

Effects of the altitudinal gradient on the daily rhythm of antioxidant capacity and dynamic photoinhibition in *Marrubium vulgare*

Ghader Habibi

Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Iran

Abstract

Several studies have been conducted focusing on antioxidant capacity of medicinal plants; however, information is lacking on the daily rhythm of antioxidant capacity as well as photochemical reactions in medicinal plants under natural conditions. Thus, in this study, changes in phenolic acids, PSII functioning and antioxidant enzymes activities in *Marrubium vulgare* L. in response to low (1,100 m) and high (2,200 m) elevation sites were investigated. Plants were harvested and analyzed in a temporal manner. The leaf samples were frozen immediately in liquid N₂ and stored in it until assay. High-altitude plants exhibited higher phenolics and carotenoids than that in low-altitude plants, which was associated with higher phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity. Results indicated that the absolute amounts of antioxidant enzymes activities were considerably greater in high-altitude plants than low-altitude plants. The high-altitude plants showed rapidly reversible inhibition of PSII reaction centers (dynamic photoinhibition) associated with an increase in the non-photochemical rate constant (k_N), which was an important photoprotection mechanism under high-mountain conditions. Surprisingly, the activities of antioxidative enzymes, the accumulation of hydrogen peroxide (H₂O₂), and the free radical scavenging activities in the leaves of high-altitude plants showed diurnal rhythm during the course of a day. Finally, we found that the ability of dynamic photoinhibition was an important photoprotection process during periods of high solar radiation in the high-altitude *Marrubium vulgare* plants.

Keywords: Antioxidant capacity, diurnal rhythm, dynamic photoinhibition, high elevation, *Marrubium vulgare*

* Corresponding Author: gader.habibi@gmail.com

تأثیر ارتفاع بر تغییرات روزانه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مهار نوری موقتی در گیاه *Marrubium vulgare*

قادر حبیبی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷ تهران، ایران

چکیده

پژوهش‌های بسیاری به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی پرداخته‌اند؛ اما اطلاعات کمی درباره نوسان روزانه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و واکنش‌های فتوشیمیایی در این گیاهان وجود دارد؛ از این رو در پژوهش حاضر، تغییرات روزانه مقدار فنولیک‌اسیدها، عملکرد فتو سیستم II و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه فراسیون (*Marrubium vulgare* L.) در ارتفاع ۱۱۰۰ و ۲۲۰۰ متری در شرایط طبیعی مطالعه شد. برگ گیاهان در ساعات‌های مختلف روز برداشت و نمونه‌های برگ‌ی بی‌درنگ به نیتروژن مایع منتقل شدند. گیاهان در ارتفاع بالاتر نسبت به گیاهان ارتفاع پایین‌تر دارای مقادیر ترکیبات فنلی و کاروتنوئید بیشتری بودند و بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز را نشان دادند. نتایج، افزایش معنادار مقدار مطلق فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را با افزایش ارتفاع نشان دادند. برگ‌های گیاهان ارتفاع بالاتر کاهش موقتی مقدار پیشینه عملکرد کوانتومی فتو سیستم II (مهار نوری دینامیک) را به شکل یکی از سازوکارهای حفاظت نوری در ساعات‌های بعدازظهر بروز دادند که با افزایش معنادار فروکش غیرفتوشیمیایی (k_N) در این برگ‌ها همراه بود؛ جالب آنکه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، انباشت مقدار پراکسید هیدروژن و میزان درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین برگ‌های گیاهان ارتفاع بالاتر نوسان روزانه را نشان دادند. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند در ساعات‌هایی از روز که شدت تابش نور خورشید بیشتر است، مهار نوری دینامیک مهم‌ترین سازوکار حفاظت نوری گیاهان فراسیون ساکن در ارتفاع بالا محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، نوسان روزانه، مهار نوری موقتی، ارتفاع بالا، گیاه فراسیون

مقدمه

الکترون و تنفس نوری اشاره کرد (Takahashi, 2010; Takahashi and Badger, 2011) در نورهای شدید، گیاهان از طریق جابه‌جایی کلروپلاست‌ها از شدت آسیب‌های نوری می‌کاهند و محل کلروپلاست‌ها در گیاهان، سرخس‌ها، خزها و جلبک‌های سبز به‌شکلی تغییر می‌یابد که شدت نور بهینه را جذب کند (Takahashi and Badger, 2011). در این گیاهان، کلروپلاست‌ها هنگام تابش نور ضعیف عمود بر راستای نور قرار می‌گیرند تا نور مؤثر را جذب کنند و در نور شدید، موازی با راستای نور قرار می‌گیرند تا از جذب مضاعف نور جلوگیری کنند (Tholen, 2008)؛ همچنین ترکیبات فیلترکننده و جاذب پرتوی فرابنفش در شرایط نور شدید و فرابنفش افزایش می‌یابند و همراه با افزایش انباشت کاروتنوئیدها، مانع تجزیه پروتئین D1 و آسیب به فتوسیستم II می‌شوند (Magaña et al., 2019). فعالیت سیستم جاروکننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از دیگر سازوکارهای حفاظت نوری در گیاهان است. گیاهان دو سیستم پاسخ‌دهنده آنتی‌اکسیداتیو شامل سیستم آنزیمی (آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و ...) و سیستم غیرآنزیمی (آسکوربات، گلوتاتیون احیاشده و توکوفرول) علیه ROS دارند. مهار نوری شامل دو نوع مهار نوری بلندمدت و مزمن (Chronic photoinhibition) و مهار نوری موقتی یا دینامیک (Dynamic photoinhibition) است (Hopkins, 2008). مهار نوری بلندمدت و مزمن در نهایت سبب بروز آسیب نوری می‌شود، ولی مهار نوری دینامیک نوعی سازگاری و یکی از سازوکارهای حفاظت نوری

