

اثر آلودگی محیطی دوده روی تغییر کربوهیدراتها و فعالیت آنزیمهای وابسته در منبع

MELISA OFFICINALIS در گیاه ملیسا (SOURCE)، ساقه و مقصد (SINK)

حیدرعلی مالمیر* و الهام کاویانی مقدس

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۳

چکیده

اندامهای منبع و مقصد نقش مهمی در توازن بین تولید و مصرف قند دارند. در این آزمایش متابولیسم کربوهیدراتها و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آنها در برگهای جوان (مقصد)، پیر(منبع) و ساقه گیاه ملیس بعد از اینکه گیاه متعدد در تیمار دوده قرار گرفت بررسی شد. نتایج نشان داد دوده مقدار ساکارز و ریاسکوز را در ساقه و مقصد کاهش و در منبع افزایش داد $P \leq 0.05$. مقدار قندهای وریاسکوز، گلوکز، فروکتوز در مقصد بیشترین مقدار را دارند و دوده آنها را کاهش داد $P \leq 0.05$. قندی‌های مانند نشاسته، رافینوز و مالتوز با دوده دهی در مقصد افزایش و در منبع و ساقه کاهش یافتند $P \leq 0.05$. میزان قندهای استاکیوز، ساکارز و وریاسکوز در ساقه بیشتر از منبع و مقصد است و دوده مقدار آنها را کاهش داده $P \leq 0.05$ و میزان قندهای محلول با دوده‌ی در مقصد افزایش یافت. با مقایسه چند قندیها دوده دهی مقدار ساکارز و استاکیوز را بیشتر از مالتوز، رافینوز و وریاسکوز تغییر داده $P \leq 0.05$ و دوده فعالیت آنزیم SS را در مقصد ابتدا افزایش سپس کاهش یافت $P \leq 0.05$. رگرسیون بین فعالیت آنزیم SS و سنتز ساکارز در منبع $R^2 = 0.65$ همبستگی با روند افزایشی نشان داد. رگرسیون بین فعالیت آنزیم SPS و سنتز ساکارز در منبع $R^2 = 0.52$ همبستگی با روند افزایشی نشان داد. به نظر می‌رسد افزایش ساکارز در منبع با فعالیت آنزیم SPS در منبع مرتبط است. به همین دلیل مقدار ساکارز در منبع و ساقه کاهش یافت. یا شاید متابولیسم ساکارز در مقصد بیشتر آسیب دیده است که یا فعالیت آنزیم SS از الگوی تعادل بین میزان سنتز و مصرف ساکارز پیروی می‌کند. دوده فعالیت آنزیم اینورتاز اسیدی AI را در منبع کاهش و در مقصد افزایش داد، همچنین دوده فعالیت آنزیم اینورتاز بازی Alk را در منبع و مقصد کاهش داد $P \leq 0.05$ ، این دو آنزیم در شکستن ساکارز دخالت دارند. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم اینورتاز اسیدی AI با کاهش مقدار ساکارز در مقصد مرتبط باشد. نتایج نشان داد در ساقه مقدار قندهای استاکیوز، ساکارز و ریاسکوز بیشتر از سایر قندها است و دوده مقدار آنها را سریع کاهش داده است $P \leq 0.05$. از طرفی دوده قندهای ذخیره‌ای در مقصد را افزایش داده است. بنابراین دوده با اختصاص منابع کربن به متابولیت‌های ثانویه بصورت قندهای ذخیره‌ای در مقصد میزان رشد را کاهش داده است.

واژه‌های کلیدی: دوده، کربوهیدراتها در منبع و مقصد، آنزیم‌های وابسته به کربوهیدراتها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۱۸۲۵۷۴۰۲، پست الکترونیکی: Malmir1970@gmail.com

مقدمه

به آلودگی هوا پاسخ می‌دهند. آلودگی اتمسفری به درجات متفاوت در گیاهان روی جابجایی مواد بین بخشهای مختلف ریشه و بخشهای هوایی و ساقه موثر است (۱). گیاهان بطور نسبی از نظر عملکرد فرایندها به بخشهای مختلف محل تولید و مصرف تقسیم می‌شوند.

آلودگی هوا یک تنش محیطی جدی برای محصولات گیاهی است. آلودگی هوا سبب تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک برگ‌گشت‌پذیر و غیربرگ‌گشت‌پذیری در گیاهان می‌شود. تحقیقات نشان داده گیاهان با کاهش سطح برگ و بیوماس، کاهش فعالیت فتوسنتزی و کاهش مواد خشک

(۲۰). ساکارز نقش مرکزی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در گیاهان ایفا می‌کند. با در نظر گرفتن موقعیت ساکارز به عنوان قند انتقالی مکانیسم‌های وجود دارد که از یک سو تولید ساکارز در منبع با تهیه فرآورده فتوسنتزی در کلروپلاست و در سیتوپلاسم از سوی دیگر با درخواست‌های فرایند مقصد تنظیم می‌کند. شکستن ساکارز به ویژه در دو شرایط اهمیت دارد، به این صورت که ساکارز شکل اصلی انتقال کربن در بیشتر گیاهان است که کربن را به بافت‌های مقصد انتقال می‌دهد. بعضی از مقاصد انتقال ساکارز بافت‌های هستند که منابع کربن ساکارز را ذخیره می‌کنند. بنابراین قبل از مصرف باید شکسته شوند و به ترکیبات ذخیره تبدیل شوند. بنابراین شکستن ساکارز یا در سیتوپلاسم و یا در اپوپلاست صورت می‌گیرد. برخی گیاهان اسیمیلانها را به صورت قندهای الکلی یا الیگوساکاریدهای خانواده استاکیوز و رافینوز از برگ‌ها به اندام‌های مقصد صادر می‌شوند. آنزیم‌های متعددی در تشکیل و شکستن قندها دخالت دارند. ساکارز در سیتوپلاسم از منبع هگزوز منو فسفات از طریق فعالیت‌های سه آنزیم سنتز می‌شود. این سه، آنزیم عبارتند از UDP-گلوکز پیروفسفریلاز، ساکارز فسفات سنتاز و ساکارز فسفاتاز را می‌سازند. در واکنش شکستن ساکارز نیز دو آنزیم دخالت دارند. آنزیم ساکارز سنتاز هست که تولید UDP-گلوکز فروکتوز می‌کند. آنزیم دیگر انورتازها هستند که ساکارز را شکسته و تولید فروکتوز و گلوکز می‌نمایند. انواع انورتاز وجود دارند که از نظر فعالیت pH بهینه و محلشان در سلول متفاوت هستند. یکی انورتاز قلیایی است که بیشینه فعالیت آن در pH=7 است و در سیتوپلاسم وجود دارد (۱۵ و ۱۶). آنزیمی که قند استاکیوز را سنتز می‌کند استاکیوز سنتاز نام دارد. فعالیت این آنزیم نقش مهمی در قسمت بندی میزان کربن بین دو فرآورده آن یعنی قند ساکارز و استاکیوز دخالت دارد. تشکیل استاکیوزیک روند پیچیده است به این صورت که ابتدا آنزیم قند رافینوز را توسط α -گالاکتوسیداز هیدرولیز

