نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۳۹۶ / صفحات: ۵۰-۳۸

تغییرات سیستم‌های پاداکساینده در انواع برگ‌های رنگی شمشاد طلایی (*Euonymus japonicus* Thunb.)

نادر چاپارزاده[1*]، سمانه صفی‌خانی[1]، لیلا زرندی میاندوآب[1]

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۶ تاریخ پذیرش:۹۶/۳/۷

چکیده

برخی نشانگرهای فیزیولوژیکی و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدان در انواع برگ‌های رنگی درختچه زینتی همیشه سبز شمشاد طلایی (*Euonymus japonicus* Thunb.) مورد مطالعه قرار گرفت. این درختچه دارای سه نوع برگ به رنگ‌های سبز تیره، سبز روشن و زرد می‌باشد. در این سه نوع برگ نشانگرهای تنش اکسیداتیو (غلظت پراکسید هیدروژن، پایداری غشاهای سلولی و پراکسیداسیون چربی‌ها)، فعالیت آنزیم پراکسیداز و برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدان (ترکیبات فنلی، پرولین و اسیدهای آمینه آزاد) مطالعه شدند. نوع برگ بر محتوای پراکسید هیدروژن، میزان پایداری غشاهای سلولی و پراکسیداسیون چربی‌های غشایی تاثیر معنی‌دار گذاشت. مقدار اسیدهای‌آمینه آزاد و پرولین در برگ‌های زرد به شکل معنی‌داری از برگ‌های سبز تیره و روشن بیشتر بود. بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فنولی آزاد به ترتیب در برگ‌های سبز تیره و زرد وجود داشت. یک الگوی افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ‌های سبز روشن نسبت به سبزتیره و برگ‌های زرد نسبت به برگ‌های سبز روشن مشاهده شد. از داده‌های حاضر می‌توان نتیجه گرفت که با وجود فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدان، تغییر رنگ برگ‌ها از سبز تیره تا زرد منجر به افزایش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اکسیداتیو، ترکیبات فنلی، پراکسیداز، پراکسید هیدروژن، شمشاد.

مقدمه

گیاهان به‌عنوان موجودات هوازی اکسیژن را در فرایند فتوسنتز تولید و برای تنفس سلولی به آن نیازمند می‌باشند. در شرایط عادی در کلروپلاست، میتوکندری، پراکسیزوم، غشاهای سلولی، دیواره سلولی و شبکه آندوپلاسمی بخشی از این اکسیژن با دریافت الکترون و واکنش‌های بعدی آنزیمی و غیرآنزیمی به گونه‌های تبدیل می‌شود (Puthur, 2016). در هر بخش از سلول‌های گیاهی راهکارهای لازم برای سم‌زدایی از ROS وجود دارد. به عبارت دیگر، همیشه بین تولید و سم‌زدایی ROS تعادل برقرار است. اگر به هر دلیل این تعادل به‌هم به‌خورد، مولکول‌های زیستی و بخش‌های مختلف سلولی آسیب اکسیداتیو خواهند دید. عدم تعادل بین تولید و سم‌زدایی ROS می‌تواند ناشی از ضعف عملکرد سیستم‌های آنتی‌اکسیدان ویا بیش‌تولید ROS در اثر عوامل مختلف باشد. آسیب غشاهای زیستی از اولیه‌ترین اثرات تنش اکسیداتیو بوده و به عنوان معیاری در تحمل گیاهان به انواع تنش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. به نظر می‌رسد که گیاهان برای اجتناب از آسیب، سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و

*نویسنده مسئول: nchapar@azaruniv.ac.ir

غیرآنزیمی را طی تکامل برای سم‌زدایی از ROS بدست آورده‌اند (Ahmad et al., 2008).

