

## کاهش تحمل به تنش اکسیداسیون نوری با افزایش سن برگ آفتابگردان

عزت‌اله اسفندیاری \* و امیر وحدتی‌راد

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

### چکیده

به منظور بررسی الگوی رفتاری تحمل به تنش اکسیداسیون نوری با افزایش سن برگ، بذرهاى آفتابگردان در مزرعه کشت شدند. در مرحله گرده‌افشانی، برگ‌های موجود در بوته‌های آفتابگردان به سه گروه جوان، میان‌سال و مسن تقسیم شد تا تغییرات توان دفاعی سلول با افزایش سن برگ، به همراه مدل‌سازی شدت‌های مختلف نور و تأثیر آن بر اکسیداسیون نوری مواد زیستی در سنین مختلف برگ بررسی شود. نتایج حاصل نشان داد که با وجود کاهش نیافتن محتوای کلروفیل در برگ‌ها با افزایش سن، میزان پروتئین کل و شاخص پایداری غشا کاهش یافته است. علاوه بر آن، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسید هیدروژن نیز با افزایش سن در برگ‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت. این در حالی بود که میزان فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن و گلوکاتایون S-ترانسفراز در برگ‌های مسن نسبت به جوان‌ترها افزایش یافته است. این نتایج نشان می‌دهند که با افزایش سن برگ توان دفاعی سلول کاهش یافته، میزان تولید اکسیدان‌ها بیش از جمع‌آوری آنهاست. نتایج حاصل از مدل‌سازی شدت‌های مختلف نور نیز نشان داد که به هنگام قرار گرفتن در شدت‌های بالای نور، میزان تولید پراکسید هیدروژن در برگ‌های مسن بسیار افزایش می‌یابد. این در حالی است که فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری کننده آن و آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز در مقایسه با شدت‌های نور کم کاهش یافته است. برآیند این عوامل باعث شد تا در برگ‌های مسن شدت نور بالا به اکسیده شدن کلروفیل و کاهش آن منجر شود. بنابراین، نتایج حاصل نشان می‌دهند که در شدت‌های بالای نور به علت کاهش توان دفاعی سلول، تنش اکسیداسیون شدیدتری در برگ‌های مسن نسبت به برگ‌های جوان اتفاق می‌افتد.

**واژه‌های کلیدی:** آفتابگردان، اکسیداسیون نوری، سن برگ، شدت نور، مکانیسم‌های دفاعی

### مقدمه

کربن در چرخه کالوین (Kitijima *et al.*, 2002; Ohe *et al.*, 2005)، کاهش میزان پروتئین‌ها، کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی، افزایش میزان نشانگرهای تنش اکسیداتیو مانند پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید و

پیری آخرین مرحله نموی برگ است که با تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بسیاری همراه است (Smart, 1994). از جمله آنها می‌توان به کاهش تثبیت دی‌اکسید

درصدی فعالیت آنزیم‌های فعال در چرخه کالوین شده، تثبیت دی اکسید کربن را کاهش می‌دهد. این عمل، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن را به دنبال دارد. به همین علت مشخص شده است که کلروپلاست نخستین تغییرات ناشی از پیری را در حضور نور تحمل می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در تمامی اندامک‌های سلول باعث اکسیداسیون مولکول‌های مهم زیستی سلول مانند لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها می‌شوند، که تجمع آسیب‌های وارده در نهایت، باعث مرگ سلول خواهد شد (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۹؛ اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸ الف و ۱۳۸۸ ب؛ Mittler, 2002؛ Mittler *et al.*, 2004؛ Edreva, 2005). برای جلوگیری از تأثیر تخریبی اکسیداسیون نوری، گیاهان دارای مکانیسم‌های بیوشیمیایی متعددی هستند که از جمله آنها می‌توان به چرخه مهلر (Asada, 2000)، چرخه گلوکوتایون-آسکوربات (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸ الف؛ Edreva, 2005)، چرخه گزانتوفیل (Ort, 2001)، انتقال چرخه‌ای الکترون در فتوسیستم I (Edreva, 2005) و تنفس نوری (Edreva, 2005) اشاره کرد. همچنین، برای مقابله با تأثیر مضر اکسیداسیون نوری، گیاهان از آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربات، گلوکوتایون، توکوفرول، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها به منظور کاهش خسارت اکسیداسیون مواد زیستی، حتی در شرایط مطلوب محیطی، بهره می‌برند (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸ ب؛ Mittler *et al.*, 2004). آنزیم آسکوربات پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که در کلروپلاست به دو شکل آیزومری، متصل به غشای تیلاکوئید و محلول در استروما، حضور دارد

افزایش نشت الکترولیتی (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۹) اشاره نمود. گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده طی فرآیندهای حیاتی سلول مانند فتوستتزی، تنفس و تنفس نوری، حتی در شرایط مطلوب محیطی، نقش مهمی در بیان ژن‌ها و اجرای فرآیندهای درگیر در پیری ایفا می‌کنند (Ohe *et al.*, 2005). در همین راستا، Del Rio و همکاران (۲۰۰۶) گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در پراکسیزوم را عامل پیری برگ‌های نخود در شرایط تاریکی می‌دانند. Jimenez و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که فعالیت همه اجزای درگیر در چرخه گلوکوتایون-آسکوربات میتوکندریایی در این شرایط کاهش می‌یابد؛ به همین علت به نظر می‌رسد میتوکندری پیش از پراکسیزوم تحت تأثیر قرار گرفته، در فرآیند پیری ایفای نقش می‌کند.

