

## ارزیابی نقش تبدلی رادیکال‌های اکسیژن بر بیان برخی ژن‌های پاد اکسیدان در گندم

### Evaluation of oxygen radicals exchange effect on expression of some anti-oxidant genes in wheat

پیرایه فائز<sup>۱</sup>، سعید نواب‌پور<sup>۲\*</sup>، علی اصغری<sup>۳</sup>، سیده ساناز رمضان‌پور<sup>۴</sup>

۱-۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشگاه محقق اردبیلی

۲-۴- استادیار و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Faez P<sup>1</sup>, Navabpour S<sup>2\*</sup>, Asghari A<sup>3</sup>, Ramezanzpour S<sup>4</sup>

1,3. MSc Student and Assistant Professor, Ardebili University

2,4. Assistant Professor and Associate Professor Gorgan Agriculture Science and Natural Resource University

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۲۷)

#### چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر تنش اکسیداتیو نیترات نقره و نقش پیش تیمار اسید اسکوربیک بر الگوی بیان ژن‌های پاد اکسیدان کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در گندم آزمایشی در سال ۱۳۸۸ در محل گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار صورت پذیرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سه میزان نیترات نقره (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار) دو مقدار اسید اسکوربیک (صفر و ۲۰ میلی مولار) و دو رقم گندم فلات و تجن به ترتیب حساس و نسبتاً مقاوم به تنش اکسیداتیو بود. اعمال تیمارها با محلول پاشی بر روی برگ در زمان ظهور سنبله صورت گرفت. تیمار شاهد محلول پاشی آب بود و در مورد تیمارهای ترکیبی اسید اسکوربیک یک ساعت قبل از نیترات نقره محلول پاشی گردید. نمونه برداری برگ در زمان‌های ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی صورت پذیرفت. میزان کلروفیل (a و b) و شاخص سطح اکسیداسیون سلولی در زمان ۴۸ ساعت پس از نمونه برداری اندازه‌گیری گردید. میزان رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن و میزان نسبی بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز با استفاده از تکنیک اندازه‌گیری در زمان واقعی (Real time PCR) در زمان‌های ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارها انجام شد. با اعمال تیمار نیترات نقره مقادیر کلروفیل a و b به ویژه در رقم فلات کاهش محسوسی نسبت به شاهد نشان داد. اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک یک ساعت قبل از محلول پاشی نیترات نقره (تیمار ترکیبی) موجب افزایش نسبی میزان کلروفیل در مقایسه تیمار نیترات نقره شد. این موضوع با توجه به نقش پاد اکسیدانی اسید اسکوربیک مورد انتظار بود. در مقابل شاخص اکسیداسیون سلولی TBARM در تیمارهای نیترات نقره افزایش معنی دار و در تیمارهای ترکیبی به طور نسبی تعدیل شد. این مسئله تا حد زیادی در مورد مقادیر رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در تیمارهای مزبور ملاحظه شد. بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در تمام تیمارهای آزمایشی و به ویژه در رقم تجن برتری قابل توجهی نسبت به ژن کاتالاز نشان داد.

#### واژه‌های کلیدی

پراکسید هیدروژن،  
ژن‌های پاد اکسیدان،  
سطح اکسیداسیونی سلولی،  
واسطه‌های فعال اکسیژن،  
یون سوپراکسید

## مقدمه

را به عنوان یک واکنش دفاعی نسبت به شرایط تنش تنظیم می‌کند (Neill et al. 2001). نقطه مشترک اغلب تنش‌های محیطی افزایش میزان عوامل اکسیژن واکنش گر است. فلزات سنگین و از آن جمله نقره نیز موجب فزونی غلظت این عوامل می‌شود (Navabpour et al. 2003). با توجه به اهمیت میزان تعادل رادیکال‌های اکسیژن واکنش گر سلول‌های گیاهی واجد سیستم‌های دفاعی فعال در مهار افزایش غلظت این رادیکال‌ها هستند. به طور کلی سازو کارهای شناخته شده در این ارتباط شامل سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز به ترتیب با نقش کنترلی میزان پراکسید هیدروژن و یون سوپراکسید از مهم‌ترین عوامل آنزیمی به شمار می‌روند (Guan et al. 2000; Mittler 2002). با توجه به همبستگی بالای سطح پراکسیداسیون چربی‌ها با میزان تنش اکسیداتیو ناشی از تأثیر فزاینده عوامل اکسیژن واکنش گر، اندازه‌گیری میزان سطح اکسیداسیون سلولی به عنوان شاخصی مناسب از روند اکسیداتیو سلولی به شمار می‌رود. در این راستا سنجش تیوباریوتریک که محصول نهایی و نسبتاً پایدار مالون دی‌آلدئید را در سطح سلول تعیین می‌نماید واجد کارایی بالایی است (Lievens et al. 2001). با توجه به مطالب فوق‌الذکر این مطالعه به منظور دستیابی به اهداف زیر صورت پذیرفت.

- ۱- ارزیابی سطوح واسطه‌های اکسیژنی پراکسید هیدروژن و یون سوپراکسید در شرایط تیماری اکسیدان و پاد اکسیدان
- ۲- بررسی روند تغییرات بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تیماری مزبور
- ۳- بررسی سطح کلی اکسیداسیون سلولی و میزان کلروفیل در ارتباط با تغییر بیان ژن‌ها در شرایط تیمارهای آزمایشی

## مواد و روش‌ها

طرح آماری و شرایط آزمایش این پژوهش در سال ۱۳۸۸ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی با ۴ تکرار انجام