نور به‌عنوان منبع انرژی برای تثبیت کربن فتوسنتزی عمل می‌کند هرچند، انرژی نوری مازاد از طریق غیرفعال کردن دستگاه فتوسنتزی باعث مهار رشد گیاهان می‌شود. اثر منفی نور بر فتوسنتز یا بازدارندگی نوری بوسیله تابش طیف مرئی شدید و پرتوهای فرابنفش به دستگاه فتوسنتزی ایجاد می‌شود (Takahashi et al., 2002). گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی مختلف شامل تغییرات مورفولوژیکی و ساختاری، تغییر در جهت‌گیری برگ، انباشتگی ترکیباتی مانند آنتوسیانین‌ها و موم‌های کوتیکولی (Shepherd and Griffiths, 2006) برای کاهش جذب فوتون، تنظیم پایین دست کارایی تبدیل انرژی نورانی مانند چرخه گزانتوفیل‌ها (Muller et al., 2001) و فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابله با آسیب نوری را به‌کار می‌برند (Miura et al., 2010). نقص در سیستم حفاظت نوری می‌تواند به انباشتگی ROS در کلروپلاست‌ها منجر شده و با آسیب رنگدانه‌ها در نهایت به سفیدشدگی دستگاه فتوسنتزی بیانجامد. برگ‌های ابلق توسط بخش‌های سفید، زرد و یا قرمز (بسته به وجود یا عدم وجود کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها) مشخص می‌شوند (Esteban et al., 2008). سلول‌ها در بخش‌های سبز از نظر مورفولوژیکی دارای کلروپلاست‌های طبیعی‌اند درحالی که در بخش‌های سفید و زرد کلروپلاست‌ها دچار نقص در رنگدانه‌ها و ساختار غشاهای درونی می‌باشند (Hu et al., 2015). در گیاهان جهش یافته دارای نقص در بیوسنتز کلروفیل نیز شرایط مشابه مشاهده می‌گردد (Jimenez-Francisco et al., 2016). در جهش یافته مشهور به *immutans* در آرابیدوپسیس فقدان آنزیم ترمینال‌اکسیداز (پلاستوکینول ترمینال اکسیداز) پلاستیدی در بخش‌های سفید، به‌دلیل عدم بیوسنتز کاروتنوییدها، موجب تشکیل برگ‌های ابلق می‌شود (Foudree et al., 2012). بررسی‌های مولکولی گیاهان ابلق مشخص کرده است که ابلق بودن نتیجه‌ای از عملکرد برخی پروتئین‌های مختلف طی نمو بوده وحتی در برخی موارد به تغذیه نیتروژنی نیز وابسته است (Yu et al., 2016). اخیراً نشان داده شده که دیواره سلولی در بخش‌های سفید از نظر ترکیب بیوشیمیایی تفاوت اساسی با بخش‌های سبز دارد (Pogorelko et al., 2016). برخی گیاهان در شرایط محیطی باز، دارای برگ‌های زرد و سبز، به‌ترتیب در موقعیت‌های جوان و پیر شاخه، می‌باشند. ویژگی مهم برگ‌های زرد، وجود مقادیر کم کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدهاست (Chaparzadeh et al., 2016). در مناطق سایه، میزان کلروفیل در برگ‌های زرد افزایش یافته و تبدیل به برگ‌های سبز طبیعی می‌شوند. به جز رنگ برگ، سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی میان برگ‌های زرد و سبز تقریباً یکسان است. این پدیده را که تابش نور شدید موجب ایجاد برگ‌های زرد می‌شود، تحت عنوان طلایی شدن نامیده‌اند (Yamasaki et al., 1995). طلایی‌شدن از این نظر که برگ‌های زرد دارای مقادیر جزئی کلروفیل هستند مشابه با برگ‌های ابلق است. پدیده طلایی‌شدن از چنین قراردادی متمایز است چون انباشتگی کلروفیل در آن‌ها اتفاق می‌افتد مگر این‌که برگ‌ها در معرض نور شدید قرار گیرند (Yamasaki et al., 1999). از طرف دیگر، کاهش میزان کلروفیل و فعالیت آنزیم روبیسکو از ویژگی‌های بیوشیمیایی مهم برگ‌های پیر بوده و از این جهت برگ‌های طلایی، ویژگی‌های مشابه با برگ‌های پیر را نشان می‌دهند. البته تفاوت اساسی میان برگ‌های طلایی و پیر وجود دارد زیرا پیدایش برگ‌های طلایی پدیده‌ای وابسته به سن نیست و در جهت مرگ برگ‌ها پیش نمی‌رود (Yamasaki et al., 1995).

همانطورکه در قبل اشاره شد، گیاهان برای اجتناب از اثرات ناشی از جذب نور مازاد و تولید و تجمع ROS در بافت‌ها، سازگاری‌های مختلف بیوشیمیایی، هیستولوژیکی و مورفولوژیکی دارند. شمشاد طلایی یکی از انواع گیاهان ابلق است که علاوه بر داشتن برگ‌های ابلق با درجات متفاوت، دارای سه نوع برگ با رنگ‌های سبز تیره، سبز روشن و زرد می‌باشد. در گزارش قبلی وجود تغییرات کمّی معنی‌دار در انواع رنگدانه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی بین سه نوع برگ یادشده مشاهده گردید (Chaparzadeh et al., 2016). نتایج حاصل از پژوهش فوق نشان داد که نور نقش اصلی و تعیین کننده در تشکیل برگ به رنگ‌های مختلف روی شمشاد طلایی دارد. شدت نور در سرشاخه‌ها و اطراف تاج پوشش موجب کمبود رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌گردد. احتمال می‌رود، رنگدانه‌های غیرفتوسنتزی با انباشته شدن در برگ‌های زرد و سبز روشن گیاه را از گزندهای اکسیداتیو ناشی از نور شدید حفظ نماید. در پژوهش حاضر سعی بر این است که ابعاد دیگری از سازگاری‌های بیوشیمیایی در برگ‌های مختلف شمشاد طلایی بررسی و در ارتباط با میزان آسیب‌های اکسیداتیو و مکانیسم‌های حفاظتی مربوطه در این برگ‌ها نکات جدیدی ارایه شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های گیاهی، شامل ۳ نوع برگ سبز تیره، سبز روشن و زرد درختچه‌های شمشاد طلایی از محوطه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان (طول‌جغرافیایی ٤٥/٥٦ و عرض‌جغرافیایی ٣٧/٤٨) جمع‌آوری شدند. نمونه‌های برگی پس از انتقال به آزمایشگاه در ٤ تکرار برای سنجش‌های لازم مورد استفاده قرارگرفتند.

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2): بافت برگی‌تر در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مول و pH=٦/٥) همگن گردیده و سپس سانتریفیوژ شد. عصاره رویی با تیتانیوم کلراید ۱ درصد مخلوط و دوباره سانتریفیوژ گردید. میزان جذب کمپلکس تیتانیوم‌پراکسید هیدروژن در مایع رویی در طول موج ٤١٠ نانومتر تعیین و محتوای H_2O_2 با استفاده از ضریب تصحیح ۰/۲۸ $\mu M^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه و بر حسب $\mu mol\ g^{-1}$ وزن تر گزارش شد (Chaparzadeh et al., 2014).

سنجش شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها: اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها از روی غلظت مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک‌اسید Thiobarbituric Acid Reacting Substances, (TBARS) صورت گرفت. بافت برگی‌تر در تری‌کلرواستیک‌اسید ۰/۱ درصد همگن و سانتریفوژ گردید. به محلول رویی، تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد اضافه و در حمام آب جوش قرار داده شد. واکنش در آب یخ متوقف گردیده و پس از سانتریفوژ دوم میزان جذب نوری در طول موج ٦٠٠ و ٥٣٢ نانومتر تعیین شد. پس از کسر جذب غیر ویژه در ٦٠٠ نانومتر، محتوای TBARS با ضریب تصحیح ۱۵۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه و بر حسب $\mu mol\ g^{-1}$ وزن تر گزارش گردید (Chaparzadeh et al., 2014).

