

برخی تغییرات فیزیو-بیوشیمیایی وابسته به سن در برگ‌های رُز

لادن رحیم‌پور شفایی^۱، نادر چاپارزاده^{۱*}، لیلیا زرنندی میان‌دوآب^۱ و میثم دولتی^۱
^۱ گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
^۲ گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان شورپسند، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

چکیده

پس از قطع رأس ساقه در *Rosa hybrid* دوره رشد جدیدی با رفع تسلط جوانه انتهایی، از جوانه‌های جانبی آغاز و طی آن شاخه‌های جدید تشکیل می‌شود. در هر شاخه، برگ‌ها به ترتیب سن آرایش می‌یابند. برای مطالعه، چهار نمونه برگ از رأس به سمت پایه شماره گذاری شدند که مرحله جوانی تا بلوغ برگ را نشان می‌دهند. نتایج، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی عمیقی را طی بلوغ نشان دادند. کاهش مقدار گونه‌های اکسیژن فعال به کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و در نهایت، افزایش پایداری غشاهای سلولی منجر شد. افزایش محتوای پروتئین‌های محلول کل با کاهش میزان آمینو اسیدهای آزاد و نیز محتوای کربوهیدرات‌های محلول همراه بود. نتایج تفاوت بین برگ‌های جوان و بالغ را در سنتز و تجزیه پروتئین‌ها نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداسیون چربی‌ها، پروتئین‌ها، رُز چند رنگ، سن برگ، کربوهیدرات‌ها

مقدمه

محتوای پروتئینی سلول را تشکیل می‌دهد. با تعیین محتوای پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدهای برگ‌ها می‌توان زمان آغاز پیری را تعیین نمود، زیرا زمان آغاز تخریب آنها می‌تواند از نشانه‌های آغاز پیری برگ باشد (Feller and Fischer, 1994).

آمینو اسیدها نیز از متابولیت‌های عمده حاوی کربن و نیتروژن هستند (Cabello et al., 2006). بیوسنتز آمینو اسیدها به صورت نموی قابل تنظیم در بخش‌های جوان گیاه فعال است (Ruuhola et al., 2003). پرولین

طی بلوغ برگ‌گی تغییرات اساسی در نشانگرهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی رخ می‌دهد. برگ جوان برای تکمیل ظرفیت فتوسنتزی خود نیازمند افزایش پروتئین‌های دخیل در این فرآیند نظیر کمپلکس‌های جمع‌کننده نور در فتوسیستم‌های I و II، آنزیم‌های مسیره‌های بیوسنتزی و ... است. در بافت‌های فعال فتوسنتزی گونه‌های C3، آنزیم روبیسکو (ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز) بیش از ۵۰ درصد

بیشتری برخوردار بوده، در همه بخش‌های سلولی طی متابولیسم طبیعی گیاه می‌تواند تولید شود. H_2O_2 به علت قابلیت انتشار به بخش‌های مختلف سلول و عبور از غشاهای می‌تواند بسیار مخرب باشد (Zengraf, 2007). با توجه به تفاوت توان آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها در مراحل مختلف نمو، میزان گونه‌های فعال اکسیژن نیز تغییر می‌کند. با آغاز روند پیری برگ و افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن آسیب گسترده به ترکیبات سلولی و غشای سلولی وارد می‌شود (Cabello *et al.*, 2006). غشای تیلاکوئید از نخستین غشاهایی است که تحت تأثیر تغییرات مخرب قرار می‌گیرد. میان‌کنش گونه‌های فعال اکسیژن با چربی‌ها، رادیکال‌های جدید نظیر هیدروپراکسیدها را تولید می‌کند و به زنجیره‌ای از واکنش‌های پراکسیداسیون منجر می‌شود که این امر باعث تخریب ساختارهای غشایی و اختلال در عملکرد طبیعی آنها می‌شود (Hopkins *et al.*, 2007).

ویژگی اصلی برگ‌های گیاه *Rosa hybrida* تغییر رنگ باری است که همراه با افزایش سن، در هر دو سطح برگی آنها اتفاق می‌افتد. در پژوهش حاضر، تلاش شده است برخی تغییرات فیزیکی-بیوشیمیایی مرتبط با افزایش سن در این گیاه آشکار و با توجه به اطلاعات موجود در مورد سایر گیاهان مقایسه و تفسیر شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این بررسی، برگ‌های گیاه *Rosa hybrida* از تیره Rosaceae به عنوان نمونه انتخاب شدند. برای

از جمله آمینو اسیدهایی است که در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد و دارای عملکردهای ویژه‌ای است. این آمینو اسید با تجمع در برگ‌ها از واسرشته شدن پروتئین‌ها پیشگیری می‌کند. همچنین، از طریق میان‌کنش با فسفولیپیدهای غشایی باعث حفظ پایداری غشاهای شده، به عنوان جمع‌کننده هیدروکسیل‌ها یا به عنوان ذخیره‌ای از ترکیبات نیتروژنی در سلول‌ها عمل می‌کند (Thomas and James, 1993).