در گیاهان، کلروپلاست مهم‌ترین اندامک تولیدکننده گونه‌های فعال اکسیژن در حضور نور محسوب می‌شود (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۹). در شرایط مزرعه‌ای، شدت نوری که از روی برگ‌ها دریافت می‌شود با تکان خوردن برگ‌ها در اثر وزش باد و حرکت ابرها مدام در حال تغییر است. اما گیاهان قادر نیستند ظرفیت فتوستتزی خود را به سرعت با تغییرات شدت نور موجود در محیط تنظیم کنند (Ort, 2001). هرگاه شدت نور دریافتی بیش از ظرفیت فتوستتزی گیاه باشد، نسبت  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ,  $\text{H}^+$  در کلروپلاست کاهش می‌یابد و به علت بسته شدن زنجیره انتقال الکترون، تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد (Esfandiari *et al.*, 2007a). پراکسید هیدروژن در کلروپلاست حتی در مقدار کم (در حدود ۱۰ میکرومولار) باعث کاهش ۵۰

میان سال و مسن تقسیم و الگوی رفتاری آنها با اهداف یاد شده، بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

بذرهای یکنواخت آفتابگردان در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه در اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۹ کشت شد. بذرها به روش کپه‌ای و در ناحیه داغ آب در عمق ۵ تا ۷ سانتی‌متری خاک قرار گرفتند. در این آزمایش، فاصله بین ردیف‌ها و فاصله بین بوته‌ها به ترتیب ۶۰ و ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بوته‌های حاصل طی دو مرحله تنک و علف‌های هرز آنها به روش مکانیکی حذف شد. نیازهای کودی بوته‌ها پس از انجام آزمایش‌های خاک تعیین و در زمان تهیه بستر به خاک اضافه شد. آبیاری کرت‌های آزمایشی به روش غرقابی و یک‌بار در هفته انجام شد. با رسیدن بوته‌های آفتابگردان به مرحله گرده‌افشانی، از میان بوته‌های رقابت‌کننده برخی انتخاب و برگ‌های موجود روی آنها (میانگین ۲۵ برگ در هر بوته) به سه گروه جوان، میان‌سال و مسن تقسیم شد. شایان ذکر است که از بوته‌های استفاده شده، برگ‌های یکسان و هم‌سن به عنوان نمونه برداشت و سپس از آنها دیسک‌های برگ‌گی (به مساحت ۲/۳ سانتی‌متر مربع) تهیه و در دو آزمایش جداگانه با اهداف متفاوت ارزیابی شد.

### بررسی تأثیر سن برگ بر مکانیسم‌های دفاعی و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک

بدین منظور از برگ‌ها با سنین مختلف، نمونه‌هایی تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. دیسک‌های برگ‌گی تهیه شده برای اندازه‌گیری فعالیت

(Edreva, 2005). این آنزیم در چرخه‌های مه‌لر و گلو‌تایتون-آسکوربات نقش مؤثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند (Mittler, 2002). وجود چرخه‌های یاد شده حتی در شرایط مطلوب محیطی نیز برای حفظ ساختار کلروپلاست و دوام فتوسنتز بسیار الزامی است (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۹). اخیراً مشخص شده است که آسکوربات پراکسیداز متصل به غشای تیلاکوئیدی عامل اصلی تحمل گیاه به تنش اکسیداسیون نوری است (Kitijima et al., 2002). در توتون تراریخته که از ویژگی بیان آنزیم کاتالاز باکتری در کلروپلاست برخوردار بود، مشخص شد که تحمل بالایی نسبت به تنش اکسیداسیون نوری وجود دارد (Ohe et al., 2005).

در حال حاضر، اطلاعات اندکی در خصوص تغییرات مکانیسم‌های دفاعی سلول با افزایش سن برگ و نیز شدت اکسیداسیون مواد زیستی در شدت‌های مختلف نور در سنین مختلف برگ‌گی وجود دارد. در حالی که مکانیسم‌های دفاعی سلول نقش مهمی در اجرای مطلوب متابولیسم سلول و جلوگیری از بروز اکسیداسیون مواد زیستی ایفا می‌نمایند. از سوی دیگر، شناخت این فرآیندها و الگوی رفتاری آنها می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص نقش برگ‌ها با سن مختلف در تولید و فیزیولوژی عملکرد در اختیار فیزیولوژیست‌های گیاهان زراعی قرار دهد. بنابراین، به منظور بررسی شیوه تغییرات مکانیسم‌های دفاعی با افزایش سن برگ و نیز بررسی تأثیر شدت‌های مختلف نور بر اکسیداسیون مواد زیستی، بذرهای آفتابگردان در مزرعه کشت و پس از رسیدن به مرحله گرده‌افشانی برگ‌های موجود روی بوته‌ها به سه گروه جوان،

پراکسیداز، گلو‌تاتیون S-ترانسفراز، میزان کلروفیل کل، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسید هیدروژن) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در این مرحله، تیمارهای آزمایش شامل سن برگ بر اساس محل قرارگیری روی ساقه (برگ‌های پایین، وسط و بالا به ترتیب به عنوان برگ‌های مسن، میان‌سال و جوان) و غلظت‌های مختلف متیل واپلوژن (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) بود. داده‌های حاصل بر اساس قالب فاکتوریل در پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تکرار تجزیه شد. در ارتباط با صفاتی که تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نشان دادند، مقایسه میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

#### اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا

شاخص پایداری غشا بر اساس میزان هدایت الکتریکی حاصل از نشت یون‌ها از سلول‌های برگ به درون آب دیونیزه اندازه‌گیری شد. بدین منظور دو عدد دیسک برگی در لوله‌های آزمایش محتوی ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه غوطه‌ور شد. سپس مجموعه‌ای از نمونه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و مجموعه دیگر در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. هدایت الکتریکی نمونه‌ها پس از رسیدن به دمای اتاق با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری و ثبت شد. شاخص پایداری غشا بر اساس فرمول ۱ محاسبه شد (Azizpour et al., 2010):

فرمول ۱  $100 \times [1 - (C1/C2)] =$  شاخص پایداری غشا  
در رابطه بالا C1 و C2 به ترتیب نشان‌دهنده میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها در دمای ۴۰ و ۱۰۰ درجه سانتیگراد هستند.

برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلو‌تاتیون S-ترانسفراز) و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک (شاخص پایداری غشا، پراکسید هیدروژن، پروتئین، کلروفیل و مالون‌دی‌آلدئید) استفاده شدند. در این بخش از آزمایش، موقعیت برگ‌ها به عنوان تیمار در نظر گرفته شده و تجزیه آماری داده‌ها بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. در ارتباط با صفاتی که تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نشان دادند، مقایسه میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

#### مدل‌سازی شدت‌های مختلف نور و بررسی تأثیر آن بر اکسیداسیون نوری مواد زیستی در سنن مختلف برگ

در حال حاضر، فیزیولوژیست‌های گیاهی برای مدل‌سازی شدت‌های نور مختلف از متیل واپلوژن استفاده می‌کنند (Ohe et al., 2005). محل عمل این ماده انتهای زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست بوده، با کاهش انرژی لازم برای تبدیل اکسیژن به رادیکال سوپراکسید، تولید رادیکال یاد شده را در حضور نور به طور چشمگیری افزایش می‌دهد (Fujibe et al., 2004). بدین منظور، دیسک‌های برگی تازه به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار متیل واپلوژن غوطه‌ور شدند. پس از اتمام زمان یاد شده، دیسک‌های برگی به مدت یک ساعت در مقابل نور ۳۰۰ میکرومولار بر ثانیه در متر مربع قرار گرفته، بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. نمونه‌های برگی تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی (فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات

دقیقه ثبت و میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی  $2/8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد (Sairam *et al.*, 2002).

