ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاهان آرابیدوپسیس جهش‌یافته *ntrc* طی پیری القاء شده توسط تاریکی

فاطمه تمسکنی، حمیدرضا صادقی‌پور*، مهناز اقدسی و احمد عبدل‌زاده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰۳/۱۲)

چکیده:

تیوردوکسین‌ها در تنظیم ردوکس بسیاری از فرآیندهای سلولی دخالت دارند. در این مطالعه نقش $NADP^+$– تیوردوکسین ردوکتاز C (NTRC) در کنترل پیری برگ از طریق مطالعه بیوشیمیائی گیاهان آرابیدوپسیس جهش یافته *ntrc* بررسی شد. گیاه وحشی و دو لاین جهش‌یافته *ntrc* چهل روزه تحت رژیم روشنائی – تاریکی نرمال یا تاریکی پیوسته به مدت ٦ روز به ترتیب به عنوان تیمار کنترل و پیری قرار گرفتند. پارامترهای رشد، میزان کربوهیدرات‌ها، رنگدانه‌ها و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بین گیاه وحشی و دو لاین جهش‌یافته *ntrc* طی پیری القاء شده توسط تاریکی مقایسه شدند. تاریکی منجر به کاهش وزن تر و خشک، محتوی کلروفیل‌ها، کارتنوئیدها، نشاسته و پروتئین‌ها در هر دو گیاه وحشی و جهش‌یافته گردید و تفاوت معنی‌داری در برهمکنش ژنوتیپ و تیمار برای این پارامترها وجود نداشت. همچنین تاریکی تجمع آنتوسیانین، قندهای کل و غیراحیائی را القاء کرد اما تجمع کربوهیدرات‌ها در لاین‌های جهش‌یافته نسبت به وحشی شدیدتر بود؛ در هر صورت تفاوت معنی‌داری در پاسخ گیاهان وحشی و جهش‌یافته نسبت به تیمار تاریکی وجود نداشت. فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز لاین‌های جهش یافته نسبت به گیاهان وحشی به صورت معنی‌دار بالاتر بود. با وجود این‌که تاریکی فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را کاهش داد، باعث افزایش فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز به‌ویژه در لاین‌های جهش‌یافته شد. تفاوت معنی‌داری در مورد هر چهار آنزیم بین گیاهان وحشی و جهش یافته در پاسخ به تاریکی وجود داشت. به‌نظر می‌رسد که جهش ایجاد شده در پروتئین NTRC بطور کلی روند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را طی فرآیند پیری تحت تأثیر قرار می‌دهد. نتایج این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی آینده برای کنترل فرآیند پیری در جهت بهبود عملکرد گیاهان زراعی مفید باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، آنتوسیانین، پیری، تیوردوکسین، جهش‌یافته *ntrc*، کلروفیل.

مقدمه:

تیوردوکسین‌ها پروتئین‌های کوچک با وزن مولکولی ١٤–١٢ کیلودالتون بوده و حداقل ٢٠ ژن کد کننده این پروتئین‌ها از طریق تعیین توالی ژنوم آرابیدوپسیس شناسائی شده است (de Dios Barajas-Lopez *et al*., 2007; Arner and Holmgren, 2000; Schurmann and Jacquot, 2000). پروتئین‌های کد شده توسط این ژن‌ها شامل تیوردوکسین‌های h سیتوزولی، m، f، x و y کلروپلاستی و تیوردوکسین o میتوکندریایی بوده که در واکنش‌های ردوکس مشارکت می‌کنند (Dietz and Pfannschmidt, 2011). تیوردوکسین‌های سیتوزولی و میتوکندریائی بوسیله NADPH و NADPH– تیوردوکسین ردوکتاز (NTR) و تیوردوکسین‌های کلروپلاستی به‌وسیله فردوکسین و فردوکسین– تیوردوکسین ردوکتاز (FTR) احیاء می‌شوند (Buchanan and Balmer, 2005). علاوه بر این گیاهان دارای نوعی NTR به نام NTRC هستند

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: hr.sadeghipour@gu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

که دارای دومین C –ترمینال تیوردوکسینی می‌باشد (Serrrato *et al*., 2004) که در این پژوهش، مطالعه بر روی دو لاین از جهش‌یافته‌های این پروتئین به نام‌های ۰۹٦۷۷٦و ۱۱٤۲۹۳ صورت می‌گیرد.

فنوتیپ بارز لاین‌های جهش‌یافته این ژن رنگ سبز پریده و کندی رشد است (Lepisto *et al*., 2008). پیشنهاد شده که NTRC در کنترل واکنش‌های مهم چندگانه کلروپلاست شرکت می‌کند (Rintamaki *et al*., 2009). مطالعه برخی گیاهان جهش‌یافته نقش تیوردوکسین‌ها را در نمو کلروپلاست، کارآئی دستگاه فتوسنتزی، محتوی رنگیزه‌ها از جمله کلروفیل، کارتنوئیدها و گزانتوفیل، عملکرد دانه، احیاء پروکسی‌ردوکسین و محافظت در مقابل تنش اکسیداتیو نشان داده است (Collin *et al*., 2004; Serrato *et al*., 2004; Perez-Ruiz *et al*., 2006; Chi *et al*., 2008). به علاوه مطالعات پروتئومیکس در دانه‌های در حال رویش برخی از آنزیم‌های هدف بالقوه تیوردوکسین از قبیل آنزیم‌های سوپرکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، پروکسی ردوکسین، گلوتامات دهیدروژناز، گلوتامین سنتتاز، گلوتامات سنتاز و سیستئین پروتئاز را گزارش کرده است (Alkhalfioui *et al*., 2007).

پیری برگ می‌تواند به صورت طبیعی در طی نمو القاء شود یا به‌وسیله عوامل محیطی مانند تاریکی، کمبود مواد غذائی و تنش تحریک شود. در واقع تغییرات بسیار تنظیم‌شده در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیائی، مولکولی و سلولی باعث مرگ سلول‌های برگ می‌شود و می‌تواند دارای تأثیرات مثبتی بر گیاه به‌ویژه تحت شرایط نامساعد باشد (Munne-Bosch and Alegre, 2003). پیری برگ اغلب با افزایش تغییر اکسیداتیو ماکرومولکول‌های سلولی به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط است. بعضی از این ترکیبات در مرکز مسیرهای سیگنالینگ در حالت موازنه بوده و می‌توانند به عنوان پیامبرهای ثانویه تعدیل کننده فعالیت پروتئین‌ها یا تنظیم‌کننده بیان ژن‌های ویژه‌ای از طریق تغییر وضعیت ردوکس سلولی باشند (Bhattacharjee, 2012). گیاهان علاوه بر سیستم آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی دارای گروهی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی نیز می‌باشند که با مهار سمیت اکسیژن‌های واکنش‌گر پیری را تا مراحل انتهائی آن کنترل می‌کنند (Prochazkova *et al*., 2009). در روند پیری برگ توازن تولید و متابولیسم گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر تغییر یافته و سبب اختلال هموستازی ردوکس سلولی شده که در مجموع به‌عنوان تنش اکسیداتیو شناخته شده است (Masclaux-Daubresse *et al*., 2010; Bhattacharjee, 2012).

مطالعه آنالیز ژنتیک مولکولی نشان داد که در فرآیند پیری بیان بسیاری از ژن‌ها تغییر می‌کند. ژن‌های مرتبط با پیری شامل تنظیم‌کننده فاکتورهای نسخه‌برداری، ژن‌های دخیل در فرآیندهای کاتابولیکی مرتبط با شکستن ماکرومولکول‌ها همچون آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز، و ریبونوکلئاز و ژن‌های با عملکرد ثانویه در تجزیه مجدد مواد که سبب تسهیل انتقال مواد از منبع به مخزن می‌گردند (Taiz and Zeiger, 2010). در هرحال هنگامی‌که تقاضای گیاه به‌وسیله اسیمیلاسیون رایج تأمین نگردد، کربن و نیتروژن ذخیره شده در بخش‌های مختلف گیاه انتقال مجدد (remobilization) می‌یابد (Juvany *et al*., 2013; Guiboileau *et al*., 2010).