گندم<sup>۱</sup> مهم‌ترین محصول زراعی دنیا است. در عرصه جهانی این گیاه با داشتن حدود ۱۶ درصد از سطح زمین‌های زراعی و با وجود مواد و عناصر با ارزش حدود ۲۰ درصد از انرژی غذایی مردم دنیا را فراهم آورده است (FAO 2005). مولکول اکسیژن در اغلب واکنش‌های حیاتی و فعالیت‌های متابولیک سلولی نقش ارزنده‌ای ایفا می‌کند. با این حال احیای ناقص این مولکول منجر به تولید واسطه‌های اکسیژن واکنش گر<sup>۲</sup> می‌شود. این واسطه‌ها به ویژه در غلظت‌های بالا، سبب اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی سلول نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها می‌شوند (Golden et al. 2002). اما غلظت‌های متعادل واسطه‌های اکسیژن در القای سازگاری نسبی گیاه در ایجاد تحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده حائز اهمیت هستند. این واسطه‌ها همچنین به عنوان مولکول‌های انتقال پیام<sup>۳</sup> در فرآیند تنظیم بیان ژن‌های القایی ایفای نقش می‌کنند (Larkindale 2005). واکنش‌های شدید فتوستتزی در خلال فرآیند انتقال الکترون در کلروپلاست از جمله مهم‌ترین منابع تولید واسطه‌های اکسیژن محسوب می‌شوند. هر چند تعداد و تنوع این واسطه‌ها بسیار زیاد است و عموماً طول عمر کوتاهی در حد اعشار ثانیه دارند، ولی توزیع و میزان متعادل آن‌ها نقش مهمی در تنظیم فعالیت‌های مهم سلول دارد (Pitzschke et al. 2006). از آن جمله پراکسید هیدروژن و یون سوپراکسید در تشکیل دیواره لیگنینی یاخته‌های گیاهی نقش موثری دارند (Lewise and Yamato 1990). رادیکال‌های مزبور در مسیر تولید هورمون‌های اتیلن، اسید جاسمونیک و اسید سالسیلیک نقش مهمی دارند (Mackerness 2002). اهمیت یون سوپراکسید در القای فعالیت‌های ژن‌های دفاعی نظیر *PR1* و *PR5* ثابت شده است (Mackerness et al. 2001). از طرفی یون سوپراکسید به عنوان یک مولکول پیام ثانویه با کنترل میزان تولید پراکسید هیدروژن تنظیم بیان ژن‌های دفاعی و فتوستتزی را تعدیل می‌کند. در این ارتباط پراکسید هیدروژن با افزایش فعالیت مسیر متابولیکی آنزیم کیناز الگوی زمان بندی باز و بسته شدن روزنه‌ها

<sup>1</sup> *Triticum aestivum*<sup>2</sup> Active oxygen species (AOS)<sup>3</sup> Signaling Molecules

اسیدتری کلرواستیک (w/v15%) به آن اضافه شد. محلول حاضر پس از افزودن ۱۰ میلی لیتر استون به شدت مخلوط شد و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب کوچک حاصل از سانتریفیوژ با ۵ میلی لیتر استون شستشو شد، پس از ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی-لیتر اسید فسفریک (w/v1%) و یک میلی لیتر اسید تیوباربیوریتیک (w/v0.6%) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد و مقدار جذب محلول حاصل را با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (Uvikon - Kontron) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن میزان یون سوپر اکسید ( $O_2^-$ ) با استفاده از روش (Elstner and Heupel 1976) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. یک گرم نمونه برگ منجمد به طور یکنواخت کوبیده و مقدار ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵ mM (pH=7.8) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر از محلول فوق برداشت و به همراه ۰/۹ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵ mM، ۰/۱ میلی لیتر هیدرو کلراید هیدوکسیل آمین ۱۰ mM در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن مقدار معادل حجم محلول اتیل اتر اضافه شد و با دور ۱۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانو متر توسط دستگاه جذب نوری (Uvikon - Kontron) خوانده شد. با استفاده از منحنی نرمال استاندارد، مقدار یون سوپر اکسید بر حسب واحد تنظیم شد. میزان رادیکال پراکسید هیدروژن با کمک روش (Brennan and Frenkel 1977) و با استفاده از کمپلکس پراکسید تیتانیوم انجام شد. میزان جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت و به وسیله منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) تصحیح و نتایج بر حسب واحد تنظیم شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و ارزیابی بیان ژن‌ها حدود سه گرم نمونه برگ در مورد تیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها برداشت شد و در نیتروژن مایع

شد. فاکتورهای آزمایشی شامل سه غلظت نیترات نقره صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار به عنوان عامل تنش اکسیدتیو، دو غلظت اسید اسکوربیک شامل صفر و ۲۰ میلی مولار به عنوان عامل پاد اکسیدان و دو رقم گندم شامل رقم فلات و تجن به ترتیب نسبتاً حساس و متحمل به شرایط تنش اکسیداتیو بودند. کشت در گلدان‌های با گنجایش هفت کیلو گرم خاک انجام شد. در هر گلدان تعداد ۳۰ بذر کشت و پس از رشد اولیه و استقرار کامل به ده بوته تنک شد. کلیه مراقبت‌های لازم در خلال رشد انجام شد. تیمارهای نیترات نقره و اسید اسکوربیک به صورت محلول پاشی بر روی برگ در زمان ظهور سنبله اعمال شد. در مورد تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک و نیترات نقره، محلول پاشی اسید اسکوربیک یک ساعت قبل از محلول پاشی نیترات نقره انجام شد. نمونه برداری تصادفی در کلیه تکرارها از ده بوته انجام شد. اندازه‌گیری میزان کلروفیل و TBARM در زمان ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی و در مورد رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن و فعالیت ژن‌ها در زمان‌های ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی صورت گرفت.

#### استخراج کلروفیل

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل از روش (Porra et al. 1989) استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ (به صورت منجمد) را کاملاً خرد و با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط می‌کنیم. پس از سانتریفیوژ میزان جذب (A) در طول موج‌های ۶۴۶/۶، ۶۶۳/۶ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (Uvikon - Kontron) ثبت شد. میزان کلروفیل a (chl a) و کلروفیل b (chl b) بر اساس روابط زیر محاسبه شد:

$$\text{chl a (mg ml}^{-1}\text{)} = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6}$$

$$\text{chl b (mg ml}^{-1}\text{)} = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6}$$

#### سنجش تیوباربیوریک<sup>۱</sup> TBARM

در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون دی آلدید، محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ، اندازه‌گیری شد. در این خصوص از روش (Hagege et al. 1990) با تغییراتی استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی لیتر

<sup>1</sup> Measurement of Thiobarbituric Acid Reactive Material

شد. در بیان فعالیت ژن‌های مورد مطالعه از روش ارزیابی نسبی استفاده شد. در این روش میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در هر تیمار نسبت به تیمار کنترل به صورت نسبت بیان می‌شود که در این حالت امکان اندازه‌گیری میزان بیان ژن در تیمار کنترل وجود ندارد و به عبارتی یک در نظر گرفته می‌شود. بنابراین بیان نسبی ژن‌ها با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد. به این صورت که هر تیمار با گیاهان کنترل مربوط به زمان خود مقایسه شد. جهت تجزیه‌ی داده‌ها از نرم افزار REST<sup>2</sup> استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### میزان کلروفیل