رشد و نمو گیاه وابسته به فرآیندهایی است که با تولید، انتقال و استفاده از فرآورده‌های فتوسنتزی ارتباط دارند. برگ جوان به سرعت رشد نموده، نیتروژن و کربن را از سایر بخش‌های گیاه دریافت می‌کند و سنتز پروتئین را شدت می‌بخشد. این حالت تا زمانی ادامه می‌یابد که برگ ظرفیت کامل برای انجام فتوسنتز را به دست آورد. در حقیقت، با بلوغ دستگاه فتوسنتزی، برگ به مخزنی از کربوهیدرات‌ها تبدیل می‌شود (Dertinger *et al.*, 2003).

غشا از اجزای مهم سلول‌های گیاهی است که نه تنها امکان کده بندی (compartmentation) فعالیت‌های مختلف سلول را فراهم می‌کند، بلکه امکان انتقال‌های ویژه و علامت‌رسانی‌های ضروری برای عملکرد طبیعی سلول را نیز فراهم می‌کند. بررسی تغییرات غشاهای سلولی شامل میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشای و مطالعه پایداری غشاهای، نشانه‌های خوبی برای بلوغ برگی به شمار می‌آیند. گونه‌های فعال اکسیژن قادر به اکسیداسیون ماکرومولکول‌های زیستی نظیر نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و لیپیدها هستند و در نتیجه باعث آسیب غشاهای سلولی می‌شوند. در این میان، مولکول H_2O_2 به علت داشتن نیمه عمر طولانی از اهمیت

سنجش میزان پروتئین‌های محلول کل

بافت برگگی تر با بافر TRIS-HCl همگن و پس از سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه سانتیگراد، سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۲۰ دقیقه) مقادیری از مایع رویی با معرف بردفورد مخلوط و جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد (Bradford, 1976). با رسم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی (BSA) مقدار نهایی پروتئین‌های محلول کل بر اساس میلی گرم بر گرم وزن تر برگ گزارش شد.

سنجش محتوای آمینو اسیدهای آزاد

بافت برگگی تر با بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار سرد با اسیدیت ۷/۵ همگن و پس از سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه سانتیگراد، سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۲۰ دقیقه) مقادیری از مایع رویی با معرف نین هیدرین مخلوط و مدتی در بن ماری جوشان قرار داده شد. پس از سرد شدن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد (Harding and MacLean, 1916). با رسم منحنی استاندارد از گلیسین مقدار آمینو اسیدهای آزاد بر اساس میکروگرم بر گرم وزن تر برگ گزارش شد.

سنجش میزان پرولین

بافت برگگی تر با سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد همگن و پس از سانتریفیوژ (سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۱۵ دقیقه) مقادیری از مایع رویی با نین هیدرین اسید و استیک اسید خالص مخلوط و مدتی در بن ماری جوشان قرار گرفت. بلافاصله پس از توقف واکنش در آب یخ با اضافه کردن تولوئن و انتقال پرولین به فاز رنگی تولوئنی جذب آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد (Bates et al., 1973). با رسم منحنی

بررسی رفتارهای گیاهان در محیط رشد طبیعی، از گیاهان رُزی که در محیط دانشگاه شهید مدنی (آذرشهر-آذربایجان شرقی) در زمینی به ابعاد ۱۰ × ۳۰ متر به طور ردیفی و به فاصله یک متر از یکدیگر کشت شده بودند، استفاده شد. در این گیاه، شاخه‌های فرعی که در فاز رویشی قرار داشته، هنوز وارد مرحله گل دهی نشده بودند، انتخاب شد. برگ‌های رأسی این شاخه‌ها در هر دو سطح، به رنگ قرمز تند دیده می‌شوند. این برگ‌ها در واقع جوان‌ترین برگ‌ها هستند و به عنوان برگ شماره ۱ انتخاب شدند. در جهت رأس به پایه با گذشت زمان، سن برگ‌ها افزایش می‌یابد، سطح رویی برگ‌ها (adaxial) به رنگ سبز درآمده، سطح زیری (abaxial) به رنگ قرمز باقی می‌ماند، این برگ‌ها شماره ۲ نامیده شدند. برگ‌های شماره ۳ برگ‌هایی هستند که سطح رویی کاملاً سبز داشته، سطح زیری آنها نیز به رنگ سبز روشن درآمده است. برگ‌های شماره ۴ که برگ‌های بالغ هستند، نسبت به سه نمونه نخست مسن تر بوده، در پایین‌ترین قسمت قرار دارند و در هر دو سطح کاملاً سبز هستند.