اطلاعات چندانی درباره نقش تیوردوکسین‌ها در فرآیند پیری برگ در دسترس نمی‌باشد. با توجه به این‌که بسیاری از آنزیم‌هایی که در فرآیند پیری برگ فعال می‌شوند به‌عنوان اهداف بالقوه تیوردوکسین شناسائی شده‌اند (Alkhalfioui *et al*., 2007; Montrichard *et al*., 2009)، بنابراین در پژوهش حاضر برای درک بهتر نقش تیوردوکسین‌ها از جهش‌یافته‌های تیوردوکسین ردوکتاز–سی (NTRC) استفاده شد تا به این سوال اساسی پاسخ داده شود که آیا اختلال این سیستم تیوردوکسینی از طریق جهش می‌تواند منجر به تغییرات بیوشیمیائی در میزان رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها در طی پیری گردد؟ در این راستا بررسی مقایسه‌ای فرآیند پیری برگ در گیاهان آرابیدوپسیس وحشی و جهش‌یافته صورت گرفت تا به این طریق نقش این دسته از پروتئین‌های تیوردوکسینی در تنظیم ردوکس فرآیند پیری آشکار شود.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

مواد و روش‌ها:

کشت گیاه: بذرهای دو لاین SALK_096776 و SALK_114293 جهش‌یافته *ntrc* به عنوان هدیه توسط گروه پروفسور Rintamaki و Lepisto از کشور فنلاند تهیه شدند که جایگاه ورود T-DNA در آنها به ترتیب در اینترون ۸ و اگزون ۹ می‌باشد. به منظور شکستن خواب، بذرها به مدت ٤ روز درون یخچال در دمای ٤ درجه سانتیگراد سرمادهی شدند و کشت بذرها در گلدآن‌های مخصوص (جی‌فی‌پات) صورت گرفت. این گلدآن‌ها به صورت قرص‌های فشرده حاوی مواد غذائی مورد نیاز برای رویش بذر و رشد گیاهچه بوده که پس از قرار گرفتن در آب، حجیم شده و تبدیل به یک بستر مناسب برای کشت بذرها می‌گردند. دمای متوسط اتاقک کشت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و گیاهان در رژیم ١٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۲ روز گیاهچه‌ها برای نشاء به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند (غلظت یک دوم هوگلند تعدیل شده) انتقال یافتند. بعد از گذشت ٤٠ روز از زمان کاشت بذر، گیاهان به مدت ۳ و ٦ روز برای القاء پیری در تاریکی قرار گرفتند. گیاهان شاهد مربوط در این حالت گیاهانی بودند که به مدت ۳ و ٦ روز رژیم عادی نوری را دریافت کرده بودند. آنالیزهای بیوشیمیایی بر روی کلیه گیاهان قبل از شروع تیمار و سپس در گیاهان ۳ و ٦ روز تیمار و شاهدان هم‌سن آنها صورت گرفت. این آزمایش در طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد.

استخراج آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز محلول و پلی‌فنل‌اکسیداز: استخراج فعالیت‌های آنزیمی با استفاده از روش Mishra و Kar (١٩٧٦) صورت گرفت. مقدار ۰/۰۵ گرم بافت در هاون چینی سرد با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیک ۰/۱ مولار با اسیدیته ٦/۸ هموژن گردید. هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ١٦٠٠٠g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از روشناور (سوپرناتانت) به‌دست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها و همچنین مقدار پروتئین‌های محلول استفاده شد. میزان پروتئین محلول به روش Bradford (١٩٧٦) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Asada و Nakano (١٩٨١) با اندکی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات مونوسدیک ۲۵۰ میلی مولار (pH= ۷)، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۱/۲ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. محلول بلانک فاقد آب اکسیژنه بود و کاهش جذب نور ناشی از پراکسیداسیون اسید آسکوربیک در طول موج۲۹۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی (ε) معادل با $mmol.L^{-1}.cm^{-1}$ ۲/۸ مربوط به آسکوربات محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز با استفاده از روش Maehly و Chance (١٩٥٥) و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز بر اساس روش Mishra و Kar (١٩٧٦) همراه با تغییراتی انجام شد. مخلوط واکنش آنزیم کاتالاز به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ٦/۸، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با اضافه کردن عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش تجزیه H_2O_2 شروع گردید. ضریب خاموشی (ε) برای H_2O_2 در طول موج ٢٤٠ نانومتر ٤٠ ($L.mmol^{-1}.cm^{-1}$) بود که از آن برای محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد.

مخلوط واکنش آنزیم گایاکول پراکسیداز به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ٦/۸، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ٤٠ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. ضریب خاموشی (ε) تتراگایاکول در طول موج ٤٧٠ نانومتر ٢٦/٦ ($L.mmol^{-1}.cm^{-1}$) بود که از آن برای محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ٦/۸، پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار و۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم در طول موج ٤٢٠ نانومتر انـدازه‌گیری شد و ضریب خاموشی برای پورپوروگالین تولید شده ($L.mmol^{-1}.cm^{-1}$) ۲/٤٧ بود که برای برآورد فعالیت آنزیم به‌کار رفت (Resende *et al.*, 2002).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

استخراج و اندازه‌گیری فنل محلول، قندها و نشاسته: استخراج فنل و قندها بر اساس روش Fukuda و همکاران (۲۰۰۳) همراه با تغییراتی انجام شد. در این روش به ۰/۰۵ گرم از بافت تر نمونه، ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه گردید و عمل استخراج در ۵ مرحله صورت گرفت. استخراج نشاسته به روش McCready و همکاران (۱۹۵۰) از رسوب به‌دست آمده پس از استخراج قندهای محلول انجام شد. فنل محلول‌کل بر اساس روش Butler و Price (۱۹۷۷) اندازه‌گیری گردید. قند محلول کل به روش McCready و همکاران (۱۹۵۰)، قندهای غیراحیایی به روش Handel (۱۹٦۸) و قندهای احیایی به روش Prado و همکاران (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری کلروفیل، کارتنوئید و آنتوسیانین: اندازه‌گیری کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها به روش Arnon (۱۹٤۹) و اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین به روش Mita (۱۹۹۷) انجام شد.

آنالیزهای آماری: به منظور آنالیز و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Excel و SAS استفاده شد. برای مقایسه‌ی میانگین داده‌ها از آزمون Duncan استفاده گردید.

نتایج:

در این مطالعه صفات رشد مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و نتایج حاکی از آن بود که میزان وزن‌تر و خشک بخش‌هوائی و ریشه و طول بخش‌هوائی در گیاه وحشی نسبت به هر دو لاین جهش‌یافته *ntrc* و همچنین در نمونه‌های شاهد (۳ و ٦ روزه) نسبت به تیمار تاریکی افزایش معنی‌داری داشت. اما طول ریشه در لاین ۱۱٤۲۹۳ نسبت به گیاه وحشی و لاین ۰۹٦۷۷٦ افزایش معنی‌داری را نشان داد. در هر حال تفاوت طول ریشه بین گیاهان شاهد وحشی و دو لاین جهش‌یافته با تیمار تاریکی همان گیاهان به جز کاهش معنی‌دار مشاهده شده در روز سوم تیمار تاریکی لاین ۱۱٤۲۹۳ نسبت به شاهد آن، معنی‌دار نبود (شکل ۱– A، B و C).

میزان کلروفیل a در گیاه وحشی در کل دوره تیمار تاریکی و در جهش‌یافته *ntrc* لاین ۰۹٦۷۷٦ در روز سوم کاهش معنی‌داری را با همان گیاهان در شرایط شاهد نشان داد، و میزان کلروفیل b در گیاه وحشی در روز ششم تیمار تاریکی و در جهش‌یافته *ntrc* لاین ۰۹٦۷۷٦ در روز سوم کاهش معنی‌داری را با همان گیاهان در شرایط شاهد نشان داد، در لاین ۱۱٤۲۹۳ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد اما الگوی تغییرات میزان کلروفیل کل در هر سه گروه مشابه بود. در مجموع میزان کلروفیل a وb و کلروفیل کل در لاین‌های جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی و در تیمار پیری نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند. (شکل ۲).

میزان کارتنوئید گیاه وحشی در روز سوم و ششم تیمار تاریکی نسبت به شاهد همان گیاه به‌ویژه در روز سوم کاهش معنی‌داری را نشان داد. در لاین‌های ۰۹٦۷۷٦ و ۱۱٤۲۹۳ نیز تیمار تاریکی سبب کاهش میزان کارتنوئیدها گردید و این کاهش در لاین ۰۹٦۷۷٦ در روز سوم تیمار تاریکی نسبت به شاهد مربوط معنی‌دار بود و در لاین ۱۱٤۲۹۳ در روز سوم تیمار تاریکی کاهش معنی‌داری را نسبت به روز ششم تیمار تاریکی و شاهد آن نشان داد (شکل ۳). در مجموع میزان کارتنوئید در هر دو لاین جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی و در تیمار تاریکی نسبت به شرایط کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند.