محل تولید که نقش منبع یا source دارند شامل قسمتهای از گیاه هستند که مواد غذایی تولید می‌کنند. بخشهای دیگری از گیاه هست که این مواد را مصرف و یا ذخیره می‌کنند، این قسمتها محل مصرف یا Sink نامیده می‌شوند. جابجایی مواد بین منبع و مقصد اهمیت زیادی روی رشد گیاهان دارد. یکی از مهمترین فرایندهای فیزیولوژیکی که با تنش آلودگی هوا ارتباط دارد فعالیت منبع در تشکیل کربوهیدرات می‌باشد. تنش آلودگی هوا از طریق تأثیر بر عوامل روزنه ای و غیرروزنه ای در بافت‌های منبع مخصوصاً برگ‌ها باعث کاهش تشکیل کربوهیدرات آنها و در نتیجه کاهش قدرت منبع در تولید تشکیل کربوهیدرات و در نهایت کاهش عملکرد می‌شود (۲ و ۱۴). در فرایند فتوسنتز قند ساخته می‌شود. در واقع مسیری است که به وسیله آن تمام موجودات زنده فتوسنتزکننده Co2 را در نهایت به کربوهیدرات تبدیل می‌کنند. در گیاهان کربوهیدراتها به اشکال مختلف مانند نشاسته، قندهای الکلی، ساکارز و انواع قندها را برای ذخیره به مدت طولانی یا برای تولید انرژی مصرف می‌کنند. البته بعضی از گیاهان مقادیر زیادی پروتئین یا روغن را نیز تولید می‌کنند. برخی از واکنش‌ها در درون کلروپلاست رخ می‌دهند در حالیکه در موارد دیگر این واکنشها در سیتوپلاسم سلول انواع بافت‌های از قندهای ساخته شده و صادر شده از کلروپلاست صورت می‌گیرد (۲۱). پلی ساکاریدها فراوان ترین ترکیبات گیاهی هستند، با وجود این اهمیت آنها از نظر فراوانی نیست، بلکه اهمیت آنها به واسطه فرایندها و کارکردهای است که انجام می‌دهند. چون این ترکیبات منبع انرژی برای رشد و نمو هستند. از طرفی موجب سنتز ترکیبات متعدد ساختاری دیواره سلولی گیاه می‌شوند. ساکاریدها حد واسط‌های تولید می‌کنند که برای سنتز ترکیبات مختلف سلولی مانند هورمون‌ها، پروتئین و چربی بکار می‌روند. ذخایر قندی در گیاهان متفاوت است و در بیشتر گیاهان به صورت ساکارز (دوقندی)، رافینوز (سه قندی)، وریاسکوز (چهارقندی) و استاکیوز (پنج قندی) و نشاسته (چند قندی) می‌باشند

آزمایش در سال ۹۵-۹۴ در باغ گیاهان دارویی استان همدان انجام شد. در این آزمایش گازوئیل، نفت کوره و چوب را در بخاری با هم مخلوط و سوزانده و دوده تولید شد با کیسه پلاستیکی جمع آوری شد. گیاهان ملیس در داخل گلخانه پلاستیکی تحت تیمار دوده قرار گرفتند، بطوریکه غلظت دوده در طول آزمایش برای تمام تیمارها یکسان بود. همه گلدانها به غیر از نمونه شاهد تحت تیمار دوده قرار گرفت، نمونه اول بعد از گذشت ۳ ساعت، نمونه های بعدی در زمانهای ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ ساعت از داخل محفظه خارج شد و در هوای آزاد قرار گرفتند. در این آزمایش نمونه ها سه بار به ترتیب با زمانهای ذکر شده به فاصله ۵ روز تیمار شدند و پس از ۲۰ روز همه نمونه‌ها برداشت شده و پارامترهای مورد نظر اندازه گیری شد.

نمونه برداری گیاهی: گیاهان ۲۰ روز پس از تیمار، به طور کامل برداشت شدند، سپس با آب مقطر سه بار شستشو داده شده و برگهای جوان (مقصد)، برگهای پیر (منبع) و ساقه از هم جدا شدند. از هر نمونه ۵ گرم وزن تر جدا شده و برای اندازه گیری، ساکارز فسفات سنتاز sucrose phosphate synthetize (SPS)، ساکارز سنتاز sucrose invertase and alkaline (SS)، اینورتازها invertase (اینورتاز اسیدی و قلیایی)، استاکیوز سنتتاز stachiose snthetase (STS)، و کربوهیدرات های غیرساختاری (گلوکز و فروکتوز=یک قندی ساکارزولاکتوز و مالتوز=دو قندی رافینوز=سه قندی استاکیوز=چهارقند و ریباکوز=۵ قندی) استفاده شد.

استخراج آنزیم های SPS (EC 2.4.1.14) و (EC Winter و SS (2.4.1.13) از ماده گیاهی: از روش همکاران (2000) برای استخراج آنزیم‌های SPS (EC 2.4.1.14) و (EC 2.4.1.13)SS از ماده گیاهی استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه های گیاهی برداشت شده در هاون در دمای ۰ درجه سانتی گراد در بافر Heps-NaOH (۵۰ میلی مولار، pH=7.5) تهیه شده به نسبت ۱:۵ (حجم/

کرده که نتیجه آن قند ساکارز و مالتوز تشکیل می شود (۹). عوامل آلاینده با شدت و ضعف روی گیاهان تأثیر دارند. در اکثر موارد نوع ماده آلاینده، غلظت آلاینده، میزان حساسیت گیاه در مقابل مواد آلاینده، نحوه ترکیبات و تجمع با سایر مواد آلایندها، مرحله رشد اندام‌های گیاه و وضعیت اندام‌های کربن گیری مانند روزنه‌ها دخالت دارند (۱۹). در این تحقیق گیاه بادرنجبویه یا ملیس (*Melissa officinalis*) بخاطر خواص دارویی و نقش ترکیبات قندی که در کیفیت ماده موثر دارویی گیاه دخالت دارد، بطوریکه چای بادرنجبویه ویژگی‌های آنتی اکسیدانی دارد و قند خون را تنظیم می‌کند. از طرف دیگر شرایط رویشی مناسب گیاه انتخاب شد. کیفیت ماده موثر گیاهان دارویی که در درمان بیماری مهم هست و به این مکانیسم بر می‌گردد که پس از ساخته شدن قندها در فرایند فتوسنتز چقدر این کربن تثبیت شده صرف رشد و نمو گیاه می‌شود. چقدر به ریشه و یا چقدر از این مواد صرف تشکیل ساقه یا بنیان گذاری برگ های جدید می‌شود. از طرف دیگر چقدر از کربن تثبیت شده به مصرف مواد دیگر اصطلاحاً به متابولیت‌های ثانویه اختصاص پیدا می‌کند. انتظار هست با افزایش تنش اختصاص منابع به انواع قندها تغییر کند و بخش بیشتری از مواد به متابولیت‌های ثانویه اختصاص یابد. بنابراین اختصاص منابع کربن در کمیت و کیفیت قندها در بخشهای منبع، ساقه و مقصد بسیار مهم است. برگهای پیر که طول عمر بیشتری دارند و در تولید کربوهیدرات نقش دارند به عنوان منبع، ساقه سیستم انتقال و نوک ساقه و برگهای جوان به عنوان مقصد در نظر گرفته شده است. در این تحقیق اثر دوده دهی مدت‌دار به صورت متناوب روی تغییرات مقدار انواع قندها و فعالیت آنزیمهای SPS، SS، AI، ALKI و STS که در ساختن و شکستن کربوهیدراتها روی گیاه ملیس در منبع و مقصد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