طی یک دوره رشد در *Rosa hybrida*، برگ‌های جدید در فصل بهار (فروردین و اردیبهشت‌ماه) به وجود می‌آیند که با گذشت زمان برگ‌های با سنین مختلف را می‌توان روی یک شاخه مشاهده کرد. در این بررسی از نمونه‌های در معرض تابش نور خورشید استفاده و تلاش شد از این نظر اختلافی بین نمونه‌ها وجود نداشته باشد. جمع‌آوری نمونه‌ها پیش از ظهر ساعت ۹ انجام شد. این چهار نمونه برگگی با انجام چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی از نظر ویژگی‌های فیزیو-بیوشیمیایی بررسی شدند.

پراکسیداسیون چربی‌های غشا بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر برگ گزارش شد (Heath and Packer, 1968).

سنجش شاخص پایداری غشای سلولی

قطعات یکسان جدا شده برگی داخل آب مقطر درون فالكون به مدت ۵ ساعت روی شیکر و در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس، میزان هدایت الکتریکی محلول سنجیده شد. در ادامه با اتوکلاو فالكون‌ها غشاهای سلولی تخریب شدند. پس از سرد شدن کامل، میزان هدایت الکتریکی مجدداً اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه ۱ میزان نشت الکتروولیت‌ها به میزان پایداری غشا سلولی (CMS, Cell Membrane Stability) تبدیل شد (Sairam and Srivastava, 2002).

رابطه ۱ $CMS = [1 - (C_1/C_2)] \times 100$
 C_1 : میزان هدایت الکتریکی نمونه پیش از تخریب غشاها

C_2 : میزان هدایت الکتریکی نمونه پس از تخریب غشاها

تحلیل داده‌ها

هر کدام از سنجش‌ها برای هر نمونه ۴ بار تکرار و داده‌های حاصل با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و به روش One-Way ANOVA تحلیل و معنی‌داری آنها در سطح احتمال ۵ درصد مشخص شد. نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

محتوای پروتئین‌های محلول کل

بر اساس جدول ۱ میزان پروتئین‌های محلول کل از برگ شماره ۱ تا برگ شماره ۴، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. طی روند بلوغ میزان سنتز پروتئین‌ها بسیار بیشتر از میزان تخریب آنها بوده، محتوای پروتئینی

استاندارد از پرولین مقدار آن بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر برگ گزارش شد.

سنجش میزان کربوهیدرات‌های محلول

بافت برگی تر با اتانول ۹۵ درصد همگن و پس از سانتریفیوژ (سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۱۵ دقیقه) مقادیری از مایع رویی با محلول آنترون مخلوط و در بن‌ماری در حال جوش قرار داده شد. بلافاصله پس از توقف واکنش در آب یخ جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر تعیین شد (Roe, 1955). با رسم منحنی استاندارد از گلوکز مقدار کربوهیدرات‌های محلول بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ گزارش شد.

سنجش محتوای H_2O_2

بافت برگی تر با بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مول با اسیدیته ۶/۵ همگن و پس از سانتریفیوژ (سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۲ دقیقه) مقادیری از مایع رویی با تیتانیوم کلراید ۱ درصد مخلوط و دوباره سانتریفیوژ شد. جذب مایع رویی در طول موج ۴۱۰ نانومتر تعیین و با استفاده از ضریب تصحیح $0.28 \mu M^{-1} cm^{-1}$ محتوای H_2O_2 بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر برگ گزارش شد (Jana and Choudhuri, 1981).

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها

بافت برگی تر با تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد همگن و پس از سانتریفیوژ (سرعت ۵۰۰۰ دور و مدت ۵ دقیقه) مقادیری از مایع رویی با محلول TCA ۲۰ درصد دارای تیوباریتوریک اسید ۰/۵ درصد مخلوط و مدتی در بن‌ماری جوشان قرار گرفت. بلافاصله پس از توقف واکنش در آب یخ و سانتریفیوژ مجدد جذب مایع رویی در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از حذف جذب غیر ویژه استفاده از ضریب تصحیح $155 mM^{-1} cm^{-1}$ میزان