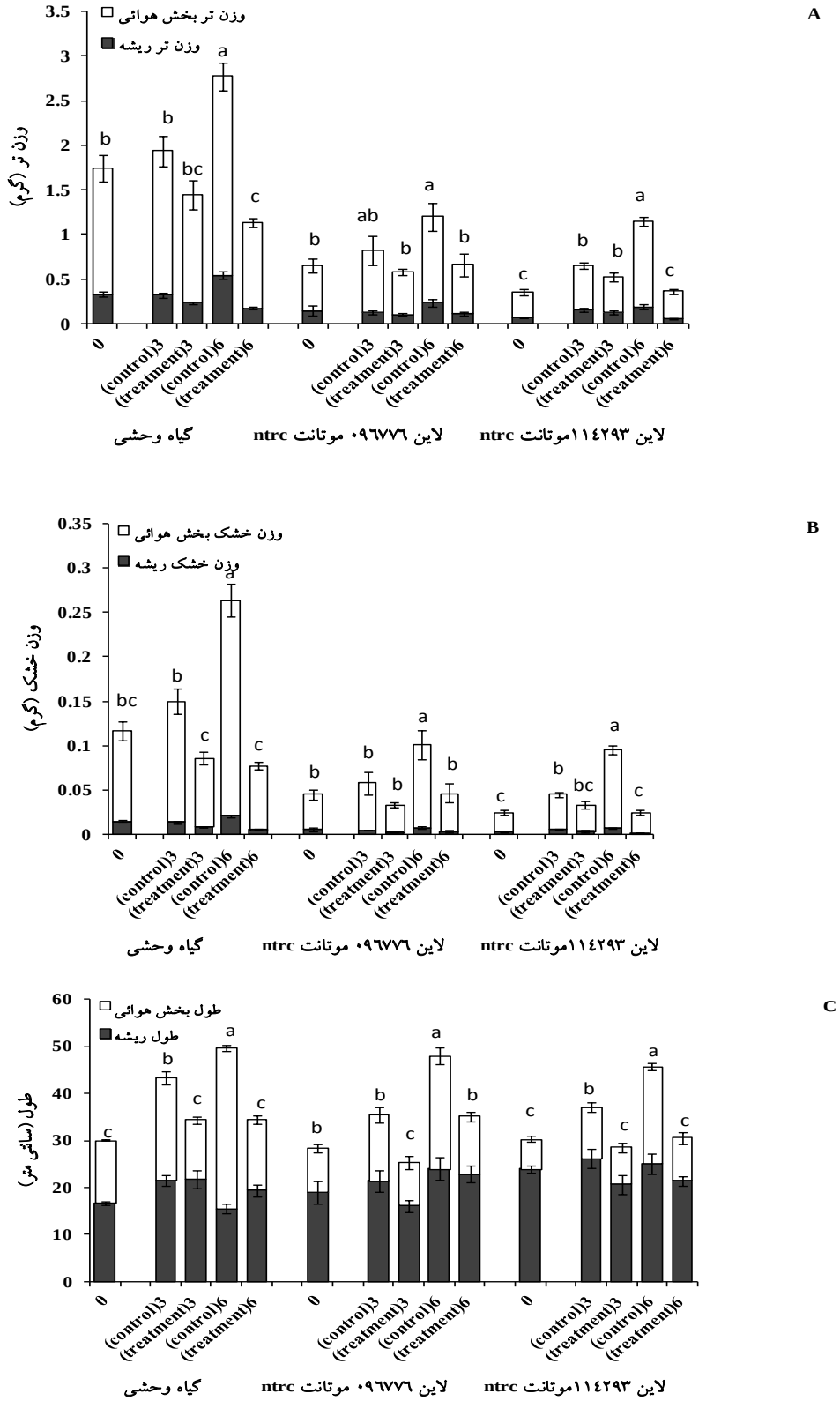
میزان آنتوسیانین در گیاه وحشی و جهش یافته *ntrc* لاین ۱۱٤۲۹۳ در روز ششم تیمار تاریکی افزایش معنی‌داری را با کل دوره نشان داد اما در لاین ۰۹٦۷۷٦ تفاوت معنی‌داری را در کل دوره نشان نداد. در مجموع میزان آنتوسیانین در طی تیمار پیری افزایش معنی‌داری را نسبت به شرایط کنترل نشان داد. (شکل٤).

میزان فنل محلول کل در گیاه وحشی و لاین ۰۹٦۷۷٦ در کل دوره تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، اما در لاین ۱۱٤۲۹۳ در روز سوم تیمار تاریکی کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد همان روز و زمان صفر نشان داد (شکل ۵).

میزان نشاسته در گیاه وحشی در روز سوم و ششم تیمار تاریکی نسبت به شاهد روز سوم و ششم کاهش معنی‌داری داشت، اما در لاین ۰۹٦۷۷٦ میزان نشاسته در کل دوره تاریکی تفاوت معنی‌داری را با گیاهان شاهد همان دوره نداشت و در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

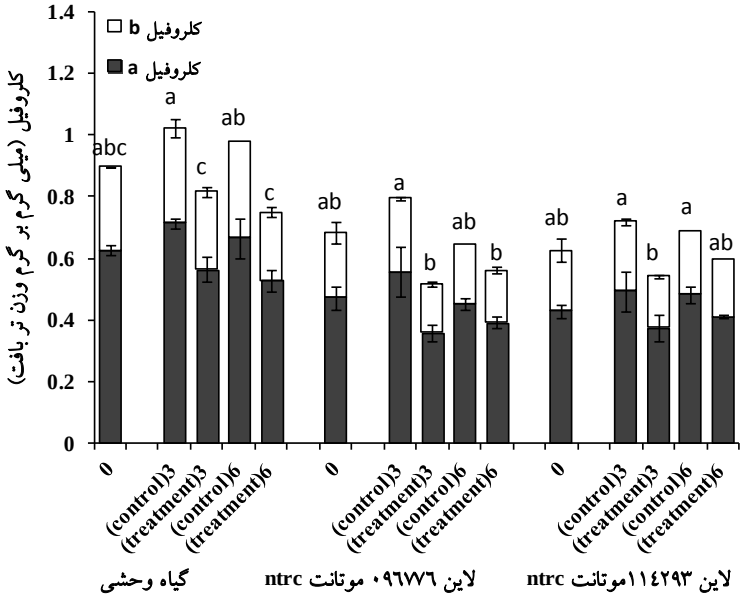
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]



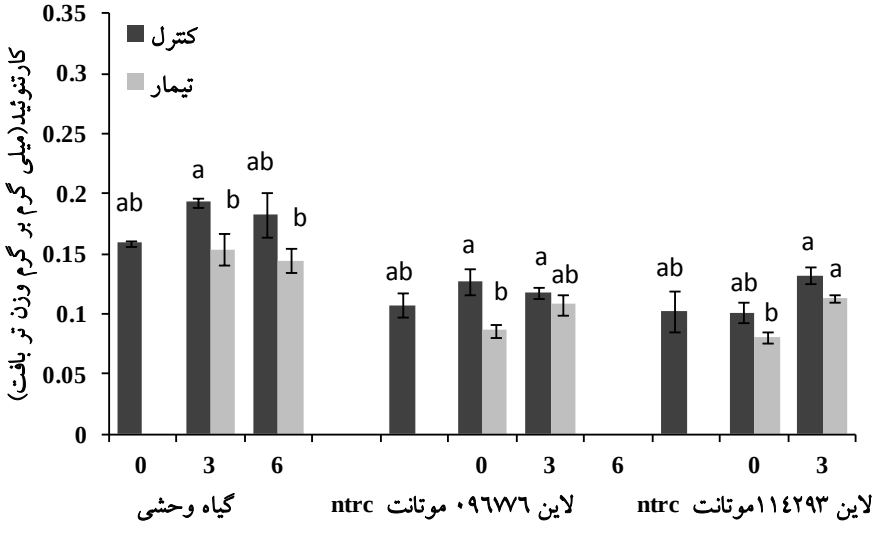
شکل ۱- (A الی C) - مقایسه وزن‌تر ریشه و بخش هوائی، وزن‌خشک ریشه و بخش هوائی، طول ریشه و بخش‌هوائی بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم. میله‌های روی هریک از ستون‌ها، خطای استاندارد را در هر گروه نشان می‌دهد و ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد با یکدگر تفاوت معنی‌داری ندارند که مربوط به A) وزن‌تر کل، B) وزن‌خشک کل و C) طول کل گیاه می‌باشد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]



شکل ۲- مقایسه میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم. میله‌های روی هریک از ستون‌ها خطای استاندارد مربوط به کلروفیل a و کلروفیل b و.حروف مشخص شده بر روی هر ستون تفاوت میزان کلروفیل کل را نشان می‌دهد.



