental Botany*. 43, 1535-1547.
- 11- Delieu, T. and Walker, D.A. 1972. An improved cathode for measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytologist*. 71, 201-225.
- 12- Dewez, D., Ali, N.A., Perreault, F. and Popovic, R. 2007. Rapid chlorophyll a fluorescence transient of *Lemna gibba* leaf as an indication of light and hydroxylamine effect on photosystem II activity. *Photochemical and Photobiological Science*. 6, 532–538.
- 13- Elich, T.D., Edelman, M. and Mattoo, A.K. 1997. Evidence for light-dependent and light independent protein dephosphorylation in chloroplasts. *FEBS Letter*. 411, 236-238.
- 14- Forti, G. and Caldiroli, G. 2005. State transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. The role of the Mehler reaction in state 2-to-state 1 transition. *Plant physiology*. 137, 492-499.
- 15- Fricke, W. and Peters, W.S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley.

- A study at the cell level. *Plant Physiology*. 129, 374–388.
- 16-Gamboa, J., Munoz, M. and Quiles, M.J. 2009. Effects of antimycin A and n-propyl gallate on photosynthesis in sun and shade plants. *Plant Science*. 177, 643–647.
- 17-Georgakopoulos, J.H. and Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. 1998. Thylakoid protein phosphorylation is suppressed by free radical scavengers. Correlation between PSII core protein degradation and thylakoid protein phosphorylation. *Photosynthesis Research*. 58, 269–280.
- 18-Govindjee, J. F 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22, 131–160.
- 19-Jegershold, C., Virgin, I. and Stryring, S. 1990. Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry*. 29, 6179–6186.
- 20-Kalaji, H.M., Govindjee, Bosa, K., Koscielniak, J. and Zuk-Golaszewska, K. 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany*. 73, 64–72.
- 21-Krause, G. H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: basics. *Annual Review of Plant Physiology*. 42, 313–349.
- 22-Krüger, G. H. J., Tsimilli-Michael, M. and Strasser, R.J. 1997. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiologia Plantarum*. 101, 265–277.
- 23-Kuntz, M. 2004. Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta*. 218, 896–899.
- 24-Lazar, D. 2006. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*. 33, 9–30.
- 25-Lu, C.M. and Vonshak, A. 2002. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum*. 114, 405–413.
- 26-Maksymiec, W. Wojcik, M. and Krupa, Z. 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere*. 66, 421–427.
- 27-Nagata, T., Todoriki, S. and Kikuchi, S. 2004. Radial expansion root cells and elongation of root hairs of *Arabidopsis thaliana* induced by massive doses of gamma irradiation. *Plant & Cell Physiology*. 45, 1557–1565.
- 28-Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G. and Strasser, R.J. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and rewatering. *Environmental and Experimental Botany*. 60, 438–446.
- 29-Pereira, W.E., deSiqueira, D.L., Martinez, C.A. and Puiatti, M. 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus root stocks under aluminium stress. *Journal of Plant Physiology*. 157, 513–520.
- 30-Raghavan, S. and Hultin, H.O. 2005. Model system for testing the efficacy of antioxidants in muscle foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53, 4572–4577.
- 31-Schoen, M. 1988. Cell counting. In: Lobban, C., Champan, D., Kermer, B.P. (Eds), *Experimental phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 32-Shariati, M. and Lilley, McC. 1994. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: Subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant Cell & Environment*. 17, 1295–1304.
- 33-Sopory, S.K., Greenberg, B.M., Mehta, R.A., Edelman, M. and Mattoo, A.K. 1990. Free radical scavengers inhibit light-dependent degradation of the 32 kDa photosystem II reaction center protein. *Zeitschrift für Naturforschung*. 45C, 412–417.
- 34-Stirbet, A.D., Rosenau, P., Stroder, A.C. and Strasser, R.J. 2001. Parameter optimization of fast chlorophyll fluorescence induction model. *Mathematics and Computers in Simulations*. 56, 443–450.
- 35-Strasser, B.J. 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52, 147–155.
- 36-Strasser, R.J., Srivastava, A. and Tsimilli Michael, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (Eds) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, pp 445–483.

- 37-Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A. 2004. Analysis of the Chlorophyll Fluorescence Transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee (Eds) Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 19, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 321–362.
- 38-Strasser, B.J. and Strasser, R.J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: Mathis, P. (Eds), Photosynthesis: from Light to Biosphere, vol. 5. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, pp 977–980.
- 39-Strasser, R.J., Srivastava, A. and Govindjee, J. F. 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. Photochemistry and Photobiology. 61, 32–42.
- 40-Strasser, R.J. and Stirbet, A.D. 2001. Estimation of the energetic connectivity of PSII centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P fitting of experimental data to three different PSII models. Mathematics and Computers in Simulations. 56, 451–461.
- 41-Tsimilli-Michael, M., Eggenberg, P., Biro, B., Koves-Pechy, Voros, I. and Strasser, R.J. 2000. Synergistic and antagonistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O–J–I–P. Applied Soil Ecology. 15, 169–182.
- 42-Wang, W.Q., Chapman, D.J. and Barber, J. 1992. Inhibition of water splitting increases the susceptibility of photosystem II to photoinhibition. Plant Physiology. 99, 16–20.
- 43-Zurita, J.L., Josb, A., Psoa, A.D., Salgueroa, M., Lopez-Artiguez, M. and Repetto, G. 2007. Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems. Water Research. 41, 2599–2611.

## Effect of propyl gallate on photosystem II efficiency in unicellular green alga *Dunaliella salina* as probed by chlorophyll fluorescence measurements

Einali A.R.<sup>1</sup> and Shariati M.<sup>2</sup> and Paizi M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Science, University of Sistan and Blouchestan, Zahedan, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

### Abstract

Effect of propyl gallate, an inhibitor of plastid terminal oxidase involved in chlororespiration, on photosystem II efficiency in *Dunaliella salina* were investigated, using chlorophyll *a* fluorescence kinetic measurements. Treated cultures with propyl gallate concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2 and 4 mM showed that photosystem II efficiency increased in the presence of concentrations up to 1 mM and chlororespiration process was inhibited at propyl gallate concentrations of 1 and 2 mM. Nonetheless, no negative significant effect was observed on photosystem II electron flow. However, the fluorescence intensity drastically decreased and reached an almost plateau in 4 mM propyl gallate-treated cells. Such reduction was also found for  $F_v/F_o$  (the activity of the water splitting complex),  $\Phi_{po}$  (efficiency of quantum yield of primary photochemistry) and  $\Phi_{Eo}$  (quantum yield for electron transport). The decrease of these parameters was also coordinated with appearance of fluorescence intensity increase at 300  $\mu$ s step. The data showed that the decrease of photosystem II efficiency in the presence of 4 mM propyl gallate is because of its effects on water splitting complex on the donor side of photosystem II. Therefore, it may be supposed that propyl gallate is a specific inhibitor of photosystem II as well as chlororespiration.

**Key words:** Propyl gallate, Chlorophyll *a* fluorescence, Photosystem II, Water splitting complex, *Dunaliella salina*