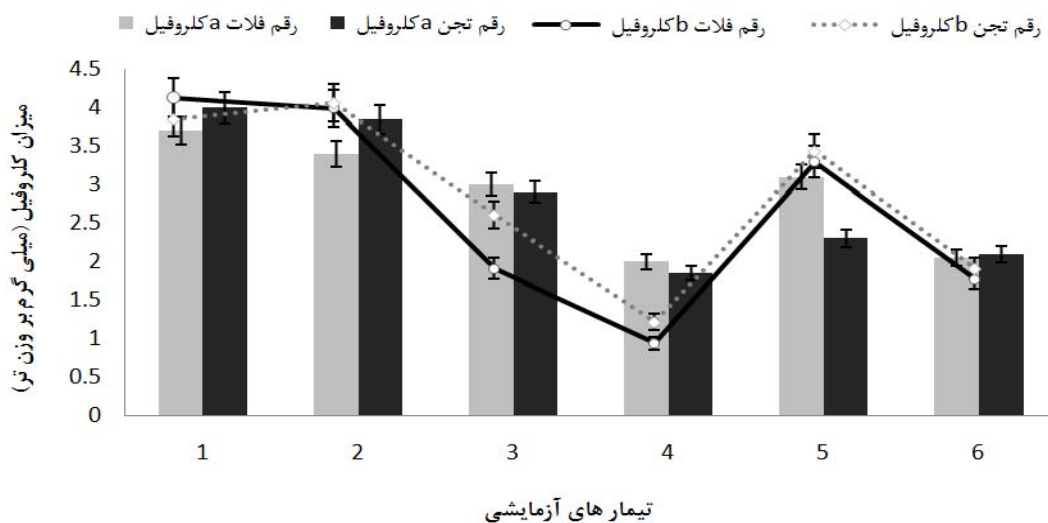
روند تغییرات میزان کلروفیل تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است. با اعمال تیمار نیترا نقره میزان کلروفیل کاهش محسوسی نسبت به شاهد نشان داد. این مسئله می‌تواند به دلیل افزایش سطح واسطه‌های اکسیژن واکنش گر حادث شود (Navabpour et al. 2003). افزایش نسبی میزان کلروفیل در تیمارهای ترکیبی (محلول پاشی اسید اسکوربیک قبل از نیترا نقره) مویید این مسئله می‌باشد. به نظر می‌رسد کلروفیل b واکنش افزایشی بیشتری نسبت به اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک را در مقایسه با کلروفیل a در هر دو تیمار ۵ و ۶ به ترتیب در مقایسه با تیمارهای ۳ و ۴ را نشان داده اند. با توجه به نقش برجسته تر کلروفیل b در واکنش به شرایط تنش که همبستگی بالایی را نیز تنظیم الگوی باز و بسته شدن روزنه ها را دارد، این موضوع توجیح‌پذیر می نماید (Nagy et al. 1996). البته نقش برخی ژن‌های مرتبط با فرآیند تبدیلی کلروفیل a و b را به یکدیگر به ویژه در شرایط تنش را نبایستی از نظر دور داشت. برای مثال ژن Lhc2<sup>3</sup> واجد نقش مهمی در تبدیل کلروفیل‌های a و b و ایجاد تعادل نسبی بین آن‌ها به منظور احراز پایداری بیشتر در تداوم فعالیت فتوسیستم I و II را به ویژه در شرایط تنش داراست (Tambussi et al. 2002). اسید اسکوربیک به طور طبیعی در اندامک‌های سلولی به وفور وجود دارد و در فعالیت‌های متابولیکی گیاه نظیر فتوستنز به عنوان کوفاکتور

منجمد و تا مرحله استخراج RNA به فریزر ۸۰- منتقل شد. استخراج RNA توسط کیت Rnx-plus از نمونه‌های برگ منجمد، صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S در روی ژل نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. برای بررسی کمی میزان استخراج، از اسپکتروفتومتر استفاده شد. مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و درصد خلوص آن محاسبه شد. نسبت بدست آمده برای طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در این آزمایش در محدوده ۱/۸ تا ۲ (میکروگرم در میکرولیتر) بود که نشان‌دهنده خلوص قابل قبول RNA بود. برای ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمتناز استفاده شد. بدین منظور رشته اول cDNA با ترکیب ۵ میکرولیتر از RNA تیمار شده با آنزیم DNase همراه با ۰/۵ میکروگرم آغازگر الیگودی تی انجام شد. حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن به سرعت روی یخ، سرد گردید. چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی-نوکلئوتری فسفات<sup>۱</sup> با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد RNase (u) inhibitor به هر تیوب افزوده شد، حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم Revert Aid M-Mulv به محلول فوق اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیر فعال نمودن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای تایید سنتز cDNA از روش RT-PCR و الکتروفورز روی ژل دو درصد آگارز استفاده شد. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌ها از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) استفاده شد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت قادر است مقدار محصول واکنش پلیمرز را در زمان واقعی نشان دهد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد استفاده

<sup>2</sup> Relative Expression Software Tool

<sup>3</sup> Light harvesting complex II (Lhc2)

<sup>1</sup> Deoxynucleothriphosphate

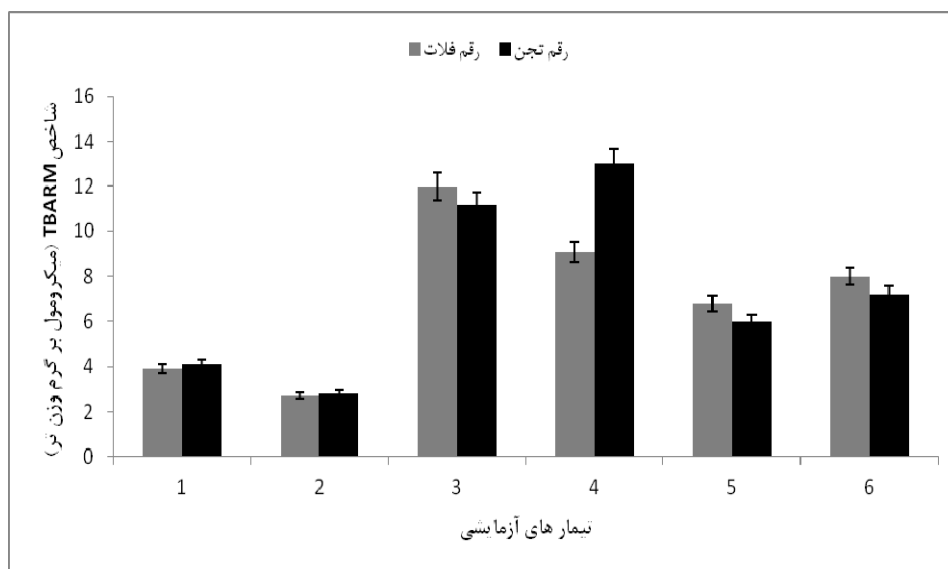


شکل ۱- تغییرات میزان کلروفیل a و b در ارقام فلات و تجن ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، تیمارها شامل محلول پاشی: (۱) آب (شاهد) (۲) اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) (۳) نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۴) نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار) (۵) تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۶) تیمار ترکیبی اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار). مقدار خطای معیار (n=۴) برای هر میانگین به طور جداگانه نشان داده شده است.