### استخراج و سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز

برای استخراج آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز، دو عدد دیسک برگی در ۲ میلی لیتر بافر فسفات سرد ۱۰۰ میلی مولار با اسیدیته  $6/8$  که حاوی EDTA  $0/4$  میلی مولار، پلی وینیل پیرولیدین  $0/5$  درصد (وزنی-حجمی) و سدیم دی متاسولفیت ۱ میلی مولار بود، همگن شد. نمونه های همگن شده در  $21000 \text{ g}$  و دمای  $4$  درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصل برای اندازه گیری فعالیت آنزیم یاد شده استفاده شد (Panda *et al.*, 2003).

کمپلکس واکنشی حاوی  $900$  میکرولیتر بافر فسفات  $100$  میلی مولار با اسیدیته  $7/4$ ،  $450$  میکرولیتر گلوتاتیون احیا  $3/5$  میلی مولار،  $100$  میکرولیتر ۱-کلرو، ۲ و ۴-دی نیتروبنزن  $30$  میلی مولار و  $100$  میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده است. تغییرات جذب نمونه ها در طول موج  $340$  نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت و میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی  $0/0096 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد (Panda *et al.*, 2003).

میزان پروتئین محلول کل با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) به دست آمد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد.

### میزان پراکسید شدن لیپیدها

این شاخص بر اساس روش Stewart و Bewley (۱۹۸۰) اندازه گیری شد. دو عدد دیسک برگی در ۱۰ میلی لیتر از محلول  $0/1$  درصد تری کلرواستیک اسید

### استخراج آنزیم های جمع آوری کننده پراکسید هیدروژن

برای استخراج آنزیم های جمع آوری کننده پراکسید هیدروژن، دو عدد دیسک برگی در ۲ میلی لیتر بافر فسفات سرد  $100$  میلی مولار با اسیدیته  $7/5$  حاوی EDTA  $0/4$  میلی مولار، آسکوربات  $3$  میلی مولار، پلی وینیل پیرولیدین  $5$  درصد (وزنی-حجمی) همگن شد. نمونه های همگن شده در  $16000 \text{ g}$  و دمای  $4$  درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصل برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های جمع آوری کننده پراکسید هیدروژن استفاده شد (Esfandiari *et al.*, 2007b).

### فعالیت کاتالاز

فعالیت این آنزیم طبق روش Aebi (۱۹۸۴) اندازه گیری شد. کمپلکس واکنشی حاوی  $1/5$  میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم  $100$  میلی مولار با اسیدیته  $7$ ،  $0/5$  میلی لیتر پراکسید هیدروژن  $7/5$  میلی مولار و  $50$  میکرولیتر از محلول آنزیمی است که حجم نمونه ها با اضافه کردن آب مقطر به  $3$  میلی لیتر رسانده شد. تغییرات در جذب نمونه ها در طول موج  $240$  نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب خاموشی  $36/6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد.

### آسکوربات پراکسیداز

کمپلکس واکنشی حاوی  $250$  میکرولیتر محلول بافر فسفات  $100$  میلی مولار با اسیدیته  $7$ ،  $250$  میکرولیتر آسکوربات یک میلی مولار،  $250$  میکرولیتر EDTA  $0/4$  میلی مولار،  $190$  میکرولیتر آب دو بار تقطیر،  $10$  میکرولیتر پراکسید هیدروژن  $10$  میلی مولار و  $50$  میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج بود. تغییرات جذب نمونه ها در طول موج  $290$  نانومتر در مدت یک

استفاده Arnon (۱۹۴۹) برای تعیین میزان کلروفیل کل استفاده شد.

### نتایج و بحث

همان‌طور که اشاره شد این پژوهش در دو بخش بررسی افزایش سن برگ بر عملکرد مکانیسم‌های دفاعی و مدل‌سازی شدت نور و ارزیابی عملکرد مکانیسم‌های دفاعی در چنین شرایطی صورت گرفته است. بنابراین، نتایج حاصل نیز در دو بخش جداگانه آورده شده است.

#### بررسی تأثیر سن برگ بر مکانیسم‌های دفاعی و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک

نتایج نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدئید (شکل ۱-الف) و پراکسید هیدروژن (شکل ۱-ب) تولید شده در برگ‌های مسن و میان‌سال آفتابگردان به طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) بیشتر از برگ‌های جوان بود. در حالی که بین همه سن‌های برگ‌ها مورد مطالعه از نظر میزان پروتئین محلول کل (شکل ۱-ج) و شاخص پایداری غشا (شکل ۱-د) در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. به طوری که میزان این شاخص‌ها در برگ‌های جوان بیشتر بوده، با افزایش سن به میان‌سالی و پیری، میزان شاخص‌های یاد شده به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بین سن‌های مختلف برگ‌ها مورد مطالعه، در برگ‌های مسن به دست آمد که با برگ‌های میان‌سال و جوان در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۲-الف). روند تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز متفاوت بوده، با افزایش سن برگ از جوانی به میان‌سالی و پیری در گیاه آفتابگردان، فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۲-ب). به

همگن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g سانتی‌فیوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل شد. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتی‌فیوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. میزان پراکسید شدن لپیدها با استفاده از اختلاف بین طول موج‌های جذبی و ضریب خاموشی  $155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  به دست آمد.

#### اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن

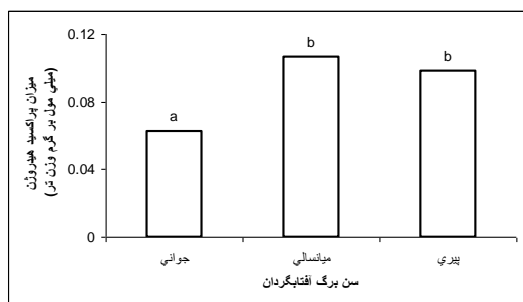
دو عدد دیسک برگ‌گی در ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری‌کلرواستیک اسید (وزنی-حجمی) همگن شده، در ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. سپس کمپلکس واکنش با ترکیب ۰/۵ میلی‌لیتر مایع رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۷ و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار به دست آمد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر ثبت شد. میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد (Sergiv et al., 1997).