سنجش پایداری غشاهای سلولی: پایداری غشاهای سلولی با استفاده از اندازه‌گیری میزان نشت یون‌ها از بافت برگی به درون آب مقطر محاسبه شد. برای این منظور، قطعات برگی هم‌اندازه در فالکون‌های حاوی آب مقطر در دمای آزمایشگاه به مدت ٢٤ ساعت روی دستگاه شیکر نگهداری و میزان هدایت‌الکتریکی (C_1) آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس همان قطعات در اتوکلاو تخریب و پس از آن به مدت ۱ ساعت روی دستگاه شیکر نگهداری و دوباره میزان هدایت الکتریکی (C_2) آن‌ها تعیین گردید. شاخص پایداری

غشا از رابطه زیر محاسبه گردید (Chaparzadeh et al., 2014).

$$CMS = [1- (C_1/C_2)] \times 100$$

سنجش پرولین: بافت برگی‌تر با سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد همگن و سانتریفوژ گردید. عصاره رویی با معرف نین‌هیدرین و اسیداستیک مخلوط و در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از توقف واکنش در آب یخ و افزودن تولوئن، میزان جذب نوری فاز رنگی در طول موج ۵۲۰ nm تعیین و مقدار پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن‌تر گزارش گردید (Bates et al., 1973).

سنجش اسیدهای آمینه آزاد: قطعات برگ تر در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مول و pH=۷/۵) همگن گردیده و سپس سانتریفیوژ شد. عصاره رویی با معرف نین هیدرین مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن جذب آن‌ها در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار اسیدآمینه با استفاده از منحنی استاندارد گلایسین خالص تعیین و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر گزارش گردید (Ghodrati et al., 2014).

سنجش محتوای ترکیبات فنلی آزاد کل: بافت برگی‌تر با متانول همگن و پس از نگهداری در حمام آب با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید. به مایع رویی حاصل، معرف فولین و کربنات سدیم ۱۵ درصد اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی نگهداری شد. میزان جذب نوری آن در طول موج ۷۲۵ نانومتر تعیین و با استفاده منحنی استاندارد اسیدگالیک مقدار فنل‌ها بر حسب mgg^{-1} وزن تر گزارش گردید (Julkunen, 1985).

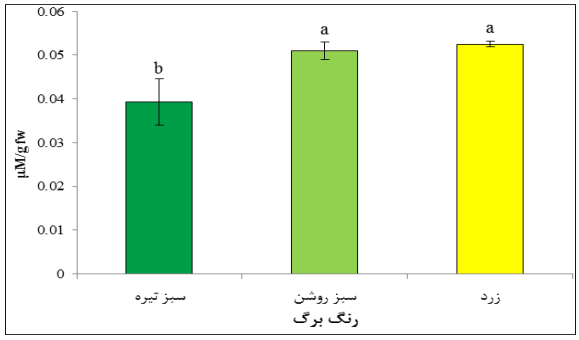
استخراج و سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: بافت برگی‌تر در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با بافر فسفات سدیم (۱۰۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی EDTA (۱ mM) و پلی‌وینیل پلی پیرولیدون (۱ درصد) همگن و سانتریفوژ گردید. جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، مقدار مشخصی مایع رویی با بافر (۵۰ mM و pH = ۷/۵) حاوی ٤۰ mM گایاکول و ۲۰ mM آب اکسیژنه مخلوط گردید. با تعیین میزان جذب در ٤۷۰ نانومتر و استفاده از ضریب تصحیح $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ٦/۳۹ فعالیت آن به‌صورت واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتیین محاسبه (Krizek et al, 1998) و داده‌ها به صورت درصد فعالیت در مقایسه با برگ‌های سبز تیره ارایه شده‌اند.

در این تحقیق تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها (٤ تکرار و با لحاظ خطای معیار) با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج

آنالیز واریانس برای همه فاکتورهای مورد مطالعه در این پژوهش تغییرات معنی‌دار را نشان داد.

محتوای پراکسید هیدروژن: محتوای پراکسید هیدروژن در برگ‌های زرد و سبز روشن به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌های سبز تیره بود. برگ‌های سبز روشن و زردتفاوت معنی‌دار در میزان پراکسید هیدروژن نشان ندادند (شکل۱).

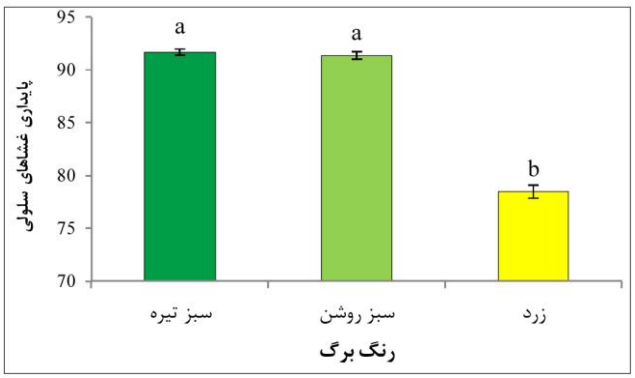


شکل ۱ : محتوای پراکسید هیدروژن در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند.
حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

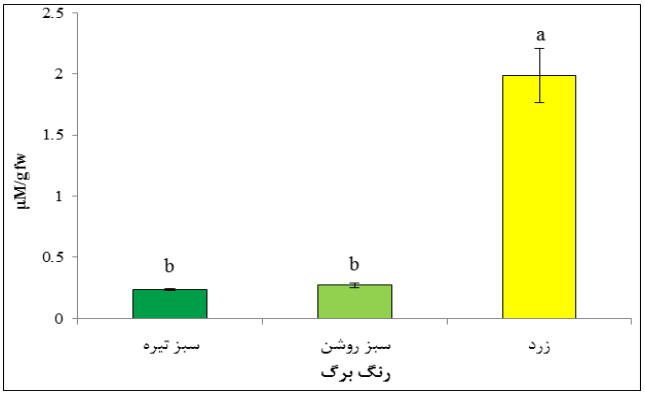
شـاخص پراکسیداسـیون چربـی: نتـایج نشـان داد برگ‌های سبز روشن و زرد در مقایسـه بـا بـرگ‌هـای سبز تیره بطور معنی‌داری محتـوای TBARS بیشـتری داشتند (شکل۲).