پروتئین‌ها تا مرحله بلوغ نشان داده شده است (Kato *et al.*, 2004). نتایج مشابه در آفتابگردان (Cabello *et al.*, 2006) و *Nasturtium officinale* (Reifenrath *et al.*, 2007) and Muller, 2007) مشاهده شده است. در بررسی دیگر، در مرحله پیش از گل دهی، کاهش تدریجی پروتئین‌ها از جوان‌ترین برگ تا پیرترین برگ از برگ‌های رأسی به سمت برگ‌های پایه در آفتابگردان مشاهده شد که نشانه بالا بودن نرخ تخریب پروتئین‌ها در تمام این مراحل است (Sairam *et al.*, 2003). بر این اساس می‌توان گفت بین نرخ سنتز و تخریب پروتئین در گذر از مرحله جوانی به بلوغ، نرخ سنتز پروتئین غالب بوده است.

برگ‌ها تا رسیدن به مرحله بلوغ افزایش نشان داده است. پس از بلوغ و در آغاز پیری، پروتئین‌ها به عنوان بزرگترین منبع نیتروژن آلی که بالقوه قابلیت جابه‌جایی نیز دارند، شناخته می‌شوند (Feller and Fischer, 1994). در بررسی برگ‌های تنباکو در سنین مختلف، افزایش میزان پروتئین‌ها (به ویژه رویسکو) تا زمان بلوغ برگ‌ها مشاهده شده است. پس از بلوغ، کاهش محتوای پروتئین‌ها عمدتاً به تخریب رویسکو نسبت داده می‌شود چرا که این آنزیم به تنهایی بیش از ۵۰ درصد محتوای پروتئینی سلول را شامل می‌شود (Ohe *et al.*, 2005). در بررسی دیگر، بر اساس وضعیت قرارگیری برگ‌های تنباکو از رأس ساقه نیز افزایش سنتز

جدول ۱- مقادیر، میانگین پروتئین‌های محلول کل، آمینو اسیدهای آزاد، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول با ۴ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

برگ	پروتئین‌های محلول کل (mg/g FW)	آمینو اسیدهای آزاد (μg/g FW)	پرولین (μmol/g FW)	کربوهیدرات‌های محلول (mg/g FW)
برگ شماره ۱	۲/۵۷۹ ^a ± ۰/۰۲۷	۰/۷۵۳ ^a ± ۰/۰۲۹	۰/۵۳۷ ^a ± ۰/۰۴۹	۰/۵۸۸ ^a ± ۰/۰۱۰
برگ شماره ۲	۳/۶۹۵ ^{ab} ± ۰/۲۳۹	۰/۴۸۴ ^b ± ۰/۰۲۱	۰/۳۹۶ ^b ± ۰/۰۲۰	۰/۳۰۱ ^b ± ۰/۰۲۶
برگ شماره ۳	۴/۹۳۵ ^{bc} ± ۰/۶۶۴	۰/۲۶۹ ^c ± ۰/۰۱۰	۰/۴۳۷ ^{ab} ± ۰/۰۴۸	۰/۲۷۰ ^b ± ۰/۰۳۰
برگ شماره ۴	۶/۲۵۸ ^c ± ۰/۵۰۱	۰/۳۱۳ ^c ± ۰/۰۴۰	۰/۴۳۰ ^{ab} ± ۰/۰۱۰	۰/۲۰۱ ^c ± ۰/۰۰۸

محتوای آمینو اسیدهای آزاد

تازه، به ویژه دو آمینو اسید گلوتامین و گلیسین، به وضعیت متابولیسم فعال بافت‌های در حال رشد نسبت داده شده است (Ruuhola *et al.*, 2003). از طرفی، آمینو اسیدهای آزاد در پاسخ به دمای پایین نیز می‌توانند تجمع یابند (Thomas and James, 1993). بنابراین، سطح بالای آمینو اسیدها در برگ‌های جوان رز در عین حال که به رشد سریع آنها مربوط است، ممکن است نوعی سازش به دماهای کم در فصل بهار باشد (Ruuhola *et al.*, 2003). کاهش تدریجی مقدار

بر اساس داده‌های جدول ۱ مقدار آمینو اسیدهای آزاد در برگ‌های جوان *Rosa hybrida* بیشتر بود ولی با افزایش سن برگ کاهش می‌یابد. مقدار اندک آمینو اسیدهای آزاد در برگ‌های پیر گیاه آفتابگردان به علت انتقال آمینو اسیدهای آزاد حاصل از شکستن پروتئین به اندام‌های در حال رشد گیاه بیان شده است (Cabello *et al.*, 2006). در گیاه *Betula pubescens* مقدار بالای آمینو اسیدهای در جوانه‌ها و برگ‌های