#### اندازه‌گیری کلروفیل

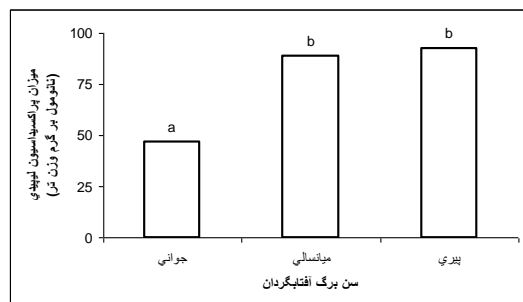
برای سنجش میزان کلروفیل کل ۰/۰۵ گرم از نمونه‌های برگ‌گی در ۴ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفو‌کسید غوطه‌ور شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۵ سانتیگراد و تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت زمان یاد شده نمونه‌ها در تاریکی نگهداری و پس از رسیدن به دمای اتاق میزان جذب آنها در طول موج‌های ۶۶۵ و ۶۴۹ نانومتر ثبت شد. سپس از فرمول مورد

اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. همچنین، نتایج حاصل مشخص نمود که سن برگ بر میزان کلروفیل کل تأثیرگذار نبوده است. به طوری که بین سن‌های جوانی، میان‌سالی و پیری از نظر این شاخص اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۲-د).

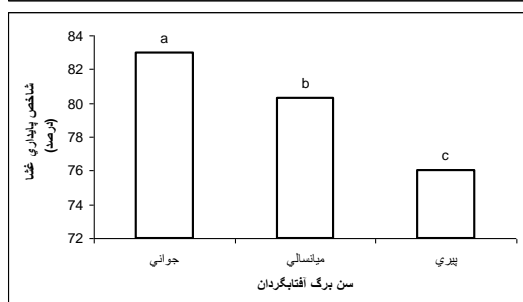
طوری که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به ترتیب در برگ‌های مسن و جوان بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون-S-ترانسفراز (شکل ۲-ج) نیز در برگ‌های مسن آفتابگردان به دست آمد که با سنین میان‌سالی و جوانی برگ‌ها



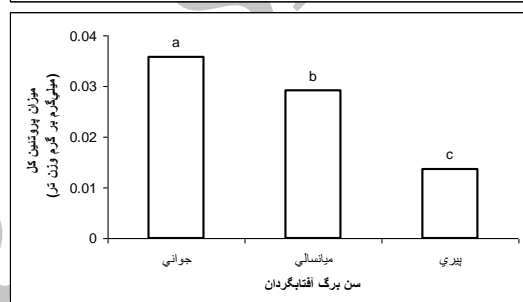
ب



الف

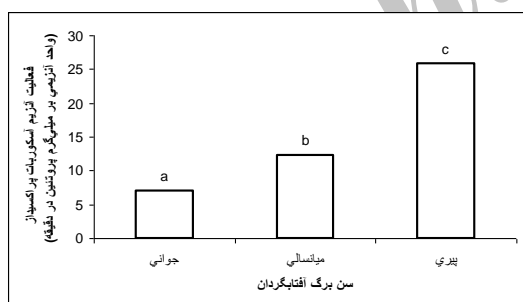


د

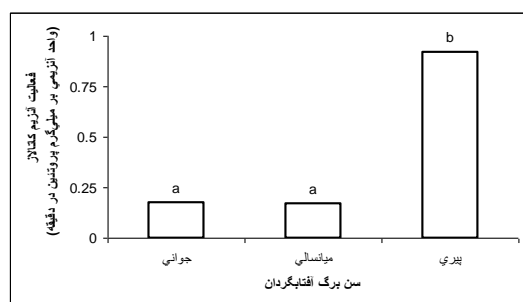


ج

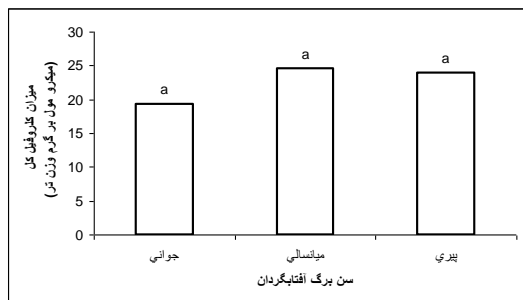
شکل ۱- تأثیر سن برگ بر میزان (الف) پراکسیداسیون لیپیدی؛ (ب) میزان پراکسید هیدروژن؛ (ج) میزان پروتئین کل؛ (د) شاخص پایداری غشا در برگ آفتابگردان



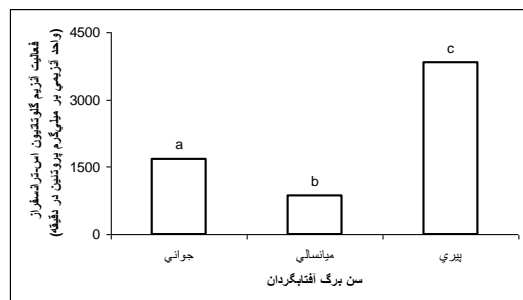
ب



الف



د



ج

شکل ۲- تأثیر سن برگ بر (الف) میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز؛ (ب) آسکوربات پراکسیداز؛ (ج) گلوتاتیون-S-ترانسفراز؛ (د) کلروفیل کل در برگ آفتابگردان

## مدل‌سازی شدت‌های مختلف نور و بررسی تأثیر آن بر اکسیداسیون نوری مواد زیستی در سنن مختلف برگ

نتایج حاصل نشان داد که در سنن جوانی و میان‌سالی برگ آفتابگردان، قرار گرفتن در شدت‌های نور بالا قادر است فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دهد (شکل ۳-الف). در حالی که در برگ‌های مسن‌تر فعالیت این آنزیم در شدت نورهای مختلف مدل‌سازی شده در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته، یا بدون تغییر بود (شکل ۳-الف). روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در سن‌های مختلف برگ آفتابگردان و شدت‌های نور متفاوت مدل‌سازی شده با مقادیر متغیر متیل و ایلوژن مشابه آنزیم آسکوربات پراکسیداز بود، به طوری که در برگ‌های جوان و به‌ویژه در مقادیر ۱ و ۲ میکرومولار متیل و ایلوژن فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشت. اما نتایج نشان داد که در برگ‌های مسن فعالیت این آنزیم در زمان قرار گرفتن در شدت‌های نور بالا به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش می‌یابد (شکل ۳-ب). فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز در برگ‌های جوان و میان‌سال با قرار گرفتن در شدت‌های نور بالای مدل‌سازی شده با مقادیر متغیر متیل و ایلوژن به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۳-ج). در حالی که فعالیت آنزیم یاد شده در برگ‌های مسن آفتابگردان در شدت‌های نور مختلف مدل‌سازی شده (به جز مقدار ۰/۵ میلی‌مولار متیل و ایلوژن) تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۳-ج).

