

تأثیر سرما و شدت نور بالا بر متابولیسم فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت گیاه آلوئه‌ورا

قادر حبیبی*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷)

چکیده

شدت بالای نور می‌تواند فعالیت فتوسنتزی، رشد و محصول‌دهی گیاهان را کاهش دهد. همچنین اثر شدت نور بالا در گیاهان رشد یافته در شرایط سرما تشدید می‌شود. از اینرو، به منظور بررسی اثر دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) و شدت‌های مختلف نور (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) بر فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت و متابولیسم فنلی گیاه آلوئه‌ورا، آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار و در شرایط گلخانه انجام شد. نتایج نشان داد که گیاه آلوئه‌ورا با انباشت جاذب‌های نوری شامل فنل‌ها و فلاونوئیدها در سلول‌های اپیدرم برگ، مقاومت بالایی به تنش شدت نور نشان داد. سازوکار افزایش فعالیت سیستم جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن در مقایسه با سازوکار انباشت جاذب‌های نوری، نقش کمی در مقابله گیاه آلوئه‌ورا با تنش شدت نور بالا داشت. هر چند تیمار سرما باعث افزایش معنی‌دار غلظت فنل‌ها و فلاونوئیدها و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و فنیل‌آلانیل‌آمونیا لیاز نسبت به شاهد شد، ولی عملکرد ضعیف آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت و افزایش مقدار مالون دی‌آلدئید بعنوان شاخص مهم پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، نشان داد که آلوئه‌ورا مقاومت کمی به دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) دارد. بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین توسط ژل برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا متناسب با افزایش فنل کل ژل در تیمار توأم سرما و شدت نور ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع به دست آمد، بنابراین این تیمار می‌تواند در جهت افزایش کیفیت و ارزش دارویی ژل آلوئه‌ورا مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آلوئه‌ورا، تنش سرما، شدت نور، فنل‌ها، سیستم جاروب‌کننده ROS.

مقدمه

(2009). بهره‌وری پایین محصولات کشاورزی در بسیاری از موارد به تنش‌های محیطی نسبت داده می‌شود. در بسیاری از نقاط دنیا، گیاهان اغلب تجربه مواجهه با تنش‌های غیر زیستی مانند شوری، خشکسالی، بالا و یا پایین بودن درجه حرارت، مسمومیت با فلزات، ازن، اشعه فرابنفش، علف‌کش‌ها و غیره را دارند، که به عنوان تهدید جدی برای تولید محصول مطرح هستند (Ahmad and Prasad, 2012).

کشاورزی جهان در آینده با دو چالش مهم مواجه خواهد شد؛ از یک طرف پیش‌بینی می‌شود که جمعیت دنیا در سال ۲۰۵۰ حدود ۲/۳ میلیارد نفر افزایش یابد که برای تأمین غذای این تعداد، تولیدات کشاورزی بایستی به ۱/۷ برابر تولیدات امروزی برسد و از طرف دیگر زمین‌های کشاورزی تحت تأثیر عوارض ناشی از تغییرات آب و هوایی کره زمین خواهند بود (FAO, 2009).

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: gader.habibi@gmail.com

تداوم مهار نوری (که ممکن است به آسیب نوری منجر شود) مقابله کند (Takahashi and Badger, 2011). یکی از مهمترین سازوکارهای حفاظت نوری در گیاهان، فعالیت سیستم جاروب کننده ROS برای تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط شدت نور بالا می‌باشد. همچنین گیاهان در شدت نورهای بالا از طریق تغییر در آرایش کلروپلاست‌ها از شدت صدمات نوری می‌کاهند (Suetsugu and Wada, 2007; Tholen et al., 2008). گیاهان تحت شرایط نور شدید و فرابنفش در طی سازوکار دیگری، مولکول‌های فیلتر کننده و جاذب پرتو فرابنفش از جمله ترکیبات فنلی یا فنولیک‌ها (مثل فنل‌ها و آنتوسیانین‌ها) که در سیتوپلاسم سنتز و در واکنش انباشته می‌شوند را ذخیره می‌کنند (Winkel-Shirley, 2002; Takahashi, 2010).

با وجود اینکه گیاهان دارویی متعلق به تیره کراسولاسه از جمله گیاه آلوئه ورا (*Aloe vera*) نسبت به شدت‌های نور بالا سازگار هستند (Hazrati et al., 2016)، ولی نسبت به دماهای پایین حساس هستند. امروزه گیاه دارویی آلوئه ورا به خاطر خواص گسترده دارویی و غذایی، به طور وسیعی در زمین‌های مستعد کشاورزی کشت می‌شود و در نتیجه لزوم بررسی سازوکارهای فیزیولوژیکی این گیاه در پاسخ به تنش‌های شدت نور و سرما به منظور یافتن تخفیف دهنده‌های تنش ضروری است. از آنجایی که در ماه‌های اول فصل بهار، ما شاهد تابش نور نسبتاً شدید همراه با سرما هستیم، در این تحقیق از تیمارهای توأم سرما و شدت‌های مختلف نوری استفاده شد. از طرف دیگر، بررسی پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که تیمار سرما در شرایط تابش نور می‌تواند باعث تشدید مهار نوری حتی در شدت نورهای پایین شود (Takahashi and Badger, 2011). سازوکارهای فیزیولوژیکی گیاه دارویی آلوئه ورا در پاسخ به تنش‌های شدت نور و سرما تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین در این تحقیق سعی شد ضمن مطالعه اثرات توأم سرما و شدت‌های مختلف نور بر گیاه دارویی آلوئه ورا، از طریق اندازه‌گیری فعالیت سیستم جاروب کننده ROS و متابولیسم فنلی، از یک طرف