شکل ۲: محتوای TBARS در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند.
حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

پایداری غشاهای سلولی: سنجش پایـداری غشـاهای سلولی، مقادیر تقریباً مشابهی در برگ‌های سبز تیـره و سبز روشن را نشان داد. برگ‌هـای زرد در مقایسـه بـا آن‌ها بطور معنی‌داری پایداری غشایی کمتری داشـتند (شکل۳).



شکل ۳ : پایداری غشاهای سلولی در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند.
حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

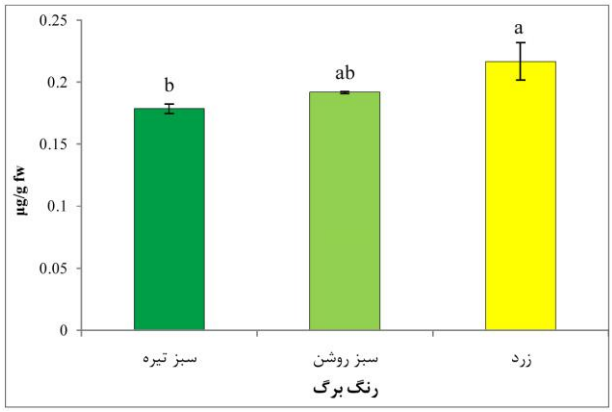


شکل ٤: محتوای پرولین در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند.

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است

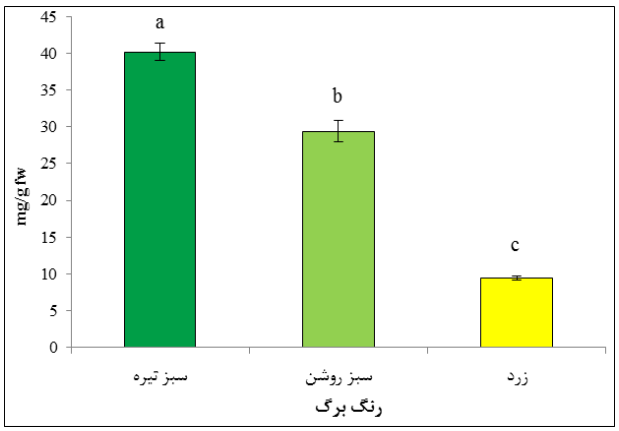
محتوای پرولین: نتایج نشان داد محتوای پرولین در برگ‌های زرد به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌های سبز تیره و روشن بود (شکل ٤).

محتوای اسیدهای‌آمینه آزاد: نتایج نشان داد برگ‌های زرد در مقایسه با برگ‌های سبزتیره، به‌طور معنی‌داری محتوای اسیدهای‌آمینه آزاد بیشتری بودند (شکل ٥).



شکل ٥: محتوای اسیدهای‌آمینه آزاد در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند.

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

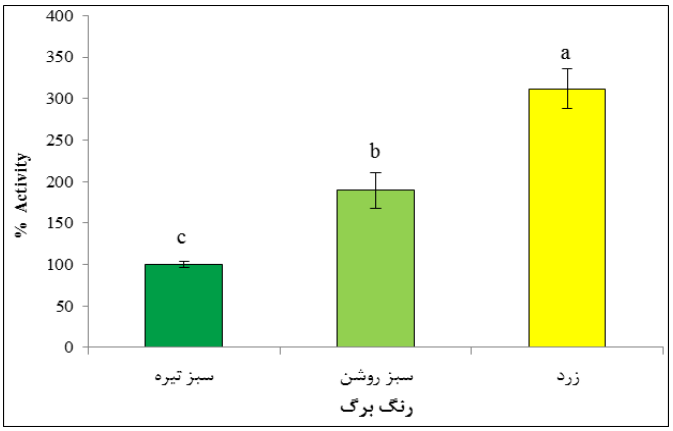


شکل ٦: محتوای ترکیبات فنلی آزاد در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند.

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است

محتوای ترکیبات فنلی آزاد کل: محتوای ترکیبات فنلی آزاد کل میان سه نوع برگ اختلاف معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در برگ‌های سبز تیره و کمترین مقدار در برگ‌های زرد مشاهده شد. برگ‌های سبز روشن نیز مقادیر حدواسطی نشان دادند (شکل ٦).

فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز میان سه نوع برگ اختلاف معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی در برگ‌های زرد و کمترین مقدار در برگ‌های سبز تیره مشاهده شد. برگ‌های سبز روشن نیز مقادیر حدواسطی نشان دادند (شکل ٧).



شکل ٧ : فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ‌های شمشاد طلایی. مقادیر میانگین ٤ تکرار ± SE هستند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ است.