میزان پراکسید هیدروژن در تمامی سن‌های برگ آفتابگردان و شدت‌های نور مدل‌سازی شده با استفاده از مقادیر متفاوت متیل و ایلوژن در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشت (شایان ذکر است که میزان پراکسیداسیون لیسیدی در ۰/۵ میکرومولار سن‌های میان‌سالی و پیری از این روند تغییرات تبعیت نمی‌کند) (شکل ۴-الف). همچنین، نتایج حاصل نشان داد که تنها در برگ‌های جوان آفتابگردان میزان کلروفیل کل در شدت‌های نور مختلف مدل‌سازی شده با مقادیر مختلف متیل و ایلوژن ثابت بوده، تغییر معنی‌داری نداشته است. در حالی که در سنن پیری و میان‌سالی برگ آفتابگردان در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف متیل و ایلوژن مقدار کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴-ب).

Ohe و همکاران (۲۰۰۵) و Kitijima و همکاران (۲۰۰۲) کاهش فتوسنتز و Buchanan (۱۹۹۷) کاهش میزان mRNA رویسکو را با افزایش سن برگ گزارش کرده‌اند. به علاوه Ohe و همکاران (۲۰۰۵) و اسفندیاری و همکاران (۱۳۸۹) نیز کاهش محتوای پروتئین برگ را با افزایش سن آن گزارش نموده‌اند که با نتایج حاصل از این پژوهش همسو است (شکل ۱-د). رویسکو بیشترین بخش پروتئین موجود در سلول‌های برگ را تشکیل می‌دهد، بنابراین، به نظر می‌رسد میزان آنزیم رویسکو با افزایش سن برگ کاهش یابد که خود می‌تواند کاهش فتوسنتز را به دنبال داشته باشد. Smart (۱۹۹۴) گزارش نمود که در روند پیری برگ، کلروپلاست از نخستین محل‌های آغاز فرآیند کاتابولیسم به شمار می‌آید. زیرا به علت عدم مصرف پتانسیل هیدروژن در چرخه کالوین،



مهم‌ترین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن به‌شمار می‌آیند (Edreva, 2005, Mittler, 2002)، با این وجود احتمال دارد که در برگ‌های میان‌سال و مسن میزان تولید پراکسید هیدروژن بیش از سرعت جمع‌آوری آن باشد. در حال حاضر نیز فیزیولوژیست‌های گیاهی بر این باورند که هرگاه تولید گونه‌های فعال اکسیژن بر فعالیت مکانیسم‌های دفاعی غلبه کند باعث آسیب به مولکول‌های زیستی مهم شده، تنش اکسیداتیو اتفاق خواهد افتاد (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۹؛ Ort, 2001؛ Mittler, 2002؛ Mittler, 2004؛ Edreva, 2005 *et al.*, 2004).

آسیب به غشاهای زیستی علاوه بر افزایش نشت الکترولیتی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی، باعث تجمع متابولیت 4-hydroxynonenal (4HNE) می‌شود (Schnieder *et al.*, 2008). این متابولیت در مقادیر بالا (در حدود ۱-۲۰ میکرومولار) برای سلول سمی بوده، سبب فعال شدن مجموعه‌ای از مسیرهای متابولیسمی مخرب دیگر می‌شود. از جمله آنها می‌توان به فعالیت آنزیم اندونوکلئاز و رهاسازی آنزیم سیتوکروم C اکسیداز اشاره نمود. در پی فعالیت آنزیم اندونوکلئاز عمل تکه تکه شدن DNA (DNA-laddering) اتفاق می‌افتد (Marrs, 1996). به علاوه، رهاسازی آنزیم سیتوکروم C اکسیداز تولید انرژی را در سلول‌های گیاهی کاهش می‌دهد (Zarkovic, 2003). تجمع این ترکیبات سمی، همراه با آسیب به سایر نقاط کلیدی متابولیسم، در نهایت، مرگ سلول را در پی خواهد داشت. گلوکوتایون S-ترانسفراز آنزیمی است که 4HNE را با گلوکوتایون ترکیب و آن را سم‌زدایی

نسبت  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ,  $\text{H}^+$  در کلروپلاست کاهش می‌یابد، سپس زنجیره انتقال الکترون در این اندامک بسته می‌شود و چون ریزش‌های فوتونی همچنان ادامه دارد، اکسیژن به طور ناقص احیا شده، بدین ترتیب تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله رادیکال سوپراکسید افزایش خواهد یافت. اسفندیاری و همکاران (۱۳۸۹) توقف فعالیت آنزیم Cu/Zn-SOD را با افزایش سن برگ گزارش کرده‌اند. آیزوزیم Cu/Zn-SOD از جمله آنزیم‌های دخیل در جمع‌آوری رادیکال سوپراکسید و تبدیل آن به پراکسید هیدروژن است (Asada, 2000). آیزوزیم یاد شده در کلروپلاست در چرخه مهلر فعال است که از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی این اندامک برای حفظ ساختار آن به شمار می‌آید (Asada, 2000). در این پژوهش نیز افزایش نشانگرهای زیستی مالون‌دی‌آلدئید (شکل ۱-الف) و پراکسید هیدروژن (شکل ۱-ب) به همراه کاهش شاخص پایداری غشا (شکل ۱-د) با افزایش سن نشان‌دهنده وقوع تنش اکسیداتیو در برگ‌های مسن است. اسفندیاری و همکاران (۱۳۸۹) در گندم دوروم و Ohe و همکاران (۲۰۰۵) در توتون نیز افزایش مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن را با افزایش سن برگ گزارش نموده‌اند. آنها معتقدند که افزایش آسیب به غشاها باعث کاهش نفوذپذیری انتخابی این بخش مهم و کلیدی سلول می‌شود. تجمع مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در حالی در برگ‌های مسن اتفاق افتاده است که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (شکل ۲-الف) و آسکوربات پراکسیداز (شکل ۲-ب) در این برگ‌ها بیشتر از برگ‌های سایر سنین بود. اگر چه این آنزیم‌ها از

