# تغییرات رنگدانه‌ای وابسته به سن در برگهای *Rosa hybrida*

**نادر چاپارزاده [۱و۲*]، لادن رحیم پور شفایی[۱]، میثم دولتی[۱] و ابوالفضل برزگر[۳]**

**۱ – تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، گروه زیست‌شناسی**

**۲ – تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان شورپسند**

**۳ - تبریز، دانشگاه تبریز، مرکز تحقیقات علوم پایه**

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۵

## چکیده

*Rosa hybrida* درختچه چند ساله‌ای است که بعد از قطع رأس ساقه، یک دوره رشدی جدید را شروع و طی آن جوانه های جانبی از تسلط انتهایی خارج شده وشروع به رشد می‌کنند. در هر دوره جدید از رشد ، برگهای جدید و جوان تشکیل می‌شوند. در این مطالعه ۴ نمونه برگی از رأس به سمت پایه، که نشانگر مرحله جوانی تا بلوغ می باشد، انتخاب و تعدادی نشانگر بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی رنگدانه ای مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که به هنگام بلوغ علاوه بر تفاوتهای ظاهری در شکل و اندازه برگ ها، برخی نشانگرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نیز تغییر می‌یابند. داده ها حاکی از افزایش میزان رنگدانه های فتوسنتزی کلروفیلی و کاروتنوئیدی، با افزایش سن برگ تا رسیدن به مرحله بلوغ به منظور بهبود کارایی دستگاه فتوسنتزی برگ انجام می باشد. کاهش تدریجی محتوای ترکیبات فنولی، آنتوسیانین ها و فلاونوئیدها با افزایش سن برگ مشاهده گردید. این نتایج بیانگر کاهش آسیبهای اکسیداتیو طی بلوغ برگی است.

واژه های کلیدی: رز چند رنگ، سن برگ، رنگدانه‌ها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۲-۴۳۲۷۵۴۱، پست الکترونیکی: nchapar@azaruniv.edu

## مقدمه

ویژگیهای فیزیولوژیکی برگها به سن و موقعیت آنها روی ساقه بستگی دارد. به دلیل اهمیت رنگدانه‌ها در فعالیت برگ، مطالعه محتوای رنگدانه‌ای می‌تواند اطلاعات خوبی در خصوص وضعیت فیزیولوژیکی برگها در اختیار ما قرار دهد. رنگدانه‌های گیاهی مانند کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها از نشانگرهای فیزیولوژیکی افزایش سن برگها بوده و همراه با نمو برگ و کلروپلاست‌ها، تولید آنها نیز به‌منظور تأمین انرژی مورد نیاز افزایش می‌یابد (۷). میزان کاروتنوئید برگها نشانه مستقیم حفاظت فتوسیستم‌ها از تابشهای با شدت بالا می‌باشد (۱).

غلظت ترکیبات فنولی که از مواد حفاظتی مهم سلول‌های گیاهی هستند به مراحل نموی برگ بستگی داشته و میزان زیادی از این ترکیبات در برگهای جوان یافت می‌شود (۲۷). فلاونوئیدها از ترکیبات مؤثر در پاسخ گیاهان به گستره وسیعی از عوامل محیطی بوده و به‌عنوان تنظیم کننده‌های نموی نیز شناخته شده‌اند (۳۰). به‌دلیل تولید $H_2O_2$ در شرایط تنشی و نیز طی متابولیسم عمومی گیاه و قابلیت انتشار آن، تجمع فلاونوئیدها یک نوع مکانیسم حفاظتی گیاه در مواجهه با $H_2O_2$ می‌باشد (۳۲).

همچنین گیاهان آنتوسیانین‌ها را به طور طبیعی طی دوره نموی خود یا به‌منظور مقاومت در برابر شرایط تنشی مانند شدت نور بالا و دمای کم انباشته می‌کنند (۸). از تغییرات قابل مشاهده در برگهای جوان تغییر رنگی است که تا رسیدن به مرحله بلوغ نشان می‌دهند، به طوری که برگهای



Archive of SID
www.SID.ir

جوان در رئوس رویشی جدید بیشتر گونه‌ها، ابتدا به رنگ قرمز آشکار و بتدریج با افزایش سن برگ سبز می‌شوند (۱۳). آنتوسیانینه بودن برگهای جوان و رنگی دیده شدن آنها تقریبا در تمام گونه‌های درختی مناطق استوایی قابل مشاهده است (۱۰). این رنگی بودن در گونه‌هایی که تأخیر سبز شدن را نشان می‌دهند، همراه با تولید کلروفیل و یا حتی مقدم بر آن می‌باشد (۸). آنتوسیانین‌ها در بافتهای در حال نمو به‌عنوان رقیق کننده‌های نوری عمل کرده و با جذب طول موج‌های پر انرژی آبی- سبز، لایه‌های سلولی زیرین را از تابش‌های شدید محافظت می‌کنند. این ویژگی برای برگهای رأس شاخه‌ها که در دوره بلوغ شدتهای نور بالاست، امتیاز بسیار سودمندی است (۱۱). به طور کلی، بررسی چگونگی تغییر ترکیباتی با توان آنتی‌اکسیدانی، مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها، می‌تواند اطلاعات مفیدی راجع به وضعیت سیستم آنتی اکسیدانی برگها طی بلوغ در اختیار ما قرار دهد. این مطالعه به‌منظور بررسی تغییراتی که به موازات افزایش سن برگ و تغییر رنگ آن، در گیاه *Rosa hybrida* رخ می‌دهد، انجام شد.