عصاره گیاه دارویی فراسیون (*Marrubium vulgare* L.) در درمان سرفه، زکام، آسم، ناراحتی‌های مجاری تنفسی فوقانی، اسهال مزمن و تب‌های مخاطی کاربرد دارد و فعالیت ضدالتهابی عصاره این گیاه بیشتر به‌علت وجود استرهای فیل‌پروپانوئیدی است. گیاه دارویی فراسیون در شیب ارتفاعی مشخصی در میشوداغ واقع در شمال‌غرب ایران یافت می‌شود. این گیاهان در شرایط طبیعی، به‌ویژه در ارتفاعات، به‌طور اجتناب‌ناپذیری در معرض تابش نور مرئی و پرتوی فرابنفش شدید قرار می‌گیرند (Habibi and Ajory, 2015)؛ با افزایش شدت تابش، ظرفیت زنجیره انتقال الکترون اشباع می‌شود و احتمال تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد. تنش اکسیداتیو با آسیب‌رساندن به بخش آزادکننده اکسیژن و تجزیه اجزای پلی‌پپتیدی فتوسیستم II سبب غیرفعال شدن فتوسیستم II می‌شود (Takahashi and Badger, 2011)؛ این تغییر با تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) سبب ممانعت نوری و بروز آسیب اکسیداتیو در اجزای درونی سلول‌ها می‌شود (Habibi, 2014). گیاهان برای جلوگیری از آسیب‌رسیدن به فتوسیستم II، سازوکارهایی با عنوان سازوکارهای حفاظت نوری را در پیش می‌گیرند که از جمله این سازوکارها می‌توان به حرکت برگ و کلروپلاست، انباشت فنل در اپیدرم برگ به‌منظور جذب پرتوی فرابنفش، فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی (مانند انباشت کاروتنوئید، گلوتاتیون و ...)، افزایش عملکرد سازوکار خاموش‌شدگی غیرفتوشیمیایی فلورسانس کلروفیل طی انتقال

از آغاز فاز زایشی در ساعت‌های ۸، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۰ انجام شد.

سنجش شاخص‌های فلورسانس کلروفیل و

آزمون JIP: دستگاه فلورسانس سنج (PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, PE 32 1JL, Engl) برای تعیین فلورسانس کلروفیل استفاده شد و شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش‌یافته با تاریکی (به مدت دست کم ۲۰ دقیقه) شامل F_0 (فلورسانس پایه) و F_m (فلورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شدند. به منظور رسم منحنی فلورسانس از آزمون JIP بهره گرفته شد. آزمون JIP داده‌های ثبت‌شده اولیه با دستگاه فلورسانس سنج را به شاخص‌های بیوفیزیکی تبدیل و کمیت مراحل جریان انرژی طی فتوسیستم II را تعیین می‌کند. در این دستگاه از نور قرمز با طول موج ۶۲۷ نانومتر و شدت ۳۵۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه (به منظور اطمینان از رسیدن به پیک F_m) برای تولید منحنی فلورسانس OJIP (O-J-I-P rise) استفاده می‌شود. شاخص‌های زیر در اندازه‌گیری‌های فلورسانس اولیه استفاده شدند:

شدت فلورسانس بیشینه (F_m)، شدت فلورسانس در ۵۰ میکروثانیه (فلورسانس پایه)، شدت فلورسانس در ۳۰۰ میکروثانیه ($F_{300\mu s}$)، نسبت فلورسانس متغیر (V) و شدت فلورسانس در ۲ میلی‌ثانیه (مرحله J) که نشان‌دهنده F_J است؛ سپس محاسبه‌های لازم برای به دست آوردن سایر شاخص‌ها شامل شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs})، بیشینه عملکرد کواتومی فتوسیستم II (F_v/F_m)، عملکرد مراکز واکنش فتوسیستم (RC/CS)، توان به‌دام‌انداختن انرژی تهییج‌شده (TR_0/CS)، میزان

برای جلوگیری از آسیب بیشتر فتوسیستم‌ها محسوب می‌شود (Murchie and Niyogi, 2011; Betancor et al., 2015).

پاسخ به افزایش ارتفاع و سازگاری گونه‌های مختلف بر اساس سازوکارهای متفاوتی انجام می‌شود و در برخی گیاهان، حتی برگ‌های مختلف یک گیاه پاسخ‌های متفاوتی به شرایط متغیر محیطی می‌دهند که با ریخت‌شناسی آن برگ‌ها ارتباط دارد (Habibi and Ajory, 2015). تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است که تفاوت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مهار نوری دینامیک را در اکوتیپ‌های یک گونه دارویی در ارتفاع‌های مختلف رویشگاه طبیعی مشخص کند. در پژوهش حاضر، تفاوت سازوکارهای حفاظت نوری و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اکوتیپ‌های گیاه فراسیون در دو ارتفاع مختلف از طریق اندازه‌گیری فعالیت فتوشیمیایی فتوسنتز و سیستم جاروکننده ROS مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه: در اواسط خردادماه سال ۱۳۹۶، نمونه‌های برگ‌گی اکوتیپ‌های مختلف گیاه *Marrubium vulgare* پس از اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل برگ‌ها، از ارتفاع‌های ۱۱۰۰ و ۲۲۰۰ متری کوه میشوداغ واقع در بخش یام مرند در فاصله ۶۵ کیلومتری جنوب شهر تبریز (۴۵ درجه و ۳۸ دقیقه شرقی و ۳۸ درجه و ۲۲ دقیقه شمالی) جمع‌آوری و بی‌درنگ به نیتروژن مایع منتقل شدند. انواع سنجش‌ها در آزمایشگاه و با استفاده از نمونه‌های ذخیره‌شده در نیتروژن مایع انجام شدند. برداشت نمونه‌های دو اکوتیپ به‌طور هم‌زمان و پیش

۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت کلروفیل‌های a ، b و کاروتنوئیدها مطابق روابط زیر به دست آمد (Lichtenthaler and Wellburn, 1985).

$$C_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$C_b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 A_{470} - 2.270 C_a - 81.4 C_b/22$$

C_a = کلروفیل a ، C_b = کلروفیل b ، C_{x+c} = کاروتنوئید

کل، A = جذب در طول موج مدنظر

سنجش فعالیت آنزیم‌ها و متابولیت‌های سیستم دفاع

آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

(SOD) مطابق روش Giannopolitis و Ries

(۱۹۷۷) و بر اساس درصد ممانعت از احیای NBT

(nitro blue tetrazolium) به ترکیب ارغوانی‌رنگ

دی‌فورمازان به وسیلهٔ رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)

حاصل از فتولیز ریوفلاوین به واسطهٔ آنزیم موجود

در عصاره اندازه‌گیری شد. نمونه‌های برگ پس از

برداشت بی‌درنگ در نیتروژن مایع پودر شدند و

عصارهٔ آنزیمی در بافر ۲۵ میلی‌مولار HEPES (4-

1-hydroxyethyl)-

piperazineethanesulfonic acid) با اسیدیتهٔ

۷/۸ و حاوی EDTA با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار

استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g

سانتریفیوژ شدند و روش‌ناور برای سنجش فعالیت

استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از روش‌ناور به ۱

میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل HEPES ۲۵

میلی‌مولار با اسیدیتهٔ ۷/۶، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار،