نشان داد. این موضوع در تحقیقات مشابه با اعمال تنش شوری گزارش شده است (Munns and Termaat 1986).

تغییرات سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM) از منظر مولکولی نقطه اشتراک اغلب تنش‌های زنده و غیر زنده افزایش میزان واسطه‌های اکسیژن واکنش گر است. با توجه به تعداد زیاد این واسطه‌ها و روند سریع تبدیل آن‌ها به یکدیگر، ارزیابی جامع سطح اکسیداسیون سلولی ناشی از تأثیر این رادیکال‌ها واجد اهمیت زیادی است. در این ارتباط استفاده از سنجش TBARM ضمن سهولت نسبی، دقت قابل توجهی داشته و در برخی مطالعات مد نظر قرار گرفته است (Page et al. 2001) و در این سنجش میزان اسید تیوباربتوریک که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ (چربی‌ها) است اندازه گیری می‌شود (Hagege et al. 1990). نتایج تغییرات میزان شاخص مزبور تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی در شکل ۲ نشان داده شده است. محلول پاشی اسید اسکوربیک منجر به کاهش مختصر میزان شاخص اکسیداسیون نسبت به شاهد شد. این مسئله در رقم نسبتاً متحمل تجن بیشتر بود. محلول پاشی نیترات نقره منجر به افزایش معنی دار سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن شد. این

فعالیت آنزیم‌ها و فرآیند ساخت هورمون‌های اتیلن و جیبرلین دخالت دارد (Smirnov and Wheeler 2000). از طرفی به عنوان یک ماده پاد اکسیدان عمومی ظرفیت بالایی در کنترل سطح رادیکال‌های واکنش گر را داراست (Sturgeon et al. 1998). بر این اساس افزایش نسبی میزان کلروفیل در تیمارهای ترکیبی دور از انتظار نیست. از دلایل دیگر افت میزان کلروفیل ناشی از اعمال تیمار نیترات نقره، سمیت فلزات سنگین است که منجر به اختلال در فرآیند بیوسنتز کلروفیل و کاهش فعالیت آنزیم ۵ آمینو لئوئیک می‌شود (Manio et al. 2003). موضوع دیگر جانشینی نقره به جای منیزیم است که اجازه پیوند کمپلکس پروتئینی کلروفیل را با لیگاند های مهم نداده و نتیجه امر تغییر شکل فضایی و افت میزان کلروفیل خواهد بود (Rout and Das 2003). به طور کلی در شرایط تنش ثبات کلروفیل به عنوان یکی از شاخص‌های تحمل محسوب می‌شود. شاخص پایداری بالا مبین عدم تأثیر یا تأثیر کم تنش بر گیاه است که در نهایت به استفاده بهینه گیاه از کلروفیل و افزایش راندمان فتوسنتز می‌شود (Munns and Termaat 1986). نتیجه این مطالعه نشان داد که رقم تجن با تحمل نسبی بیشتر در مقایسه با رقم حساس فلات عموماً و به ویژه تحت تنش اکسیداتیو نیترات نقره برتری محسوس از نظر میزان کلروفیل

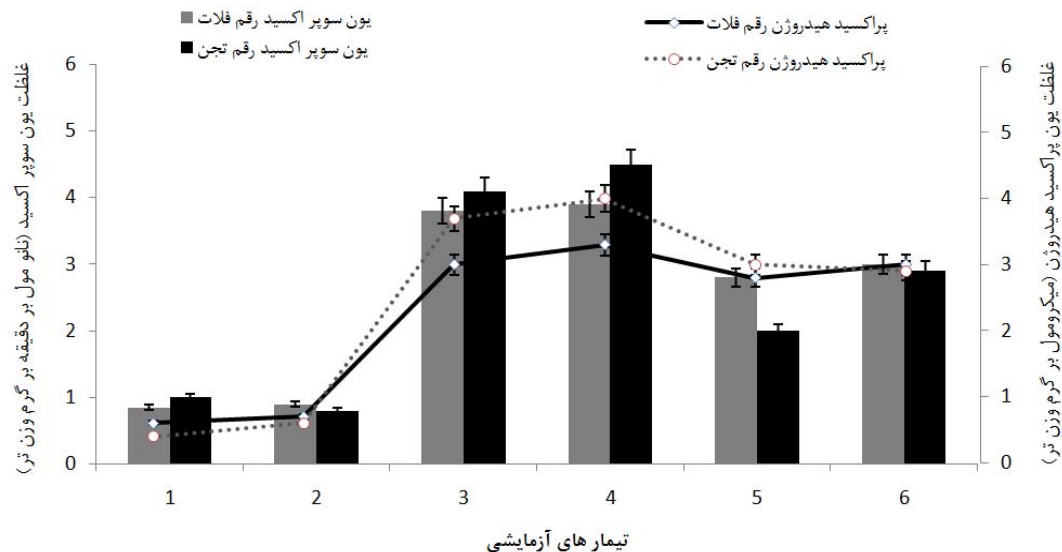


شکل ۲- تغییرات میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در ارقام فلات و تجن ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، تیمارها شامل محلول پاشی: ۱) آب (شاهد) ۲) اسید اسکوربیک ۲۰ میلی مولار (۳) نیترات نقره ۰/۷۵ میلی مولار (۴) نیترات نقره ۱/۵ میلی مولار (۵) تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۶) تیمار ترکیبی اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار). مقدار خطای معیار (n=۴) برای هر میانگین به طور جداگانه نشان داده شده است.