میزان آن کاهش می‌یابد. محل تولید یا منبع کربوهیدرات‌ها، برگ‌های بالغ فتوسنتزی است که کربوهیدرات‌ها را به میزان بیش از نیاز خود تولید می‌کنند. اندام‌های غیرفتوسنتزی مانند ریشه‌ها و برگ‌های جوان یا اندام‌های مقصد در حال رشد که قادر به تأمین مواد مورد نیاز خود برای رشد نیستند، برای نمو طبیعی خود نیازمند دریافت کربوهیدرات‌ها هستند (Feucht *et al.*, 2004). کربوهیدرات‌ها با انتقال از برگ‌های بالغ به برگ‌های جوان در حال نمو، علاوه بر تأمین مواد مورد نیاز رشد طبیعی برگ، مواد لازم برای تولید ترکیبات شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه را نیز فراهم می‌کنند (Arnold and Schultz, 2002). مطالعه روی درخت تبریزی هیبرید نشان می‌دهد که بین میزان واردات قندها از بخش‌های دیگر به برگ جوان و سنتز ترکیبات فنلی آن ارتباط مستقیم وجود دارد. حذف برگ‌های بالغ صادرکننده کربوهیدرات‌ها، میزان ترکیبات فنلی برگ‌های جوان را کاهش داد (Arnold *et al.*, 2004). به طور کلی، در نهان‌دانگان ارتباط مستقیم بین واردات کربوهیدرات‌ها و متابولیسم فنل‌ها اثبات شده است (Honkanen *et al.*, 1999).

در *Rosa hybrida*، برگ جوان در حال نمو به علت عدم بلوغ دستگاه فتوسنتزی قادر به تولید کربوهیدرات‌های کافی نیست، در نتیجه برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه از برگ‌های بالغ کربوهیدرات‌ها را وارد می‌کند. بخشی از این مقدار زیاد کربوهیدرات‌ها می‌تواند به علت برداشت صبح هنگام نمونه‌های برگ باشد؛ چرا که طی ساعات شب نشاسته ذخیره شده در برگ‌های بالغ متحرک شده، به بافت‌های در حال رشد منتقل می‌شود. با افزایش سن و

آمینو اسیدهای آزاد می‌تواند به دلیل به کارگیری آنها برای افزایش سنتز پروتئین‌ها نیز باشد.

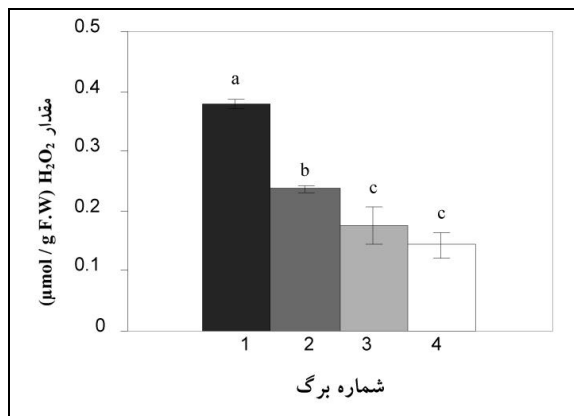
محتوای پرولین

جدول ۱ بالا بودن میزان پرولین را در برگ‌های جوان *Rosa hybrida* نشان می‌دهد. پرولین حفاظت‌کننده اسمزی است که در شرایط تنش سرما نیز انباشته می‌شود (Thomas and James, 1993). میزان بالای این آمینو اسید در جوانه‌ها و برگ‌های جوان گیاه *Betula pubescens* می‌تواند به دمای پایین ساعات شب نسبت داده شود (Ruuhola *et al.*, 2003). همان‌طور که پیش از این اشاره شد، انباشته شدن آمینو اسیدها در برگ‌های جوان گیاهان در فصل بهار در پاسخ به دمای اندک شب اتفاق می‌افتد. در گیاه *Brassica juncea* نیز از برگ شماره ۱ تا برگ شماره ۴ کاهش مقدار پرولین مشاهده شد که این کاهش به تفاوت سن فیزیولوژیک برگ‌ها و میزان مواجهه آنها با نور خورشید نسبت داده شده است. برگ شماره ۱ جوان‌ترین برگ بوده، بیشترین نور را در مقایسه با سایر برگ‌ها دریافت می‌کند. در این گیاه، میزان فعالیت آنزیم پیروولین ۵-کربوکسیلاز ردوکتاز (P5C) که کاتالیزکننده مرحله نهایی بیوسنتز پرولین است، کاهش نشان می‌دهد (Madan *et al.*, 1994). به این ترتیب، احتمال دارد میزان بالای پرولین برگ‌های جوان به سن فیزیولوژیک و حساسیت آنها در مقابل نور در طی روز و دمای کم ساعات شب باشد.