سرما یکی از مهمترین عوامل زیست محیطی محدود کننده بهره‌وری گیاهان زراعی است. شناسایی روش‌هایی که موجب تخفیف اثر تنش سرما به ویژه سرمای بهاره شده و تا حد ممکن از افت عملکرد گیاهان جلوگیری نمایند، می‌تواند یکی از روش‌هایی مقابله با این معضل باشد (Munns et al., 2006; Liang et al., 2008; Kishimoto et al., 2014). سازوکارهای تحمل به سرما هنوز به طور کامل مشخص نیست و تلاش برای بهبود عملکرد در شرایط تنش سرما، عمدتاً به دلیل منشاء چند ژنی پاسخ‌های سازگاری، تا حد زیادی ناموفق بوده است. با این حال بررسی سازوکارهای فیزیولوژیکی تحمل به سرما و شدت نور بالا به منظور یافتن تخفیف دهنده‌های تنش یکی از وظایف زیست شناسان گیاهی است.

فتوسنتز از جمله فرآیندهایی است که به شدت تحت تأثیر شدت نور بالا (Azzabi et al., 2012) و دمای پایین (Yamori et al., 2011) قرار می‌گیرد. با افزایش شدت نور، ظرفیت زنجیره انتقال الکترونی تکمیل شده و احتمال اکسیداسیون نوری افزایش می‌یابد. اکسیداسیون نوری باعث آسیب و تجزیه پروتئین‌ها شده و باعث مهار نوری می‌شود (Azzabi et al., 2012). از طرف دیگر کاهش دما، تثبیت دی اکسیدکربن در گیاهان را محدود می‌کند (Yamori et al., 2010). سرما به تنهایی نیز باعث افزایش شکل‌گیری ROS می‌شود. شدت نور بالا هم باعث تخریب پروتئین D1 موجود در فتوسیستم II می‌شود و هم باعث افزایش انباشت گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) در کلروپلاست می‌شود (Scheller and Haldrup, 2005; Takahashi and Badger, 2012; Ivanov et al., 2012). وقتی تنش شدت بالای نور با تنش سرما همراه می‌شود، باعث تشدید شکل‌گیری گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن می‌شود. انباشت ROS باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تیلاکوئید، مهار سنتز پروتئین D1 و در نهایت باعث مهار بازسازی فتوسیستم II می‌شود (Chen et al., 2012). در چنین شرایطی گیاه از طریق افزایش فروکش غیر فتوشیمیایی (NPQ)، جریان انتقال الکترون چرخه ای و همچنین سایر سازوکارهای حفاظت نوری می‌تواند با

اسپکتروفوتومتر، بعد از ۲۴ ساعت استخراج در استن ۱۰۰ درصد تعیین شد. جذب در ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت کلروفیل a ، b و کل طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد (Lichtenthaler and Wellburn, 1985).

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

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

سنجش فعالیت آنزیم‌ها: فعالیت آنزیم سوپراکسید

دیسموتاز (SOD) بر اساس درصد ممانعت از احیاء نیتروبلوتترازولیم (NBT) به ترکیب ارغوانی رنگ دی‌فورمازان بوسیله‌ی رادیکال سوپراکسید (O_2^-) حاصل از فتولیز ریوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره اندازه‌گیری شد (Giannopolitis and Ries, 1977). نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع، پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر ۲۵ mM از هیدروکسی اتیل پیرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES) با $pH=7/8$ و حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت ۰/۱ mM استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g سانتریفوژ شده و روشنور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل ۲۵ mM Na_2CO_3 ، ۵۰ mM EDTA، $pH=7/6$ ، ۱۲ mM L-متیونین، ۷۵ μM NBT و ۱ μM ریوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور ۱۵۰ میکرومول/مترمربع/ثانیه به منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد مخلوط فوق بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه شد و جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ nm توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای القاء ۵۰ درصد ممانعت از احیاء NBT در مقایسه با نمونه‌های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه شده و به صورت میلی‌گرم پروتئین/واحد بیان شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش سایمون و همکاران (Simon et al., 1974)، بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲۴۰ nm اندازه‌گیری شد. عصاره آنزیمی پس از پودر شدن نمونه‌ها در ازت مایع، در بافر

سازوکارهای حفاظت نوری آلوئه ورا را مطالعه کرده و از طرف دیگر تأثیر سرما و شدت‌های مختلف نور بر مقدار فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی ژل برگ آلوئه ورا که مصارف دارویی و غذایی دارد، مشخص شود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثرات دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) و شدت‌های مختلف نور (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) بر فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت و متابولیسم فنلی گیاه آلوئه ورا، آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. پایه‌های جوان آلوئه ورا با طول تقریبی ۱۵ سانتی متر که از گیاه مادر منشعب شده بودند، جداسازی و در گلدان‌های جداگانه کشت شدند. گیاهان در شرایط گلخانه با دوره روشنایی ۱۰/۱۴ ساعت، رطوبت ۵۰/۶۰ درصد و دمای $19^{\circ}C/25^{\circ}C$ (به ترتیب در دوره روشنایی/تاریکی) و شدت نور ۲۰۰ میکرومول/مترمربع/ثانیه که توسط لامپ‌های فلورسنت تأمین شده بود، رشد کردند. پس از رشد گیاهان به مدت ۴ ماه در شرایط پیش‌تیمار، به منظور افزایش اثرات شدت نور و بازسازی شرایط طبیعت در فصل بهار، گیاهان به مدت یک هفته تحت تیمارهای نوری با شدت‌های مختلف شامل ۲۰۰، ۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه قرار گرفتند. سپس نصف گیاهان هر گروه تحت تیمار سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند و سپس بلافاصله گیاهان برداشت شدند. سنجش رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها بر روی نمونه‌های تازه برداشت شده و یا نگهداری شده در ازت مایع انجام شد.