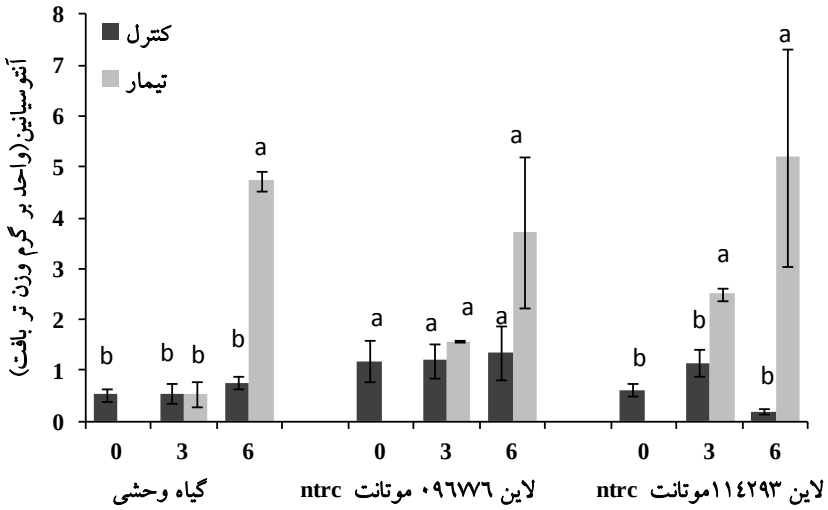
شکل ۳- مقایسه میزان کارتنوئید بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم.

لاین ۱۱٤۲۹۳ در تیمار تاریکی روز سوم نسبت به شاهد روز سوم کاهش معنی‌داری داشت در هر صورت در این لاین میزان نشاسته در روشنایی در روز سوم افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت (شکل ٦).

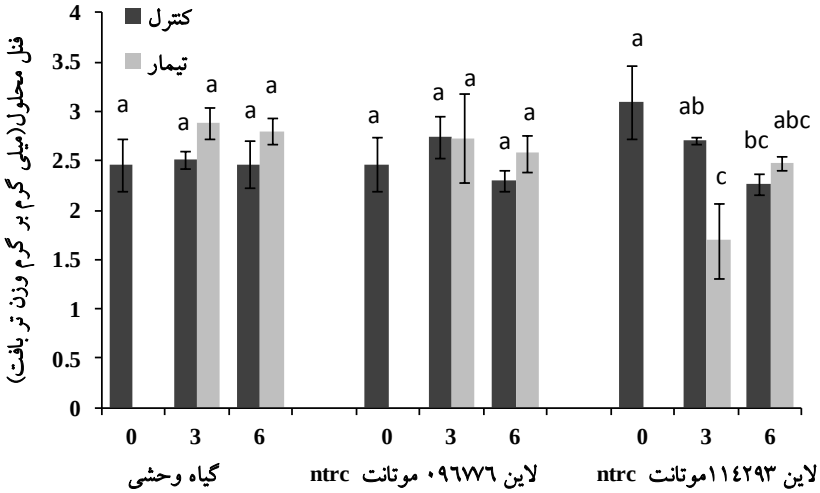
میزان قند کل در گیاه وحشی در کل دوره تاریکی تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد هم‌دوره نشان نداد. در هر دو لاین ۰۹٦۷۷٦ و ۱۱٤۲۹۳ میزان قند کل در روز ششم تیمار تاریکی نسبت به شروع تیمار افزاش معنی‌داری یافت و به‌ویژه در لاین ۱۱٤۲۹۳ در روز ششم تیمار تاریکی افزایش قندکل با شاهد همان دوره معنی‌دار بود (شکل ۷- A).

میزان قند احیائی در گیاه وحشی در شرایط شاهد پس از ٦ روز کاهش یافت ولی تیمار تاریکی به مدت ٦ روز سبب حفظ

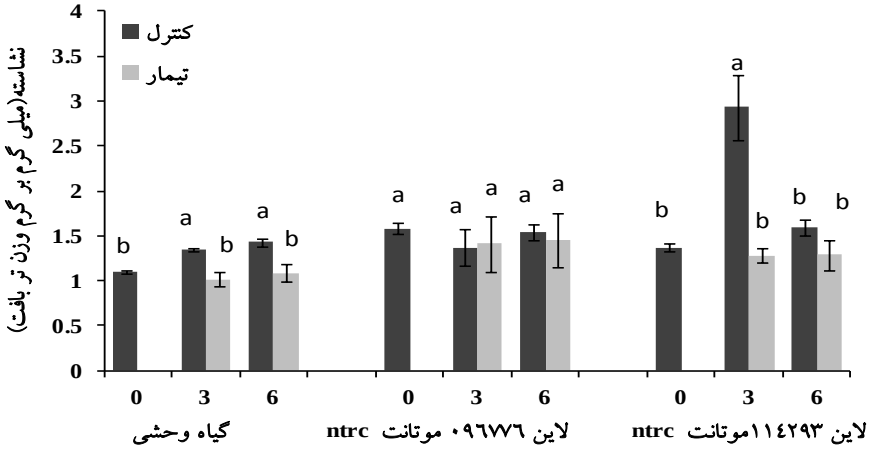
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]



شکل ٤- مقایسه میزان آنتوسیانین بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم.



شکل ٥- مقایسه میزان فنل محلول بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم.



شکل ٦- مقایسه میزان نشاسته بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

میزان قندهای احیایی در سطح برابر با گیاهان شاهد در شروع آزمایش گردید. روند تغییر قند احیایی در لاین ۰۹٦۷۷٦ در گیاهان شاهد و تیمار تاریکی در طی دوره ٦ روز کاهشی بود و به لحاظ مقدار قند متفاوت نبودند اما در لاین ۱۱٤۲۹۳ میزان قند احیایی در کل دوره چه در گیاهان شاهد و تیمار تاریکی ثابت باقی‌ماند و تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان قندهای احیایی بین این دو دسته وجود نداشت (شکل ۷–B).

میزان قندهای غیراحیائی در گیاهان وحشی و هر دو لاین جهش‌یافته در شرایط شاهد افزایش یافت (شکل ۷– C). برخلاف گیاهان وحشی، میزان قندهای غیراحیائی در هر دو لاین جهش‌یافته در شرایط تاریکی افزایش معنی‌داری را در روز سوم برای لاین ۰۹٦۷۷٦ و در روز ششم برای لاین ۱۱٤۲۹۳ نسبت به گیاهان شاهد همان دوره نشان داد.

میزان پروتئین محلول گیاه وحشی در روزهای سوم و ششم تیمار تاریکی نسبت به گیاهان شاهد در زمآنهای مشابه کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۸). برخلاف گیاهان وحشی کاهش پروتئین محلول در تاریکی در لاین‌های ۰۹٦۷۷٦ و ۱۱٤۲۹۳ صرفا در روز ششم در مقایسه با گیاهان شاهد مربوط مشاهده گردید. در مجموع میزان پروتئین محلول در لاین‌های ۰۹٦۷۷٦ و ۱۱٤۲۹۳ نسبت به گیاه وحشی افزایش معنی‌داری یافت. همچنین تیمار تاریکی نسبت به شرایط کنترل سبب کاهش معنی‌داری در پروتئین محلول گردید.

به‌طور معمول فعالیت آنزیمی در عصاره استخراج شده را به دو روش گزارش می‌کنند. فعالیت ویژه (specific activity)، که در این حالت میزان فعالیت آنزیم بر مبنای مقدار پروتئین استخراج شده بیان می‌شود. این روش بیشتر برای مطالعات تخلیص آنزیم سودمند بوده زیرا بیانی از کل فعالیت را بدست نداده و تابعی از پروتئین استخراج شده است که پارامتر اخیر بویژه می‌تواند بسته به بافت و یا شرایطی که بافت در آن قرار می‌گیرد و نوع حلال بکار رفته بسیار تغییر کند. روش دوم ثبت فعالیت کل آنزیم (total activity) است که در آن کل فعالیت استخراج شده بر واحد وزن تر بافت بیان شده و در مطالعات فیزیولوژیکی کارایی بهتری برای تفسیر داده‌ها دارد. زیرا تغییرات فعالیت آنزیمی در بافت صرفنظر از تغییرات مقدار پروتئین سنجیده می‌شود و در این مطالعه از این روش استفاده شد.

روند تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه وحشی و لاین ۱۱٤۲۹۳ در شرایط شاهد و تیمار تاریکی دارای الگوی یکسانی بود (شکل ۹– A). در هر دو گیاه فعالیت این آنزیم ابتدا در روز سوم کاهش و سپس در روز ششم افزایش یافت. در لاین ۰۹٦۷۷٦ در روز سوم تیمار تاریکی نسبت به شاهد همان روز فعالیت آنزیم به شدت کاهش یافت ولی تفاوتی در فعالیت آنزیم در روز ششم بین گیاهان تیمار تاریکی با شاهد مشاهده نشد.

فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه وحشی و جهش‌یافته *ntrc* لاین ۰۹٦۷۷٦ در روز سوم تیمار تاریکی نسبت به شاهد مربوط کاهش معنی‌داری را نشان دادند. در لاین ۱۱٤۲۹۳ در روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهدمربوط نسبت به زمان صفر کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۹– B) در مجموع فعالیت آنزیم کاتالاز در دو لاین جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی افزایش معنی‌دار و در تیمار تاریکی نسبت به شرایط کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد.