Na_2CO_3 ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیتهٔ ۱۰/۲، L-متیونین

۱۲ میلی‌مولار، NBT ۷۵ میکرومولار و ریوفلاوین

۱ میکرومولار اضافه شد و به منظور انجام واکنش،

مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور تقریباً

۸۰۰۰ لوکس قرار گرفت. به منظور تهیهٔ نمونه‌های

انتقال الکترون در واحد تهییج‌شدهٔ برگ‌ها

(ET₀/CS)، جذب انرژی نورانی در هر مرکز واکنش

(ABS/RC)، جریان انرژی نورانی در هر مرکز

واکنش (DI/RC)، عملکرد کوانتومی انتقال الکترون

(ϕE_0)، ضریب فروکش غیرفتوشیمیایی (k_N)،

ضریب فروکش فتوشیمیایی (k_P)، نسبت فلورسانس

متغیر در فاز J منحنی فلورسانس (I_j) و فعالیت

کمپلکس فتولیزکنندهٔ آب (F_v/F_0) انجام شدند

(Strasser *et al.*, 2004). به منظور رسم منحنی گذار

فلورسانس کلروفیل از نرم‌افزار PEA Plus V1.10

استفاده شد. در منحنی گذار فلورسانس OJIP

برگ‌ها، گذار فلورسانس کلروفیل از سطح پایه «O»

(فلورسانس کمینه) به سطح «J» که حدود ۲ میلی‌ثانیه

طول می‌کشد، به احیای QA به وسیلهٔ فتوسیستم II

مربوط می‌شود. تداوم فلورسانس از سطح «J» به

سطح «I» که حدود ۳۰ میلی‌ثانیه طول می‌کشد، با

احیای کامل ذخایر پلاستوکوئینونی (PQ) مرتبط

است. گذار فلورسانس از سطح «I» به سطح «P» نتیجهٔ

احیای جایگاه گیرندهٔ الکترون PSI است (Kalaji

et al., 2011)

سنجش رنگیزه‌های برگ: به منظور سنجش مقدار

رنگیزه‌ها، نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر

شستشو و روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از

اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها

درون ورقهٔ آلومینیومی قرار گرفتند و تا زمان سنجش

در ازت مایع نگهداری شدند. استخراج رنگیزه با

حلال استون روی یخ و به کمک هاون چینی سرد

انجام شد. غلظت کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها پس از

۲۴ ساعت استخراج در استون ۱۰۰ درصد با دستگاه

اسپکتروفوتومتر تعیین شد؛ به این ترتیب که جذب در

مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر بر اساس منحنی استاندارد H_2O_2 در محدوده صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شدند.

سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها) بر اساس روش Doran و Boominathan (۲۰۰۲) انجام شد. عصاره گیاهی در محلول ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) استخراج و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتی‌فیوژ شد. روش‌ناور با محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتوریک‌اسید با نسبت ۱ به ۴ در لوله آزمایش مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس لوله‌ها به سرعت در یخ سرد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتی‌فیوژ شدند. هم‌زمان با عصاره‌های گیاهی، محلول‌های استاندارد نیز در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۳،۳، ۱- ترا اتوکسی‌پروپان تهیه شدند و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد؛ در نهایت، مقدار MDA نمونه‌ها بر حسب $nmol\ g^{-1}\ FW$ محاسبه شد. به منظور اندازه‌گیری پروتئین کل، عصاره پروتئینی در بافر فسفات‌سدیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۶/۸ استخراج و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتی‌فیوژ شد؛ روش‌ناور حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز:
فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز (PAL) مطابق روش Zucker (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد؛ به این ترتیب

شاهد، مخلوط یادشده بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه و جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس مقدار پروتئین آنزیمی لازم برای القای ۵۰ درصد ممانعت از احیای NBT در مقایسه با نمونه‌های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه و به شکل $Unit\ mg^{-1}\ protein$ بیان شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکاران (۱۹۷۴) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر تعیین شد. پس از پودر شدن نمونه‌ها در نیتروژن مایع، عصاره آنزیمی در بافر فسفات‌پتاسیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۷ استخراج و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتی‌فیوژ شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیم، مقدار مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار افزوده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد؛ در نهایت، فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی $(H_2O_2\ mM^{-1}\ cm^{-1})$ (۰/۰۴۱) بر حسب $\mu M\ H_2O_2\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$ محاسبه شد.

غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بر اساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) به دست آمد. محلول استخراج برگ‌ها، محلول ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) بود. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتی‌فیوژ شدند و روش‌ناور استفاده شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به ۱ میلی‌لیتر محلول واکنشی شامل بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) و یدیدپتاسیم ۱ مولار اضافه و به منظور انجام واکنش،

در عصاره تیمارها به شکل میلی گرم گالیک اسید در گرم بافت بیان شد.

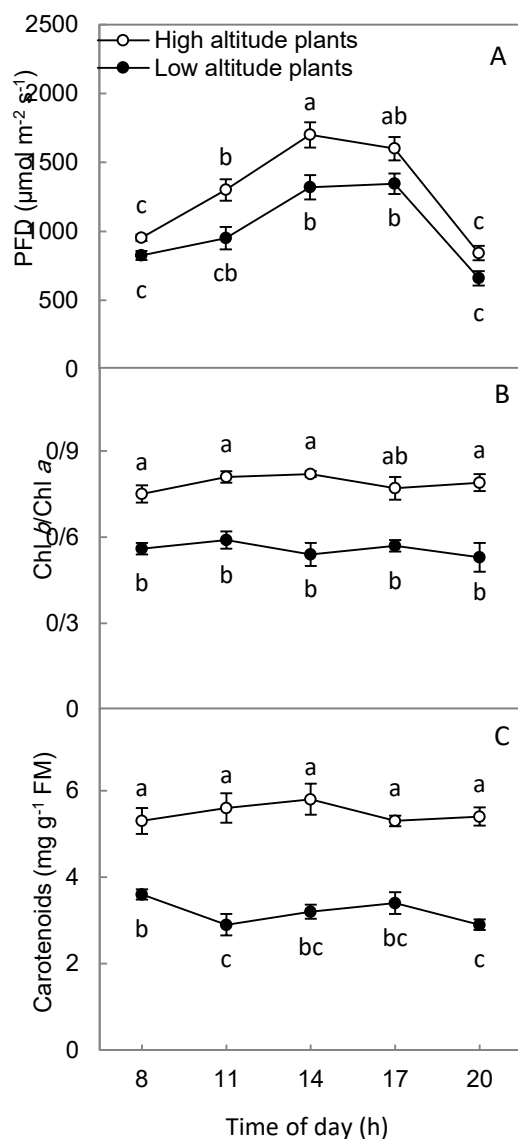
به منظور سنجش فلاونوئیدها، نمونه‌های برگ در متانول حاوی آلومینیوم کلرید ۲ درصد استخراج شدند و پس از سانتریفیوژ، روشناور برداشت و جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر تا ۱۶ میلی گرم در لیتر) برای استاندارد استفاده شدند و مقدار فلاونوئیدها بر اساس (Sarikurkcu $\text{mg quercetin g}^{-1}$ FW *et al.*, 2008).