سنجش رنگیزه‌های برگ: جهت سنجش مقدار رنگیزه‌ها،

نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر شستشو شده و بر روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها در داخل ورقه آلومینیومی قرار گرفته و در ازت مایع تا زمان سنجش نگهداری شدند. استخراج ماده مورد نظر با استفاده از استن بر روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها به وسیله

در ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر بر اساس منحنی استاندارد H_2O_2 در محدوده صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز: فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) مطابق روش زوکر (Zucker, 1965) اندازه‌گیری شد. ابتدا عصاره آنزیمی در بافر ۵۰ mM بافر فسفات سدیم با $pH=7/8$ و حاوی اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) با غلظت ۲ mM، ۱۸ mM مرکاپتواتانول و ۰/۱ درصد تریتون X-100 استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ g سانتریفوژ شده و روشن‌آور برای سنجش فعالیت استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۵۰ mM بافر سدیم بورات ($pH=8/8$) و ۵ mM L-فنیل آلانین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه به منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۲۹۰ nm توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای تولید یک نانومول سینامیک اسید محاسبه شد.

سنجش فنل کل: از آنجایی که بیشترین ترکیبات فنلی گیاهان از نوع پلی‌فنل‌ها می‌باشد، از روش معرف فنلی فولین سیوکالتو (Mavi et al., 2004) برای سنجش فنل کل استفاده شد. برای این منظور ۵ گرم بافت سبز برگ یا ژل برگ جداسازی شده و پس از پودر شدن توسط هاون در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد و با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین با ۲۵ میکرولیتر عصاره و ۵۰۰ میکرولیتر محلول آبی کربنات سدیم ۲۰ درصد مخلوط شد. نمونه‌های شاهد فاقد عصاره بودند. پس از قرار دادن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه جذب آنها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت فنل کل بر اساس منحنی استاندارد اسید گالیک به دست آمد. برای هر عصاره این سنجش ۴ بار تکرار شد و میانگین فنل کل موجود در عصاره تیمارها به صورت میلی‌گرم اسید گالیک در گرم بافت بیان شد.

فسفات با غلظت ۵۰ mM و $pH=7$ استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم غلظت مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ mM ($pH=7$) و ۱۰ mM از H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی H_2O_2 ($0/041 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) بر حسب دقیقه/ میلی‌گرم پروتئین/ میکرومول پراکسید هیدروژن محاسبه شد.

سنجش متابولیت‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانت:

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA) به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش بومیناتان و دوران (Boominathan and Doran, 2002) صورت گرفت. عصاره برگ در محلول ۰/۱٪ (w/v) تری کلرواستیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. نسبت ۱ به ۴ از روشن‌آور با محلول ۲۰٪ از TCA حاوی ۰/۵٪ تیوباربیئوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به سرعت سریعاً در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. هم‌زمان با عصاره‌های برگ انگور محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۳،۳، ۱-ترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ nm توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت غلظت مالون دی‌آلدئید نمونه‌ها بر حسب گرم وزن تر/ نانومول محاسبه شد.

غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بر اساس روش ولی کوا و همکاران (Velikova et al., 2000) به دست آمد. محلول استخراج برگ‌ها محلول تری کلرواستیک اسید (۰/۱ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شده و روشن‌آور مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل ۱۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم ($pH=7$) و یک مولار یدید پتاسیم اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی به منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها

نتایج

بررسی نتایج تأثیر سرما و شدت‌های مختلف نور بر میزان رنگیزه‌های فتوستتزی نشان داد که سرما و شدت‌های مختلف نور به تنهایی یا توأم نتوانستند تغییر معنی‌داری در میزان کلروفیل کل ($a+b$) برگ‌های تیمار شده نسبت به برگ‌های شاهد ایجاد کنند (شکل ۱).

با افزایش شدت نور، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) تغییر نیافت. همچنین تیمار سرما در شدت نور ۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز اعمال نکرد (شکل A۲). بررسی اثر شدت‌های مختلف نور و سرما بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) نشان داد که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر سرما در شدت نور ۴۵۰ تغییر معنی‌دار نشان نداد، ولی با افزایش شدت نور به ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه، فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر سرما، نسبت به گروه شاهد (شدت نور ۲۰۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل B۲).

تغییر معنی‌داری در مقدار انباشت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تحت تأثیر شدت‌های مختلف نور در برگ‌های گیاه آلوئه ورا، ایجاد نشد (شکل A۳). اما اعمال سرمای چیلینگ (۴ درجه سانتی‌گراد) باعث افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن برگ‌ها نسبت به گروه شاهد (شدت نور ۲۰۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) شد. بررسی مقدار مالون‌دی‌آلدئید برگ‌ها (به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در برگ‌ها) نشان داد که هر چند مقدار این متابولیت تحت تأثیر شدت‌های مختلف نور قرار نگرفت، ولی تیمار سرما باعث افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در شدت نور ۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه شد (شکل B۳).