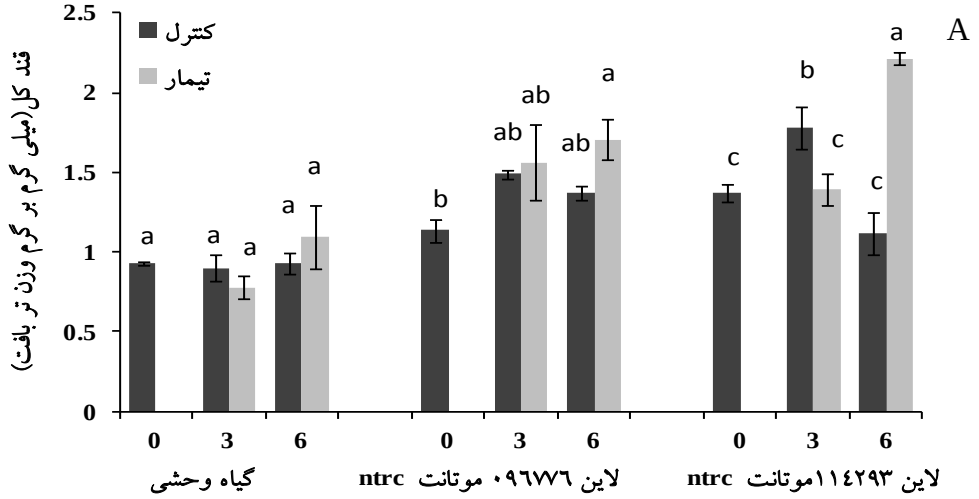
فعالیت آنزیم پراکسیداز در لاین‌های جهش‌یافته در کل بیشتر از گیاه وحشی بود (شکل ۹– C). تیمار تاریکی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در روز ششم (در گیاهان وحشی و لاین ۰۹٦۷۷٦) و روز سوم و ششم (لاین ۱۱٤۲۹۳) نسبت به گیاهان شاهد مربوط گردید.

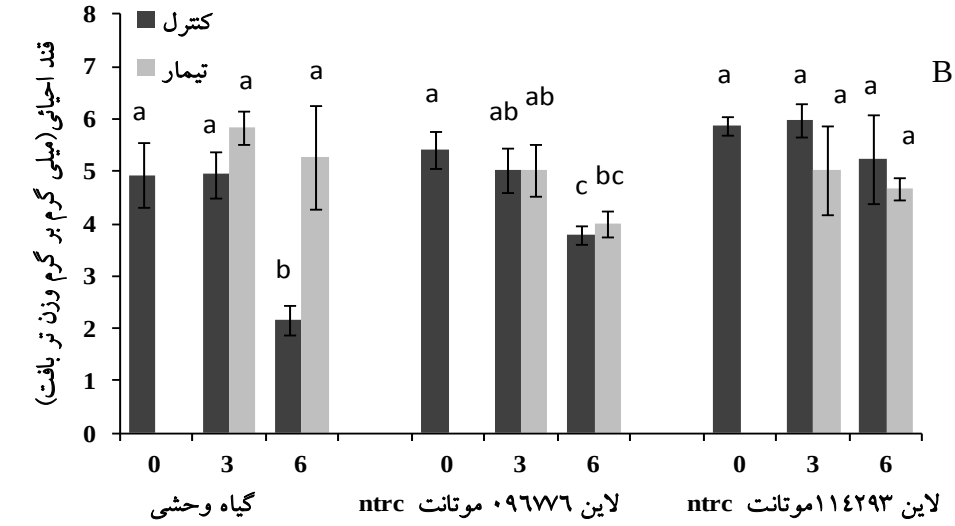
فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز در دو لاین جهش‌یافته در کل بیشتر از گیاه وحشی بود (شکل ۹– D). تیمار تاریکی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در روز ششم (در لاین ۰۹٦۷۷٦) و روز سوم (لاین ۱۱٤۲۹۳) نسبت به گیاهان شاهد مربوط گردید.

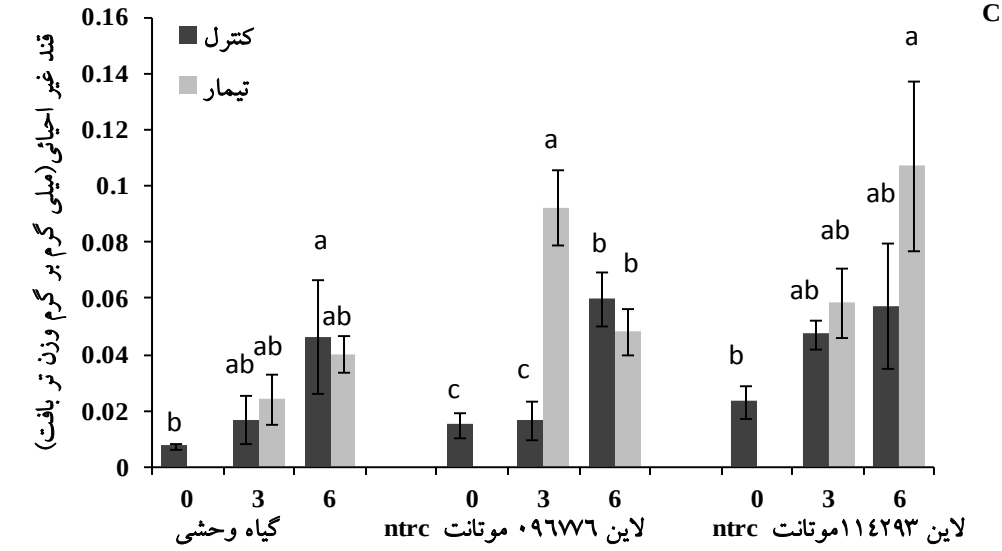
جدول آنالیز واریانس نشان داد که برهمکنش ژنوتیپ گیاه و تیمار، ژنوتیپ گیاه و زمان ، ژنوتیپ گیاه و تیمار و زمان در مورد آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز معنی‌دار بودند (جدول ۱).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]



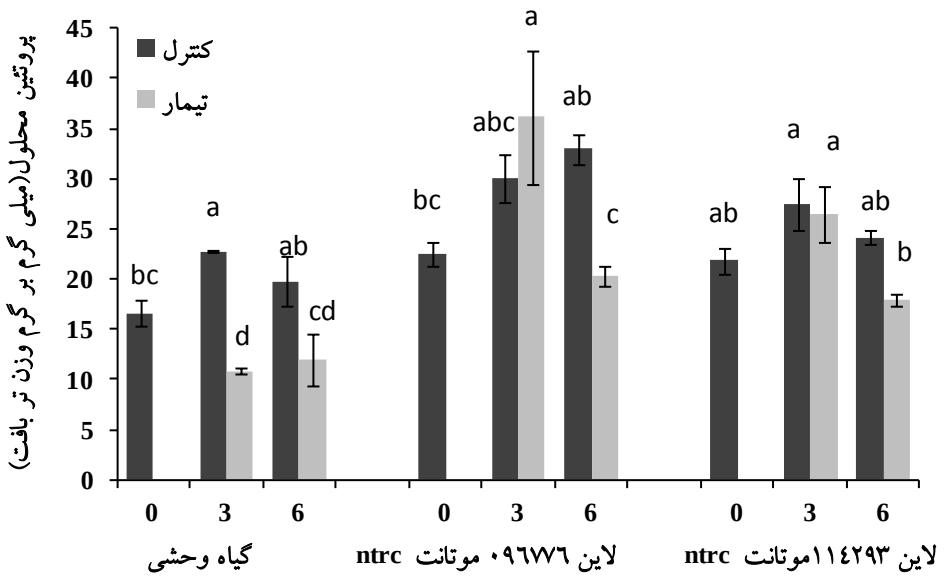




شکل ۷– (A الی C) – مقایسه میزان قند محلول کل، قند احیائی و قند غیراحیائی بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]



شکل ۸- مقایسه میزان پروتئین محلول بین گیاه وحشی و دو لاین موتانت *ntrc* در زمان صفر، روز سوم و ششم تیمار تاریکی و شاهد روز سوم و ششم.

جدول ۱- آنالیز واریانس برخی از پارامترها تحت تأثیر تیپ، تیمار و زمان و تأثیر متقابل آنها بر یکدیگر.