گیری میزان رادیکال‌های مذکور در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. در زمان ۱۰ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی اختلاف چندانی برای مقادیر رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تحت تأثیر تیمار شاهد (محلول پاشی آب) و تیمار اسید اسکوربیک ملاحظه نشد (شکل ۳). در حالیکه با اعمال تیمار اسید اسکوربیک در مقایسه با شاهد در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال محلول پاشی اختلاف چشمگیری در کاهش رادیکال‌های مزبور حاصل شد (شکل ۴). این موضوع با توجه به نقش اسید اسکوربیک در تعدیل میزان واسطه‌های اکسیژن فعال دور از انتظار به نظر نمی‌رسد. نتایج برخی مطالعات دیگر نیز موید چنین نتیجه‌ای است (Navabpour et al. 1998; Sturgeon et al. 2003). میزان رادیکال‌های مزبور با اعمال تیمار نیترات نقره به طور چشمگیری افزایش یافت، با این حال تفاوت زیادی بین تأثیر غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار در زمان ۱۰ ساعت پس از نمونه برداری ملاحظه نشد (اشکال ۳ و ۴) در حالیکه در زمان ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی نیترات نقره تفاوت بیشتری بین سطوح رادیکال‌های تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار نیترات نقره حاصل شد. به نظر می‌رسد تجمع میزان این

موضوع با توجه به نقش اکسیداتیو نیترات نقره قابل انتظار بود (Navabpour et al. 2003). بر خلاف انتظار میزان شاخص اکسیداتیو در رقم فلات تحت تأثیر محلول پاشی غلظت بالاتر نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار) در مقایسه با غلظت کمتر (۰/۷۵ میلی مولار) بود. این مسئله با توجه حساسیت نسبی رقم فلات می‌تواند به دلیل فراوانی بیشتر مرگ سلولی ناشی از اثر شدیداً مخرب غلظت ۱/۵ میلی مولار باشد. کاهش چشمگیر در میزان سطح اکسیداتیو سلولی در تیمارهای ترکیبی ملاحظه شد، راندمان این کاهش برای رقم تجن بیشتر بود. این موضوع با توجه به تحمل نسبی رقم تجن به شرایط تنش اکسیداتیو منطقی به نظر می‌رسد. همبستگی منفی و معنی داری ( $r = -0/67$ ) بین مقادیر شاخص TBARM و میزان کلروفیل تحت شرایط تیمارهای آزمایشی حاصل شد.

با توجه به اهمیت نسبی دو رادیکال یون سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن از نظر فراوانی، پایداری نسبی، ظرفیت تبدلی و نقش آن‌ها در فرآیندهای سلولی (Mackerness 2000; Larkindale 2006; Pitzschke et al. 2005) به اندازه گیری سطح این رادیکال‌ها در شرایط تیمارهای آزمایشی اقدام شد. نتایج اندازه



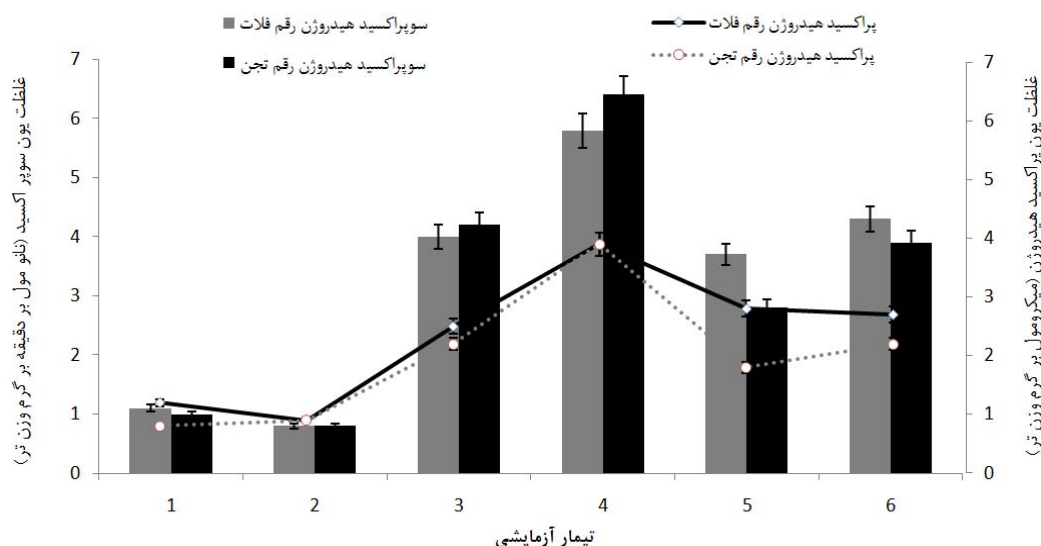
شکل ۳- تغییرات میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن ۱۰ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی شامل محلول پاشی: (۱) آب (شاهد) (۲) اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار (۳) نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار (۴) نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار (۵) تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۶) تیمار ترکیبی اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار). مقدار خطای معیار ( $n=4$ ) برای هر میانگین به طور جداگانه نشان داده شده است.

بیشتر بود. این مسئله ناشی از اثر متقابل تیمار ترکیبی (اسید اسکوربیک + نیترات نقره) بر ارقام مورد مطالعه است. در بروز این اثر متقابل عکس العمل رقم تجن نسبت به تیمار ترکیبی در جهت کاهش رادیکال‌های مورد اندازه گیری نقش مهم‌تری داشته است.

#### تغییرات بیان ژن‌ها

واکنش سلول‌های گیاهی و تغییرات فرآیندهای متابولیک در گرو الگوی بیان ژن‌هاست. تغییرات بیان نسبی ژن‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز طی زمان‌های نمونه برداری ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی در اشکال ۵ و ۶ نشان داده شده است. در هر دو زمان نمونه برداری در اغلب موارد بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز برتری قابل توجهی نسبت به ژن کاتالاز داشت. ژن سوپر اکسید دیسموتاز رمز کننده گروه پروتئین‌های متالو آنزیم است. محصول آنزیمی این ژن توانایی پاکسازی یون سوپر اکسید را داراست. از آنجا که تولید رادیکال سوپر اکسید در حلقه‌های اولیه زنجیره تولید واسطه‌های اکسیژن فعال قرار دارد. برتری میزان فعالیت این ژن نسبت به کاتالاز توجیه پذیر است