بررسی متابولیسم فنل‌ها در این آزمایش نشان داد که افزایش شدت نور از ۴۵۰ به ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه باعث افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل و فلاونوئید برگ‌ها شد (شکل ۴ A و B). همچنین سرما باعث افزایش معنی‌دار و قابل ملاحظه مقدار فنل کل و فلاونوئید برگ‌ها در همه شدت‌های نور شامل ۲۰۰، ۴۵۰ و ۸۵۰ شد (شکل ۴ A و B). بررسی

سنجش فلاونوئیدها: برای سنجش غلظت فلاونوئیدها،

نمونه‌های برگ در متانول حاوی آلومینیوم کلراید دو درصد استخراج شده و پس از سانتریفوژ، روش‌ناور برداشت و جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر تا ۱۶ میلی گرم در لیتر) به عنوان استاندارد استفاده شد و غلظت فلاونوئیدها براساس واحد $mg\ quercetin\ g^{-1}\ FW$ محاسبه شد (Simon et al., 1974).

سنجش مهار رادیکال‌های دی فنیل پیکریل هیدرازین

توسط ژل برگ: برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره به روش مهار ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازین (DPPH) (Lee et al., 1998)، ابتدا عصاره ۱۰ گرم ژل در ۱۰۰ میلی لیتر متانول با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۸ ساعت در دمای آزمایشگاه استخراج شد. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (رقیق شده بین ۰/۱ تا ۲ میلی گرم در میلی لیتر) با ۴۵۰ میکرولیتر بافر تریس اسید کلریدریک (pH=۷/۴) و یک میلی لیتر محلول متانولی دی فنیل پیکریل هیدرازین (۰/۱ میلی مولار) مخلوط شد. نمونه‌های شاهد بجای عصاره، متانول دریافت کردند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌ها بر اساس درصد مهار رادیکال‌های دی فنیل پیکریل هیدرازین با رابطه زیر به دست آمد:

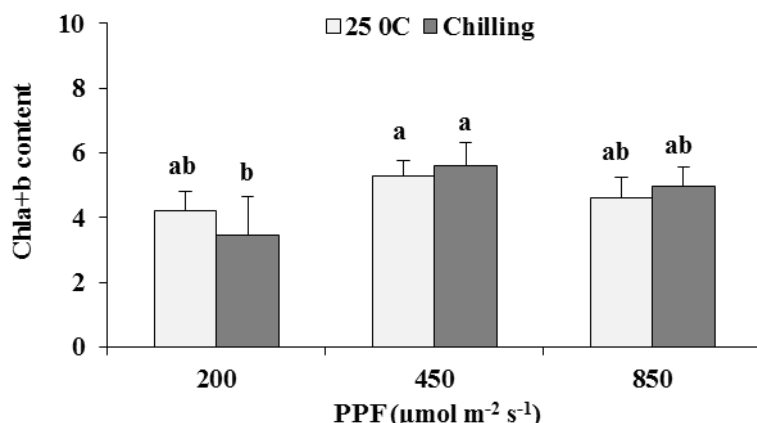
$100 \times \text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) = \text{درصد مهار } (I)$

اندازه‌گیری پروتئین کل: عصاره پروتئینی در بافر فسفات

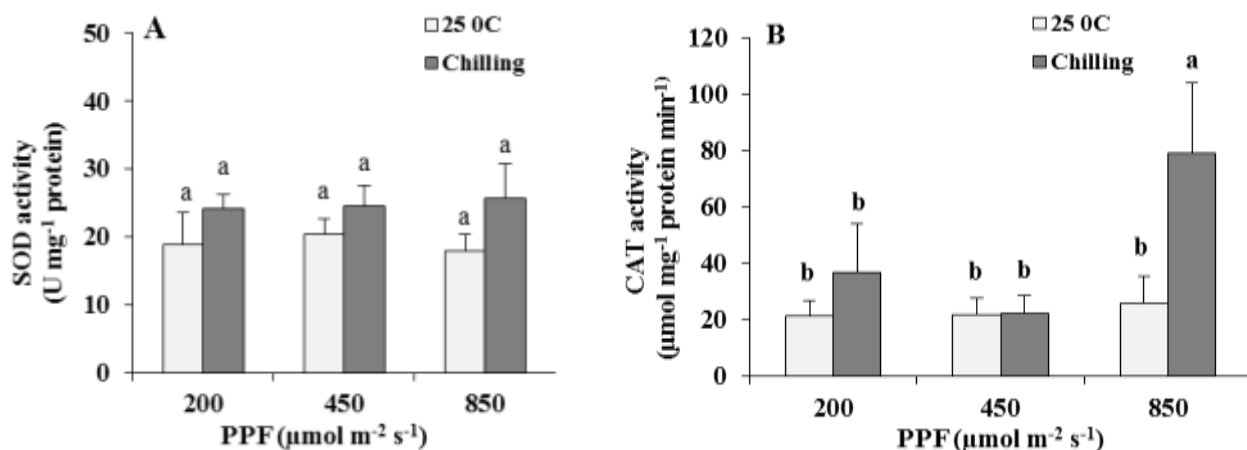
سدیم با غلظت ۵۰ mM و pH=۶/۸ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. از روش‌ناور حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها: میانگین و انحراف معیار

(SD) داده‌ها و همچنین رسم نمودارها بوسیله نرم افزار Excel 2010 انجام شد. برای گروه‌بندی میانگین‌ها نیز از نرم افزار Sigma stat 3.5 با آزمون Tukey در سطح احتمال $P \leq 0/05$ استفاده شد.