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین محلول	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز
تیپ	۲	۵۵۲/۳۰۱**	۱۷۳۰۰۷/۴۷۸**	۵۸۸۳۹۳۵/۲**	۸۵۶۴۹۴۰۰۸**	۱۱۲۴۱۲۶۰/۴۷**
تیمار	۱	۱۸۷/۰۷۸**	۵۲۷۱۰/۶۲۸**	۳۷۳۷۸۳۱/۶*	۳۲۰۴۴۲۹۴۸**	۲۲۲۲۶۳۵/۶۱**
زمان	۲	۱۴۶/۱۳۷**	۸۴۸۱۴۲/۷۵**	۱۹۱۷۶۷۹۶۰/۱**	۳۴۴۱۳۷۲۹ns	۱۱۵۹۵۳۰/۶۵**
تیپ×تیمار	۲	۲۸/۱۵۵ ns	۵۰۴۹۸/۱۴۷**	۱۹۳۲۲۹۷۹/۱**	۱۲۴۱۲۷۴۵۹**	۹۰۴۶۶۳/۸۱*
تیپ×زمان	۴	۴۵/۳۵۶*	۴۲۳۱۰/۶۹۴**	۱۶۲۰۰۲۳۳/۴**	۹۱۶۸۷۷۰۶**	۸۱۰۴۰۷/۲۱*
تیمار×زمان	۲	۹۵/۴۶۱**	۴۴۱۶۲/۳۸۹**	۲۳۹۳۶۵۹/۳ ns	۹۷۳۱۲۲۷۶**	۷۸۹۷۳۱/۷۰*
تیپ×تیمار×زمان	۴	۵۶/۴۳۵ *	۴۲۷۰۴/۰۱۵**	۱۷۳۶۵۵۰۷/۴**	۷۹۲۶۰۷۵۵**	۱۰۴۵۷۹۳/۳۴**
خطا	۳۶	۱۵/۵۵۱۴	۶۸۶۳/۱۵۴	۸۰۴۴۰۵/۷	۱۵۹۶۳۹۰۲	۲۲۲۴۱۵/۰۲
کل	۵۳					

**** در سطح کمتر از ۱ درصد معنی‌دار است. * در سطح کمتر از ۵ درصد معنی‌دار است. ns نشان دهنده معنی‌دار نبودن داده‌ها می‌باشد.**

بحث:

تحقیقات نشان داده که تیمار تاریکی به میزان زیادی سرعت پیری را تشدید می‌کند و مکررا برای مطالعات پیری بکار رفته است (Weaver *et al.*, 1998). مطالعات انجام شده توسط Lepisto و همکاران (۲۰۰۸) حاکی از این‌است که لاین‌های جهش‌یافته *ntrc* بی‌نظمی‌های نموی وابسته به سن و فتوپریود را نشان داده و دارای برگ‌های رنگ سبز پریده و رشد کند می‌باشند.

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه پیری القاء شده توسط تاریکی در این گیاهان گزارش نشده است. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که جهش در ژن NTRC سبب تغییرات بارزی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

در فنوتیپ گیاه در طی پیری القاء شده توسط تاریکی می‌گردد. به‌این صورت که در این گیاهان پدیدار شدن رنگ زرد برگ‌ها که یکی از مارکرهای شاخص پیری می‌باشد با سرعت و شدت بیشتری نسبت به گیاهان وحشی اتفاق می‌افتد و کاهش معنی‌داری در وزن تر و خشک بخش هوائی و ریشه گیاهان جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی و در گیاهان قرار گرفته در تاریکی نسبت به شرایط کنترل ایجاد می‌گردد. علیرغم این امر طول ریشه در لاین ۱۱٤۲۹۳ نسبت به گیاه وحشی و لاین ۰۹٦۷۷٦ بیشتر بود (شکل ۱- A، B و C) .در طی پیری برگ‌های آفتابگردان نیز میزان وزن خشک توده برگی کاهش پیدا کرد (Aguera *et al*., 2012). در لاین بیش بیان شده ژن ARABIDOPSIS A FIFTEEN آرابیدوپسیس، طویل شدن ریشه‌ها و تشدید تشکیل تارهای کشنده (Chen *et al*., 2012) را مربوط به عمل سیگنالی گونه‌های فعال اکسیژن در لوکوپلاست ریشه دانسته‌اند که نمو ریشه را تنظیم می‌کند (Dunand *et al*., 2007). با توجه به فنوتیپ ریشه‌های طویل در گیاهان جهش‌یافته این احتمال وجود دارد که میزان گونه‌های فعال اکسیژن در ریشه‌های این گیاهان نیز بالا باشد.

ارزیابی میزان کلرفیل و کارتنوئید در گیاهان وحشی و جهش‌یافته *ntrc* نشان داد که میزان کلروفیل a، b و کلروفیل‌کل و کارتنوئید در گیاهان جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی و در طی تیمار تاریکی نسبت به شرایط کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد (اشکال ۲ و ۳). مطالعات Lepisto و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان داد که گیاهان جهش یافته*ntrc* ۱٤ و ۷۰ روزه تحت شرایط روز کوتاه میزان کلروفیل کل کمتری نسبت به گیاه وحشی داشتند. در طی ٦ روز تیمار تاریکی در تره آبی و در طی پیری طبیعی در برگ‌های آفتابگردان و آلو میزان کلروفیل و کارتنوئید کاهش پیدا کرد (Scebba *et al*., 2001; Karatas *et al*., 2010; Aguera *et al*., 2012).

شواهد اخیر نشان می‌دهد که تغییرات رنگ سلولی در طی پیری برگ منعکس کننده کاتابولیسم کلروفیل بوده و مستقیما با تنظیم تجزیه نیتروژن و جذب مجدد پروتئین‌های تیلاکوئید مرتبط می‌باشد (Ougham *et al*., 2005).

مطالعه حاضر نشان داد که تیمار تاریکی نسبت شرایط کنترل سبب کاهش میزان پروتئین می‌شود (شکل ۸). در ژنوم آرابیدوپسیس بیان بیشتر ژن‌های کدکننده پروتئازهای کلروپلاستی در برگ‌های در حال پیری گزارش شده است (Liu *et al*., 2008)، که می‌تواند توجیه‌کننده کاهش پروتئین در طی تیمار تاریکی در این گیاهان باشد؛ در هر صورت میزان پروتئین گیاهان جهش‌یافته نسبت به گیاهان وحشی بیشتر بود و این افزایش قابل توجه در موتانت SALK_096776 مشاهده شد. این امر شاید با در نظر داشتن نقش بسیار گسترده پروتئین‌های تیوردوکسین در تنظیم واکنش‌های ردوکس قابل توجیه باشد (Alkhalfioui *et al*., 2007) ، که در این حالت فعالیت پروتئازی در این جهش یافته بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته و در جهت تجزیه پروتئین‌ها ناکارآمدتر عمل کرده بنابراین میزان پروتئین‌ها در آن بیشتر است. علاوه براین با توجه به این‌که تیوردوکسین‌ها از طریق احیاء پروتئین‌های ذخیره‌ای باعث انحلال و افزایش حساسیت آنها نسبت به پروتئازها می‌گردند (Kobrehel *et al*., 1992) ، احتمالا نقص ایجاد شده در سیستم تیوردوکسین از طریق جهش در پروتئین NTRC منجر به اختلال در عملکرد پروتئازها در فرایند تجزیه پروتئین‌ها در گیاهان جهش‌یافته شده است.

میزان فنل محلول در لاین ۱۱٤۲۹۳ در روز سوم تیمار تاریکی نسبت به شاهد آن کاهش معنی‌داری را نشان داد، اما در مجموع در بقیه دوره‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵). کاهش میزان فنل به موازات افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در تیمار تاریکی می‌تواند مبین این امر باشد که مصرف فنل‌های محلول در طی فرآیند پالایش رادیکال‌های آزاد تحت استرس اکسیداتیو ایجاد شده بیشتر شده است. فنل‌ها از ترکیبات دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند (Stankovic *et al*., 2012) و به عنوان عوامل دهنده الکترون یا هیدروژن، سلول‌ها را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند و به عنوان «آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی در گیاه و دارا بودن ویژگی‌های ردوکس (Halliwell *et*

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

(*al*., 2005) مقادیر بهینه آن می‌تواند حاکی از وضعیت مطلوبتر ردوکس سلولی باشد.