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

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

که ابتدا عصاره آنزیمی در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷/۸ و حاوی اتیلن‌دی‌آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) با غلظت ۲ میلی مولار، مرکاپتواتانول ۱۸ میلی مولار و ۰/۱ درصد تریتون X-100 استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و روشناور برای سنجش فعالیت استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره به ۱ میلی لیتر محلول واکنشی شامل بافر سدیم بورات ۵۰ میلی مولار (اسیدیته ۸/۸) و L- فنیل آلانین ۵ میلی مولار اضافه و به منظور انجام واکنش، مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۲۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای تولید ۱ نانومول سینامیک اسید محاسبه شد.

سنجش فنل کل: از آنجا که بیشترین ترکیبات فنلی گیاهان از نوع پلی‌فنل‌ها هستند، روش معرف فنلی فولین سیوکالتیو (Mavi *et al.*, 2004) برای سنجش فنل کل استفاده شد؛ به این منظور، ۵ گرم برگ به کمک هاون پودر و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر جوشانده شد؛ در نهایت، نمونه با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد. مقدار ۲۵۰ میکرو لیتر معرف فولین با ۲۵ میکرو لیتر عصاره و ۵۰۰ میکرو لیتر محلول آبی کربنات سدیم ۲۰ درصد مخلوط شد. نمونه‌های شاهد بدون عصاره بودند. پس از قراردادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت فنل کل بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید به دست آمد. سنجش برای هر عصاره چهار بار تکرار شد و میانگین فنل کل موجود



شکل ۱- تغییرات روزانه شدت تابش نور (میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) (A)، نسبت کلروفیل *a* به *b* (B) و کاروتنوئیدهای (C) اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در ریشگاه طبیعی. اعداد میانگین ۴ تکرار \pm StD (انحراف معیار) هستند و میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معناداری با یکدیگر در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی ندارند.

بررسی آماری نتایج: هر تیمار دارای چهار تکرار

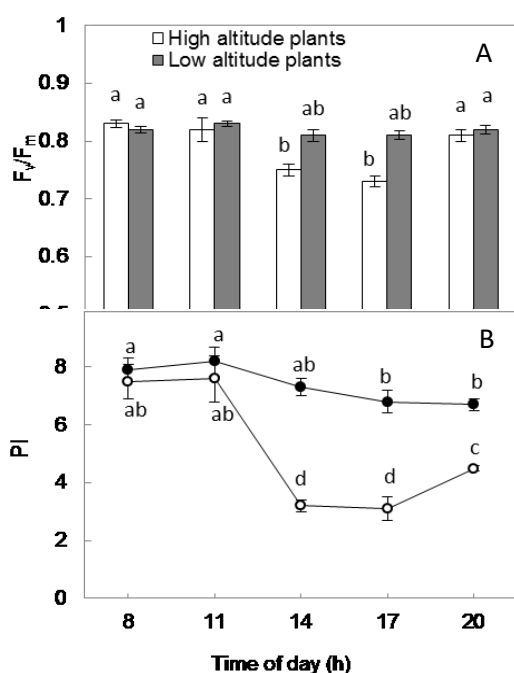
مستقل بود. نمونه‌برداری از طبیعت برای هر دو اکوتیپ به‌طور هم‌زمان و یک بار انجام شد. با توجه به وجود دو ریشگاه و چند مرحله نمونه‌برداری، تجزیه واریانس دو طرفه برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد. میانگین و انحراف معیار (SD) داده‌ها و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2007 انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار Sigma Stat 3.5 استفاده و برای مقایسه میانگین تیمارها (معادل اکوتیپ‌ها) از آزمون Tukey در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بهره گرفته شد.

نتایج

سنجش شدت تابش نور در ارتفاعات می‌شوداغ در اواسط خردادماه نشان داد در بازه زمانی ساعت ۱۴ تا ۱۷ عصر، گیاهان در معرض بیشترین شدت تابش قرار دارند (شکل ۱). مقایسه محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین و بالا نشان داد برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا نسبت به برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین مقادیر کلروفیل *b* و کاروتنوئید بیشتری دارند. بررسی رنگیزه‌های فتوسنتزی طی ساعت‌های مختلف روز نشان داد مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین و بالا نوسان روزانه ندارد (شکل ۱).

بررسی شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) و بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) در برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین و بالا نشان داد اگرچه مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در

مقایسه متابولیسم فنلی در برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین و بالا نشان داد برگ‌های گیاهان ساکن ارتفاع بالا در مقایسه با برگ‌های گیاهان ساکن ارتفاع پایین دارای مقادیر زیادی فنل کل و فلاونوئید هستند (شکل ۵). افزایش مقدار فنل کل و فلاونوئید در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) همراه بود؛ هر چند افزایش شدت تابش در طول روز و طی ساعت‌های ۱۴ و ۱۷ تغییر معناداری در مقادیر فنل کل و فلاونوئید و فعالیت آنزیم PAL ایجاد نکرد (شکل ۵).