شکل ۱- میزان رنگیزه‌های کلروفیل *a* و *b* (میلی‌گرم/گرم وزن تر) در آلوئه‌ورا که در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه به مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. مقادیر، میانگین \pm تکرار ۴ (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

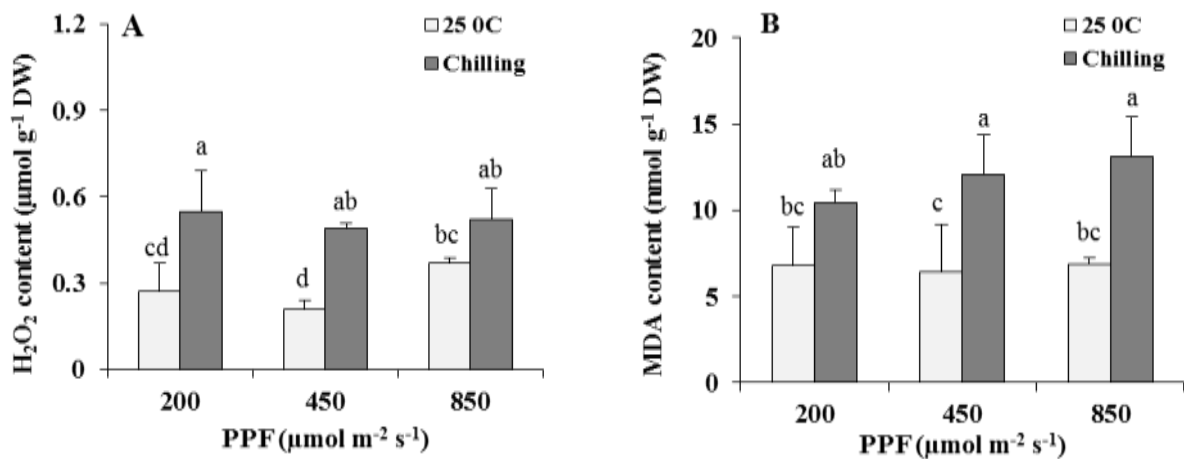


شکل ۲- فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسوتاز (SOD) و آنزیم کاتالاز (CAT) در آلوئه‌ورا که در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه به مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. مقادیر، میانگین \pm تکرار ۴ (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

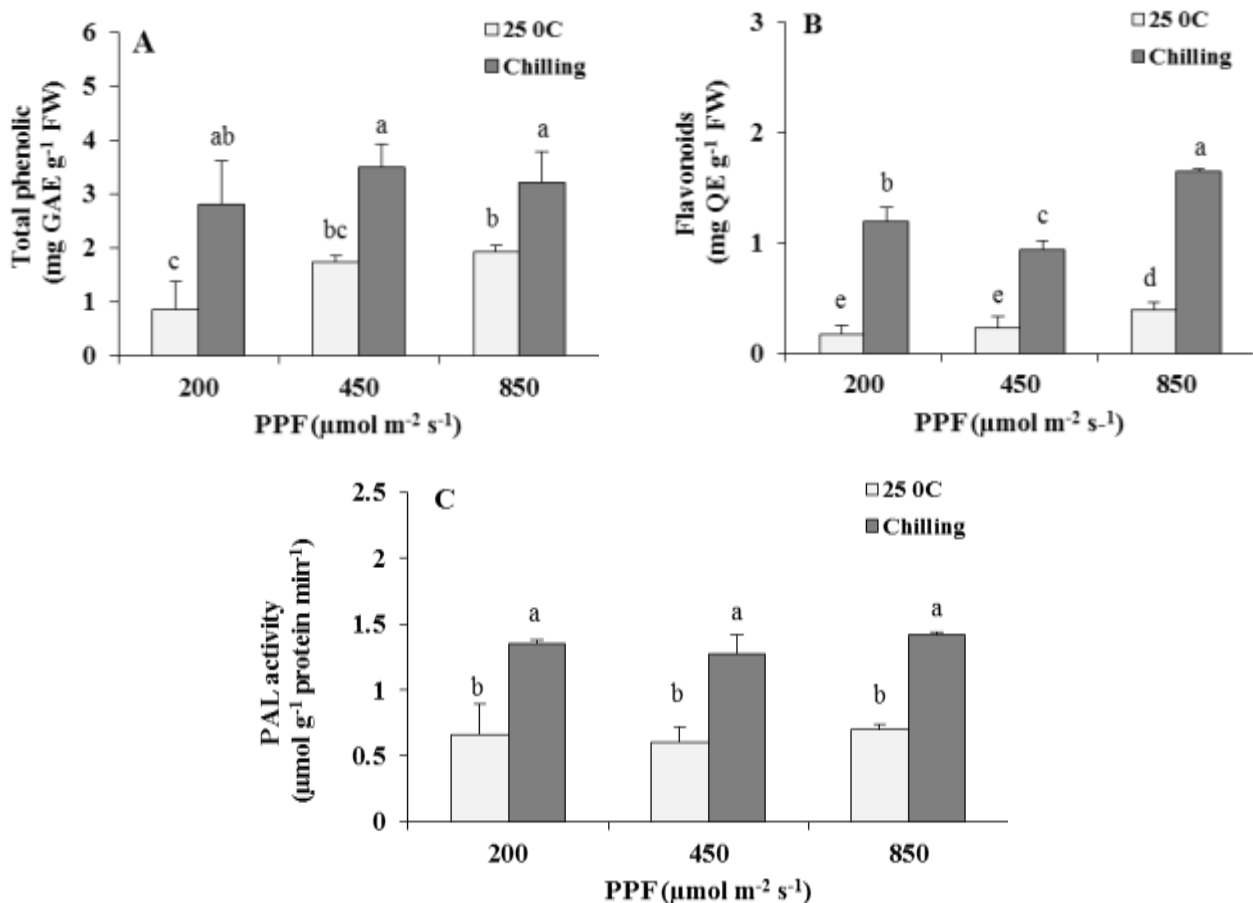
بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیاپاز تحت تأثیر تیمار سرما در شدت‌های نور شامل ۲۰۰، ۴۵۰ و ۸۵۰ مشاهده شد (شکل ۴ C).