در مطالعه حاضر در طی پیری اعمال شده توسط تاریکی میزان نشاسته برخلاف میزان قند که روند افزایشی را نشان داد، نسبت به شرایط کنترل کاهش پیدا کرد (اشکال٦، ٧- A، B و C). در گیاه تره‌آبی نیز با پیشرفت پیری در طی ٦ روز تیمار تاریکی میزان نشاسته کاهش پیدا کرد (Karatas *et al*., 2010). به‌نظر می‌رسد که واکنش گیاه در شرایط تاریکی در دو مسیر کاهش فعالیت آنزیم سنتز کننده نشاسته و یا افزایش کاتابولیسم نشاسته به واحدهای کوچک‌تر قند می‌باشد. میزان نشاسته در انتهای سیکل نوری در گیاهان آرابیدوپسیس دارای بالاترین مقدار بوده و در پایان دوره تاریکی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت (Graf *et al*., 2010). مطالعات نشان داده است که آنزیم AGPase به عنوان یکی از اهداف تنظیم ردوکس وابسته به NTRC می‌باشد که این پروتئین سنتز نشاسته را تحت شرایط احیائی فعال می‌کند بنابراین گیاهان جهش یافته NTRC تحریک وابسته به ردوکس پائین‌تر آنزیم AGPase را نشان دادند (Michalska *et al*., 2009; Dietz and Pfannschmidt, 2011). نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه جهش‌یافته نسبت به گیاه وحشی میزان نشاسته برابر و در شاهد روز سوم لاین ۱۱٤۲۹۳ جهش‌یافته *ntrc* افزایش معنی‌داری داشت با توجه به این‌که نقش پروتئین تیوردوکسین *f1* در سنتز نشاسته از طریق مطالعه جهش‌یافته تیوردوکسن *f1* محرز شده است و این گزارش که میزان نشاسته در آن کاهش و میزان قند افزایش پیدا کرد، احتمالا علاوه بر پروتئین NTRC، پروتئین تیوردکسین F1 و یا سایر پروتئین‌های خانواده تیوردوکسین به عنوان سیستم ردوکس جایگزین نقش جبرانی از طریق فعال‌سازی AGPase در سنتز نشاسته دارند(Thormahlen *et al*., 2012) .

همچنین نتایج این مطالعه در مورد میزان قند کل و غیراحیائی که تحت شرایط پیری اعمال شده توسط تاریکی نسبت به شرایط کنترل افزایش پیدا کرد، می‌تواند با دلایل بیان شده در فرایند پیری در گیاه آفتابگردن هماهنگ باشد که تجمع قندهای محلول در گیاهان پیر با افزایش سن مرتبط شده است نه با فعالیت فتوسنتزی و بیشتر به علت هیدرولیز نشاسته می‌باشد زیرا سرعت تثبیت دی‌اکسیدکربن در طی پیری کاهش پیدا می‌کند. همچنین افزایش میزان قندهای محلول در طی پیری ممکن است به علت کاهش تمامیت ساختاری و عملکردی در غشاهای سلولی باشد که موجب تقویت کاتابولیسم لیپید غشائی و ازاین‌رو سبب تولید قند به‌وسیله مسیر گلوکونئوژنز گردد (Buchanan-Wollaston *et al*., 2003b; Lim *et al*., 2007).

میزان آنتوسیانین در گیاه جهش‌یافته تفاوت معنی‌داری را با گیاه وحشی نشان نداد اما در تاریکی نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت (شکل ٤). بسیاری از استرس‌های محیطی سبب تحریک میزان آنتوسیانین در بافت‌های رویشی می‌شوند (Graf *et al*., 2010). آنتوسیانین در لایه‌های مزوفیل پیرامونی، نردبانی و اپیدرمی برگ‌های در معرض نور شدید قرار گرفته و شدت نور را کاهش می‌دهد و به عنوان حفاظت کننده نوری دستگاه فتوسنتزی در طی پیری عمل می‌کند (Mittler, 2002). با توجه به این‌که قندهای محلول نیز در شرایط تاریکی کاهش یافت (شکل ٧- A) و از طرفی افزایش میزان قند محلول به احتمال برای شروع سنتز آنتوسیانین ضروری است (Yamakawa *et al*., 1983; Gollop *et al*., 2002). به‌نظر می‌رسد احتمالا قندها در مسیر سنتز آنتوسیانین در شرایط تاریکی مصرف می‌شوند.

در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در لاین‌های جهش‌یافته نسبت به وحشی بیشتر بود و در پیری القا شده توسط تاریکی نسبت به کنترل کاهش یافت (شکل ٩- A و B). تفاوت قابل توجه بین کنترل‌های دو لاین بعد از ٣ روز در مورد فعالیت این آنزیم‌ها احتمالا ناشی از تأثیر تیمار تاریکی است که در مقابل نمونه‌های کنترل کاملا مشهود است اما در مجموع نیاز به مطالعه بیشتری دارد. از آنجا که این آنزیم‌ها به عنوان اهداف بالقوه تیوردوکسین‌ها شناسائی شده‌اند (Alkhalfioui *et al*., 2007). به‌نظر می‌رسد سیستم کنترل ردوکس این آنزیم‌ها مختل شده است. آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز دو آنزیم کلیدی در سمیت‌زدائی پراکسید هیدروژن می‌باشند (Foyer and Noctor, 2000,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

.(2009 گزارشات متناقضی در مورد فعالیت آنزیم کاتالاز وجود دارد و هر دو روند فعالیت افزایشی و کاهشی این آنزیم در طی پیری گزارش شده است. مثلا فعالیت کاتالاز در طی پیری برگ‌های برنج و برگ‌های جداشده تنباکو (Parish, 1968)، در طی ٦ روز تیمار تاریکی در تره آبی و در برگ‌های پیر گیاهان گرهک‌دار شده نخود فرنگی کاهش و در جو و گندم (Kisban *et al*., 1964; Karatas *et al*., 2010) افزایش پیدا کرد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز هم با پیشرفت پیری در برگ‌های تنباکو کاهش پیدا کرد (Prochazkova *et al*., 2009).

فعالیت دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در پیری القا شده توسط تاریکی افزایش یافت (شکل۹ – C و D). اهمیت کاربردی افزایش فعالیت پراکسیداز معلوم نیست و ممکن است ناشی از جراحت ایجاد شده به‌دلیل جدا کردن برگ‌ها باشد؛ در هر صورت افزایش پراکسیداز به عنوان شاخص قابل اعتماد پیری برگ نمی‌باشد. آنزیم پراکسیداز نقش تعیین‌کننده‌ای را در مکانیسم‌های دفاعی در مقابل استرس اکسیداتیو احتمالاً با همکاری دیگر آنتی‌اکسیدانت‌ها ایفا می‌کند. در تره آبی و دربرگ‌های پیر گیاهان نخود فرنگی نیز با پیشرفت پیری القاء شده با تاریکی فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت (Vanacker *et al*., 2006; Karatas *et al*., 2010). البته اعتقاد بر این است که کاهش در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانت نتیجه یا پیامد پیری است تا منشأ آن (Dertinger *et al*., 2003). علاوه بر این با توجه به اینکه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به‌وسیله خانواده چند ژنی با تنظیم و محل ناهمسان کد می‌شوند و دارای سوبستراهائی هستند که به عنوان مولکول سیگنالنگ نیز عمل می‌کنند درک تنظیم هماهنگ آنها بسیار پیچیده است (Zimmermann *et al*., 2006).

نتیجه‌گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد که بین میزان پروتئین، کلروفیل، کارتنوئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و پیشرفت پیری ارتباط هماهنگی وجود دارد در واقع گیاهان تحت تیمار تاریکی در مقایسه با شرایط کنترل کاهش معنی‌داری را در میزان این پارامترها نشان دادند اما فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در طی پیری القا شده توسط تیمار تاریکی در مقایسه باگیاهان کنترل افزایش معنی‌داری پیدا کرد. میزان رنگدانه‌های کلروفیل و کارتنوئید در گیاهان جهش‌یافته کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان وحشی نشان دادند اما میزان پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش معنی‌داری پیدا کرد که احتمالا می‌تواند ناشی از افزایش سنتز پروتئین‌های از قبل وجود داشته یا پروتئین‌های تازه سنتز شده طی تیمار تاریکی باشد.

در مجموع با توجه به اطلاعات موجود در ارتباط با نقش تیوردوکسین‌ها در فرایندهای رشد و نموی و حفاظت کلروپلاست در مقابل تنش اکسیداتیو و نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، نقش پروتئین‌های مشابه تیوردوکسین (NTRC) در تنظیم ردوکس واکنش‌های مختلف بیوشیمیائی دخیل در فرایند پیری برگ تائید می‌شود که البته نیاز به تحقیق بیشتری در این زمینه از طریق مطالعه بر روی برخی آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربن و نیتروژن می‌باشد. و این مطالعه اولین گام برای ورود در برنامه‌های اصلاحی در جهت بهبود فرایند تجزیه از برگ‌های در حال پیری و نهایتا بهبود عملکرد گیاهان زراعی می‌باشد.

منابع:

Aguera, E., Cabello, P., De La Mata, L., Molina, E. and de la Haba, P. (2012) Metabolic Regulation of Leaf Senescence in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants, Senescence. (Ed. T., Nagata), ISBN: 978-953-51-0144-4, InTech Europe.

Alkhalfioui, F., Renard, M., Vensel, W. H., Wong, J., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Buchanan, B. B. and Montrichard, F. (2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of Medicago truncatula seeds. Plant Physiology144: 1559–1579.

Arner, E. S. and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. European Journal of Biochemistry 267: 6102–6109.

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

and practical implications. Antioxid Redox Signal 11: 861–905.

Fukuda, T., Ito, H. and Yoshida, T. (2003) Antioxidative polyphenols from Walnuts (*Juglans regia L.*). Phytochemistry 63:795-801.