بحث

H_2O_2 در شرایطی که تنش اکسیداتیو در بافت‌ها حاکم می‌شود تجمع حاصل می‌کند. در مطالعه حاضر با توجه به شکل ١، برگ‌های زرد بیشترین مقدار H_2O_2 را داشتند. برگ‌های سبز روشن نیز در مقایسه با برگ‌های سبز تیره محتوای H_2O_2 بیشتری داشتند. H_2O_2 یکی از گونه‌های اکسیژن فعال است که توسط واکنش‌های اکسیداتیو کلروپلاست و پراکسی‌زوم تولید شده و می‌تواند به عنوان اکساینده و کاهنده در سلول‌های گیاهی عمل کند. H_2O_2 پایدارترین شکل ROS است و به‌دلیل داشتن نیمه عمر نسبتاً طولانی و توانایی انتشار از عرض غشاءهای سلولی، مولکول مهمی محسوب می‌شود. گزارش‌ها نشان می‌دهند H_2O_2 در غلظت‌های غیرسمی به‌عنوان پیامبر ثانویه در مسیر علامت‌رسانی سلولی در گیاهان عمل کرده (Krishnamurthy and Rathinasabapathi, 2013) و تنظیم کننده بیان برخی از ژن‌ها مانند ژن‌های کدکننده آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین‌های دفاعی، پروتیین‌های علامت‌رسان و عوامل رونویسی است. H_2O_2 در پاسخ دفاعی تعدادی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شود. در دانه‌رست‌های شمشاد افزایش غلظت H_2O_2 در تیمار دمایی بالا به همراه افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده شده است (Jin et al., 2010). تولید زیاد H_2O_2 در شرایط تنش اکسیداتیو در گیاهان زیانبار بوده و H_2O_2 به‌عنوان یک اکسیدان قوی می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو سلول‌های برگی شده و منجر به اختلال عملکرد متابولیکی، کاهش پایداری غشاهای سلولی و نیز باعث تحریک پیری شود (Ahmad et al., 2008). افزایش میزان رادیکال‌ها در گیاه، نه تنها بوسیله افزایش تولید بلکه به دلیل ضعف عملکرد سیستم‌های آنتی‌اکسیدان نیز ممکن است حاصل شود

(Cheeseman, 2006). همانطور که در پژوهش قبلی (Chaparzadeh et al., 2016) نشان داده شده شدت نور در سرشاخه‌های شمشاد طلایی موجب کاهش شدید میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود. بدین ترتیب در مورد برگ‌های زرد و سبز روشن می‌توان گفت کمبود رنگیزه‌های کلروفیلی و کاروتنویید باعث تسریع انجام پدیده بازدارندگی نوری شده و محتوای H_2O_2 نسبت به برگ‌های سبز تیره افزایش می‌یابد.

پراکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند بوسیله رادیکال‌های آزاد راه‌اندازی شود. رادیکال‌های اکسیژن قادرند با اسیدهای چرب غیراشباع واکنش داده و باعث پراکسیداسیون چربی‌های غشاهای سلولی یا غشاهای اندامک‌های درون سلولی شوند (Nimse and Pal, 2015). با توجه به شکل ۲ محتوای TBARS در برگ‌های زرد و سبز روشن در مقایسه با برگ‌های سبز تیره بطور معنی‌داری بیشتر بود. به عبارت بهتر حساسیت برگ‌های زرد و سبز روشن به دلیل ضعف سیستم‌های آنتی‌اکسیدان به فرآیند آسیب چربی‌ها بالاست. پراکسیداسیون در غشاهای سلولی به افزایش نشت از سلول‌ها و تسریع دهیدراتاسیون و در نهایت به مرگ سلولی منجر می‌شود. آسیب به غشاهای درون سلولی نیز ممکن است فعالیت اندامک‌ها را تحت تاثیر قرار داده و باعث تخریب رنگیزه‌ها و کاهش توانایی تثبیت CO_2 شود.

در حضور مقادیر اندکی از یون‌های فلزی نظیر آهن و مس، H_2O_2 با رادیکال سوپراکسید واکنش داده و باعث تشکیل رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود. رادیکال هیدروکسیل به‌عنوان سمی‌ترین ROS باعث اکسیداسیون ترکیبات مهم سلولی می‌شود (Nimse and Pal, 2015). کاربرد H_2O_2 برون‌زا در برگ‌های برنج با افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید پیری برگ را تحریک می‌کند (Lin and Kao, 1998). همچنین نشان داده‌اند که در جهش یافته *npq1* آرابیدوپسیس کاهش زئاگزانتین به‌واسطه انباشتگی ROSباعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Muller-Moule et al., 2003). در تحقیق حاضر نیز افزایش محتوای TBAR در برگ‌های زرد و سبز روشن به موازات افزایش محتوای H_2O_2 را می‌توان به نقص سیستم آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت داد.

پراکسیداسیون چربی‌های غیراشباع بوسیله ROS اصلی‌ترین مسیر تخریب غشاهای سلولی است. افزایش تشکیل مالون‌دی‌آلدئید همراه با افزایش نشت الکترولیت‌ها و مواد محلول به کاهش پایداری غشاهای سلولی منجر می‌شود. در پژوهش حاضر (شکل۳)، شاخص پایداری غشاهای سلولی در برگ‌های زرد بطور معنی‌داری کمتر از برگ‌های سبز تیره و سبز روشن بود. نتایج مشابه در بخش‌های سفید برگ‌های آگاو ابلق در مقایسه با بخش‌های سبز مشاهده شده است (Deng, 2012). به‌عبارت بهتر غشاهای سلولی در برگ‌های زرد بسیار ناپایدار و آسیب دیده هستند. شاخص پایداری غشاهای سلولی معیاری دیگر برای تایید میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است. در مطالعات تنشی از این شاخص‌ها برای ارزیابی میزان تحمل به تنش و یا حتی تمایز گیاهان حساس و متحمل به تنش استفاده می‌شود (Chaparzadeh et al., 2014). بازدارندگی نوری از طریق القای تولید رادیکال‌های آزاد باعث تخریب غشا می‌شود. بنابراین، پایداری کم غشاهای سلولی بافت‌های برگ زرد را می‌توان به‌دلیل پراکسیداسیون زیاد چربی‌ها دانست.