بررسی فنل کل ژل برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا در این آزمایش نشان داد که متناسب با فنل کل و فلاونوئید بافت برگ، بیشترین مقدار انباشت فنل کل مربوط به تیمار توأم سرما و شدت نور ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع بود (شکل ۵ A). ولی

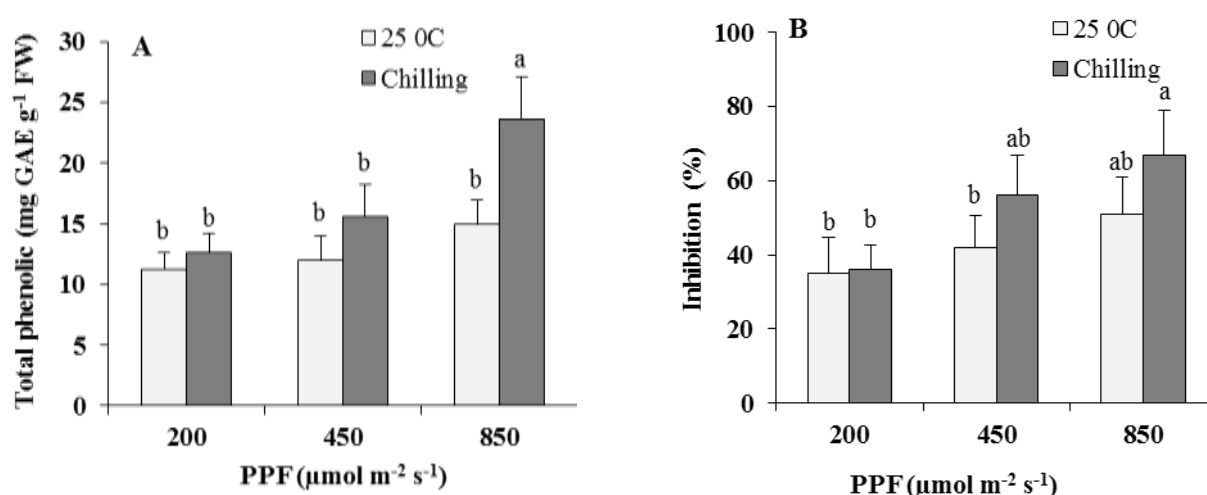
مقدار فلاونوئید برگ‌ها نشان داد که بیشترین مقدار انباشت فلاونوئید مربوط به تیمار توأم سرما و شدت نور ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع بود. این بیش افزایش فلاونوئید برگ‌ها در تیمار توأم سرما و شدت نور ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع نشان داد که اثر سرما در شدت نور بالا تشدید شده است. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیاپاز (PAL) در همه تیمارها از الگوی افزایش مقدار فنل کل و فلاونوئید برگ‌ها تبعیت کرد و



شکل ۳- مقدار انباشت پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و مالون دی آلدئید (MDA) در برگ‌های گیاه آلوئه ورا که در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) به مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. مقادیر، میانگین ± تکرار ۴ (انحراف معیار) StD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P < ۰/۰۵ است.



شکل ۴- مقدار فنل کل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز (PAL) در آلوئه ورا که در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) به مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. مقادیر، میانگین ± تکرار ۴ (انحراف معیار) StD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح P < ۰/۰۵ است.



شکل ۵- مقدار فنل کل ژل و درصد مهار رادیکال های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH) توسط عصاره ژل گیاه آلوئه ورا که در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و شدت های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه به مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. مقادیر، میانگین \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $P < 0.05$ است.

سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و عدم افزایش متابولیت های H_2O_2 و MDA تحت تأثیر شدت های مختلف نور نشان داد که احتمالاً تیمار شدت نور بالا به تنهایی و در غیاب تیمار سرما باعث تنش اکسیداتیو نشده است. در شرایط شدت نور بالا، گیاهان مقاوم به شدت نورهای بالا از طریق فعال کردن سازوکارهای حفاظت نوری شامل افزایش فروکش غیر فتوشیمیایی (NPQ)، افزایش فعالیت سیستم جاروب کننده ROS، انباشت جاذب های نوری در اپیدرم و افزایش جریان انتقال الکترون چرخه ای، می توانند با تداوم مهار نوری (که ممکن است به آسیب نوری منجر شود) مقابله کنند (Takahashi and Badger, 2011). بنابراین یکی از مهمترین سازوکارهای حفاظت نوری در گیاهان، فعالیت سیستم جاروب کننده ROS می باشد. ولی نتایج این تحقیق مشخص کرد که گیاه آلوئه ورا در مقابله با اثر شدت نور بالا از سازوکار افزایش فعالیت سیستم جاروب کننده ROS استفاده نمی کند.

با اعمال تیمار دمای پایین (۴ درجه سانتی گراد) ما شاهد افزایش معنی دار پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید (MDA) در برگ ها بخصوص در شدت نور ۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول بر

سرما تغییر معنی دار و قابل ملاحظه در مقدار فنل کل ژل در شدت های نور کم و متوسط (شامل ۲۰۰ و ۴۵۰) ایجاد نکرد. بررسی درصد مهار رادیکال های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازین ژل برگ های گیاه آلوئه ورا نشان داد که متناسب با تغییرات فنل کل ژل، بیشترین درصد مهار رادیکال های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازین در تیمار توأم سرما و شدت نور ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع به دست آمد (شکل B۵).