رادیکال‌ها در فاصله زمانی بین نمونه برداری منجر به این امر شده است. این مسئله در برخی تحقیقات انجام شده با سایر تیمارهای القای تنش اکسیداتیو گزارش شده است (Clijsters et al. 1999; Choi et al. 2007). اگر چه اطلاعات محدودی در خصوص مکانیزم دقیق تأثیر یون نقره در ارتباط با افزایش واسطه‌های اکسیژن و در پی آن بروز تنش اکسیداتیو وجود دارد (Epple et al. 1995) با این حال شواهد تحقیقاتی نشان می‌دهد جایگزینی نقره به جای عناصر فلزی واجد نقش محوری در فرآیندهای مهم متابولیکی نظیر فتوسنتز و چرخه‌های تنفسی موجب بر هم خوردن تعادل اکسیداسیون و احیاء شد که ما حاصل آن افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن است (Manning et al. 2009; Qi-lin et al. 2009). محلول پاشی اسید اسکوربیک قبل از نیترات نقره کاهش نسبی معنی داری را در میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن ایجاد کرد. الگوی این روند کاهشی طی زمان‌های نمونه برداری ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی شباهت قابل توجهی داشت. در عین حال تأثیر اسید اسکوربیک در کاهش میزان رادیکال‌های مزبور در رقم تجن



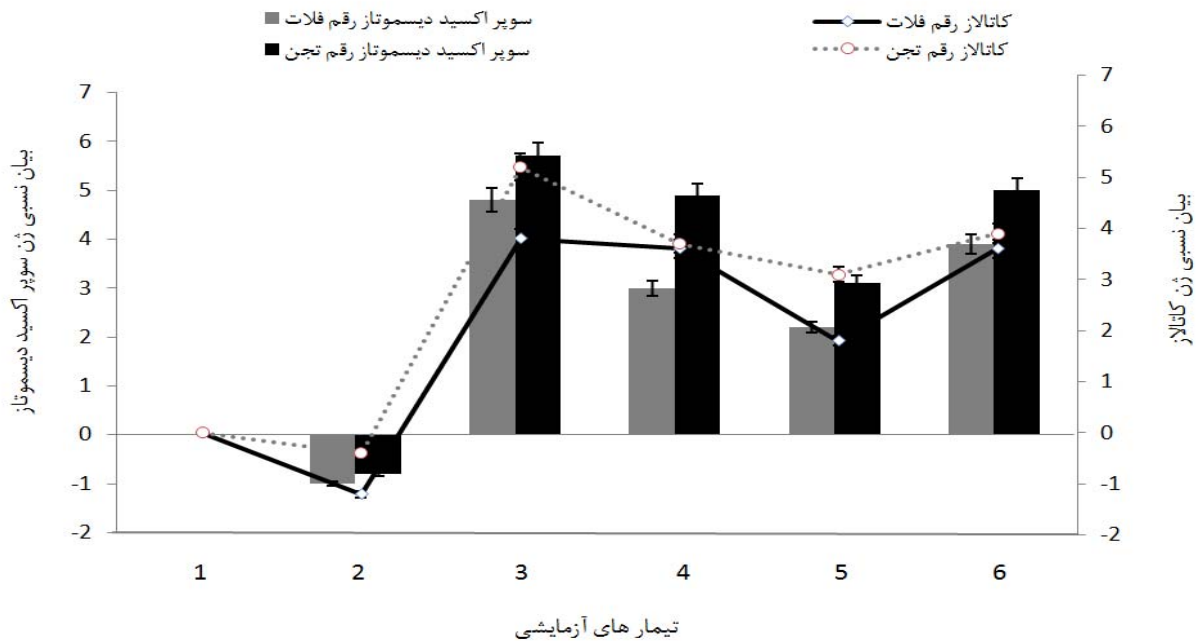
شکل ۴- تغییرات میزان رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی شامل محلول پاشی: ۱) آب (شاهد) ۲) اسید اسکوربیک ۲۰ میلی مولار ۳) نیترات نقره ۰/۷۵ میلی مولار ۴) نیترات نقره ۱/۵ میلی مولار ۵) تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) ۶) تیمار ترکیبی اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار). مقدار خطای معیار (n=۴) برای هر میانگین به طور جداگانه نشان داده شده است.

حادث شود. توجه به میزان شاخص اکسیداسیون سلولی TBARM موید این نتیجه است. محققین دیگر نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده اند (Navabpour et al. 2001; Mackerness et al. 2003). محلول پاشی اسید اسکوربیک به تنهایی در مقایسه با شاهد (محلول پاشی آب) موجب کاهش جزئی در میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه شد. این را چطور توجیه می‌نمایید؟ در حالیکه اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک قبل از نیترات نقره بسته به میزان غلظت نیترات نقره عکس العمل متفاوتی در سطح فعالیت ژن‌های مورد مطالعه ایجاد نمود به طوری که در تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک و نیترات نقره ۰/۷۵ میلی مولار کاهش چشمگیری در میزان بیان هر دو ژن نسبت به تیمار نیترات نقره ۰/۷۵ میلی مولار ملاحظه شد. در حالیکه سطح فعالیت هر دو ژن در هر دو زمان نمونه برداری در تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک و نیترات نقره ۱/۵ میلی مولار افزایش قابل توجهی نسبت به محلول پاشی نیترات نقره ۱/۵ میلی مولار نشان داد. چنین به نظر می‌رسد که غلظت ۰/۷۵ میلی مولار نیترات نقره با تولید رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در سطحی متعادل موجب

(Bowler et al. 1994). محلول پاشی نیترات نقره در غلظت ۰/۷۵ میلی مولار در هر دو زمان نمونه برداری تقریباً به یک میزان افزایش میزان بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز را به همراه داشت. در عین حال رقم تجن در هر دو مرحله سطح بیشتری از فعالیت این ژن را نشان داد. این روند با سطح تولید یون سوپراکسید (اشکال ۳ و ۴) هم خوانی داشت. به نظر می‌رسد واکنش آغازگر ژن مزبور نسبت به محرک نیترات نقره در غلظت ملایم تابع یک روند خطی است (اشکال ۵ و ۶). این موضوع علیرغم سمیت یون نقره و ماهیت خسارت زای رادیکال سوپراکسید به دلیل سازگاری سیستم پاد اکسیدان آنزیمی به عنوان یک واکنش دفاعی گیاه رخ می‌دهد. نتایج برخی مطالعات انجام شده نیز نشان می‌دهد اعمال تیمارهای تنش زا در سطوح پایین با فعال نمودن مکانیزم مقاومت سیستمیک<sup>۱</sup> موجب بروز مقاومت نسبی می‌گردد (Van et al. 1998). اعمال تیمار نیترات نقره ۱/۵ میلی مولار سبب افت نسبی میزان ژن‌های مورد مطالعه در رقم حساس فلات شد. این امر می‌تواند به دلیل خسارت سلولی ناشی از شدت تنش اکسیداتیو و احتمالاً به دلیل بروز اختلالات شدید در فرآیندهای مهم سلولی