محتوای کربوهیدرات‌های محلول

از داده‌های جدول ۱ مشخص است که برگ جوان شماره ۱ در *Rosa hybrida* محتوای کربوهیدرات بالاتری نسبت به سایر برگ‌ها دارد ولی با افزایش سن

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باشد (داده‌ها نشان داده نشده است).



شکل ۱- مقادیر، میانگین H₂O₂ با ۴ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

پراکسیداسیون لیپیدها

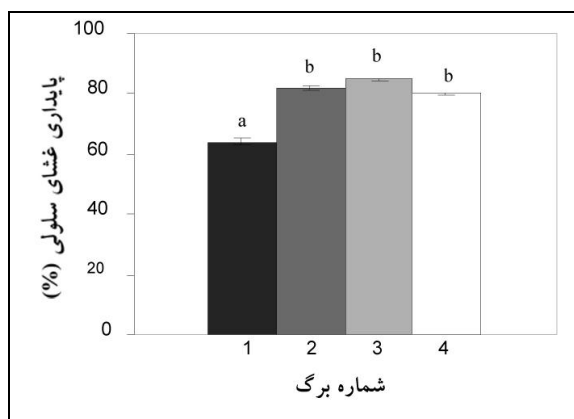
بر اساس داده‌های شکل ۲، برگ شماره ۱ بیشترین میزان آسیب لیپیدهای غشایی را نشان می‌دهد و با افزایش سن برگ از میزان اکسیداسیون لیپیدها به طور معنی‌داری کاسته می‌شود. بالا بودن میزان گونه‌های فعال اکسیژن همراه با ضعف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در برگ باعث آسیب شدید غشایی می‌شود. نتایج مشابه در آفتابگردان نیز مشاهده شده است (Cabello *et al.*, 2006). تغییر در ترکیب لیپیدهای غشایی باعث از دست رفتن یکپارچگی، تغییر ساختار دو لایه و کاهش سیالیت غشا می‌شود (Hopkins *et al.*, 2007). در گیاه *Mentha pulegium* از برگ‌های جوان رأسی تا برگ بالغ، کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها دیده شده است، در ادامه با افزایش سن و پیری برگ افزایش محسوس تولید پراکسیدها اتفاق می‌افتد. این مسأله نشان می‌دهد تا زمان بالغ شدن برگ سازوکارهای دفاعی گیاه شامل آنزیم‌ها و سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان فعال بوده، مانع آسیب غشا

فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها، واردات کربوهیدرات‌ها کاهش و با رسیدن به مرحله بلوغ، برگ بالغ خود به عنوان صادرکننده کربوهیدرات‌ها محسوب خواهد شد.

محتوای H₂O₂

بر اساس آنچه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان H₂O₂ در برگ شماره ۱ بیشترین مقدار را داشته، با افزایش سن به تدریج به طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد. در گیاهان، کلروپلاست‌ها منبع اصلی تولید گونه‌های فعال اکسیژن هستند، زیرا طی روند فتوسنتز و حتی تحت شرایط بهینه نیز زنجیر انتقال الکترون آنها را تولید می‌کند (Takeda *et al.*, 1995). برگ‌های مسن تنباکو در مقایسه با برگ‌های جوان رأسی، ۴۰ درصد H₂O₂ بیشتری دارند که نشانگر پایین بودن ظرفیت جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن در برگ‌های پیر نسبت به برگ‌های جوان است (Ohe *et al.*, 2005). در برگ‌های آفتابگردان میزان H₂O₂ تا مرحله بلوغ کاهش اندکی نشان داده، پس از بلوغ برگ به شدت افزایش می‌یابد که نشانگر افزایش میزان تنش اکسیداتیو است (Cabello *et al.*, 2006). برگ‌های جوان آسکوربات بسیار کمتری نسبت به برگ‌های بالغ دارند که با توجه به نقش آسکوربات پراکسیداز در خنثی‌سازی H₂O₂، کمبود آسکوربات می‌تواند عامل بالا بودن H₂O₂ برگ جوان باشد. در چنین شرایطی اهمیت بالا بودن مقادیر فلاونوئیدها در برگ جوان و سم‌زدایی H₂O₂ از طریق واکنش فلاونوئید پراکسیداز بیشتر می‌شود (Yamasaki *et al.*, 1997). روند کاهش‌ی میزان H₂O₂ در *Rosa hybrida* طی بلوغ برگ‌ی بیانگر افزایش ظرفیت سیستم جمع‌آوری‌کننده H₂O₂ است که می‌تواند به علت افزایش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و یا افزایش