بحث

آلوئه ورا گیاهی با مسیر فتوسنتزی کام (CAM) محسوب می شود که توان زیستن در مناطق خشک با شدت نور بالا را دارد (Hazrati et al., 2016). با افزایش شدت نور، تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) در هر دو فتوسیستم I و II افزایش می یابد. انباشت ROS باعث مهار سنتز پروتئین D1 و مهار چرخه بازسازی فتوسیستم II می شود و پدیده مهار نوری تشدید می شود (Asada, 2006; Telfer, 2014). گیاهان دارای دو سیستم پاسخگر آنتی اکسیداتیو شامل سیستم آنزیمی و سیستم غیر آنزیمی بر علیه ROS می باشند (Habibi, 2014). در این تحقیق، عدم تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت

می‌کنند (Takahashi and Badger, 2011). نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهان آلوئه ورا با فعال کردن سازوکار حفاظت نوری، یعنی افزایش توان فیلتر کردن نور شدید در سلول‌های اپیدرم برگ‌ها، خود را با شرایط شدت نور بالا سازگار می‌کنند. در نتیجه میزان بالایی از انرژی شدت نور بالا، فتوسیستم‌ها را تحت تأثیر قرار نداده (Takahashi and Badger, 2011) و پدیده مهار نوری رخ نداد. ترکیبات فنلی متابولیت‌های غنی از کربن و به عنوان گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند. همچنین این ترکیبات جزو آنتی‌اکسیدانت‌ها محسوب شده و در شرایط تنش‌های غیر زیستی ممکن است در جاروب کردن‌های رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن نقش ایفا کنند (Dicko *et al.*, 2005). این ترکیبات فیتوشیمیایی با تغییر در بیان ژن‌ها و فعالیت پروتئین‌ها بر فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیداتیو اثرگذار هستند (Tesfay *et al.*, 2011).

با اعمال سرما، فعالیت آنزیم PAL در برگ‌ها افزایش یافت و برگ‌ها مقادیر بسیار بالایی ترکیبات فنلی و فلاونوئید در مقایسه با تیمارهای شدت نور و شاهد انباشته کردند. با وجود افزایش مقادیر ترکیبات فنلی و فلاونوئید در شرایط سرما، بدلیل عملکرد ضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت، سرما باعث تحریک پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاها شد. بررسی درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازین توسط ژل برگ‌های گیاه آلوئه ورا نشان داد که متناسب با تغییرات فنل کل ژل، بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازین در تیمار توأم سرما و شدت نور ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع به دست آمد. از آنجایی که مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازین به عنوان معیاری برای فعالیت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره ژل محسوب می‌شود (Dzialo *et al.*, 2016)، نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازین از طریق افزایش میزان فنل‌ها انجام گرفته است و می‌تواند بعنوان عاملی در جهت افزایش کیفیت و ارزش غذایی و دارویی ژل برگ‌های گیاه آلوئه ورا مطرح شود.

مترمربع در ثانیه نسبت به گروه شاهد (شدت نور ۲۰۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) بودیم که نشان دهنده وقوع تنش اکسیداتیو در این تیمارها می‌باشد. مهمترین شاهد برای وقوع تنش اکسیداتیو در این شرایط، افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید بدلیل پراکسیداسیون لیپیدها در برگ‌ها بود. افزایش این متابولیت می‌تواند بعنوان شاخصی برای مهار رشد و کاهش توان سازگاری گیاه در برابر شرایط تنش تلقی شود (Habibi, 2014). افزایش فعالیت کاتالاز در برگ‌های گیاه آلوئه ورا تیمار شده با «سرما + شدت نور ۸۵۰» با نتایج Barros و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین نتایج Li و همکاران (۲۰۱۶) که افزایش فعالیت این آنزیم را تحت تأثیر تیمار «سرما + شدت نور بالا» در گیاه *Kappaphycus lvarezii* گزارش کرده‌اند، مطابقت داشت. هر چند افزایش فعالیت کاتالاز در تیمار «سرما + شدت نور ۸۵۰» که نشان دهنده فعال شدن سیستم پاسخگر آنتی‌اکسیداتیو گیاه بر علیه ROS می‌باشد، در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اثر کمی داشت، به طوریکه پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در تیمار «سرما + شدت نور ۸۵۰» نیز مشاهده شد. نتایج این تحقیق مشخص کرد که سرما باعث انباشت گونه‌های فعال اکسیژن و تخریب غشاهای برگ‌های گیاه آلوئه ورا شد و با وجود فعال شدن سیستم پاسخگر آنتی‌اکسیداتیو گیاه بر علیه ROS، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت گیاه آلوئه ورا توان لازم برای مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) را نداشت.

همان طور که گفتیم یکی از سازوکارهای دیگر حفاظت نوری در گیاهان، انباشت جاذب‌های نوری در اپیدرم برگ‌ها از جمله فنل‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد (Takahashi and Badger, 2011). در این پژوهش با افزایش شدت نور از ۴۵۰ به ۸۵۰ میکرومول بر مترمربع درثانیه، افزایش مقادیر فنل کل و فلاونوئیدهای برگ‌ها به عنوان سازوکار دیگر حفاظت نوری عمل کرد. از آنجایی که شدت نور بالا باعث آسیب مستقیم فتوسیستم II می‌شود (Tyystjärvi, 2008)، گیاهان برای مقابله با آسیب نوری فتوسیستم‌ها، مقادیر بالایی فیلترهای نوری شامل فنل‌ها و فلاونوئیدها در اپیدرم برگ‌های خود تولید

نتیجه گیری کلی

وجود افزایش مقادیر ترکیبات فنلی و فلاونوئید در شرایط سرما، بدلیل عملکرد ضعیف آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی اکسیدانت از جمله آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاهای مشاهده شد. همچنین با توجه به افزایش مقدار فنل و فعالیت آنتی اکسیدانتی ژل برگ آلوئه ورا پس از اعمال ۴۸ ساعت تیمار دمای پایین، توصیه می‌شود نقش سرمای قبل از برداشت در افزایش کیفیت و ارزش غذایی و دارویی آلوئه ورا مورد توجه و بررسی تکمیلی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارنده از سرکار خانم نسرین ثروتیان بابت همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نماید.