## مواد و روشها

**نمونه‌برداری:** در این مطالعه برگهای گیاه *Rosa hybrida* از خانواده Rosaceae به‌عنوان نمونه‌های مورد نظر انتخاب شدند. برای بررسی رفتارهای گیاهان در محیط رشد طبیعی آنها، از گیاهان رزی که در محوطه دانشگاه تربیت معلم آذربایجان (آذرشهر – آذربایجان‌شرقی) کشت شده بودند، استفاده گردید. در این گیاهان شاخه‌های فرعی که در فاز رویشی قرار داشته و هنوز وارد مرحله گل‌دهی نشده بودند انتخاب و برگهای رأسی این شاخه‌ها که در هر دو سطح به رنگ قرمز تند دیده می شدند، به‌عنوان جوانترین برگ (برگ شماره ۱) انتخاب گردید. با رفتن به سمت پایه و گذشت زمان، سن برگ افزایش می‌یابد، سطح رویی برگ (adaxial ) به رنگ سبز در آمده و سطح زیرین برگ (abaxial) به رنگ قرمز باقی می‌ماند. این برگ شماره ۲ نامیده شد. برگ شماره ۳ برگی است که سطح رویی کاملا سبز داشته و سطح زیری آن نیز به رنگ سبز روشن درآمده است. برگ شماره ۴ که برگ بالغ می‌باشد، نسبت به سه نمونه اول مسن‌تر بوده و در پایین‌ترین قسمت قرار دارد و در هر دو سطح کاملا سبز می‌باشد.

طی یک دوره رشد در *Rosa hybrida*، برگهای جدید برای اولین بار در فصل بهار ظاهر می‌شوند و در اوایل اردیبهشت می توان روی یک شاخه، همه برگها را در سنین مختلف، از تازه جوانه زده تا برگ بالغ مشاهده کرد. برای اطمینان از صحت نمونه‌برداری با استفاده از دستگاه SPAD که برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل برگ به کار می‌رود، میزان کلروفیل نمونه‌های موردنظر قبل از برداشت اندازه‌گیری شد. استفاده از این وسیله برای چنین بررسی هایی تأیید شده است (۲۰). از نمونه‌هایی که در معرض تابش نورخورشید بودند استفاده و تلاش شد از این نظر اختلافی بین نمونه‌ها وجود نداشته باشد. جمع‌آوری نمونه ها ساعت ۹ قبل از ظهر انجام می‌شد. این ۴ نمونه برگی از نظر تفاوت‌های کمی بیوشیمیایی رنگدانه‌ای با انجام آنالیزهای زیر بررسی و مقایسه گردیدند.

**سنجش کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها:** ۰/۲ گرم وزن تر هر نمونه برگی با ۱۰ میلی لیتر استن خالص در هاون سرد همگن گردید. عصاره حاصل بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور صاف شد. رسوب با ۵ میلی لیتر استن خالص شستشو و کار تکرار گردید. در طول موج‌های ۶۴۶، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر میزان جذب مایع رویی در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب‌ها در روابط زیر جاگذاری و مقادیر Chl*a* ، Chl*b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها محاسبه شد (۲۰). گزارش نهایی مقادیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شده است.

$$\text{Chlorophyll } \underline{a} \text{ (µg/ml)} = 12.21\ (A_{663}) - 2.81\ (A_{646})$$

$$\text{Chlorophyll } \underline{b} \text{ (µg/ml)} = 20.13\ (A_{646}) - 5.03\ (A_{663})$$

$$\text{Total chlorophyll (µg/ml)} = 20.2\ (A_{646}) + 8.02\ (A_{663})$$



Archive of SID
www.SID.ir

$$\text{Carotenoids } (\mu g/ml) = (1000A_{470} - 3.27(\text{chl a}) - 104(\text{chl b}))/227$$

**سنجش فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها:** ۰/۲ گرم وزن تر هر نمونه برگی با ۱۰ میلی لیتر حلال (متانول: ۷۹، آب مقطر: ۲۰، HCl :۱) سابیده شد. محلول به مدت ۷۲ ساعت در دمای صفر درجه در یخچال قرار داده شده و بعد در ۴۰۰۰ دور به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از صاف کردن، جذب عصاره در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر اندازه‌گیری و از رابطه $A_{530} - 0.24\ A_{657}$ برای به‌دست آوردن مقادیر جذب ویژه آنتوسیانین‌ها استفاده شد. از ضریب تصحیح ۳۰ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ برای محاسبه مقدار آنتوسیانین‌ها براساس مول بر گرم وزن تر برگ استفاده بعمل آمد (۲۳). میزان فلاونوئیدها براساس جذب در ۳۱۵ نانومتر گزارش شد.