استخراج اینورتازاسیدی (EC 3.2.1.26) و اینورتاز قلیایی (EC 3.2.1.27): مقدار ۵/۰ گرم از نمونه گیاهی سرد شده در هاون روی یخ سرد با استفاده از بافر آسیاب شد. بافر جهت استخراج متشکل از K_2HPO_4, KH_2PO_4 (M 0/2) با pH=7 و ۲- مرکاپتو اتانول (۲۰ میلی مولار مطابق روش Marshal و همکاران (۱۹۸۸) تهیه و استخراج شد (۱۵). محتویات استخراج شده با پارچه ملام صاف شدند، سپس به لوله‌های فالكون منتقل و مخلوط نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰۰ دور سانتریوفوز گردید. محتویات جهت اندازه‌گیری پروتئین محلول و فعالیت آنزیم در یخچال گذاشته شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اینورتازاسیدی (EC 3.2.1.26) و قلیایی (EC 3.2.1.27): برای اندازه فعالیت اینورتاز اسیدی و قلیایی از روش marshal و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد (۱۵). برای سنجش فعالیت آنزیم اسید اینورتاز ابتدا یک لوله آزمایش برداشته مقدار ۰/۶ میلی لیتر بافر استات سدیم (M ۰/۱، pH=4.5) و ۰/۲ میلی لیتر ساکارز (M ۰/۷۵) به داخل لوله آزمایش ریخته سپس مقدار ۰/۲ میلی لیتر از عصاره بدست آمده را به لوله آزمایش اضافه می‌کنیم و در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گذاشته می‌شود. به مدت ۳۰ دقیقه اجازه داده شد تا واکنش ادامه یابد و در ادامه براساس روش miao (۲۰۰۷) با افزودن ۱ میلی‌لیتر معرف اسید دی‌نیتروسالیسیلیک به محتویات لوله‌ها واکنش متوقف شد (۱۲). در این واکنش قندهای احیاء آزاد شده و مقدار گلوکز آزاد شده تعیین شدند. به جای بافر استات سدیم از بافر استات پتاسیم (M ۰/۱، pH = 7.0) K_2HPO_4 استفاده شد.

سنجش آنزیم STS و پروتئین: برای اندازه فعالیت آنزیم STS از روش هابر و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد. فعالیت STS به طور معمول در مخلوط‌های واکنشی که حاوی ۵۰ میلی‌میلی لیتر HEPES-NaOH (pH= 7/0)، ۱ میلی‌میلی لیتر DTT، ۱۰ میلی‌میلی لیتر گالاکتینول، ۵۰ میلی لیتر رافینوز و

وزن)، که حاوی $MgCl_2$ (۵ میلی‌مولار)، Na-EDTA (۱ میلی‌مولار)، DTT (۲ میلی‌مولار)، BSA (۰/۵ میلی گرم در ۱ میلی لیتر) و X100=triton به نسبت (۰/۵ درصد در واحد حجم/حجم) کاملاً له شدند. بعد از صاف کردن نمونه‌ها با پارچه ملام لوله‌های فالكون حاوی مخلوط نمونه در دور ۱۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوز شدند. عصاره به دست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای (SS، SPS) و پروتئین محلول با استفاده از روش برادفورد (۱۹۷۶) در یخچال نگهداری شدند (۲۰).

سنجش فعالیت آنزیم SPS (EC 2.4.1.14) و SS (EC 2.4.1.13): روش winter و همکاران (2000) برای سنجش فعالیت ساکارز فسفات سنتاز مورد استفاده قرار گرفت. در این روش میزان تشکیل ساکارز وابسته به میزان واکنش Fru6P با UDP-Glc در حضور آنزیم SPS هست. ابتدا یک لوله آزمایش برداشته مقدار ۱۵ میکرولیتر از بافر Hepes-NaOH (۵۰ میلی مولار با pH= 7/5)، ۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مولار)، ۱۰ میکرولیتر Fru6P (۲۵ میلی‌مولار)، ۱۰ میکرولیتر Glc6P (۲۵ میلی‌مولار) و ۴۰ میکرولیتر UDP-Glc (۲۵ میلی‌مولار)، و عصاره استخراج شده اضافه می‌کنیم و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده در حمام آب گرم با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گذاشته می‌شود. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس با افزودن ۷۰ میکرولیتر KOH ۳۰ درصد (w/v) واکنش خاتمه یافت. برای نمونه شاهد از مخلوط آنزیمی با KOH در ۰ دقیقه استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و میزان فعالیت آنزیم براساس مقدار تشکیل ساکارز در نمونه مجهول تعیین شد. فعالیت ساکارز سنتاز مطابق با نمونه تعیین شد، فقط در مخلوط واکنش از فروکتوز (۲۵ میلی مولار) به جای Fru6P استفاده شد. برای نمونه شاهد از مخلوط آنزیمی ساکارز سنتاز با KOH در ۰ دقیقه استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و میزان فعالیت آنزیم براساس مقدار تشکیل ساکارز در نمونه مجهول تعیین شد.

گلیسرول به محلول اضافه شد و نمونه‌ها با در نیتروژن مایع به سرعت منجمد شدند. پس از خروج از نیتروژن مایع از عصاره اتانولی هریک از نمونه‌ها برای تفکیک و اندازه‌گیری قندهای استاکیوز، ورباسکوز، رافینوز، فروکتوز، گلوکز، ساکارز و مالتوز در برگ و ریشه با استفاده از دستگاه (HPLC, Germany, Knuer) با ستون (EURO H (Kat در دمای ستون ۲۵ درجه سانتیگراد و فاز متحرک آب میلی‌کیو با واکنش شیمیایی ۲ با جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و دتکتور RI اندازه‌گیری شد. جمع‌آوری و پردازش millennium داده‌های کروماتوگرافی توسط نرم‌افزار Excel انجام شد. برای تجزیه آزمون آماری از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۰ و برای بررسی نتایج از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد.

نتایج

مقایسه مقدار قند‌ها در برگ‌های پیر (source)، جوان (sink) و ساقه: اندازه‌گیری‌های مقدار کربوهیدرات‌ها متناسب با استانداردها در کروماتوگرام تعیین شد و نتایج نشان داد با افزایش زمان دوده دهی قندها به صورت متفاوت در برگ‌های پیر، جوان و ساقه تغییر یافتند که در بیشتر موارد معنی‌دار است.

مالتوز: مقدار قند مالتوز در برگ‌های پیر بیشتر از برگ‌های جوان و ساقه ($P \leq 0.05$) (شکل ۱) است. با افزایش زمان دوده دهی میزان قند مالتوز در برگ‌های پیر به شدت افزایش یافت ($P \leq 0.05$). تغییر مقدار مالتوز در ساقه و برگ‌های جوان معنی‌دار نبود.

فروکتوز: مقدار قند فروکتوز در برگ‌های جوان بسیار بیشتر از برگ‌های پیر و ساقه است ($P \leq 0.05$) (شکل ۲). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند فروکتوز در برگ‌های جوان به شدت کاهش یافت ($P \leq 0.05$). با افزایش زمان دوده دهی مقدار فروکتوز در برگ‌های پیر کاهش یافت ($P \leq 0.05$). تغییر فروکتوز در ساقه ناچیز است.