در گیاهان عالی پرولین از گلوتامات یا اورنیتین ساخته می‌شود. تولید پرولین از شرایط تنشی بسیار متاثر می‌گردد. بیوسنتز و تجزیه پرولین توسط دو آنزیم کلیدی کنترل می‌شود (Fabro et al., 2004). بسته به اینکه شرایط حاکم بر گیاه کدام یک از این دو

مسیر را تحت تاثیر قرار دهد میزان پرولین در بافت‌ها افزایش یا کاهش می‌یابد. براساس نتایج این پژوهش (شکل٤) میزان پرولین برگ‌های زرد به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌های سبز تیره و سبز روشن بود. گزارشی از سنجش محتوای پرولین آزاد در برگ‌های غیرسبز در دست نیست. گیاهان می‌توانند پرولین آزاد را در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون مانند خشکی، شوری، سرما یا تابش مضر در بافت‌های گیاهی انباشته کنند. عقیده براین است که پرولین به عنوان یک اسمولیت سازگار، پایدار کننده پروتیین‌ها و جاروب کننده ROS عمل می‌کند (Puthur, 2016). انباشتگی جاروب کننده‌های ROS در بافت‌های گیاهی موجب حذف سریع H_2O_2 می‌گردد (Gould et al., 2002). میزان پرولین به دنبال بیان ژن سنتز کننده آن که به وسیله ROS در گیاهان طبیعی القا می‌شود افزایش می‌یابد (Fabro et al., 2004). پرولین نه تنها به‌عنوان یک محافظ اسمزی بلکه به‌عنوان یک ترکیب ذخیره‌ای برای کربن احیا شده و نیتروژن در این شرایط عمل می‌نماید. تیمار گیاهان با پرولین برون‌زا موجب افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو القا شده توسط شوری می‌گردد (Hasanuzzaman et al., 2014). باتوجه به یافته‌های فوق، به نظر می‌رسد تولید مقادیر زیاد پرولین در برگ‌های زرد به دلیل حساسیت زیاد این بافت برگی به بازدارندگی نوری و افزایش ROS اتفاق می‌افتد. احتمال دارد H_2O_2 از طریق القا آنزیم‌های سنتزکننده پرولین در برگ‌های زرد وظیفه حذف ROS را در این برگ‌ها انجام دهد.

محتوای اسیدهای آمینه به وسیله شرایط فیزیولوژیکی و ژنتیکی گیاهان و همچنین توسط تغییرات در نور تابشی و مرحله نموی گیاه تغییر می‌یابد (Szalai et al., 1997). اسیدهای آمینه آزاد اهمیّت زیادی در تغذیه گیاه دارند و باعث تحریک تشکیل کلروفیل، اکسین، ویتامین‌ها و سیستم‌های آنزیمی مختلف می‌شوند. با توجه به شکل ۵ محتوای اسیدهای آمینه آزاد برگ‌های زرد به طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌های سبز تیره و روشن بود. مقایسه کمی و کیفی اسیدهای آمینه آزاد در بافت‌های سبز و سفید برگ‌های تنباکوی ابلق نشان داده که بافت‌های سفید دارای محتوای اسیدهای آمینه آزاد بیشتری نسبت به بخش‌های سبز می‌باشند (Tanabe and Kawashima, 1982). در شرایط تنشی همانند تنش عناصر سنگین افزایش محتوای اسیدهای آمینه آزاد در گیاهان بیان شده‌است (Lutts and Lefevre et al., 2015). اهمیت سازشی تجمع اسیدهای آمینه در گیاهان عالی در طی دوره تنش ناشناخته باقی مانده است، اما به نظر می‌رسد که سلول آن‌ها را به عنوان اسمولیت برای سازگاری اسمزی استفاده کنند (Szalai et al., 1997). از طرفی در فرآیند پیری گیاهان، اسیدآمینه‌ها از تجزیه پروتئین‌ها حاصل و به عنوان شکل اصلی نیتروژن بازیافتی در برگ‌های پیر محسوب می‌شوند. افزیش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز در طی پیری دلیلی برای افزایش محتوای اسیدهای آمینه آزاد است (Diaz et al., 2006). می‌توان چنین ارزیابی کرد که افزایش غلظت اسیدهای آمینه آزاد در در برگ‌های زرد نسبت به برگ‌های سبزتیره به دلیل مهار سنتز و یا افزایش تجزیه پروتئین‌ها رخ می‌دهد.

ترکیبات فنلی به‌عنوان گروه بزرگی از فراورده‌های ثانویه، فعالیت‌های زیستی مختلفی را در گیاهان بر عهده دارند که از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جذب پرتوهای زیان‌بار فرابنفش را می‌توان نام برد. فنل‌ها به خاطر خاصیت الکترون دهندگی قادرند حذف ROS را انجام دهند. به همین دلیل این ترکیبات نقش اساسی در سلامتی و تغذیه انسان نیز دارند (Pandey and Rizvi, 2009). در مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی بیشتر از ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان و کاروتنوئیدها