آفتابگردان نسبت به برگ‌های جوان، میزان گونه‌های فعال اکسیژن کمتری داشته، غشاهای سلولی پایداری بیشتری نشان می‌دهند (Cabello *et al.*, 2006). ارزیابی میزان پایداری غشایی برای بررسی های فیزیولوژیک در مورد تعدادی از گونه‌های گیاهی مانند رقم‌های گندم در شرایط مختلف تنش‌های محیطی، مانند شوری، استفاده شده است. از این طریق رقم‌های پایدارتر، نسبت به شوری مقاوم‌تر شناخته شده‌اند (Ozlap *et al.*, 2000). بنابراین، افزایش پایداری غشای سلولی در گیاه *Rosa hybrida* می‌تواند به دلیل کاهش میزان گونه‌های اکسیژن فعال آسیب‌رسان در طی دوره بلوغ باشد، زیرا گونه‌های اکسیژن فعال می‌توانند باعث پراکسیداسیون چربی‌ها و به پس از آن افزایش نفوذپذیری غشا شوند (Ohe *et al.*, 2005).

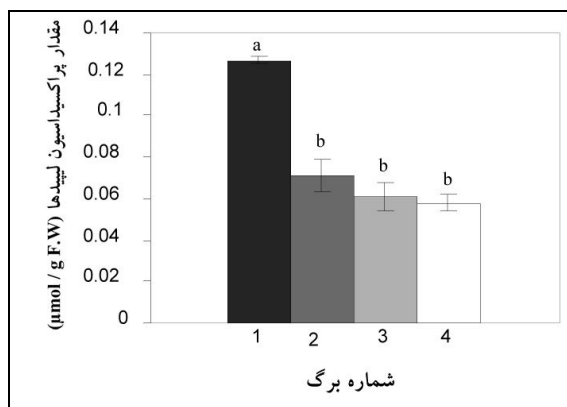


شکل ۳- مقادیر، میانگین شاخص پایداری غشای سلولی با ۴ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

جمع‌بندی

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان چنین ارزیابی کرد که توان سنتز پروتئین در برگ‌های جوان اندک بوده، به تدریج طی بلوغ آمینو اسیدهای بیشتری به کار گرفته می‌شوند تا میزان پروتئین‌ها در برگ‌های بالغ به

می‌شوند. با آغاز فرآیند پیری، مکانیسم‌های دفاعی گیاه با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مهار و لپیدها و بافت‌ها با حملات پراکسیدها مواجه می‌شوند و سلول‌ها آسیب می‌بینند (Candan and Tarhan, 2003). بنابراین، با توجه به کاهش میزان H_2O_2 از برگ شماره ۱ تا برگ شماره ۴ و کاهش آسیب‌رسانی آن، روند کاهش تولید پراکسیدهای لیپیدی منطقی و مورد انتظار است.



شکل ۲- مقادیر، میانگین پراکسیداسیون لیپیدها با ۴ تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

پایداری غشای سلولی

بر اساس داده‌های شکل ۳، برگ شماره ۱ غشای ناپایداری داشته، به تدریج با افزایش سن برگ پایداری غشا افزایش یافته، به بیشینه مقدار خود رسیده است. از مرحله جوانی تا مرحله بلوغ غشای دو لایه لیپیدی پایدارتر شده، امکان نقل و انتقال و علامت‌رسانی‌ها را فراهم می‌کند. پس از بلوغ به علت افزایش آسیب غشایی ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، غشا نفوذپذیری انتخابی خود را از دست می‌دهد. بهترین شاهد برای این وضعیت مطالعاتی هستند که افزایش نشی مواد محلول از خلال غشا را در آغاز پیری نشان می‌دهند (Hopkins *et al.*, 2007). برگ‌های بالغ

کاهش تدریجی پراکسید هیدروژن طی بلوغ به کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی منجر شده، برگ‌های بالغ پایدارترین غشای سلولی را دارند.

بیشینه مقدار خود برسد. برگ‌های بالغ برخلاف برگ‌های جوان مخزنی از کربوهیدرات‌ها هستند و می‌توانند آنها را به سایر بخش‌های گیاه ارسال کنند.