**سنجش ترکیبات فنولی:** ۰/۲ گرم از نمونه‌های برگی تر با ۳ میلی لیتر متانول در هاون همگن و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ و دوباره رسوب با ۳ میلی لیتر متانول شستشو شد. بعد از سانتریفیوژ مجدد و صاف کردن، مایع رویی آن با قبلی مخلوط و برای سنجش ترکیبات فنولی استفاده شد. ۰/۱ میلی لیتر مایع رویی با ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر و ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۱۵٪ مخلوط شد. مخلوط حاصل را هم زده و ۳ دقیقه بعد ۱۰۰ میلی لیتر معرف فولین اضافه و دوباره هم زده شد. مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها در ۴۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته و بعد مدت ۱ ساعت در ۲۵ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگه داشته شدند. جذب محلول در طول موج ۷۵۰ nm اندازه‌گیری شد (۲۹). برای رسم منحنی استاندارد، محلول‌هایی از اسیدگالیک با غلظت‌های ۰/۵-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و جذب آنها در ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار نهایی فنول‌ها براساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ گزارش شد.

جدول ۱- تاثیر سن برگ بر محتوای رنگدانه های کلروفیلی و کاروتنوئیدی (میانگین ± SE) و نسبتهای آنها

| شماره برگ | Chl*a* mg/g F.W. | Chl*b* mg/g F.W. | Chl $_{tot}$ mg/g F.W. | Chl $_{tot}$ (SPAD) | Chl*a*/Chl*b* | Car mg/g F.W. | Car/Chl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۰/۳۹۰ $^{a}$ ±۰/۰۲۶ | ۰/۴۱۰ $^{a}$ ±۰/۰۳۷ | ۰/۸۴۱ $^{a}$ ±۰/۰۶۱ | ۱۱/۲۷۵ $^{a}$ ±۰/۷۲۶ | ۰/۹۷۰ $^{a}$ ±۰/۰۹۷ | ۰/۰۷۵ $^{a}$ ±۰/۰۰۴ | ۰/۰۹۴ $^{a}$ ±۰/۰۰۹ |
| ۲ | ۰/۶۴۷ $^{b}$ ±۰/۰۴۱ | ۰/۳۵۷ $^{ab}$ ± ۰/۰۵۹ | ۱/۰۳۰ $^{ab}$ ±۰/۰۴۹ | ۱۸/۳۰ $^{b}$ ±۰/۶۸۶ | ۱/۹۲۲ $^{ac}$ ±۰/۲۶۴ | ۰/۰۸۸ $^{a}$ ±۰/۰۰۵ | ۰/۰۸۸ $^{a}$ ±۰/۰۰۳ |
| ۳ | ۰/۹۲۶ $^{c}$ ±۰/۱۱۶ | ۰/۲۸۷ $^{ab}$ ±۰/۰۳۸ | ۱/۲۳۳ $^{b}$ ±۰/۰۸۹ | ۲۶/۹۰ $^{c}$ ±۰/۷۵۶ | ۳/۴۱۰ $^{bc}$ ±۰/۶۲۴ | ۰/۱۱۹ $^{b}$ ±۰/۰۰۵ | ۰/۰۹۱ $^{a}$ ±۰/۰۰۷ |
| ۴ | ۰/۹۵۹ $^{c}$ ±۰/۰۹۵ | ۰/۲۳۹ $^{b}$ ±۰/۰۲۸ | ۱/۲۰۵ $^{b}$ ±۰/۰۶۵ | ۲۹/۴۰ $^{d}$ ±۰/۹۹۲ | ۴/۱۷۵ $^{b}$ ±۰/۷۰۲ | ۰/۰۷۸ $^{a}$ ±۰/۰۱۰ | ۰/۰۶۴ $^{b}$ ±۰/۰۰۵ |
| $LSD_{٪۵}$ | ۰/۲۴ | ۰/۱۲۸ | ۰/۲۰۶ | ۲/۴۶۳ | ۱/۵۱۲ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۲۱ |

حروف متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.



Archive of SID
www.SID.ir

**بررسی آماری:** هر کدام از سنجشها برای هر نمونه ۴ بار تکرار و داده‌های حاصل از طریق نرمافزار SPSS 13 و به روش One-Way ANOVA تحلیل و معنی‌داری آنها در سطح احتمال ۵ درصد مشخص شد. نمودارها با نرم‌افزار Excel 2003 رسم شدند.