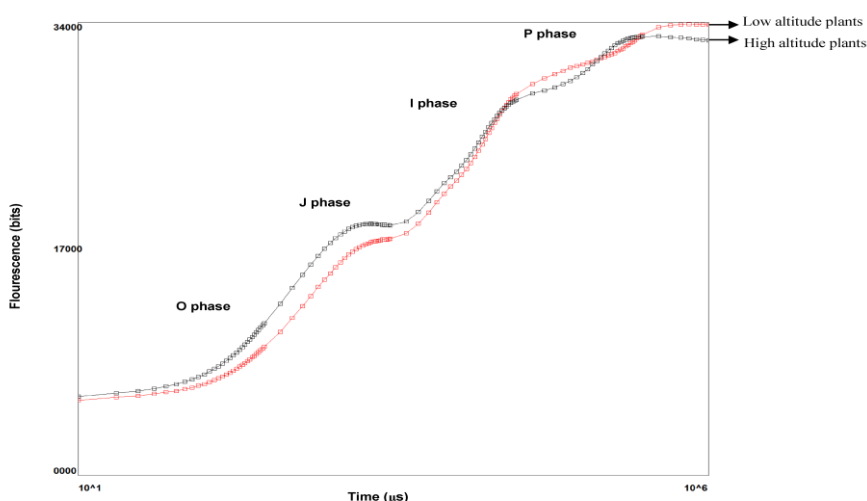


شکل ۲- تغییرات روزانه شاخص‌های بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) (A) و شاخص کارایی فتوسیستم‌های فتوسیستم‌های اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی. اعداد میانگین ۴ تکرار \pm StD (انحراف معیار) هستند و میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معناداری با یکدیگر در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی ندارند.

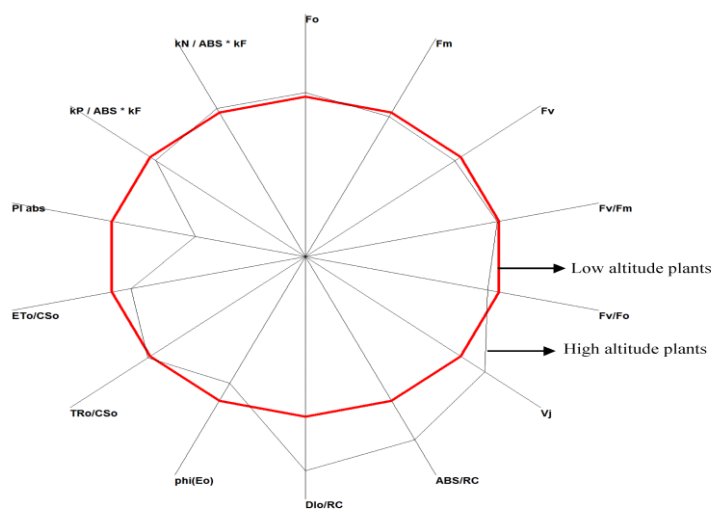
برگ‌های ارتفاع بالا تفاوت معناداری با برگ‌های ارتفاع پایین ندارد، مقدار این شاخص در برگ‌های ارتفاع بالا در ساعت‌های ۱۴ و ۱۷ کاهش معناداری نسبت به ساعت‌های صبح نشان می‌دهد (شکل ۲). کاهش مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های ارتفاع بالا در ساعت‌های ۱۴ و ۱۷ کوتاه‌مدت و گذرا بود و در ساعت ۲۰ به مقدار اولیه بازگشت؛ همچنین شاخص کارایی فتوسیستم‌های برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین و بالا کاهش معناداری در ساعت‌های بعد از ظهر نشان داد.

بررسی تغییرات منحنی فلورسانس OJIP با استفاده از آزمون JIP در گیاه *Marrubium* در شرایط طبیعی نشان داد برگ‌های ارتفاع بالا افزایش شدت فلورسانس را در فاز O-J نشان می‌دهند (شکل ۳). شدت فلورسانس در فاز IP تغییر محسوسی را در برگ‌های ارتفاع پایین و بالا نشان نداد.

بررسی تأثیر ارتفاع بر شاخص‌های مختلف فلورسانس کلروفیل در ساعت ۱۴ ظهر نشان داد برگ‌های گیاهان ارتفاع بالاتر در مقایسه با برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین‌تر دارای عملکرد کوانتومی انتقال الکترون (ϕE_0)، فعالیت کمپلکس فتولیزکننده آب (F_v/F_0) و شاخص کارایی فتوسیستمی (PI_{abs}) کمتری هستند (شکل ۴). کاهش شاخص‌های یادشده با افزایش شاخص‌های جریان انرژی نورانی در هر مرکز واکنش (DI/RC)، جذب انرژی نورانی در هر مرکز واکنش (ABS/RC)، فلورسانس متغیر در فاز J، منحنی فلورسانس (I_j) و ضریب فروکش غیرفتوشیمیایی (k_N) در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالاتر همراه بود.



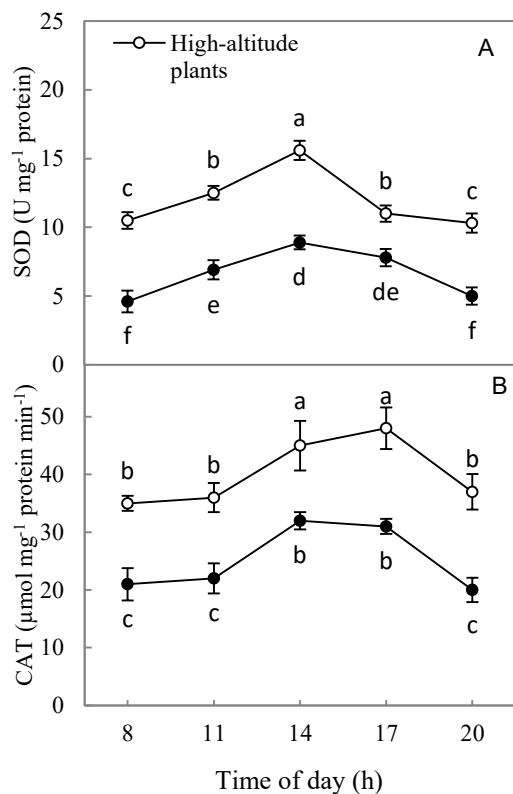
شکل ۳- تغییرات منحنی فلورسانس OJIP (محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان بر اساس میکروثانیه است) در اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی در ساعت ۱۴ ظهر. به منظور تولید منحنی فلورسانس OJIP، از نور قرمز با طول موج ۶۲۷ نانومتر و شدت ۳۵۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه (برای اطمینان از رسیدن به پیک F_m) استفاده شد.