مصرف محصولات نوری فتوسنتز می‌شود. با این تفاوت که متیل وایلوژن نقش واسطه را داشته و با انتقال الکترون بر روی اکسیژن باعث تولید رادیکال سوپراکسید می‌شود (Ohe *et al.*, 2005). در حقیقت، هدف استفاده از این ترکیب بررسی توانایی مکانیسم‌های دفاعی فعال در کلروپلاست به ویژه چرخه‌های مهلر و گلو تاتیون-آسکوربات در جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده است. در همین راستا، رادیکال سوپراکسید تولید شده در کلروپلاست توسط آیزوزیم Cu/Zn-SOD به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود (Asada, 2000). در این پژوهش، افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در همه سنن برگی و غلظت‌های مختلف متیل وایلوژن نشان‌دهنده افزایش فعالیت آیزوزیم Cu/Zn-SOD است (شکل ۴-الف). پراکسید هیدروژن حاصل نیز با فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در کلروپلاست جمع‌آوری و به آب تبدیل می‌شود که پتانسیل هیدروژن لازم از  $\text{NADPH, H}^+$  تأمین می‌شود (Edreva, 2005). این آنزیم در چرخه‌های گلو تاتیون-آسکوربات و مهلر فعال است. با افزایش شدت نور مدل‌سازی شده با متیل وایلوژن، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سن جوانی و میان‌سالی افزایش یافت (شکل ۳-الف). با توجه به اینکه محل اثر متیل وایلوژن کلروپلاست است، افزایش پراکسید هیدروژن تولید شده در غلظت‌های مورد مطالعه متیل وایلوژن در سنن مختلف برگ آفتابگردان نسبت به شاهد در این اندامک خواهد بود. بنابراین، اختلاف بین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شدت‌های نور مختلف مدل‌سازی شده و سن‌های متفاوت برگ مورد مطالعه ناشی از تغییر فعالیت

می‌کند (Katsuhara *et al.*, 2005; Koca *et al.*, 2006). فعالیت این آنزیم در مرحله پیری به طور معنی‌داری نسبت به سنن میان‌سالی و جوانی افزایش یافته است (شکل ۲-ج). نتایج پژوهش نشان می‌دهد که اگر چه فعالیت آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی متابولیت‌های مضر با مسن تر شدن برگ افزایش می‌یابد، با این حال سرعت تولید عوامل آسیب‌رسان بیش از فعالیت مکانیسم‌های دفاعی بوده است؛ به طوری که با وجود ثابت بودن میزان کلروفیل کل (شکل ۲-د)، سایر شاخص‌های بروز تنش اکسیداتیو نظیر مالون‌دی‌آلدئید (شکل ۱-الف)، شاخص پایداری غشا (شکل ۱-د) و تجمع پراکسید هیدروژن (شکل ۱-ب) به طور معنی‌داری افزایش یافته است. بنابراین، همه نتایج مؤید این موضوع است که با افزایش سن برگ به علت غلبه عوامل مضر بر مکانیسم‌های دفاعی در سلول‌های گیاه تنش اکسیداتیو اتفاق می‌افتد.

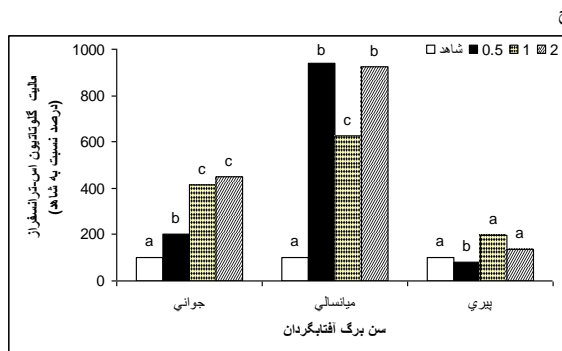
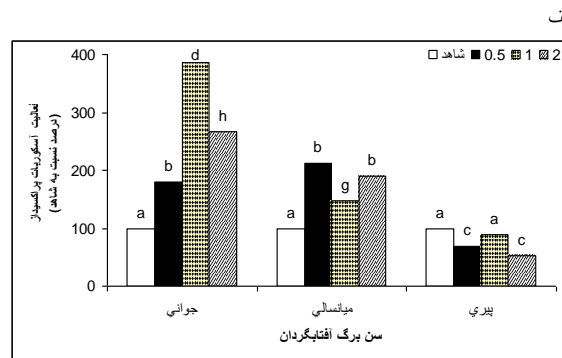
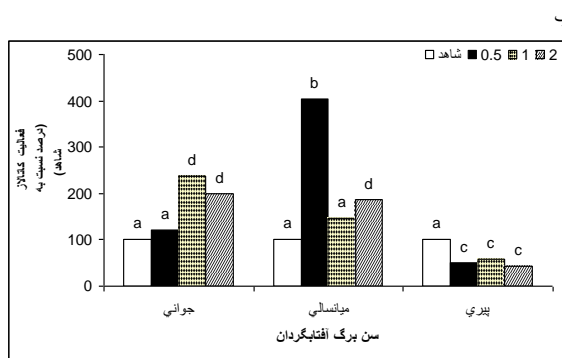
شدت‌های نور بالا در برگ‌های جوان و مسن باعث برهم خوردن تعادل بین تولید و مصرف محصولات واکنش‌های نوری فتوسنتز می‌شود (Ort, 2001). در این شرایط نیز به علت کاهش مصرف پتانسیل ردوکس، نسبت  $\text{NADP}^+/\text{NADPH, H}^+$  کاهش یافته و ناقل‌های زنجیره انتقال الکترون به شکل احیا درآمده، به اصطلاح مسیر بسته می‌شود که افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در پی خواهد داشت. در حال حاضر، محققان از متیل وایلوژن برای مدل‌سازی شدت‌های بالای نور و مطالعه آن روی کلروپلاست استفاده می‌کنند (Ohe *et al.*, 2005). این ترکیب به عنوان گیرنده الکترون از ناقل فرودوکسین عمل کرده، جایگزین چرخه کالوین در

مقدار پراکسید هیدروژن تولید شده به طور معنی داری کمتر از پیری (البته فقط در جوانی) بود (شکل ۴-الف). در مرحله جوانی فعالیت آنزیم کاتالاز نیز با قرارگیری در غلظت‌های مختلف متیل و ایلوژن افزایش معنی داری داشت (شکل ۳-ب). در حالی که در مرحله میان‌سالی به جز غلظت ۰/۵ میلی‌مولار در سایر موارد با شاهد تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳-ب). اما در مرحله پیری فعالیت این آنزیم در همه موارد تیمار با متیل و ایلوژن کاهش داشت. کاتالاز پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسی‌زوم را طی فعالیت تنفس نوری جمع‌آوری می‌کند. آنزیم کاتالاز در پراکسی‌زوم فعال است. پراکسید هیدروژن در این اندامک طی واکنش  $\beta$ -اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاتابولیسم اسیدهای آمینه آروماتیک و تنفس نوری تولید می‌شود (Del Rio et al., 2006).