## نتایج

**محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها:** براساس جدول ۱ مقادیر کلروفیل *a* و کلروفیل کل افزایش معنی‌دار وابسته به سن از برگ ۱ تا ۳ برگ داشته ولی بین برگهای ۳ و ۴ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما مقدار کلروفیل *b* کاهش معنی‌داری را نشان نداد. نسبت کلروفیل *a/b* از برگ ۱ تا ۴ افزایش معنی‌داری نشان داد.

مقدار کاروتنوئیدها در برگ ۱ کم بود، ولی بتدریج با افزایش سن تا برگ ۳ به طور معنی‌داری افزایش یافت. در برگ ۴ کاهش مقدار کاروتنوئید نسبت به برگ ۳ مشاهده شد. نسبت کاروتنوئید به کلروفیل کل از برگ ۱ تا برگ ۳ معنی‌دار نبود، ولی بین برگ ۳ و برگ ۴ کاهش معنی‌داری دیده شد.

**محتوای آنتوسیانین‌ها:** طبق شکل شماره ۱، برگ شماره ۱ دارای بیشترین مقدار آنتوسیانین بود. میزان این رنگدانه تا برگ شماره ۴ به طور معنی‌داری روند کاهشی داشت.

**محتوای ترکیبات فنولی کل:** براساس نمودار ۲، غلظت کل ترکیبات فنولی از برگ ۱ تا برگ ۴ با افزایش سن کاهش معنی‌داری را نشان داد.

**محتوای فلاونوئیدها:** همان طور که در نمودار ۳ مشخص شده، مقدار این ترکیبات با افزایش سن برگ از برگ ۱ تا ۴ کاهش معنی‌داری را نشان داد.

## بحث

**کلروفیل‌ها:** متناسب با سن و موقعیت برگ روی شاخه، سطح برگ به تدریج افزایش یافته و همراه با آن تغییرات بیوشیمیایی برای تولید کلروپلاست‌های کاملا نمو یافته انجام می‌شود. براساس نتایج حاصل از SPAD و آنالیز شیمیایی (جدول ۱) با افزایش سن برگها میزان کلروفیل بشدت افزایش می‌یابد. افزایش کلروفیل کل برگ از مرحله جوانی تا بلوغ، در سیب‌زمینی (۲۵)، آفتابگردان (۲۸) و گیاه *Mentha pulegium* نیز مشاهده شده است (۶). در *Hedera helix* که برگ جوان و برگ بالغ نیز از نظر مورفولوژیکی متفاوتند، تغییری در میزان کلروفیل مشاهده نشده است (۳). جدول شماره ۱ افزایش میزان Chl*a* و کاهش جزئی Chl*b* را در *Rosa hybrida* نشان می‌دهد. در برگهای آفتابگردان از مرحله جوانی تا رسیدن به مرحله بلوغ نیز چنین تغییری مشاهده شده است (۵). مطالعه برگهای کلم در سنین مختلف نیز افزایش میزان Chl*a* را تا رسیدن به بلوغ نشان داده، ولی Chl*b* افزایش بسیار جزئی و میزان کلروفیل کل افزایش معنی‌دار داشته است (۱۷). تغییر میزان کلروفیل‌های *a* و *b* اغلب به صورت نسبت Chl*a* / Chl*b* بیان می‌شود. این نسبت طبق جدول شماره ۱ در *Rosa hybrida* افزایش نشان می‌دهد. نسبت بالای Chl*a* / Chl*b* افزایش مرکز فتوسیستم‌ها (Chl*a*) را نسبت به کمپلکس جمع‌آوری کننده نور ( Chl*b* + Chl*a* ) بیان می کند و به تعبیری دیگر بیانگر نسبت بالاتر PS I به PS II می‌باشد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که نسبت پائینی از Chl*a* / Chl*b* در کلروپلاست‌های در حال نمو با میزان پائین PSI / PSII هماهنگی دارد. کمبود PSI در کلروپلاست‌ها قبل از بلوغ با کمی میزان گرانوم‌های استرومایی که به طور طبیعی محل اصلی قرارگیری PSI هستند در ارتباط است، ولی با گذشت زمان و افزایش گرانوم‌های استرومایی میزان PSI و Chl*a* هم افزایش یافته و در نتیجه افزایش نسبت Chl*a* / Chl*b* اتفاق می‌افتد (۱۳). نسبت کم Chl*a* / Chl*b* در برگهای جوان آنتوسیانینه در مقایسه با برگهای سبز، نتیجه اثر سایه‌ای آنتوسیانین‌ها می باشد که آنتوسیانین‌ها با جذب قوی نور آبی- سبز باعث کاهش نور ورودی به برگها می‌شوند. سایه میزان



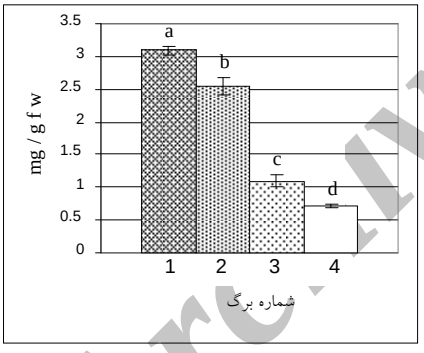
Archive of SID
www.SID.ir

رشد و نمو را به تأخیر انداخته و در نتیجه میزان Chl*a* را هم پائین نگه می‌دارد. برگهای سایه‌ای نازک‌تر بوده و غلظت پائینی از ترکیبات چرخه گزانتوفیل را هم نشان می دهند (۲۱). افزایش نسبت Chl*a* / Chl*b* از برگهای رأسی به سمت پایه در سه گونه آنتوسیانینی *styraciflua* (*Liquidambar* L.) و (*Cercis canadensis* L.) و ( *Acer rubrum* L.) گزارش شده است (۱۳).