شکل ۴- تأثیر ارتفاع بر نمودار راداری تغییرات شاخص‌های مختلف فلورسانس کلروفیل در اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی در ساعت ۱۴ ظهر

پایین بیشتر است (شکل ۶)؛ همچنین بررسی تغییرات روزانه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های گیاهان ساکن ارتفاع‌های مختلف گیاه *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز به نمونه‌های

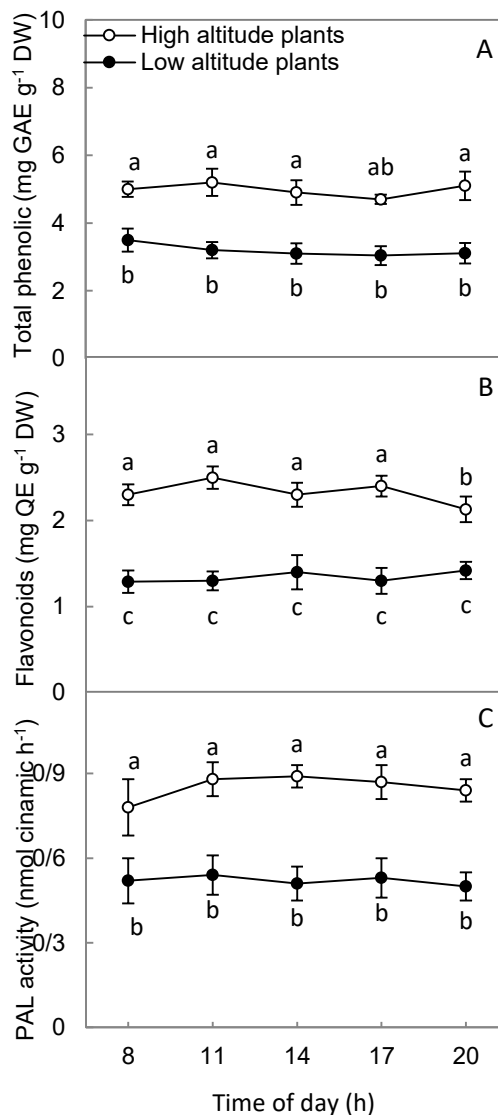
بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های گیاهان ساکن ارتفاع‌های مختلف گیاه *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی نشان داد مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز و کاتالاز در برگ‌های ساکن ارتفاع بالا در مقایسه با برگ‌های ساکن ارتفاع



شکل ۶- تغییرات روزانه فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD) (A) و کاتالاز (CAT) (B) در اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی. اعداد میانگین \pm StD (انحراف معیار) هستند و میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معناداری با یکدیگر در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی ندارند.

بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز که به نمونه‌های برداشت شده در ساعت ۱۴ تعلق داشت، با افزایش مقدار انباشت پراکسیدهیدروژن در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا همراه بود (شکل ۷)؛ هرچند افزایش مقدار انباشت پراکسیدهیدروژن در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا طی ساعت‌های بعدازظهر سبب افزایش معنادار مقدار مالون‌دی‌آلدئید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدها) نشد (شکل ۷).

برداشت‌شده در ساعت ۱۴ و بیشترین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز به نمونه‌های برداشت‌شده در ساعت‌های ۱۴ و ۱۷ تعلق دارد.

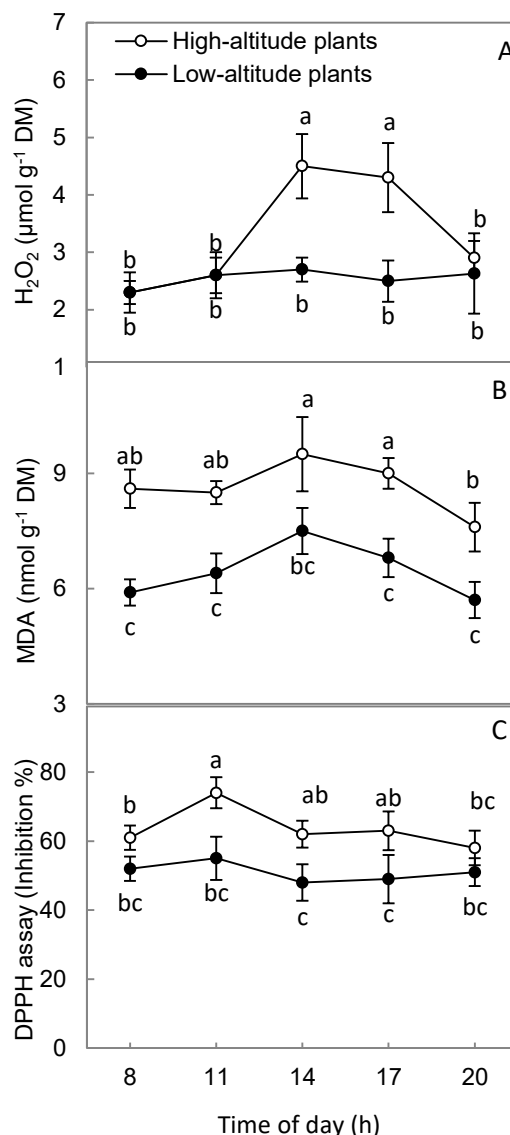


شکل ۵- تغییرات روزانه مقدار فنل (A)، فلاونوئید (B) و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا لایز (PAL) (C) در اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی. اعداد میانگین \pm StD (انحراف معیار) هستند و میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معناداری با یکدیگر در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی ندارند.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا در مقایسه با برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین بیشتر است و بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین در نمونه‌های برداشت شده از گیاهان مرتفع در ساعت ۱۱ به دست می‌آید (شکل ۷).

بحث

برگ‌های گیاه *Marrubium vulgare* (به‌ویژه در ارتفاعات بالاتر) در معرض شدت نور زیاد قرار دارند. تداوم شدت نور زیاد سبب انباشت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (Magaña *et al.*, 2019) و در نتیجه، آسیب پروتئین‌ها و مولکول‌های آلی فتوسیستم‌ها می‌شود (Habibi, 2014)؛ بنابراین به‌منظور جلوگیری از آسیب فتوسیستم‌ها، برگ‌ها باید انرژی مازاد حاصل از شدت نور زیاد را به گرما تبدیل کنند یا این انرژی به‌شکل فلورسانس منتشر شود. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا نسبت به برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین مقادیر کلروفیل *b* و کاروتنوئید بیشتری ذخیره می‌کنند؛ انباشت کاروتنوئیدها نقش مهمی در حفاظت از فتوسیستم‌ها و جارو کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد (Habibi and Ajory, 2015). افزایش کاروتنوئیدها، فعال‌شدن چرخه ویولاگزانتین/زناگزانتین و فروکش غیرفتوشیمیایی سبب تخفیف آسیب‌های ناشی از تنش در گیاهان می‌شوند (Hazrati *et al.*, 2016). یکی از نکته‌های درخور توجه پژوهش حاضر، کاهش موقتی مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا طی ساعت‌های ۱۴ و ۱۷



شکل ۷- تغییرات روزانه مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) (A)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (B) و درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین (C) در اکوتیپ‌های *Marrubium vulgare* در رویشگاه طبیعی. اعداد میانگین \pm StD (انحراف معیار) هستند و میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معناداری با یکدیگر در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی ندارند.