<sup>1</sup> Systemic Acquired Resistant (SAR)





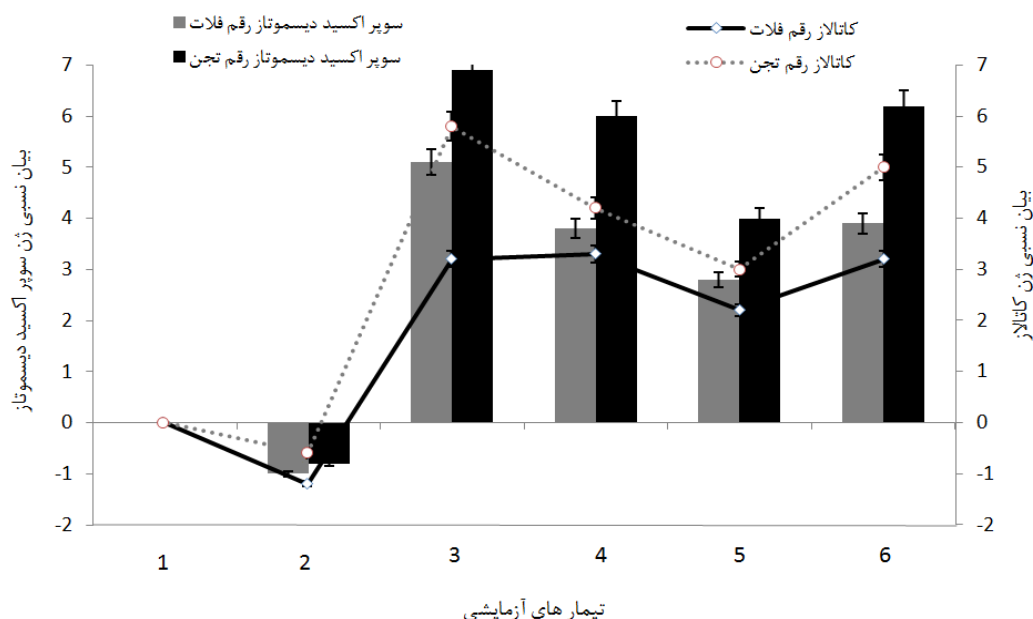
شکل ۵- تغییرات بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ۱۰ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی شامل محلول پاشی: (۱) آب (شاهد) (۲) اسید اسکوربیک ۲۰ میلی مولار (۳) نیترات نقره ۰/۷۵ میلی مولار (۴) نیترات نقره ۱/۵ میلی مولار (۵) تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۶) تیمار ترکیبی اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار). مقدار خطای معیار ( $n=4$ ) برای هر میانگین به طور جداگانه نشان داده شده است.

کننده آنزیم پاد اکسیدان کاتالاز است که نقش آن تعدیل رادیکال پراکسید هیدروژن و تنظیم غلظت آن است. اگر چه غلظت بالای پراکسید هیدروژن منجر به تنش اکسیداتیو و خسارت سلولی می‌شود ولی بر اساس نتایج برخی مطالعات تأثیر غلظت‌های متعادل آن به عنوان یک فاکتور انتقال پیام در بیان ژن‌های القایی نظیر کاتالاز گزارش شده است (Navabpour et al. 2005; Larkindale 2003).

#### نتیجه گیری

نقطه اشتراک اغلب تنش‌های محیطی تجمع واسطه‌های اکسیژن واکنش‌گر می‌باشد. اگرچه این واسطه‌ها در غلظت‌های بالا مخرب بوده و موجب آسیب سلولی و اختلال در فرآیندهای مهم آن می‌شدند، ولی در غلظت‌های متعادل واجد نقش مهم و مفید بوده و به عنوان مولکول‌های انتقال پیام و یا محرک سیستم القای مقاومت سازگار عمل می‌نمایند. بر این اساس انجام تحقیقات در شرایط تیماری کنترل شده که در سطح مولکولی و سلولی وضعیت تقریباً مشابه با تنش‌های زنده و غیر زنده محیطی را القاء

تحریک آغازگر ژن‌های مزبور شده است. آیا این تحریک سبب افزایش بیان در همین سطح تیمار باید بشود نکته قابل توجه این است سطح آنتی‌اکسیدان‌ها هر دو بعد از اعمال اسید اسکوربیک سبب کاهش آن‌ها شده این مسئله چطور توجیه می‌شود؟ طبعاً با اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک سطح رادیکال‌های مزبور کاهش یافته و القای لازم در جهت بیان ژن‌های مربوطه را ایجاد ننموده است. تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک و نیترات نقره ۱/۵ میلی‌مولار با توجه به تولید فزاینده رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در سطح ۱/۵ میلی‌مولار نیترات نقره با اعمال پیش تیمار اسید اسکوربیک به حد متعادل رسیده و افزایش سطح فعالیت ژن‌ها توجیه پذیر به نظر می‌رسد. نتایج سایر تحقیقات نیز موید این مسئله می‌باشد (Bolwell 1999; Mackerness et al. 2001). به طور کلی میزان فعالیت ژن سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تیمارهای آزمایشی نسبت به ژن کاتالاز بیشتر بود. این موضوع با توجه به بیشتر بودن سطح نسبی یون سوپراکسید نسبت به پراکسید هیدروژن دروازا انتظار به نظر نمی‌رسد. ژن کاتالاز رمز



شکل ۶- تغییرات بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارهای آزمایشی شامل محلول پاشی: (۱) آب (شاهد) (۲) اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) (۳) نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۴) نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار) (۵) تیمار ترکیبی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۰/۷۵ میلی مولار) (۶) تیمار ترکیبی اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) + نیترات نقره (۱/۵ میلی مولار). مقدار خطای معیار (n=۴) برای هر میانگین به طور جداگانه نشان داده شده است.