Gollop, R., Even, S., Colova-Tsolova, V. and Per, A. (2002) Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. Journal of Experimental Botany 53: 1397–1409.

Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M. and Smith, A. M. (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. Proc Natl Acad Sci USA 107: 9458–9463.

Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C., Masclaux-Daubresse, C. (2010) Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. Comptes Rendus Biologies 333: 382–391.

Halliwell, B., Rafter, J. and Jenner, A. (2005).Health ptomotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? antioxidant or not? American Journal of Clinical Nutrition 81:268S-276S.

Handel, E. V. (1968) Direct micro-determination of sucrose. Analytical Biochemistry 22: 280-83.

Juvany, M., Muller, M. and Munne-Bosch, S. (2013) Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? Journal of Experimental Botany 3087-3098.

Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during *Rice* leaf senescence. Plant Physiology 57:315-319.

Karatas, I., Ozturk,L., Ersahin, Y. and Okatani, Yener (2010) Effects of auxin on photosynthetic pigments and some enzyme activities during ark- induced senescence of Tropaeolum leaves. Pakistan Journal of Botany 42: 1881-1888.

Kisban, C., Horvath, M., Dezsi, L., Udvardy, J. and Farkas, G. L. (1964) Role of root system in the regulation of enzyme leves in leaf tissues. Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae 10:275-287.

Kobrehel, K., Wong, J. H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B. C. and Buchanan, B. B. (1992) Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. Plant Physiology 99: 919-924.

Lepisto, A., Kangasjarvi, S., Luomala, E.M., Hannikainen, K., Brader, G. and Rintamaki, E. (2008) Chloroplastic NADPH thioredoxin reductase mediates photoperiod-dependent development of leaves in *Arabidopsis*. In: Photosynthesis energy from the sun. 14th International Congress on Photosynthesis Research, Springer, Heidelberg, ISBN: 978-1-4020-6707-5, 1303-1306.

Lepisto, A., Kangasjarvi, S., Luomala, E. M., Brader, G., Sipari, N., Keranen, M., Keinanen, M. and Rintamaki, E. (2009) Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic

Bhattacharjee, S. (2012) The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. Journal of Botany 1-22.

Bradford, M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-252.

Buchanan, B. B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon. Annual Review of Plant Biology 56: 187–220.

Buchanan-Wollaston, V., Wellesbourne, H. R. I. and Warwick, U. K. (2003b) Senescence, leaves, In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Elsevier Academic Press 808-816.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase andperoxidase. Methods Enzymol 2: 764-775.

Chen, G. H., Liu, C. P., Chen, S. C. G. and Wang, L. C. (2012) Role of *Arabidopsis* a-fifteen in regulating leaf senescence involves response to reactive oxygen species and is dependent on ethylene insensitive. Journal of Experimental Botany 63: 275–292.

Chi, Y. H., Moon, J. C., Park, J. H., Kim, H. S., Zulfugarov, I. S., Fanata, W. I., Jang, H. H., Lee, J. R., Lee, Y. M., Kim, S. T., Chung, Y. Y., Lim, C. O., Kim, J. Y., Yun, D. J., Lee, C. H., Lee, K. O. and Lee, S. Y. (2008) Abnormal chloroplast development and growth inhibition in Rice thioredoxin m Knock-Down plants. Plant Physiology 148: 808-817.

Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Dietz, K. J. and Issakidis-Bourguet, E. (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new y-type. Plant Physiology 136:4088–4095.

De Dios Barajas-Lopez, J., Serrato, A. J., Olmedilla, A., Chueca, A. and Sahrawy, M. (2007) Localization in roots and flowers of *Pea* chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosynthetic organs. Plant Physiology 145: 946–960.

Dertinger, U., Schaz, U. and Schulze, E. D. (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. Physiologia Plantarum 119: 19–29.

Dietz, K. J. and Pfannschmidt, T. (2011) Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. Plant Physiology 155:1477-1485.

Dunand, C., Crevecoeur, M. and Penel, C. (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. New Phytologist 174: 332–341.

Foyer, C.H. and Noctor, G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. New Phytol 146: 359–388.

Foyer, C. H. and Noctor, G. (2009) Redox-regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

against Oxidative Damage. The Plant Cell. 18: 2356–2368.

Prado, F. E., Gonzalez, J. A., Boero, C. and Sampietro, A. R. (1998) A simple and sensitive method for determining reducing sugars in plant tissues. Application to quantify the sugar content in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) seedlings. Phytochemical Analysis 9: 58-62.

Price, M. P. and Butler, L. G. (1977) Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 25:1268-1273.

Prochazkova, D., Haisel, D. and Wilhelmova, N. (2009) Content of carotenoids during ageing and senescence of tobacco leaves with genetically modulated life-span. Photosynthetica 47:409-414.

Resende, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O. Andrade, G. C. G. Carvalho, G. A. and Castro, R. M. (2002) Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-s-methyl (ASM). Plant Pathology 51:621-628.

Rintamaki, E., Lepistö, A. and Kangasjärvi, S. (2009) Implication of chlorophyll biosynthesis on chloroplast-to-nucleus retrograde signaling. Plant Signaling and Behavior 4: 545-547.

Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C. (2001) Activities of antioxidant enzymes during senescence of Prunus armeniaca leaves. Biology Plant 44:41–46.

Schurmann, P. and Jacquot, J. P. (2000) Plant thioredoxin systems revisited. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 371–400.

Serrato, A., Perez-Ruiz, J. M., Spinola, M. C. and Cejudo, F. J. (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast,which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry 279: 43821–43827.

Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Mihailovic, V., Topuzovic, M. and Solujic, S. (2012) Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucium Polium* L. subsp. *Polium*. Acta Societatis Botannicorum Poloniae 81:117-122.

Taiz, L., and Zeiger, E. (2010) Plant Physiology (5th edition). Sinauer Associates Inc., ISBN 978-0-87893-866-7, Sunderland, Massachusetts USA.

Thormahlen, I., Ruber, J., Von Roepenack-Lahaye, E., Ehrlich, S.M., Massot, V., Hummer, C., Tezycka, J., Issakidis-Bourguet, E. and Geigenberger, P. (2013) Inactivation of thioredoxin *f*1 leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of *Arabidopsis* plants. Plant, Cell and Environment 36:16-29.

development in *Arabidopsis*. Plant Physiology 149: 1261–1276.

Lim, P. O., Kim, H. J. and Nam, H. G. (2007) Leaf senescence. Annual Review of Plant Biology 58: 115–136.

Liu, J., Wu, Y. H., Yang, J. J., Liu, Y. D. and Shen, F. F. (2008) Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. Journal of Plant Biology 51:11-19.

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Fabien, C., Gaufichon, L. and Suzuki, A. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Annals of Botany 105: 1141–1157.

McCready, R., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables, application to peas. Analytical Chemistry 22:1156-1158.

Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B. B., Cejudo, F. J. and Geigenberger, P. (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 9908-9913.

Mita, S., Murano, N and Akaike Nakamura, K. (1997) Mutants of Arabidopsis thaliana with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that is inducible by sugars. Plant Journal 11: 841-851.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405–410.

Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. H. and Buchanan, B. B. (2009) Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. Journal of Proteomics 72, 452-474.

Munne-Bosch, S. and Alegre, L. (2003) Drought-induced changes in the redox state of α-tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. Plant Physiology 131: 1816–1825.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in Spanish chloroplast. Plant Cell Physiology 22:867-880.

Ougham, H. J., Morris, P. and Thomas, H. (2005) The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. Current Topics in Developmental Biology 66: 135–160.

Parish, R.W. (1968). Studies on senesceing tobacco leaf discs with special reference to peroxidase1. The effect of cutting and inhibition of nuclic acid and protein synthesis. Planta 82:1-13.

Perez-Ruiz , J. M., Maria Cristina Spinola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. and Cejudoa, F. J. (2006) Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]

stress and hormone treatment. Plant Molecular Biology 37: 455–469.

Yamakawa, T., Kato, S., Ishida, K., Kodama, T. and Monoda, Y. (1983) Production of anthocyanin by Vitis cells in suspension culture. Agricultural and Biological Chemistry 47: 2185–2191.

Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G. and Zentgraf, U. (2006) Senescence-specific regulation of catalase in *Arabidopsis thaliana (L.)* Heynh. Plant, Cell and Environment 29:1049–1056.

Vanacker, H., Sandalio, L. M., Jimenez, A., Palma, J. M., Corpas, F. J., Meseguer, V., Gomez, M., Sevilla, F., Leterrier, M., Foyer, C. H. and del Rio, L. A. (2006) Roles for redox regulation in leaf senescence of *pea* plants grown on different sources of nitrogen nutrition. Journal of Experimental Botany 57: 1735–1745.

Weaver, L. M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R. M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescenceassociated genes in response to

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.15.2.5]