بررسی درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین عصاره برگ‌های اکوتیپ‌های مختلف گیاه *Marrubium vulgare* نشان داد متناسب با تغییرات فنل کل و فعالیت

کلروفیل پایه برگ‌های گیاهان ارتفاع بالاتر بیشتر است؛ زیرا این شدت نور زیاد در ارتفاع بالاتر باید به واسطه برگ‌ها به گرما تبدیل یا فلورسانس شود. بررسی تغییرات منحنی فلورسانس در برگ‌های *Marrubium vulgare* نشان داد شدت فلورسانس در فاز J در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا افزایش می‌یابد. افزایش شدت فلورسانس در فاز J با کاهش ذخایر کوئینون A احیا (QAH2) و پلاستوکوئینون احیا (PQH2) مرتبط است (Habibi, 2017a). کاهش ذخایر QAH2 و PQH2 نشان می‌دهد جریان انتقال الکترون در ناقل‌های پایین دست فتوسیستم II برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا مسدود شده است (Van Heerden *et al.*, 2007).

تداوم شدت نور زیاد سبب برهم خوردن تعادل سلولی مقادیر مولکول‌های ROS می‌شود و با بیش‌انباشت ROS در اندام‌های فتوستنتزی، تنش اکسیداتیو بروز می‌کند و زنجیره انتقال الکترون و فعالیت فتوشیمیایی فتوستنتز مختل می‌شود (Foyer *et al.*, 2020). یکی دیگر از سازوکارهای مهم حفاظت نوری در گیاهان، فعال شدن سیستم جاروکننده مولکول‌های ROS (Telfer, 2014) و انباشت جاذب‌های نوری از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در اپیدرم برگ‌هاست (Takahashi *et al.*, 2016). در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم PAL، مقادیر فنل کل و فلاونوئید در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا نسبت به برگ‌های گیاهان ارتفاع پایین افزایش نشان داد. ترکیبات فنلی، متابولیت‌های غنی از کربن و گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند؛ همچنین این ترکیبات جزو آنتی‌اکسیدان‌ها محسوب می‌شوند و در تنش‌های

و بازگشت آن به مقدار اولیه در ساعت ۲۰ بود. شاخص F_v/F_m یکی از شاخص‌های مهم برای تعیین مقاومت به انواع تنش‌هاست (Rousseau *et al.*, 2013). کاهش مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا طی ساعت‌های بعد از ظهر، این واقعیت را به ذهن متبادر می‌کند که مهار نوری رخ داده است (Xu *et al.*, 2014; Habibi *et al.*, 2017b). بررسی منابع نشان می‌دهد مهار نوری دینامیک نوعی سازگاری و یکی از سازوکارهای حفاظت نوری برای جلوگیری از آسیب بیشتر فتوسیستم‌هاست (Hopkins, 2008; Murchie and Niyogi, 2011)؛ بنابراین، کاهش موقتی مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا طی ساعت‌های ۱۴ و ۱۷ و بازگشت آن به مقدار اولیه در ساعت ۲۰ را می‌توان سازوکار مهار نوری دینامیک و یکی از سازوکارهای حفاظت نوری در نظر گرفت که در نهایت، مانع افزایش مالون‌دی‌آلدئید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدها) و مانع تنش اکسیداتیو در ساعت‌های پرتنش می‌شود. سازوکار مهار نوری دینامیک در پژوهش حاضر با افزایش ضریب فروکش غیرفتوشیمیایی (k_N) در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالاتر همراه بود. افزایش خاموش‌شدگی غیرفتوشیمیایی فلورسانس کلروفیل طی انتقال الکترون یکی از سازوکارهای مهم حفاظت نوری است که سبب مهار نوری موقتی می‌شود (Hopkins, 2008).

افزایش شدت فلورسانس در فاز O و در نتیجه، افزایش شدت فلورسانس پایه (F_0) در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا نشان داد مقدار فلورسانس

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ محسوب می‌شود (Dziato *et al.*, 2016)، نتایج پژوهش حاضر نشان دادند برگ‌های گیاه ساکن ارتفاع بالا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی زیادی در مقایسه با برگ‌های گیاه ساکن ارتفاع پایین دارد و بهترین زمان برداشت آنها، ساعت ۱۱ صبح است.

نتیجه‌گیری

مقایسه ویژگی‌های فیزیولوژیکی برگ‌های گیاه *Marrubium vulgare* ساکن ارتفاع پایین و بالا مشخص کرد برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا نسبت به گیاهان ارتفاع پایین دارای مقادیر بیشتری از کلروفیل *b*، کاروتنوئید، فنل و فلاونوئید هستند. انباشت متابولیت‌های یادشده و همچنین فعالیت مؤثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب می‌شود گیاهان ارتفاع بالا سازوکارهای حفاظت نوری مؤثرتری داشته باشند و در نتیجه، مهار نوری دینامیک را بروز دهند. از نکته‌های درخور توجه در پژوهش حاضر، وجود ریتم روزانه برخی شاخص‌ها به‌ویژه در برگ‌های گیاه *Marrubium vulgare* ساکن ارتفاع بالا است؛ بنابراین، وقوع مهار نوری دینامیک نوعی سازگاری و سازوکار مؤثر حفاظت نوری است که از وقوع آسیب نوری در گیاهان ساکن ارتفاع بالا جلوگیری می‌کند. این گیاهان به بهترین شیوه و با صرف کمترین هزینه با افزایش میزان فروکش غیرفتوشیمیایی و درپیش‌گرفتن مهار نوری موقتی از آسیب به فتوسیستم‌ها ممانعت می‌کنند؛ البته با توجه به اینکه در پژوهش حاضر، بروز مهار نوری دینامیک با افزایش توان سیستم آنتی‌اکسیدان همراه بود، ارتباط مهار نوری دینامیک با افزایش توان سیستم

غیرزیستی ممکن است در جاروکردن رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن ایفای نقش کنند (Dicko *et al.*, 2005). این ترکیبات فتوشیمیایی با تغییر در بیان ژن‌ها و فعالیت پروتئین‌ها بر فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیداتیو اثر می‌گذارند (Tsfay *et al.*, 2011). زیادبودن محتوای ترکیبات فنلی برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا به‌شکل سازوکار حفاظت نوری عمل و میزان زیاد پرتوی فرابنفش در ارتفاعات را فیلتر می‌کند.