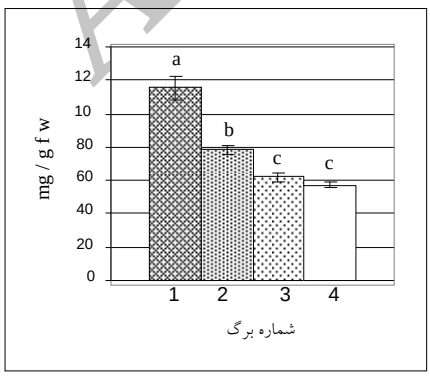
**کاروتنوئیدها:** ظرفیت تثبیت کربن در برگهای جوان تا رسیدن به مرحله بلوغ پائین است، بنابراین این برگها در مواجه با پرتوهای با انرژی بالا فقط کسری از انرژی دریافت شده را می‌توانند در واکنش‌های فتوشیمیایی استفاده کنند (۱۵). افزایش تدریجی مقدار کاروتنوئیدها در *Rosa hybrida*، مشابه با افزایش وابسته به سن میزان کاروتنوئیدها در برگهای *Mentha pulegium* می‌باشد (۶). کاروتنوئیدها از خاموش‌کننده‌های مهم حالت یکتایی کلروفیل و اکسیژن یکتایی محسوب می‌شوند. حضور و افزایش تدریجی آنها با افزایش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی برگ، باعث کاهش رادیکال‌های آزاد تولید شده در برگ شده و از این طریق آسیب مراکز واکنشی و غشاها کاهش می‌یابد. از طرفی کاروتنوئیدها ازجمله سیستم‌های دفاعی هستند که بتدریج و با بلوغ برگ، جایگزین سیستم دفاعی آنتوسیانینی برگ جوان می‌شوند. کاهش میزان کاروتنوئیدها بعد از بلوغ برگی احتمال تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهد (۶). در آفتابگردان، افزایش میزان کاروتنوئیدها از برگ جوان تا برگ بالغ گزارش شده است (۲۸).

**نسبت کاروتنوئیدها به کلروفیل کل:** از نسبت کاروتنوئیدها به کلروفیل کل برای بیان حفاظت نوری به وسیله کاروتنوئیدها (گزانتوفیل‌ها) طی بلوغ دستگاه فتوسنتزی برگها استفاده می‌شود (۱۳). بر طبق نتایج جدول شماره۱، نسبت کاروتنوئیدها به کلروفیل کل در *Rosa hybrida*روند کاهشی بسیار جزئی داشته و تنها در برگ ۴ کاهش معنی‌داری وجود دارد که می‌تواند به دلیل افزایش محتوای کلروفیل کل در این برگ باشد. این وضعیت نشان می‌دهد در برگ جوان قرمز، اثرات زیان‌آور فوتون‌های با انرژی بالا می‌تواند به وسیله تجمع رنگدانه‌های غیرفتوسنتزی و غربال‌کننده نور مانند آنتوسیانین‌ها جبران شود. اما در مورد درختان جنگلی مناطق معتدله نسبت کاروتنوئیدها به کلروفیل در برگهای جوان سبز در مقایسه با برگهای بالغ سبز بیشتر می‌باشد که فعالیت بالای چرخه گزانتوفیل‌ها در برگهای جوان بالا مانع آسیب دستگاه فتوسنتزی می‌شود (۱۹).

**آنتوسیانین‌ها:** طبق نمودار ۱ محتوای آنتوسیانین از برگ ۱ تا ۴ در *Rosa hybrida* کاهش می‌یابد. برگهای نابالغ به دلایل مختلفی همانند ساختار کلروپلاستی نابالغ و میزان کم آنزیم‌های فتوسنتزی نسبت به شدت‌های بالای نور حساسند (۱۳).