۳ تا ۳۰ pkat فعالیت آنزیمی در حجم نهایی ۶۰ میکرولیتر بودند، تعیین شد. محتویات در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و به مدت ۵ دقیقه جوشانده و واکنش پایان یافت. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی با استفاده از رزین‌های تبادل یونی (Dowex 50-100 H⁺-form، mesh: 50WX8، فرمت فرمت، Sigma) یونیزه شد. تشکیل استاکیوز توسط HPLC با تشخیص آمپرومیلی لیتریک پالسی (Sunnyvale, Dionex, DX 500, CA) بر روی ستون CarboPac PA10 (۲۵۰ × ۴ میلی‌میلی لیتر، Dionex) با ۱۰۰ میلی‌میلی لیتر NaOH به عنوان شوینده با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر دقیقه بررسی شد. (۳۰ درجه سانتیگراد). برای تعیین فعالیت GOS، آماده‌سازی آنزیمی با ۲۰ میلی‌میلی لیتر d-ononitol و ۱۰ میلی‌میلی لیتر گالاکتینول انکوبه شدند. محصولات واکنش توسط HPLC با تشخیص آمپرومیلی لیتریک پالسی بر روی ستون CarboPac MA1 (۲۵۰ × ۴ میلی‌میلی لیتر، دیونکس) با ۱۰۰ میلی‌میلی لیتر NaOH با سرعت جریان ۰/۴ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد جدا شدند. هویت محصولات واکنش توسط GC-MS بررسی شد. غلظت پروتئین با BSA به عنوان استاندارد، با استفاده از روش اتصال رنگ برادفورد (آزمایش پروتئین، Bio-Rad) برآورد شد.

تعیین مقدار کربوهیدرات‌های غیر ساختاری: برای اندازه‌گیری مقدار انواع قندها به روش HPLC با درجه بالا به روش Gobbet (۲۰۰۲) انجام شد (۷). برای هریک از تیمارها مقدار ۳۰ گرم از برگ‌های پیر، جوان و ساقه گیاه ملیس بصورت همگن در ۳-۲ C° با ۰/۱ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (pH= 7/6) حاوی ۰/۳ میلی‌لیتر مانتول، 0.01 MgCl₂، 0.02 EDTA میلی‌لیتر، سیستین-0.02 HCl میلی‌لیتر، ۰/۰۲ میلی‌لیتر DIECA و ۱۰ درصد TritonX-100 در آسیاب همگن شد. سپس نمونه‌ها از طریق دو لایه پارچه ممل صاف شدند. نمونه صاف شده در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از این مرحله، ۲۰ درصد (v/v)

صورتیکه ساکارز کاهش یافت $P \leq 0.05$. مقایسه انواع قندها در ساقه (با افزایش زمان دوده دهی مقدار انواع قندها در ساقه) کاهش یافت (شکل ۹). مقایسه انواع قندها در منبع با افزایش زمان دوده دهی مقدار همه قندها به شدت در منبع کاهش یافت $P \leq 0.05$. (شکل ۱۰).

نشاسته: مقدار نشاسته در برگهای پیر بسیار بیشتر از برگهای جوان و ساقه است $P \leq 0.05$ (شکل ۱۱). با افزایش زمان دوده دهی مقدار نشاسته در برگهای پیر به شدت کاهش یافت $P \leq 0.05$. با افزایش دوده دهی مقدار نشاسته در برگهای جوان به مدت ۱۲ ساعت دوده دهی تغییری نداشت سپس در ادامه با افزایش زمان دوده دهی ۱۵ تا ۱۸ ساعت کاهش یافت $P \leq 0.05$.

فعالیت آنزیم SPS: میزان فعالیت آنزیم SPS در برگهای پیر بیشتر از برگهای جوان است $P \leq 0.05$ (شکل ۱۲). با افزایش زمان دوده دهی تا ۹ ساعت فعالیت آنزیم SPS در برگهای پیر و جوان افزایش یافت $P \leq 0.05$ ، و این افزایش در برگهای پیر بیشتر از برگهای جوان است $P \leq 0.05$. با ادامه افزایش زمان دوده دهی فعالیت آنزیم SPS در برگهای پیر و جوان کاهش یافت $P \leq 0.05$.

فعالیت آنزیم SS: میزان فعالیت آنزیم SS در برگهای جوان بسیار بیشتر از برگهای پیر است $P \leq 0.05$ (شکل ۱۳). با افزایش زمان دوده دهی تا ۱۲ ساعت فعالیت آنزیم SS در برگهای جوان افزایش یافت $P \leq 0.05$ ، سپس با افزایش زمان دوده دهی ۱۵ تا ۱۸ ساعت این فعالیت کاهش یافت $P \leq 0.05$. با افزایش زمان دوده دهی فعالیت آنزیم SS در برگهای پیر روند کاهشی داشت.

فعالیت آنزیم اسید اینورتاز AI: میزان فعالیت آنزیم AI در برگهای جوان بسیار بیشتر از برگهای پیر است $P \leq 0.05$ (شکل ۱۴). با افزایش زمان دوده دهی تا ۶ ساعت فعالیت آنزیم AI در برگهای جوان افزایش یافت $P \leq 0.05$. سپس با افزایش زمان دوده دهی از ۶ تا ۱۲ ساعت فعالیت آنزیم AI در برگهای جوان کاهش یافت $P \leq 0.05$. با افزایش زمان دوده

گلوکز: مقدار گلوکز در برگهای جوان بسیار بیشتر از برگهای پیر و مقدار گلوکز ساقه بسیار ناچیز است $P \leq 0.05$ (شکل ۳). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند گلوکز در برگهای جوان و پیر به شدت کاهش یافت $P \leq 0.05$ ، و این کاهش در جوان بیشتر از برگهای پیر است $P \leq 0.05$.

استاکیوز: مقدار قند استاکیوز در ساقه بسیار بیشتر از برگهای پیر و جوان است $P \leq 0.05$ (شکل ۴). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند استاکیوز در ساقه کاهش یافت $P \leq 0.05$. با افزایش زمان دوده دهی مقدار استاکیوز در برگهای پیر و جوان کاهش یافت $P \leq 0.05$.

رافینوز: مقدار رافینوز در برگهای پیر بیشتر از ساقه و در ساقه بیشتر از برگهای جوان است $P \leq 0.05$ (شکل ۵). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند رافینوز در برگهای جوان افزایش یافت $P \leq 0.05$ ، در حالیکه مقدار رافینوز در برگهای پیر و ساقه کاهش یافت که این کاهش در ساقه بیشتر از برگهای پیر است $P \leq 0.05$.

ساکارز: مقدار ساکارز در ساقه بسیار بیشتر از برگهای پیر و جوان است $P \leq 0.05$ (نمودار-۶). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند ساکارز در ساقه کاهش یافت $P \leq 0.05$. با افزایش زمان دوده دهی مقدار ساکارز در برگهای پیر کاهش و در برگهای جوان افزایش یافت $P \leq 0.05$.

ورباسکوز: مقدار ورباسکوز در برگهای جوان بسیار بیشتر از ساقه و در ساقه بیشتر از برگهای پیر است $P \leq 0.05$ (شکل ۷). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند ورباسکوز در برگهای پیر، جوان و ساقه کاهش یافت $P \leq 0.05$ ، بطوریکه این کاهش در برگهای پیر بیشتر از برگهای جوان و ساقه است $P \leq 0.05$.

مقایسه انواع قندها در مقصد: با مقایسه مقدار انواع قندها در مقصد به ترتیب فروکتوز = گلوکز < ساکارز < رافینوز < استاکیوز است (شکل ۸). با افزایش زمان دوده دهی مقدار قند گلوکز و فروکتوز در مقصد افزایش یافت $P \leq 0.05$. در

پیر کاهش یافت $P \leq 0.05$. با افزایش زمان دوده دهی فعالیت آنزیم STS در برگهای جوان روند افزایش داشت $P \leq 0.05$.