در پژوهش حاضر، به‌منظور تعیین آسیب غشاها در برگ‌های گیاهان ارتفاع بالا و پایین، مقدار MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها سنجش شد. نتایج نشان دادند ارتفاع بالا سبب افزایش مقدار H_2O_2 در برگ‌ها می‌شود، ولی شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در ارتفاع بالا تغییر معناداری نشان نمی‌دهد؛ در نتیجه با افزایش ارتفاع، افزایش مقدار H_2O_2 به‌شکل پیک ثانویه برای راه‌اندازی پاسخ‌های حفاظت نوری عمل می‌کند؛ ولی به‌علت فعالیت مؤثر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، این افزایش به اندازه‌ای نیست که سبب بروز تنش اکسیداتیو در برگ‌های ارتفاع بالا شود (Habibi, 2014).

بررسی درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین توسط عصاره برگ نشان داد متناسب با تغییرات فنل کل عصاره، بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین در نمونه‌های برداشت‌شده گیاهان مرتفع در ساعت ۱۱ به دست می‌آید. از آنجاکه مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین معیاری برای فعالیت و

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.

Habibi, G. (2014) Hydrogen peroxide (H_2O_2) generation, scavenging & signaling in plants. In: *Oxidative damage to plants: Antioxidant networks & signaling*. (Ed. Ahmad, P.) 557-574. Elsevier, Amsterdam.

Habibi, G. and Ajory, N. (2015) The effect of drought on photosynthetic plasticity in *Marrubium vulgare* plants growing at low & high altitudes. *Journal of Plant Research* 128: 987-994.

Habibi, G. (2017a) Physiological, photochemical & ionic responses of sunflower seedlings to exogenous selenium supply under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(10): 213-222.

Habibi, G., Servataian, N. and Abedini, M. (2017b) Photoprotection mechanisms in wheat plants under high light and cold temperature conditions. *Iranian Journal of Plant Biology* 9(1): 59-72.

Habibi, G., Elyaghi, S., Abedini, M. and sabourmoghaddam, N. (2018) Benefit of iodine soil application for alleviating detrimental effects of salinity stress in strawberry. *Iranian Journal of Plant Biology* 10(2): 57-72.

Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S. A. M., Mokhtassi-Bidgoli, A. and Nicola, S. (2016) Effects of water stress & light intensity on chlorophyll fluorescence parameters & pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 141-148.

Hopkins, W. G. (2008) *Introduction to plant physiology*. 4th edition, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Lee, S. K., Mbwambo, Z. H. and Chung, H. S. (1998) Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 1(2): 35-46.

آنتی‌اکسیدان و تعیین میزان همبستگی آنها باید در پژوهش‌های آتی بررسی شود.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از همکاری صمیمانه خانم ندا آجری سپاسگزاری می‌کنند.

References

Betancor, S., Domínguez, B., Tuya, F., Figueroa, F. L. and Haroun, R. (2015) Photosynthetic performance & photoprotection of *Cystoseira humilis* (Phaeophyceae) & *Digenea simplex* (Rhodophyceae) in an intertidal rock pool. *Aquatic Botany* 121: 16-25.

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 & sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Dicko, M. H., Gruppen, H., Barro, C., Traoré, A. S., van Berkel, W. J. and Voragen, A. G. (2005) Impact of phenolic compounds & related enzymes in sorghum varieties for resistance & susceptibility to biotic & abiotic stresses. *Journal of Chemical Ecology* 31(11): 2671-2688.

Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J. and Kulma, A. (2016) The potential of plant phenolics in prevention & therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 17(2): 160-201.

Foyer, C. H., Kyndt, T. and Hancock, R. D. (2020) Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives and outstanding issues. *Antioxidants and Redox Signaling* 32: 463-485.

- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids & chlorophylls *a* & *b* of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Kalaji, H. M., Bosa, K., Kościelniak, J. and Żuk-Gołaszewska, K. (2011) Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany* 73: 64-72.
- Magaña U. R., Escudero, A. and Gavilán, R. G. (2019) Metabolic & physiological responses of Mediterranean high-mountain & alpine plants to combined abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* 165(2): 403-412.
- 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.
- Murchie, E. H. and Niyogi, K. K. (2011) Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. *Plant Physiology* 155(1): 86-92.
- Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F. and Berruyer, R. (2013) High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9: 17-28.
- Sarikurkcü, C., Tepe, B. and Yamac, M. (2008) Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir- Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresource Technology* 99: 6651-6655.
- Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovics, B. (1974) Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 166: 387-392.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A. (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis* (Eds. Papageorgiou, G. C. and Govindjee, K.) 321-362. Springer, Dordrecht.
- Takahashi, S. and Badger, M. R. (2011) Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* 16: 1-10.
- Takahashi, S. (2010) The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiology* 153: 988-993.
- Takahashi, D., Kawamura, Y., Uemura, M. (2016) Cold acclimation is accompanied by complex responses of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 67: 5203-5215.
- Telfer, A. (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection & the protective role of *b*-Carotene. *Plant Cell Physiology* 55(7): 1216-1223.
- Tholen, D. (2008) The chloroplast avoidance response decreases internal conductance to CO₂ diffusion in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environment* 31: 1688-1700.
- Tesfay, S.Z., Bertling, I., Bower, J.P. (2011) Effects of postharvest potassium silicate application on phenolics & other antioxidant systems aligned to avocado fruit quality. *Postharvest Biology & Technology* 60: 92-99.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress & some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants-protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Van Heerden, P.D.R., Swanepoel, J.W., Krüger, G.H.J. (2007) Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C₃-mode CO₂

assimilation. Environmental & Experimental Botany 61(2): 124-136.

Xu, H.G., Liu, G.J., Liu, G.T., Yan, B.F., Duan, W. & Wang L.J. (2014) Comparison of investigation methods of heat injury in grapevine (*Vitis*) & assessment to heat tolerance in different cultivars & species. BMC Plant Biology 14: 156.

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