گیاهان در شرایط شدت نور بالا برای مقابله با آسیب نوری فتوسیستم‌ها، از دو سازوکار مهم بهره می‌برند: در سازوکار اول مقادیر بالایی رنگیزه‌های حفاظتی و فیلترهای نوری شامل فنل‌ها، فلاونوئیدها و ... را در اپیدرم برگ‌های خود تولید می‌کنند، و در سازوکار دوم از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم جاروب کننده ROS باعث تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط شدت نور بالا می‌شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهان آلوئه ورا در شرایط شدت نور بالا از سازوکار اول بطور مؤثرتری استفاده می‌کنند تا خود را با شرایط شدت نور بالا سازگار کنند. نتایج نشان داد که آلوئه ورا مقاومت کمی به دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) دارد و با

منابع

- Ahmad, P., Prasad, M. N. V. (2012) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer, New York.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.
- Azzabi, G., Pinnola, A., Betterle, N., Bassi, R., Alboresi, A. (2012) Enhancement of non-photochemical quenching in the *Bryophyte physcomitrella patens* during acclimation to salt and osmotic stress. *Plant Cell Physiology* 53:1815-1825.
- Barros, M. P., Necchi, O., Colepicolo, P. and Pedersen, M. (2006) Kinetic study of the plastoquinone pool availability correlated with H₂O₂ release in seawater and antioxidant responses in the red alga *Kappaphycus alvarezii* exposed to single or combined high light, chilling and chemical stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1757:1520-1528.
- Boominathan, R. and Doran, P. M. (2002) Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. *New phytologist* 156: 202-205.
- Bradford, M. 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: 248-254.
- Chen, L., Jia, H., Tian, Q., Du, L. and Gao, Y. (2012) Protecting effect of phosphorylation on oxidative damage of D1 protein by down-regulating the production of superoxide anion in photosystem II membranes under high light. *Photosynth Research* 112: 141-148.
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Barro, C., Traore, A. S., van Berkel, W. J. and Voragen, A. G. (2005) Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2671-2688.
- Dzialo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A. (2016) The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International journal of molecular sciences* 17: 160.
- FAO (2009) High level expert forum – how to feed the world in 2050. Economic and Social Development Department, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Habibi, G. (2014) Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Generation, scavenging and signaling in plants. In: *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (ed. Ahmad, P.) Pp. 557-574. Elsevier, USA.
- Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S. A. M., Mokhtassi-Bidgoli, A., and Nicola, S. (2016) Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 141-148.

- Ivanov, A. G., Allakhverdiev, S. I., Huner, N. P. A. and Murata, N. (2012) Genetic decrease in fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol increased photoinhibition of photosystem I at low temperature in tobacco leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817: 1374-1379.
- Kishimoto, T., Sekozawa, Y., Yamazaki, H., Murakawa, H., Kuchitsu, K. and Ishikawa, M. (2014) Seasonal changes in ice nucleation activity in blue berry stems and effects of cold treatments in vitro. *Environmental and Experimental Botany* 106:13-23.
- Lee, S. K., Mbwambo, Z. H., Chung, H. S. (1998) Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 1: 35-46.
- Liang, Y., Zhuc, J., Li, Z., Chua, G., Dingc, Y., Zhangc, J. and Sun, W. (2008) Role of silicon in enhancing resistance to freezing stress in two contrasting winter wheat cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 64:286-294.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Li, H., Liu, J., Zhang, L., Pang, T. (2016) Antioxidant responses and photosynthetic behaviors of *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* (Rhodophyta, Solieriaceae) during low temperature stress. *Botanical Studies* 57: 21.
- Mavi, A., Terzi, Z. and Ozgen, U. (2004) Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *Verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 702-705.
- Munns, R., James, R. A. and Lauchli, A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043.
- Scheller, H., Haldrup, A. (2005) Photoinhibition of photosystem I. *Planta* 221: 5-8.
- Suetsugu, N. and Wada, M. (2007) Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biological Chemistry* 388: 927-935.
- Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovic, B. (1974) Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 166: 387-392.
- Takahashi, S. and Badger, M. R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16: 1-10.
- Telfer, A. (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of b-Carotene. *Plant Cell Physiology* 55: 1216-1223.
- Tesfay, S. Z., Bertling, I., Bower, J. P. (2011) Effects of postharvest potassium silicate application on phenolics and other antioxidant systems aligned to avocado fruit quality. *Postharvest Biology and Technology* 60:92-99.
- Tholen, D. (2008) The chloroplast avoidance response decreases internal conductance to CO₂ diffusion in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environment* 31: 1688-1700.
- Tyystjarvi, E. (2008) Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361-376.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants-protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:18-223.
- Yamori, W., Evans, J. R. and von Caemmerer, S. (2010) Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO₂ assimilation rate in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* 33: 332-343.
- Yamori, W., Sakata, N., Suzuki, Y., Shikanai, T. and Makino, A. (2011) Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *The Plant Journal* 68: 966-976.
- Zucker, M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light, its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Physiologia Plantarum* 40: 779-784.