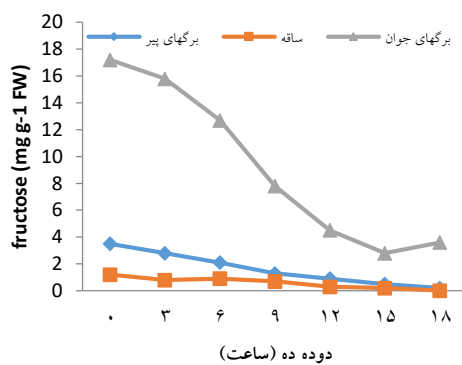
بحث و نتیجه گیری

تغییر غلظت کربوهیدراتها در منبع (source) و مقصد (sink) و سیستم انتقال: گزارشهای زیادی نشان داده اثرات آلاینده های هوا روی گیاهان دامنه وسیعی از آسیبها را در بر می گیرد و بطور عمده بیشتر روی فرایند فیزیولوژیکی مرتبط با متابولیسم کربن تأثیر گذار هستند. آلاینده های جوی میزان فتوسنتز در واقع تثبیت کربن را با توجه به روند رشد گیاه کاهش می دهند (۱۱).

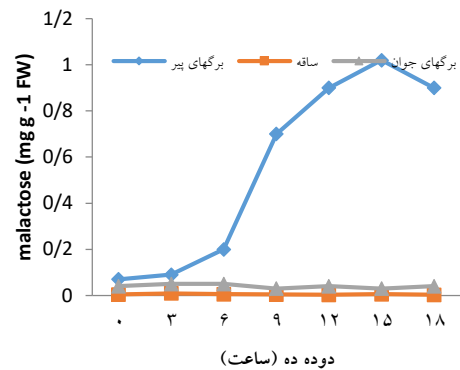
دهی فعالیت آنزیم AI در برگهای پیر روند افزایشی دارد $P \leq 0.05$.

فعالیت آنزیم اینورتاز قلبایی alkaline in میزان فعالیت آنزیم alkaline in در برگهای جوان بیشتر از برگهای پیر است $P \leq 0.05$ (شکل ۱۵). با افزایش زمان دوده دهی فعالیت آنزیم alkaline in در برگهای پیر و جوان افزایش یافت $P \leq 0.05$.

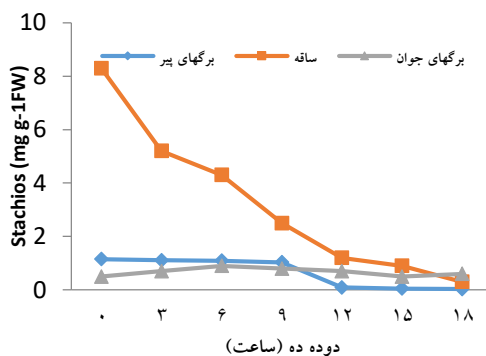
فعالیت آنزیم STS: میزان فعالیت آنزیم STS در برگهای پیر بسیار بیشتر از برگهای جوان است $P \leq 0.05$ (شکل ۱۶). با افزایش زمان دوده دهی تا ۴ ساعت فعالیت آنزیم STS در برگهای پیر افزایش یافت $P \leq 0.05$. سپس با افزایش زمان دوده دهی از ۶ تا ۱۲ ساعت فعالیت آنزیم STS در برگهای



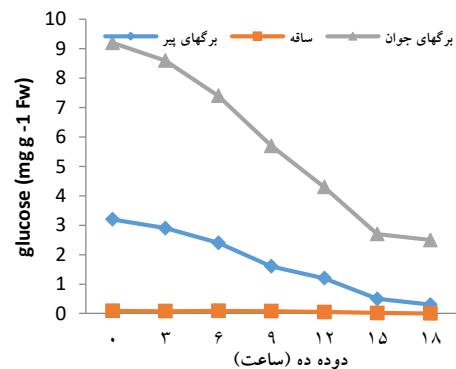
شکل ۲- اثر دوده دهی روی تغییرات قند فروکتوز $sd=2.3$



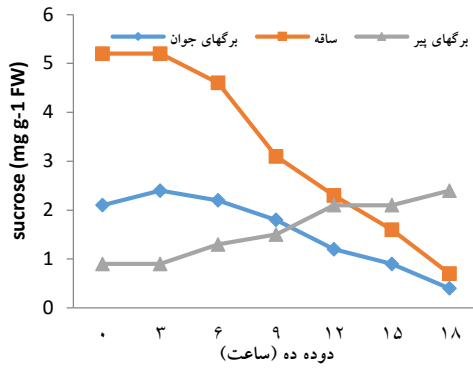
شکل ۱- اثر دوده دهی روی تغییرات قند مالتوز $sd=0.18$



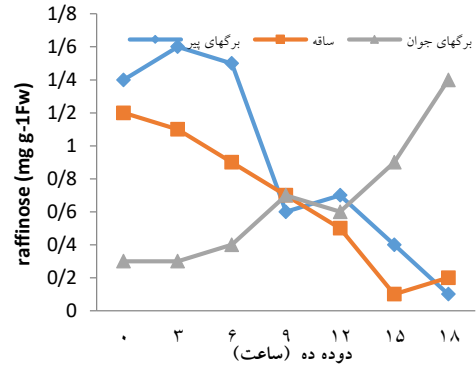
شکل ۴- اثر دوده دهی روی تغییرات قند استاکیوز $sd=0.78$



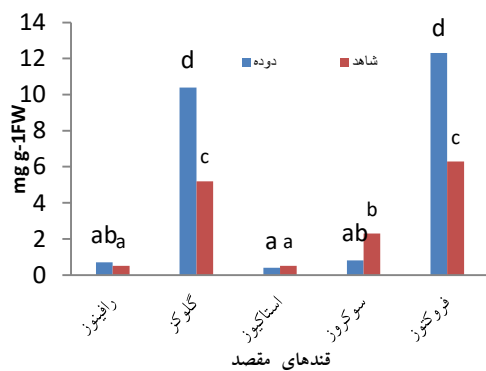
شکل ۳- اثر دوده دهی روی تغییرات قند گلوکز $sd=0.94$



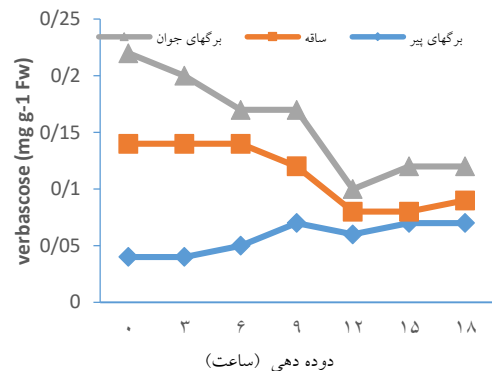
شکل ۶- اثر دوده دهی روی تغییرات قند ساکارز $sd=1.05$



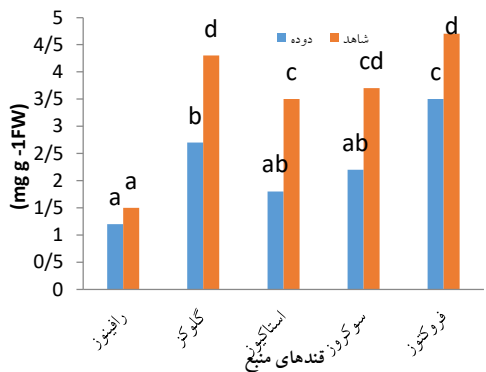
شکل ۵- اثر دوده دهی روی تغییرات قند رافینوز $sd=0.15$