است. در حالت کلی ویژگی تجمع ترکیبات فنلی در بافت‌های برگی به‌عنوان شاخصی برای دفاع شیمیایی گیاهان به شمار می‌رود (Edreva, 2005). تغییرات کمی و کیفی به هنگام تنش در ترکیبات فنلی برگ‌ها موجب بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Tattini et al., 2004). اختلاف معنی‌داری در محتوای ترکیبات فنلی میان ۳ نوع برگ شمشاد وجود داشت. برگ‌های زرد کمترین و برگ‌های سبز تیره بیشترین مقدار ترکیبات فنلی آزاد را به خود اختصاص دادند (شکل ٦). احتمال دارد کاهش ترکیبات فنلی در برگ‌های زرد به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیدازها (شکل۷) باشد زیرا این آنزیم‌ها از ترکیبات فنلی به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند. از طرف دیگر وجود یک افزایش در فلاونوئیدها در برگ‌های زرد (Chaparzadeh et al., 2016) می‌تواند یک نوع اولویت بندی در تولید متابولیت‌های ثانویه را نشان دهد. یک رابطه مثبت میان افزایش شدت نور و میزان ترکیبات فنلی گزارش شده است. در این شرایط تولید فراورده‌های ثانویه علاوه بر عملکرد حفاظتی آن‌ها، مکانیسمی برای مصرف کربن‌های اضافی تولید شده به شمار می‌رود. همچنین ثابت شده است که بافت‌های گیاهی در نواحی سایه ترکیبات فنلی کمتری دارند. یک توضیح احتمالی برای ارتباط میان شدت نور و تولید فنل‌ها فرضیه تخصیص منبع برای سنتز آن‌هاست. بر این اساس چنین استدلال می‌شود که کاهش در شدت نور منجر به کاهش میزان فتوسنتز و در نهایت منجر به کاهش تولید کربوهیدرات می‌شود. بنابراین کاهش اساسی در نسبت C/N در برگ‌های سایه، منجر به کاهش تولید فراورده‌هایی مانند ترکیبات فنلی می‌شود که اساس ساختاری آن‌ها کربن است (Mole et al., 1988). با توجه به اینکه غلظت کلروفیل یک شاخص مهم برای بازده فتوسنتزی است به روشنی می‌توان گفت میزان فتوسنتز در برگ‌های غیر سبز کمتر از برگ‌های سبز است. می‌توان چنین نتیجه گرفت که کمبود کلروفیل در برگ‌های غیرسبز منجر به کاهش کربن اختصاصی برای سنتز این متابولیت ثانویه می‌شود در صورتی که در برگ‌های سبز تیره چنین محدودیتی وجود ندارد.

پراکسیدازها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان حاوی گروه هِم می‌باشند که اکسیداسیون تک الکترونی سوبستراهای مختلف مانند پروتئین‌های دیواره سلولی، اکسین و ترکیبات فنلی مانند اسید بنزوئیک، فلاونول‌ها، سینامیل الکل‌ها و آنتوسیانین‌ها را با مصرف H_2O_2 کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها در واکوئل‌ها و دیواره‌های سلولی متمرکز می‌باشند. آن‌ها توسط خانواده بزرگ چند ژنی در گیاهان بیان می‌شوند که به همین دلیل ایزوزیم‌های مختلفی دارند. القا ایزوزیم‌های ویژه پراکسیدازها به عنوان پاسخ عمومی به تنش‌های محیطی گوناگون و پیری تلقی می‌شود. در تحقیق حاضر، بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی در برگ‌های زرد و کمترین مقدار در برگ‌های سبز تیره مشاهده شد (شکل۷). براساس تحقیقات، فعالیت پراکسیدازها در برگ‌ها در طی نمو سلول‌های گیاهی و در پاسخ به عوامل زیستی و غیرزیستی به شدت تنظیم می‌شود (Barcelo et al., 2003).

در جهش یافته *var2* آرابیدوپسیس مشخص شده است که بیشتر ژن‌های مربوط به فتوسنتز و عملکرد کلروپلاست در بخش‌های سفید متوقف شده‌اند ولی ژن‌های مربوط به تنش اکسیداتیو (سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات‌پراکسیداز) در آن‌ها تنظیم بالادست می‌شوند، در حالی که در بخش‌های سبز چنین اتفاقی نمی‌افتد (Miura et al., 2010). در برگ-های طلایی *Ficus microcarpa* فقدان فعالیت آنزیم دهیدروآسکوربات‌ردوکتاز که برای باز تولید آسکوربات از دهیدروآسکوربات (گلوتاتیون به عنوان دهنده الکترون) لازم است، وسیله تشخیص برگ‌های

طلایی از نوع وحشی بیان شده است (Yamasaki et al., 1999). با توجه به این یافته‌ها و نتایج ما در این تحقیق چنین ارزیابی می‌شود که کمبود رنگیزه‌های فتوسنتزی به ترتیب در برگ‌های زرد و سبز روشن موجب تنش اکسیداتیو شده و افزایش فعالیت پراکسیداز به عنوان سیستم دفاعی گیاهان در برابر ROSدر آن‌ها القا می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، در شمشاد طلایی نور موجب زرد رنگ شدن برگ‌های جوان راس شاخه‌ها می‌شود. این شرایط باعث تنش اکسیداتیو در این برگ‌ها شده و آنها را آسیب‌پذیرتر می‌کند. سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در جهت تقلیل آثار زیان‌بار عمل می‌نمایند تا برگ طی نمو از این حالت گذر نماید و با کسب ویژگی‌های جدید و انجام کارآمد فرآیند فتوسنتز به احتمال زیاد از حالت هتروتروف به اتوتروف تبدیل شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر حمایت مالی از این پژوهش، سپاسگزاری می نمایند.

References

Chaparzadeh, N., Safikhani, S. and Zarandi-Miandoab, L. (2016). Study of pigments markers in leaves of Japanese spindle (*Euonymus japonicus* Thunb.). Journal of Plant Environmental Physiology. 10(40): 13-20.

Ghodrati, M., Chaparzadeh, N. and Dilmaghani, K. (2014). Interactive effects of copper and ascorbic acid on some physiological characters in *Allium cepa* L. Iranian Journal of Plant Biology. 5(18):37-52.

Ahmad, P., Sarwat, M. and Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. Journal of Plant Biology. 51: 167-173.

Barcelo, A.R., Pomar, F., Lopez-Serrano, M. and Pedreno, M.A. (2003). Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. Functional Plant Biology. 30: 577-591.

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.