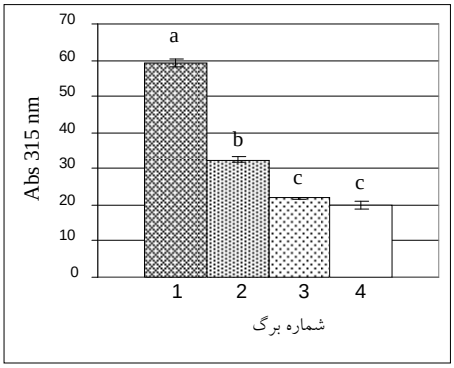

نمودار ۱- تاثیر سن برگ بر محتوای آنتوسیانین‌ها ( میانگین ± SE)




نمودار ۲- تاثیر سن برگ بر محتوای ترکیبات فنولی کل ( میانگین ± SE)



Archive of SID
www.SID.ir




نمودار ۳- تاثیر سن برگ بر محتوای فلاونوئیدها ( میانگین ± SE)

در شدت‌های نوری بیش از ظرفیت فتوسنتزی، جذب بالای طول موجهای آبی- سبز (۵۰۰-۶۰۰ نانومتر) توسط آنتوسیانین‌ها، برگ را از بازدارندگی نوری و آسیب به فتوسیستم‌ها محافظت می‌کند (۱۴). برگهای جوان در حال رشد *Hedera helix*، از نظر فتوسنتزی به سرعت اشباع می‌شوند و حتی در شدت‌های نوری پائین، بازدارندگی نوری در آنها اتفاق می‌افتد. بنابراین ویژگی رقیق‌سازی نوری آنتوسیانین‌ها برای این برگها از نظر تنظیم نور دریافتی بسیار مؤثر است (۱۲). در شدت‌های نوری طبیعی توزیع عمومی آنتوسیانین‌های گیاهی بیشتر در روپوست بالایی بوده (۱۴) و وجود روپوست زیرین ارغوانی در برخی از گیاهان سازش یافته به محیط‌های با نور کم، حکایت از نقش آنتوسیانین‌ها به‌عنوان منعکس‌کننده‌های طول موج قرمز دارد که از سطح رویی وارد برگ شده و کارایی گیرندگی نوری را در شدت‌های پائین نور افزایش می‌دهند. این عملکرد برای توضیح حضور آنتوسیانین‌ها در سطح زیرین برگ در محیطی با شدت نور بالا کافی نیست، زیرا در این صورت آنتوسیانین‌ها می‌توانند با افزایش انعکاس نور، حتی باعث بازدارندگی نوری شوند (۱۴). به نظر می‌رسد آنتوسیانین‌های هر دو سطح رویی و زیرین برگ *Rosa hybrida* به‌عنوان کاهنده نوری عمل نموده و مانع بازدارندگی نوری می‌شوند. در *Mangifera indica* (۱) و *Gazania splendens* کمبود آنتوسیانین‌ها در برگ بالغ نسبت به برگ جوان، به مهار بیوسنتز آنها نسبت داده شده است (۷). در *Cotyledon orbiculata* که برگ جوان قرمز و برگ بالغ سبز رنگ دارد میزان آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدهای برگ جوان بیشتر می‌باشد که با بلوغ برگ مکانیسم‌های حفاظتی دیگری غیر از کاروتنوئیدها، مانند مومها جایگزین مکانیسم حفاظتی کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌شوند (۱۴). در *Rosa hybrida* در برگهای جوان میزان آنتوسیانین‌ها و در برگهای بالغ غلظت کاروتنوئیدها بیشتر است. احتمال دارد نیاز به فعالیت بالای چرخه گزانتوفیل‌ها در برگهای جوان به وسیله حضور بالای آنتوسیانین‌ها جبران و برگهای جوان به‌رغم ظرفیت پائین چرخه گزانتوفیل‌ها به علت داشتن آنتوسیانین‌ها نسبت به برگهای بالغ بدون آنتوسیانین، در برابر بازدارندگی نوری مقاوم‌تر شوند. غربال نوری توسط آنتوسیانین‌ها اجازه می‌دهد کلروپلاست جوان تا رسیدن به حالت بلوغ از تابش‌های آسیب‌رسان محافظت شود. این نتایج همان‌طور که اشاره شد، با نتایج مشاهده شده در مورد برگهای جوان سبز گونه‌های مناطق معتدله در تضاد است (۱۹). در اینجا نقش آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین‌ها نیز می‌تواند مطرح باشد. از آن‌جایی که بین گونه‌های فعال اکسیژن تنها $H_2O_2$ قابلیت انتشار به واکوئل‌ها را که محل حضور آنتوسانین‌هاست دارد، بنابراین در شرایط تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن، واکوئل‌های غنی از آنتوسیانین برگ جوان می‌تواند محل سم‌زدایی $H_2O_2$ باشد (۱۳).