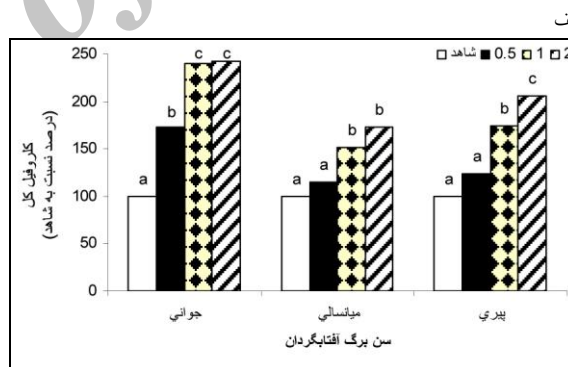
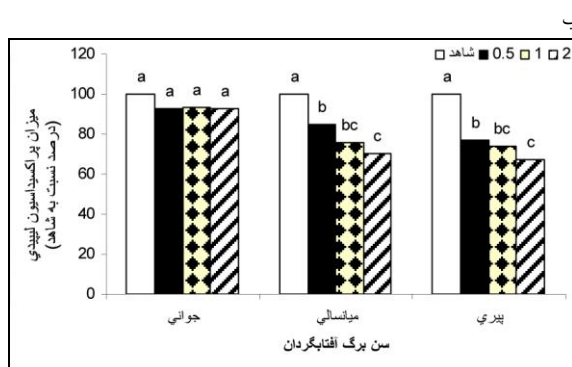
آسیب به کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن نشان‌دهنده وقوع تنش اکسیداتیو در کلروپلاست است. گونه‌های فعال اکسیژن کلروفیل‌های موجود در غشاهای تیلاکوئیدی را اکسیده نموده، با تجزیه آنها، برگ‌ها رنگ سبز خود را از دست می‌دهند. در برگ مسن با قرارگیری در غلظت‌های مختلف متیل و ایلوژن به علت تجمع پراکسید هیدروژن و کاهش فعالیت آنزیم‌های دفاعی کاهش کلروفیل اتفاق افتاد (شکل ۴-ب). در حالی که در برگ‌های جوان و میان‌سال اعمال تیمار با مقادیر مختلف متیل و ایلوژن نتوانست میزان کلروفیل را کاهش دهد (شکل ۴-ب)، زیرا در برگ‌های جوان مکانیسم‌های دفاعی فعال در کلروپلاست به راحتی توانسته‌اند مانع از تجزیه آنها شوند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز از مهم‌ترین آنهاست (شکل ۳-الف).

این آنزیم در کلروپلاست است. بنابراین، افزایش فعالیت این آنزیم در مراحل جوانی و میان‌سالی در کاربرد مقادیر مختلف متیل و ایلوژن برای مدل‌سازی شدت‌های نور متفاوت نسبت به شاهد ناشی از فعال شدن آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز کلروپلاستی است. اجرای چرخه‌های مهلر و گلو‌تاتیون-آسکوربات باعث تعدیل نسبت  $NADP^+/NADPH, H^+$  در کلروپلاست می‌شود (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۷). زیرا در هر دو چرخه یاد شده پتانسیل هیدروژن لازم برای احیای پراکسید هیدروژن در نهایت، از  $NADPH, H^+$  تأمین می‌شود. علاوه بر این، در چرخه مهلر الکترون‌ها از برخی محل‌های دیگر نظیر فرود و کسین نیز الکترون روی اکسیژن منتقل شده، تولید رادیکال سوپراکسید می‌کند که در نهایت، در چرخه مهلر به آب تبدیل شده، از اثر تخریبی آنها پیشگیری می‌شود (Edreva, 2005). اجرای این مسیر نیز خود به باز ماندن مسیر اصلی انتقال الکترون کمک شایانی می‌کند (Asada, 2000). در این برگ‌ها اگر چه پراکسید هیدروژن نیز تجمع یافته است، با این حال همواره کمتر از سن پیری بوده است که نشان دهنده عملکرد خوب مکانیسم دفاعی است (شکل ۴-الف). Ohe و همکاران (۲۰۰۵) نیز عامل اصلی تجمع پراکسید هیدروژن و بروز تنش اکسیداتیو در مدل‌سازی شدت‌های نور بالا را کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز کلروپلاستی اعلام نموده‌اند.

افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سنین جوانی و میان‌سالی گویای فعال شدن چرخه مهلر و کنترل پراکسید هیدروژن دارد (شکل ۳-الف). به طوری که با وجود افزایش این ترکیب سمی در هر دو سن برگ‌گی،



شکل ۳- تأثیر سن برگ و مقادیر متفاوت متیل و ایلوژن بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ آفتابگردان الف) آسکوربات پراکسیداز؛ ب) کاتالاز؛ ج) گلوکاتیون S-ترانسفراز



شکل ۴- تأثیر سن برگ و مقادیر متفاوت متیل و ایلوژن بر میزان کلروفیل کل الف) و پراکسید هیدروژن ب) در برگ آفتابگردان

خلاف برگ‌های مسن اتفاق رخ نداد. این نتیجه در واقع ناشی از اجرای مؤثر مکانیسم‌های دفاعی است که توانست با ممانعت از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و صدمات ناشی از آنها، از تجزیه رنگیزه کلروفیل در برگ‌های جوان جلوگیری کند.

به طور کلی می‌توان گفت که با افزایش سن برگ، علیرغم عدم کاهش کلروفیل کل و سبز ماندن برگ‌ها، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و دیگر ترکیبات سمی

نتایج حاصل از کلروفیل برگی نیز تأییدی بر موارد یاد شده در بالاست. زیرا در سن جوانی کلروفیل کل موجود در برگ در غلظت‌های مختلف متیل و ایلوژن تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل ۴-الف). در صورتی که یکی از اصلی‌ترین محل‌های آسیب به کلروپلاست تیلاکوئید است که در طی آن کلروفیل‌های موجود در آن تجزیه شده، برگ‌ها رنگ سبز خود را از دست می‌دهند. اما در برگ‌های جوان این عمل بر

فعال اکسیژن افزایش یافته و به علت عدم توانایی سلول در سنن بالا برای جمع آوری متابولیت‌های سمی، تنش اکسیداتیو اتفاق می‌افتد که کاهش کلروفیل و تجمع پراکسید هیدروژن بیانگر این موضوع است.