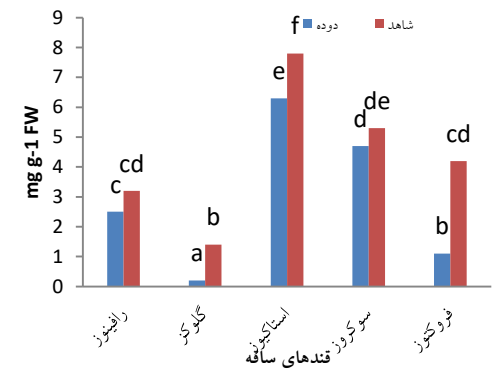
شکل ۸- تغییر قندها در برگهای جوان (مقصد)



شکل ۷- اثر دوده دهی روی تغییرات قند ورباسکوز $sd=0.02$



شکل ۱۰- تغییر قندها در برگهای پیر (منبع)



شکل ۹- تغییر مقدار قندها در ساقه

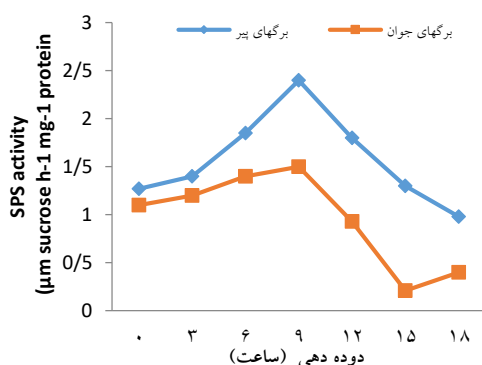
فروکتوز بسیار بیشتر از گلوکز است که با نتایج Bu chi و همکاران (۱۹۹۸) همخوانی دارد. ساکارز نقش مرکزی را در متابولیسم کربوهیدرات در گیاهان ایفا می‌کند.

ساکارز از ترکیبات دو قندی است و شکل اصلی انتقال کربن در گیاه است که اثرات باز دارندگی روی اکثر فرایندهای بیوشیمیایی ندارد و فاقد خاصیت احیا کنندگی است

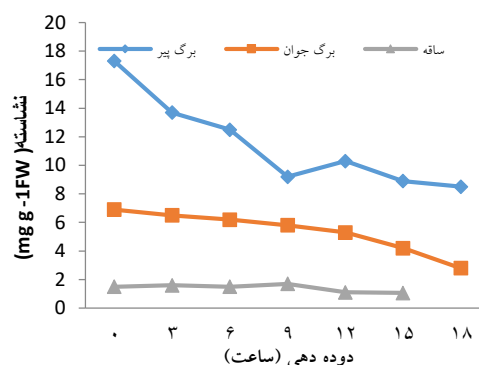
نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش زمان آلودگی مقدار قندهای شش کربنه یا مونوساکارید شامل فروکتوز و گلوکز که با هم مجموع قندهای محلول را تشکیل می‌دهند، در منبع و مقصد کاهش می‌یابد. با مقایسه این دو قند مقدار فروکتوز در منبع و مقصد بیشتر از گلوکز است. تغییر مقدار این دو قند در منبع تقریباً مساوی ولی در مقصد مقدار

از سایر قندها تغییر کرده که احتمالاً بخاطر تغییر در مکانیسم‌های که از یک سو تولید ساکارز را در سیتوپلاسم با تهیه فراورده فتوسنتزی در کلروپلاست و از سوی دیگر با درخواست‌های فرایند مقصد تنظیم می‌کنند (۱۵ و ۱۷).

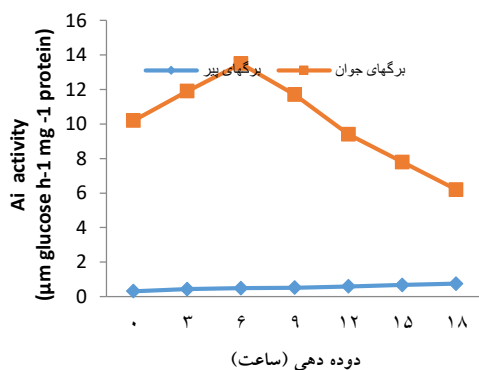
(۲۰). از طرفی رافینوز، استاکیوز و ورباسکوز بعنوان فرم‌های انتقالی و ذخیره‌ای قندها نیز دارای اهمیت هستند. با مقایسه انواع دی، تری، تترا و پنتا ساکارید به ترتیب ساکارز، رافینوز، استاکیوز و ورباسکوز ملاحظه شد مقدار ساکارز در منبع و مقصد و ساقه به عنوان قند انتقالی بیشتر



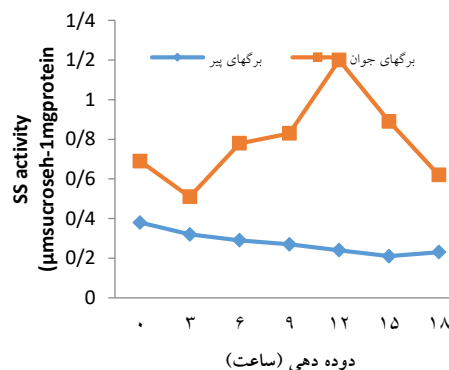
شکل ۱۲. اثر دوده دهی روی فعالیت آنزیم SPS، $sd=0.82$



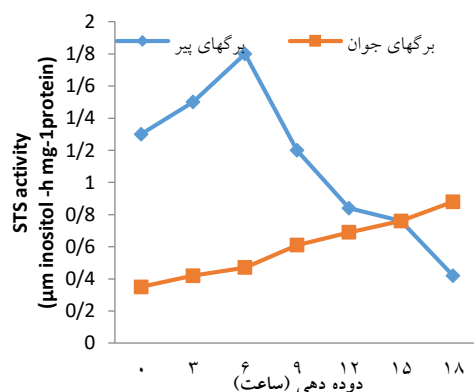
شکل ۱۱- اثر دوده دهی روی تغییرات نشاسته $sd=2.7$



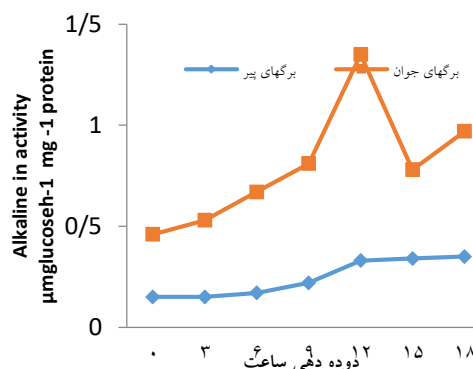
شکل ۱۴- اثر دوده دهی روی فعالیت آنزیم اسید اینور تاز $sd=0.95$



شکل ۱۳- اثر دوده دهی روی فعالیت آنزیم SS $sd=0.06$



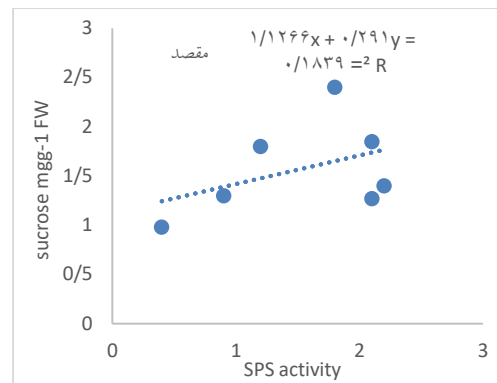
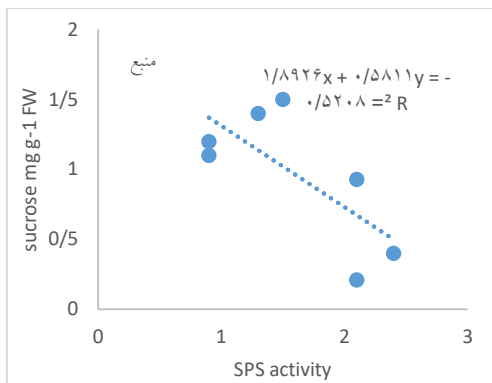
شکل ۱۶- اثر دوده دهی روی فعالیت آنزیم STS، $sd=0.12$