**ترکیبات فنولی کل:** نمودار ۲ کاهش میزان ترکیبات فنولی کل را با افزایش سن در برگهای *Rosa hybrida* نشان می دهد. سنتز ترکیبات فنولی تنظیم نموی دارد و از طرفی باتوجه به القای سنتز ترکیبات فنولی توسط پرتو UV و شدت‌های نوری بالا، پیش‌بینی می‌شود غلظت فنول‌ها طی تشکیل جوانه‌های برگی و نیز در مرحله‌ای که برگها با نور فراوان مواجه می شوند زیاد باشد. (۱۶). این تنظیم با تغییر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL ) قابل پیگیری می‌باشد (۲۲). در مرحله جوانی به علت عدم بلوغ سیستم فتوسنتزی امکان آسیب‌دیدگی در برابر تابشهای زیاد وجود



Archive of SID
www.SID.ir

داشته و برگها برای اجتناب از تنشهای زیستی و غیرزیستی، غلظت آنزیم PAL را برای سنتز بیشتر ترکیبات فنولی بالا می‌برند. با افزایش سن و میزان ماده خشک برگ تا رسیدن به بلوغ، غلظت ترکیبات فنولی کاهش می‌یابد. البته نقش آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در دفاع از گونه‌های فعال اکسیژن را نباید نادیده گرفت. در *Catha edulis* (۳۱) و سیب‌زمینی (۱۶) کاهش میزان ترکیبات فنولی از برگهای رأسی به سمت برگهای پائین مشاهده شده است. این کاهش به علت گسترش برگ و افزایش ماده خشک است که باعث رقیق‌سازی و کاهش غلظت فنول‌ها می‌شود (۱۶). در برگهای گلابی (۲) و رقم *Golden Delicious* سیب (۲۲) نیز روند کاهشی وابسته به سن برگ ترکیبات فنولی گزارش شده است.

**فلاونوئیدها:** کاهش تدریجی وابسته به سن در فلاونوئیدهای برگی *Rosa hybrida* مشاهده گردید (نمودار ۳). با توجه به حساسیت بالای دستگاه فتوسنتزی در برگهای جوان نسبت به برگهای بالغ، احتمال می‌رود تجمع فلاونوئیدها در برگهای جوان نتیجه بالا بودن فعالیت آنزیم PAL و تنظیم بالادست ژنهای مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها باشد که این تنظیم در مراحل مختلف نمو برگ متفاوت است (۲۶). تجمع فلاونوئیدها مکانیسمی حفاظتی برای برگها در مقابل نور شدید و گونه‌های فعال اکسیژن بیان می‌شود. کاهش تدریجی فلاونوئیدها در نتیجه افزایش زی توده و یا ناشی از کاهش نیاز به سیستم آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدی طی نمو برگ می‌باشد که با افزایش سایر ترکیبات شیمیایی دفاعی مانند کاروتنوئیدها یا آسکوربات همراه می‌باشد و مشخص شده طی نمو برگ بین میزان فلاونوئیدها و محتوای آسکوربات برگ ارتباط منفی وجود دارد (۳۲). در برگهای رأسی سیب‌زمینی (۲۴)، *Nasturtium officinale* و *Sinapis alba* محتوای فلاونوئیدی بالا در اپیدرم برگ جوان گزارش شده که نتیجه افزایش فعالیت رونویسی ژن رمز کننده آنزیم PAL و دیگر ژنهای لازم برای بیوسنتز فلاونوئیدها بوده است (۲۶). در دو گونه *Inga goldmanii* و *Inga umelifera* نیز برگهای جوان در مقایسه با برگهای بالغ محتوای فلاونوئیدی بیشتری داشته اند. کاهش بعدی مقادیر آن به افزایش زی‌توده و نه کاهش محتوای خود فلاونوئیدها نسبت داده شده است (۴).

در کل می‌توان چنین ارزیابی نمود که طی فرایند بلوغ، برگهای رژ همزمان با تغییر رنگ ظاهری از نظر محتوای رنگدانه‌ای هم دستخوش تغییرات می‌شوند. افزایش محتوای کلروفیلی باعث افزایش کارایی فتوسنتزی برگها شده و همراه با این تغییرات، افزایش محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها باعث افزایش توان آنتی‌اکسیدانی برگها می‌گردد.

## منابع


1. Ali K., Koeda K. and Nii N. 1999. Changes in anatomical features, pigment content and photosynthetic activity related to age of Irwin Mango leaves. Journal of Japanese Society of Horticultural Science, 68: 1090-1098.
2. Andreotti C., Costa G. and Treutter D. 2006. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. Scientia Horticulturae, 109: 130–137.
3. Bauer H. and Bauer U. 1980. Photosynthesis in leaves of the juvenile and adult phase of ivy (*Hedera helix*). Physiologia Plantarum, 49: 366-372.
4. Brenes-Arguedas T., Horton M., Coley P., Lokvam J. and Waddell R. 2006. Contrasting mechanisms of secondary metabolite accumulation during leaf development in two tropical tree species with different leaf expansion strategies. Oecologia, 149: 91–100.
5. 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




Archive of SID
www.SID.ir

senescence. Physiologia Plantarum, 128: 175–185.

6. Candan N. and Tarhan L. 2003. Changes in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Mentha pulegium*. Turk Journal of Chemistry, 27: 21-30.

7. Cevahir G., Yentur S., Yazgan M., Ünal M. and Yilmazer N. 2004. Peroxidase activity in relation to anthocyanin and chlorophyll content in juvenile and adult leaves of "MINI-STAR" *Gazania splendens*. Pakistan Journal of Botany, 36: 603-609.