احراز می‌شود. ارزیابی دقیق‌تر سطوح دو رادیکال فعال اکسیژنی مهم سوپراکسید و پراکسید هیدروژن عموماً منجر به یافتن نتایج مشابه به وضعیت TBARM در واکنش به تیمارهای آزمایشی شد. با توجه به اهمیت این دو رادیکال به لحاظ پایداری نسبی، ظرفیت تبدلی و نقش آن‌ها در فرآیندهای مهم سلولی مقادیر آن‌ها در دو زمان ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارها اندازه‌گیری شد. در این راستا و با توجه به تاثیر پذیری مستقیم بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز از رادیکال‌های مزبور، سطح فعالیت این ژن‌ها نیز در دو زمان ۱۰ و ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی تیمارها صورت پذیرفت. میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در تمامی تیمارهای آزمایشی در رقم تجن و با یک مورد استثنا در رقم فلات بیش از ژن کاتالاز بود. این مسئله با روند تغییرات سطوح مقادیر یون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن انطباق نسبی داشت.

می‌نمایند، حائز اهمیت زیادی است. در این تحقیق محلول پاشی سطوح نیترات نقره (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار) با فرض تیمار القای تنش اکسیداتیو موجب افت قابل توجه میزان کلروفیل به ویژه در غلظت ۱/۵ میلی مولار و خصوصاً در رقم فلات در مقایسه با شاهد (محلول پاشی آب) شد. محلول پاشی اسید اسکوربیک (۲۰ میلی مولار) به عنوان تیمار پاد اکسیداسیون تفاوت خاصی را در میزان کلروفیل در مقایسه با شاهد نشان نداد. محلول پاشی پیش تیمار اسید اسکوربیک یک ساعت قبل از نیترات نقره موجب افزایش نسبی سطح کلروفیل شد. اندازه‌گیری سطح اکسیداسیون سلولی بر اساس شاخص TBARM وضعیت متضادی نشان داد به طوریکه محلول پاشی سطوح نیترات نقره سبب افزایش قابل توجه این شاخص و اعمال تیمار ترکیبی موجب کاهش نسبی سطح اکسیداسیون سلولی در مقایسه با تیمار نیترات نقره شد. براساس این نتایج و با توجه به نقش شناخته اسید اسکوربیک به عنوان عامل پاد اکسیدان (پاک‌کننده عمومی واسطه‌های اکسیژن فعال)<sup>۱</sup> نقش القایی اکسیداتیو نیترات نقره

<sup>1</sup> General quenching of ROS

## منابع

- Bolwell GP (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin in Plant Biol* 2: 287-294.
- Bowler C, Vancamp W, Van Montagu M and Inze D (1994) Superoxide-dismutase in plants. *Critical Rev in Plant Sci* 13: 199-218.
- Brennan T, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant physiology* 59: 411-416.
- Choi HW, Kim YJ, Lee SC, Hong JK, Hwang BK (2007) Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology* 145: 890-904.
- Clijsters H, Cuypers A, Vangronsveld J (1999) Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Z Naturforsch* 54: 730-734.
- Elstner EF, Heupel A (1976) Inhibition of nitrite formation from hydroxyl ammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anall Biochemistry* 70: 616-620.
- Epple P, Apel K, Bohlmann H (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transformation pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109: 813-820.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2005 FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/>.
- Golden TA, Hinerfeld D, Melov S (2002) Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* pp: 117-123.
- Guan L, Zhao J, Scandalios JG (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal* 22: 87-95.
- Hagege D, Nouvelot A, Boucard J, Gaspar T (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochem Anal* 1: 86-89.
- Larkindale JD, Hall JR, Knight M, Vierling E (2005) heat stress phenotypes of arabidopsis mutants implicate multiples signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* 138: 882-897.
- Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin - occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
- Lievens S, Goormachtig S, Holsters M (2001) A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research* 29: 3459-3468.
- Mackerness SAH (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B : 280-320 nm) stress. What are the key regulators? *Plant Growth Reg* 32: 27-39.
- Mackerness SAH, John CF, Jordan B, Thomas B (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett* 489: 237-242.
- Manio T, Stentiford EI, Millner PA (2003) The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typhalatifolia* plants, growing in substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecological Engineering* 20: 65-7.
- Manning V, Chu A, Steeves J, Wolpert T, Ciuffetti L (2009) A host-Selective toxin of *pyrenophoratrifici-repentis*, *ptrToxA*, induces photosystem changes and reactive oxygen species accumulation in sensitive wheat. *American Phytopathological Society* 22: 665-676.
- Mittler R (2002) Oxidative stress , antioxidant and stress tolerance. *Ann Rev Plant Science* 7: 405-415.
- Munns R, Termaat A (1986) Whole plant responses to salinity. *Plant Physiol* 13: 143-160.
- Nagy F, Fejes E, Wehmeyer B, Dallman G, Schafer E (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6290-6294.
- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, Mackerness S, Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J Exp Bot* 54: 2285 -2292.
- Navabpour S, Bagherieh-Najjar MB, Soltanloo H (2007) Identification of novel genes expressed in *Brassica napus* during leaf senescence and in response to oxidative stress. *Plant production* 1: 35 -44.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst R, Hancock JT (2001) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 52: supp- 9.
- Page T, Griffiths G, Buchanan Wollaston V (2001) Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiology* 125: 718-727.
- Pitzschke A, Forzani C, HIRT H (2006) Reactive oxygen species signaling in Plants. *Antioxid Redox Signal* 8: 1757-1764.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedmann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochemistry Biophysics Acta* 975: 384-394.

Qi- lin D, Chen CH, Bin F, Ting ting L, Yuan ya G, Ying kun S, Jin W, Shi zhang D (2009) Effects of NACL treatment on the antioxidant enzymes of oilseed rape (*Brassica napus*) seedlings 8: 5400 -5405.

Rout GR, Das P (2003) Effect of metaltoxicity on plant growth and metabolism; *Zinc. Agronomy Journal* 23: 3-11.

Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Plant Sci* 19: 267-290.

Sturgeon BE, Sipe HJ, Barr DP, Corbett JT, Martinez JG, Mason RP (1998) The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the present of glutathione and ascorbate. *J BiolChem* 273: 30116-30121.

Tambussi LA, Casadesus J, Munne-Bosch S, Araus JL (2002) Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (*Triticum ttrigidum* var. durum): Changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments *Func Plant Biol* 29: 35-44.

Van Camp W, Van Montagu M, Inze D (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Sci* 3:330-334.