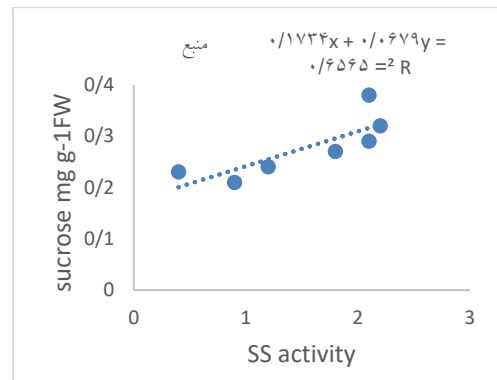
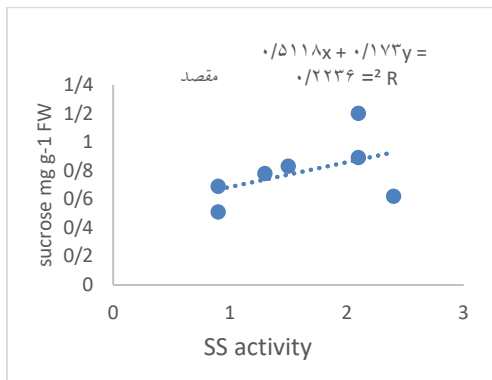
شکل ۱۵- اثر دوده دهی روی فعالیت آنزیم اینور تاز قلبایی $Sd=0.08$

در برگ‌های پیر در سطح معنی‌دار افزایش یافت، در صورتیکه مقدار این قند در ساقه و مقصد تغییری نداشت. مقدار ساکارز در ساقه بیشتر از مقصد و منبع است و با افزایش زمان آلودگی مقدار ساکارز در ساقه بسیار کاهش یافت، در منبع کاهش و در مقصد افزایش یافت.

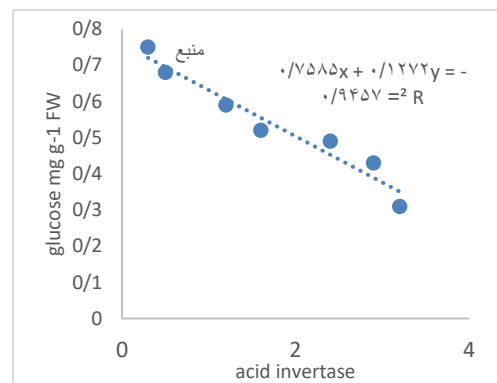
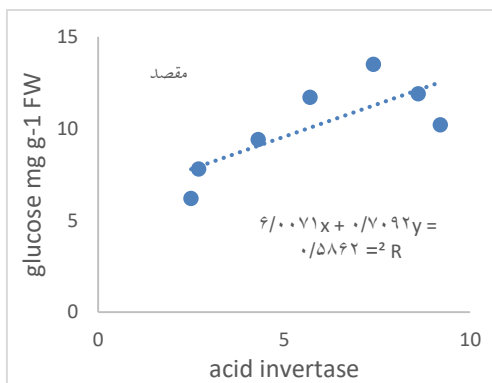
با مقایسه دی‌ساکاریدها مقدار ساکارز در ساقه و منبع و مقصد بسیار بیشتر از مالتوز است. بنابراین برگ‌ها به عنوان منبع تولید قندها و ساقه به عنوان مسیر انتقال قند جهت قسمت بندی کربن تثبیت شده به مقصد مانند برگ‌ها و اندام‌های در حال رشد ملیس تقسیم بندی وجود دارد (۱۸). نتایج نشان داد با افزایش زمان آلودگی مقدار مالتوز



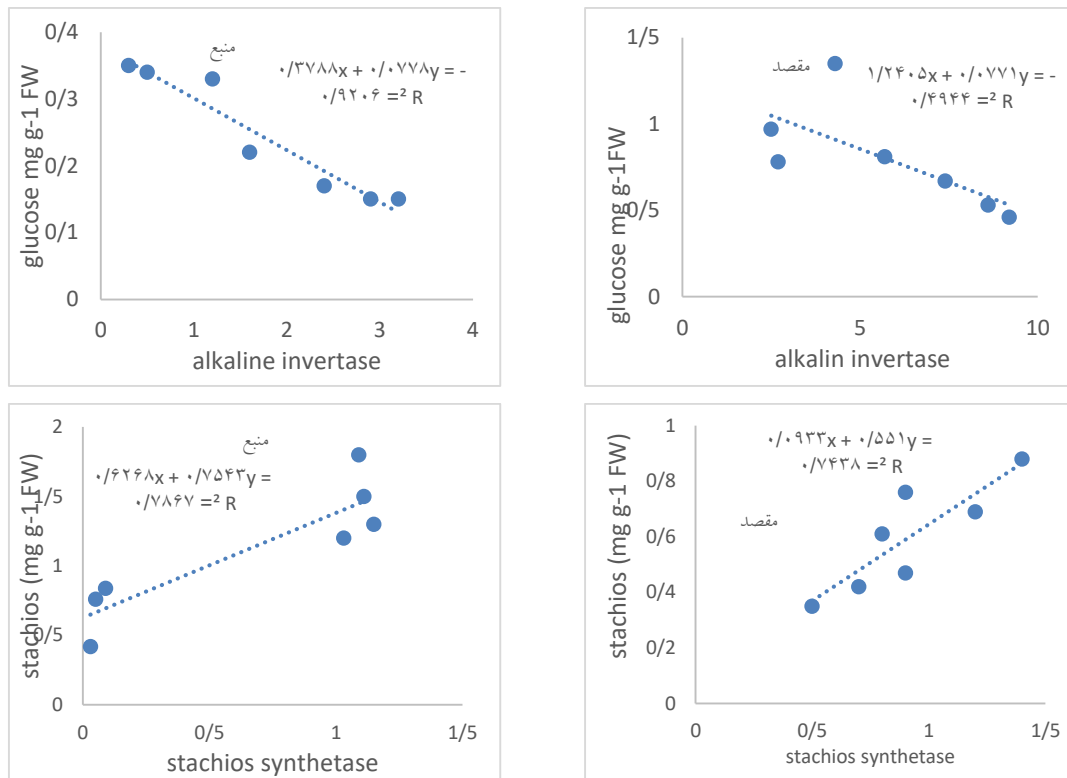
شکل ۱۸- رگرسیون و همبستگی بین فعالیت آنزیم SPS با تغییر ساکارز در منبع و مقصد



شکل ۱۹- رگرسیون و همبستگی بین فعالیت آنزیم SS با تغییر ساکارز در منبع و مقصد



شکل ۲۰- رگرسیون و همبستگی بین فعالیت آنزیم acid invertase با تغییر گلوکز در منبع و مقصد



شکل ۲۱- رگرسیون و همبستگی بین فعالیت آنزیم alkaline invertase با تغییر گلوکز در منبع و مقصد