8. Chalker-Scott L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochemistry and Photobiology, 70: 1-9.

9. Cui M., Vogelmann T.C. and Smith W.K. 1991. Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. Plant, Cell and Environment, 14: 493–500.

10. Dominy N.J., Lucas P.W., Ramsden L.W., Riba-Hernandez P., Stoner K.E. and Turner I.M. 2002. Why are young leaves red? Oikos, 98: 163–176.

11. Gould K.S. 2004. Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 5: 314–320.

12. Hoflacher H. and Bauer H. 1982. Light acclimation in leaves of the juvenile and adult life phases of ivy (*Hedera helix*). Physiologia Plantarum, 49: 366–372.

13. Hughes N.M., Morley C.B. and Smith W.K. 2007. Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. New Phytologist**,** 175: 675–685**.**

14. Hughes N.M., and Smith W.K. 2007. Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. American Journal of Botany, 94: 784–790.

15. Jiang C., Li P., Gao H., Zou Q., Jiang G. and Li L. 2005. Enhanced photoprotection at the early stages of leaf expansion in field-grown soybean plants. Plant Science, 168: 911–919.

16. Laitinen M., Julkunen-Tiitto R. and Rousi M. 2002. Foliar phenolic composition of European white birch during bud unfolding and leaf development. Physiologia Plantarum, 114: 450-460.

17. Lefsrud M., Kopsell D., Wenzel A. and Sheehan J. 2007. Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. Scientia Horticulturae, 112: 136–141.

18. Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350–83.

19. Manetas Y., Drinia A. and Petropoulou Y. 2002. High contents of anthocyanins in young leaves are correlated with low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition. Photosynthetica, 40: 349–354.

20. Manetas Y., Grammatikopoulos G. and Kyparissis A. 1998. The use of the portable, non-destructive, SPAD-502 (Minolta) chlorophyll meter with leaves of varying trichome density and anthocyanin content. Journal of Plant Physiology, 153: 513-516.

21. Manetas Y., Petropoulou Y., Psaras G.K. and Drinia A. 2003. Exposed red (anthocyanic) leaves of *Quercus coccifera* display shade characteristics. Functional Plant Biology, 30: 265–270.

22. Mayr U., Treutter D., Santos-Buelga C., Bauer H. and Feucht W. 1995. Developmental changes in the phenol concentrations of Golden Delicious apple fruits and leaves. Phytochemistry, 38: 1151–1155.

23. Murray J.R and Hackett W.P. 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. Plant Physiology, 97: 343–351.

24. Poethig R.S. 2003. Phase change and regulation of developmental timing in plants. Science, 301: 334-336.

25. Polatti A.D., Dalmas F.R. and Astarita L.V. 2009. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. Biological Research, 42: 205-215.

26. Reifenrath K. and Muller C. 2007. Species-specific and leaf-age dependent effects of ultraviolet radiation on two Brassicaceae. Phytochemistry, 68: 875–885.

27. Rice-Evans C., Miller N.J and Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2: 152-159.

28. Sairam R.K., Singh D.V. and Srivastava G.C. 2003. Changes in activities of antioxidant



Archive of SID

www.SID.ir

enzymes in sunflower leaves of different ages. Biologia Plantarum, 47: 61-66.

29. Singleton V.L. and Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.

30. Stafford H.A. 1991. Flavonoid evolution: an enzymic approach. Plant Physiology, 96: 680–685.

31. Vinokur Y., Levi A., Feygenberg O. and Rodov V. 2008. Hydrophilic and lipophyllic antioxidant capacity and content of phenolic compounds in fresh khat leaves (*Catha edulis Forsk*.).Ethnobotanical leaflets, 12: 557-564.

32. Yamasaki H., Sakihama Y. and Kehara N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against $H_2O_2$. Plant Physiology, 115: 1405-1412.

# Age dependent changes of pigments in *Rosa hybrida*

**Chaparzadeh N.[1,2], Rahimpour L.[1], Dolati M.[2] and Barzgar A.[3]**

**[1] Biology Dept., Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran**

**[2]Halophyte Biotechnology Center, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran**

**[3]Research Institute for Fundamental Sciences, Tabriz University, Tabriz, I.R. of Iran**

## Abstract

*Rosa hybrida* is a perennial plant that after cut off head of the stem, lateral buds become free from apical dominance and begin to growth. In each new period of growth, new and young leaves can be formed. The four leaf samples were numbered from apex to base, showing young to mature leaf stages and some biochemical pigment markers changes were studied. The results suggest that during maturation, in addition to morphological differences, some physiological and biochemical markers are change. Data showed age dependent increase in the amount of pigments such as chlorophylls and carotenoids to reach the stage of leaf maturity to improve the leaf photosynthetic system efficiency. Gradually reducing in content of phenolic compounds, anthocyanins and flavonoids suggest reduction on oxidative damage.

**Keywords**: *Rosa hybridus*, leaf age, pigments.

Archive of SID



www.SID.ir