منابع

- Arnold, T. and Schultz, J. (2002) Induced sink strength as a prerequisite for induced tannin biosynthesis in developing leaves of *Populus*. *Oecologia* 130: 585-593.
- Arnold, T., Appel, H., Patel, V., Stocum, E., Kavalier, A. and Schultz, J. (2004) Carbohydrate translocation determines the phenolic content of *Populus* foliage: a test of the sink-source model of plant defense. *New Phytologist* 164: 157-164.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Clinical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cabello, P., Aguera, E. and Haba, P. (2006) Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. *Physiologia Plantarum* 128: 175-185.
- Candan, N. and Tarhan, L. (2003) Changes in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in zn-stressed *Mentha pulegium*. *Turkish Journal of Chemistry* 27: 21-30.
- Dertinger, U., Schaza, U. and Schulze, E. D. (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum* 119: 19-29.
- Feller, U. and Fischer, A. (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Science* 13: 241-273.
- Feucht, W., Treutter, D. and Polster, J. (2004) Flavanol binding of nuclei from tree species. *Plant Cell Reports* 22: 430-436.
- Harding, V. J. and MacLean, R. M. (1916) A colorimetric method for the estimation of amino acid alpha nitrogen. *Journal of Biological Chemistry* 24: 503-515.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Honkanen, T., Haukioja, E. and Kitunen, V. (1999) Responses of *Pinus sylvestris* branches to simulated herbivory are modified by tree sink /source dynamics and by external resources. *Functional Ecology* 13: 126-140.
- Hopkins, M., Mcnamra, L., Taylor, C., Wang, T. W. and Thompson, J. (2007) Membrane dynamic and regulation of subcellular changes during senescence. In: *Senescence process in plants* (Ed. Gan, S.) 76-79. Blackwell Publishing, Iowa.
- Jana, S. and Choudhuri, M. A. (1981) Glycolat metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquatic Botany* 12: 345-354.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A. and Sato, F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose 1, 5 -bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* 220: 97-104.

- Madan, S., Nainawatee, H. S., Jain, S., Jain, R. K., Malik, M. S. and Chowdhury J. B. (1994) Leaf-position dependent changes in proline, pyrroline-5- carboxylate reductase activity and water relations under salt stress in genetically stable salt-tolerant somaclones of *Brassica juncea* L. Plant and Soil 163: 151-156.
- Ohe, M., Rapolu, M., Mieda, T., Miyagawa, S. and Yabuta, Y. (2005) Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. Plant Science 168: 1487-1493.
- Ozlap, V. C., Oktem, H. A., Naqvi, S. M. and Yucel, M. (2000) Photosystem II and cellular membrane stability evaluation in hexaploid wheat seedlings under salt stress condition. Journal of Plant Nutrition 23: 275-283.
- Reifenrath, K. and Muller, C. (2007) Species-specific and leaf-age dependent effects of ultraviolet radiation on two Brassicaceae. Phytochemistry 68: 875-885.
- Roe, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. Journal of Biological Chemistry 212: 335-346.
- Ruuhola, T., Ossipov, V., Lempa, K. and Haukioja, E. (2003) Amino acids during development of mountain birch leaves. Chemoecology 13: 95-101.
- Sairam R. K. and Srivastava, G. C. (2002) Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science 162: 897-904.
- Sairam, R. K., Singh, D. V. and Srivastava, G. C. (2003) Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. Biologia Plantarum 47: 61-66.
- Takeda, T., Yokota, A. and Shigeoka, S. (1995) Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. Plant Cell Physiology 36: 1089-1095.
- Thomas, H. and James, A. R. (1993) Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. Annals of Botany 72: 249-254.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Kehara, N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. Plant Physiology 115: 1405-1412.
- Zengraf, U. (2007) Oxidative stress and leaf senescence. In: Senescence process in plants (Ed. Gan, S.) 69-81. Blackwell Publishing, Iowa.

Some physio-biochemical age dependent changes in leaves of *Rosa hybrida*

Ladan Rahimpour Shafae¹, Nader Chaparzadeh^{1,2} *, Leila Zarandi-Miandoab¹
and Meysam Dolati¹

Department of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Abstract

In *Rosa hybrida*, after removing head of the stem, the lateral buds become free from apical dominance and start to form new branches. In each branch, leaves arrange in an age dependent manner. Four leaf samples were numbered from apex to base, exhibiting young to mature leaf stages. During maturation, physiological and biochemical changes occurred. Decrease of reactive oxygen species contents, led to reduction of membrane lipid peroxidation and ultimately increased the stability of cell membranes. Increasing total soluble protein contents were accompanied by decreasing of free amino acids and soluble carbohydrates contents. Results demonstrated differences in synthesis and degradation of proteins between young and mature leaves.

Key words: Lipids peroxidation, Proteins, *Rosa hybrid*, Leaf age, Carbohydrates

* Corresponding Author: nchapar@azaruniv.ac.ir