بر مکانیسم‌های دفاعی غلبه کرده و باعث بروز تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاه می‌شود. در شدت‌های بالای نور نیز به علت بر هم خوردن تعادل بین واکنش‌های نوری فتوسنتز و مرحله تثبیت دی‌اکسید کربن، تولید گونه‌های

## منابع

اسفندیاری، ع.، شکبیا، م.، ر.، محبوب، س.، آلیاری، ه. و برادران فیروزآبادی، م. (۱۳۸۸ ب) اثرات تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه‌های گندم. دانش کشاورزی ۱۹: ۱۲۹-۱۳۸.

اسفندیاری، ع.، محبوب، س.، و شکاری، ف. (۱۳۸۷) اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال، مکانیسم‌های محافظتی گیاه و ضرورت توجه به آن. مجموعه مقالات کلیدی دهمین کنگره زراعت و صلاح نباتات ایران، کرج، ایران.

اسفندیاری، ع.، تاجیک، ط.، شکرپور، م. و برادران فیروزآبادی، م. (۱۳۸۹) کاهش توان دفاعی سلول در مقابل اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال با افزایش سن برگ. مجله الکترونیکی تولید گیاهان زراعی ۳: ۲۱۹-۲۲۷.

اسفندیاری، ع.، محبوب، س.، شکبیا، م.، ر. و آلیاری، ه. (۱۳۸۸ الف) نقش حجم خزانه آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و پرولین در محافظت از غشاهای سلولی در تنش خشکی. دانش کشاورزی ۱۹: ۱۳۹-۱۴۷.

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Method of Enzymology 105: 121-126.

and Barroso, J. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. production, scavenging and role in cell signaling. Plant Physiology 141: 330-335.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment 106: 119-133.

Asada, K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society 355:1419-1431.

Esfandiari, E., Shakiba, M. R., Mahboob, S., Alyari, H. and Toorchi, M. (2007a) Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. Journal of Food, Agriculture and Environment 5: 48-53.

Azizpour, K., Shakiba, M. R., Khosh Kholgh Sima, N., Alyari, H., Moghaddam, M., Esfandiari, E. and Pessarakli, M. (2010) Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. Journal of Plant Nutrition 33: 859-873.

Esfandiari, E., Shekari, F., Shekari, F. and Esfandiari, M. (2007b) The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 35: 48-56.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Fujibe, T., Saji, H., Arakawa, K., Yabe, N., Takeuchi, Y. and Yamamoto, T. (2004) A methyl viologen resistant mutant of Arabidopsis, which is allelic to ozone

Buchanan, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. Journal of Experimental Botany 48: 181-199.

Del Rio, L., Sandalio, L., Corpas, F., Palma, J.

- sensitive rcd1, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiology* 134: 275-285.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., Pastori, G., Del Rio, L. A. and Sevilla, F. (1998) Role of the ascorbat-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* 118: 1327-1335.
- Katsuhara, M., Otsuka, T. and Ezaki, B. (2005) Salt stress induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxidase is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science* 169: 369-373.
- Kitijima, K., Mulkey, S., Samaniego, M. and Wright, S. (2002) Decline of photosynthetic capacity with leaf age and position in two tropical pioneer tree species. *American Journal of Botany* 88: 1925-1932.
- Koca, H., Ozedemir, F. and Turkan, I. (2006) Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biologia Plantarum* 50: 745-748.
- Marrs, K. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferase in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127-158.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. Y. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Ohe, M., Rapolu, M., Mieda, T., Miyagawa, Y., Yabuta, Y., Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2005) Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. *Plant Science* 168: 1487-1493.
- Ort, D. (2001) when there is too much light. *Plant Physiology* 125: 29-32.
- Panda, S. K., Singha, L. B. and Khan, M. H. (2003) Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiate*)? *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29: 77-86.
- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Schnieder, C., Porter, N. and Brash, A. (2008) Routes to 4-hydroxynonenal: fundamental issues in the mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry* 283: 15539-15543.
- Sergiv, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare Sciences* 51: 121-124.
- Smart, C. M. (1994) Gene expression during leaf senesce. *New Phytology* 126: 419-448.
- Stewart, R. R. C. and Bewley, J. D. (1980) Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Zarkovic, N. (2003) 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular Aspects of Medicine* 24: 281-291.

## Decline of tolerance in leaf photooxidative-stress with age in sunflower

Ezatollah Esfandiari \* and Amir Vahdati Rad

Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh,  
Maragheh, Iran

### Abstract

Sunflower seeds were planted under field conditions in order to investigate the behavioral pattern of photooxidation tolerance in plants in response to leaf aging. During pollination stage, the leaves were theoretically divided into three sections including young, middle aged and senescent leaves, so that the cell defense potential would change with leaf aging, and then modeling of different intensities of light and its effects on light oxidation of biological materials in the leaves of different ages was investigated. The results from the first series of experiments showed that despite of no change of chlorophyll content in leaves due to leaf aging, total protein content and membrane stability index were declined. Furthermore, lipid peroxidation and hydrogen peroxide were increased in respond to leaf aging. Meanwhile, the activity of hydrogen peroxide scavenging enzymes and glutathione S-transferase in senescent leaves were higher than that of young leaves. Overall, the results showed that with any increase in leaf age, defense potential of cells slowed down and the production of oxidants exceeded the scavenging potential of the cells. The results of modeling of different intensities of light revealed that in senescent leaves under high light intensities, hydrogen peroxide reached to its highest levels. However, under those light condition, hydrogen peroxide scavenging enzymes and glutathione S-transferase activities were recorded at amounts lower than that of low light intensities. The outcome of the above mentioned factors lead to oxidation of chlorophyll and subsequently its content reduction under highlight intensities in aged leaves. In total, under high light intensities, the damage of oxidation stress on aged leaves was more intensified compared to young leaves mainly due to diminished defense potential of stress faced cells.

**Key words:** Sunflower, Photooxidation, Leaf age, Light intensity, Defense mechanisms

\* Corresponding Author: [esfand1977@yahoo.com](mailto:esfand1977@yahoo.com)