Chaparzadeh, N., Aftabi, Y., Dolati, M., Mehrnejad, F. and Pessarakli, M. (2014). Salinity tolerance ranking of various wheat landraces from the west of the Urmia saline lake in Iran by using physiological parameters. Journal of Plant Nutrition. 37(7): 1025-1039.

Cheeseman, J.M. (2006). Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. Journal of Experimental Botany. 57: 2435-2444.

Deng, B. (2012). Antioxidative response of Golden Agave leaves with different degrees of variegation under high light exposure. Acta Physiologiae Plantarum. 34: 1925-1933.

Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J.F. and Masclaux-Daubresse, C. (2006). Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology. 47(1): 74-83.

Edreva, A. (2005). The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. Agriculture, Ecosystems and Environment. 106(1&2): 135-146.

Esteban R., Fernandez-Marin B., Becerril J. and Garcia-Plzaola, J. (2008). Photoprotective implications of leaf variegation in *Erytronium dens-canis* L. and *Pulmonaria officinalis* L. Journal of Plant Physiology. 165(12): 1255-1263.

Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L. and Alvarez M.E. (2004). Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*.

the American Phytopathological Society. 17: 343-350.

Foudree, A., Putarjunan, A., Kambakam, S., Nolan, T., Fussell, J., Pogorelko, G. and Rodermel, S. (2012). The Mechanism of variegation in *immutans* provides insight into chloroplast biogenesis. Frontiers in Plant Science. 3: 260.

Gould, K.S., McKelvie, J. and Markham, K.R. (2002). Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H_2O_2 in red and green leaves after mechanical injury. Plant, Cell and Environment, 25: 1261-1269.

Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M. (2014). Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. BioMed Research International. 2014: 1-17.

Hu, F., Zhu, Y., Wu, W., Xie, Y. and Huang, J. (2015). Leaf variegation of thylakoid formation1 is suppressed by mutations of specific σ-factors in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 168(3): 1066-1075.

Jimenez-Francisco, B., Trejo, C., Zavaleta-Mancera, H., Moreno-Gómez, B., Garcia-Moya, E., Conde-Martnez, F. and Aguado-Santacruz, G. (2016). Ultrastructural and physiological characterization of YELP, a novel, yellow, chlorophyll-deficient cell mutant line that develops etioplast-like plastids in the light. American Journal of Plant Sciences. 7: 510-524.

Jin S.H., Li, X.Q., Zheng, B.S. and Wang J.G. (2010). Response of the photosynthesis and antioxidant systems to high-temperature stress in *Euonymus japonicus* seedlings. Forest Science. 56(2): 172-180.

Julkunen, R.T. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. Journal Agricultural and Food Chemistry. 33 (2): 213–217.

Krishnamurthy, A. and Rathinasabapathi, B. (2013). Oxidative stress tolerance in plants: novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. Plant Signaling and Behavior. 8(10): e25761.

Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M. (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum. 103(1): 1-7.

Lin, J.N. and Kao, C.H. (1998). Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 39: 161-165.

Lutts, S. and Lefevre, I. (2015). How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? Annals of Botany. 115(3): 509-528.

Miura, E., Kato, Y. and Sakamoto, W. (2010). Comparative transcriptome analysis of green/white variegated sectors in *Arabidopsis* yellow variegated2: responses to oxidative and other stresses in white sectors. Journal of Experimental Botany. 61: 2433-2445.

Mole, S., Ross, J.A.M. and Waterman, P.G. (1988). Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain forest plants. Journal of Chemical Ecology. 14: 1-21.

Muller, P., Li X. and Niyogi, K.K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology. 125(4): 1558-1566.

Muller-Moule, P., Havaux, M. and Niyogi, K.K. (2003). Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. Plant Physiology. 133: 748-760.

Nimse, S.B. and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances. 5(35): 27986-28006.

Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2(5): 270-278.

Pogorelko, G.V., Kambakam, S., Nolan, T., Foudree, A., Zabotina, O.A. and Rodermel S.R. (2016). Impaired chloroplast biogenesis in *immutans*, an arabidopsis variegation mutant, modifies developmental programming, cell wall composition and resistance to *Pseudomonas syringae*. Public Library of Science ONE. 11(4): e0150983.

Puthur, J.T. (2016). Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. South Indian Journal of Biological Sciences. 2(1): 9-13.

Shepherd, T. and Griffiths, W. (2006). The effect of stress on plant cuticular waxes. New Phytologist. 171: 469-499.

Szalai, G., Janda, T., Bartok, T. and Paldi, E. (1997). Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*). Physiologia Plantarum. 101: 434-438.

Takahashi, S., Tamashiro, A., Sakihama, Y., Yamamoto, Y., Kawamitsu, Y. and Yamasaki, H. (2002). High susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in the tropical plant *Ficus microcarpa* L.f.cv. golden leaves. BioMed Central Plant Biology. 2: 1-8.

Tanabe, Y. and Kawashima, N. (1982). Comparison of free and bound amino acids in white and green tissues of Variegated Tobacco plants. Plant and Cell Physiology. 23: 433-439.

Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. and Agati, G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. New Phytologist. 163(3): 547-561.

Yamasaki, H., Takahashi, S. and Heshiki, R. (1999). The tropical fig *Ficus microcarpa* L. cv. golden leaves lacks heat-stable dehydroascorbate reductase activity. Plant Cell Physiology. 40: 640-646.

Yamasaki, H., Heshiki, R. and Ikehara, N. (1995). Leaf-goldenning induced by high light in *Ficus microcarpa* L. a tropical fig. Journal of Plant Research. 108(2): 171-180.

Yu, J., Zhang, J. Zhao, Q., Liu, Y., Chen, S., Guo, H., Shi, L. and Dai, S. (2016). Proteomic analysis reveals the leaf color regulation mechanism in chimera *Hosta* "Gold Standard" leaves. International Journal of Molecular Sciences. 17: 346.