انتقالی با ساکارز قابل مقایسه است. مقدار ساکارز از قندهای دی ساکاریدی بیشترین مقدار در ساقه وجود دارد و در برگهای مقصد کمتر از منبع است. البته مقدار ساکارز و استاکیوز که در شیره آوندی یا ساقه به صورت جریانی بالا است و با افزایش زمان دوده دهی میزان کاهش استاکیوز بیشتر از ساکارز است. می توان گفت ساکارز بیشتر از استاکیوز فرم انتقالی قند در گیاه ملیس است که با نتایج Sayed و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد. با افزایش زمان دوده دهی مقدار مالتوز در منبع افزایش و در مقصد بدون تغییر در صورتیکه مقدار ساکارز در مقصد افزایش و در منبع کاهش یافت. شاید میزان افزایش مالتوز در منبع با کاهش ساکارز همخوانی داشته باشد. در برگهای جوان مقدار قندهای ورباسکوز، گلوکز، فروکتوز بیشتر از برگهای پیر و ساقه است. در برگهای پیر مقدار قندهای نشاسته، رافینوز و مالتوز بیشتر از برگهای جوان و ساقه است. تعادل بین انواع قندها یا تخصیص‌های مختلف کربن برای رشد

به نظر می رسد با افزایش زمان آلودگی تولید و بارگیری ساکارز در منبع دچار مشکل شده به همین دلیل مقدار ساکارز در برگهای پیر و ساقه کاهش یافته و یا شاید متابولیسم ساکارز در مقصد بیشتر آسیب دیده است. گیاهان کربن را در فتوسنتز تثبیت می کنند و برای رشد و تنفس مصرف می کنند. حداکثر مواد رشد چه از نظر پیش ماده- های رشد ویا از نظر انرژی از فرایند گلیکولیز بویژه چرخه کربس تامین می گردد. بنابراین اگر کربن تثبیت شده بخواهد به مواد رشد تبدیل گردد، حتماً باید از چرخه گلیکولیز عبور نماید. در مقصد تنفس بیشتر از فتوسنتز آسیب دیده است که سبب تجمع ساکارز در مقصد شده است. چون گیاهان از کربن تثبیت شده برای تنفس، تولید هورمونها و برگ، ریشه و مواد ذخیره استفاده می کنند (۱۴). در مقایسه انواع قندها مقدار چهار قندی مانند استاکیوز بسیار بیشتر از رافینوز و ورباسکوز است. استاکیوز در ساقه بیشتر از منبع و مقصد هست و به عنوان قند

دارد. با مقایسه داده‌ها ملاحظه شد روند تغییرات قندها در منبع و مقصد متفاوت تغییر یافتند که با شرایط طبیعی متفاوت است. در سلولهای مزوفیل سنتز ساکارز به طور معمول مهمترین مسیر مصرف تریوز فسفات است. اولین واکنش برگشت پذیر سنتز ساکارز به وسیله فروکتوز ۱-۶ بیس فسفاتاز سیتوسولی کاتالیز می‌شود. این واکنش نقطه کنترل کننده مهمی بوده و یک دریچه ورودی است که از طریق آن تریوزفسفات برای سنتز ساکارز برگشت داده می‌شود.

ساکارز در سیتوپلاسم از منبع هگزوز منو فسفات از طریق فعالیت‌های آنزیم SPS و SS سنتز می‌شود. در واکنش شکستن ساکارز نیز دو آنزیم دخالت دارند (۱۷). آنزیم اینورتازها هستند که ساکارز را شکسته و تولید فروکتوز و گلوکز می‌نمایند (۱۸).

نتایج نشان داد میزان فعالیت آنزیم SS در مقصد ابتدا افزایش سپس کاهش یافت، بطوریکه مقدار پروتئین آنزیم در شاهد $0.69 \text{ sucrose mM h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ و با زمان دوده دهی تا ۱۲ ساعت به $0.79 \text{ sucrose mM h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein افزایش یافت، و در ادامه کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم SS در منبع بعد از افزایش یک روند تدریجی است که با افزایش زمان دوده دهی پیش می‌رود. میزان فعالیت آنزیم SS در منبع بیش از فعالیت این آنزیم در مقصد است. باین توصیف با افزایش زمان دوده دهی رگرسیون بین فعالیت آنزیم SS و سنتز ساکارز در مقصد و منبع به ترتیب $R^2=0/22$ $R^2=0/65$ همبستگی نشان داد (نمودار-۱۹). بنابراین با افزایش زمان دوده دهی میزان فعالیت آنزیم SS در برگهای پیر بیشتر از برگهای جوان آسیب دیده است.

دومین آنزیم که در مقایسه با آنزیم SS نقش بیشتری در تشکیل ساکارز دارد آنزیم (ساکارز فسفات سنتتاز) SPS (نمودار-۱۴) است. در بیشتر تحقیقات فعالیت آنزیم SPS را مسئول سنتز ساکارز در گیاهان معرفی کرده اند (۵ و

توسط هورمونهای گیاهی تنظیم می‌شود. یکسری قندها مانند گلوکز و فروکتوز که با گروههای عاملی پروتئینها و قندهای دیگر واکنش نشان می‌دهند. بنابراین خاصیت احیا کنندگی دارند (۱۲ و ۱۹). با در نظر گرفتن موقعیت ساکارز به عنوان قند انتقالی مکانیسم های وجود دارد که از یک سو تولید ساکارز را در سیتوپلاسم با تهیه فرآورده فتوسنتزی در کلروپلاست و از سوی دیگر با درخواستهای فرایند مقصد تنظیم می‌کند (۸). اساساً روند بیوسنتزی انواع دی، تری و تتراپلی ساکارید با ایجاد پیوند گلیکوزیدی بین کربن شماره یک گلوکزیل جدید و کربن شماره چهار آخرین گلوکزیل زنجیره گلوکان وجود می‌آید. با این روند مرحله به مرحله یک زنجیر بلند گلیکوزیل ساخته می‌شود و زنجیر درامداد $C_1 \rightarrow C_4$ مرتباً طویل می‌گردد. بنابراین به ترتیب دی، تری، تترا و پنتاساکارید مانند ساکارز، رافینوز، استاکیوز و ورباسکوز تشکیل می‌شود (۲۱). نتایج نشان داد مقدار کل نشاسته در برگهای پیر خیلی بیشتر از برگهای جوان بود و با اعمال تیمار دوده دهی مقدار نشاسته در برگهای پیر و جوان کاهش یافت. با مقایسه روند تغییر مقدار نشاسته و ساکارز، دوده دهی میزان ساکارز را در برگهای جوان افزایش داده ولی مقدار نشاسته را کاهش داده است در واقع آلودگی دوده میزان قند بصورت محلول در مقصد افزایش یافته است (۱۴) البته انواع چند قندی‌ها در مقصد متفاوت متابولیزه شده اند و نتایج دقیقی را نمی‌توان تعیین کرد. ساکارز نقش مهمی در متابولیسم گیاهی دارد زیرا این مولکول در مقایسه با استاکیوز مهمترین فرم انتقالی قند در ملیس است. در تفاوت ساکارز و استاکیوز با سایر چند قندی‌های مانند مالتوز، رافینوز و ورباسکوز می‌توان گفت ساکارز و استاکیوز تغییرات بیشتری دارند و فرم انتقالی قند هستند در حالیکه رافینوز، مالتوز و ورباسکوز بیشتر فرم ذخیره ای قند هستند. با اعمال تیمار زمان دوده دهی تغییر مقدار قند رافینوز در منبع و ساقه و مقصد روندی مشابه ساکارز داشته است که با نتایج Bunce و همکاران (۱۹۹۰) مطابقت

همواره بسیار کمتر از فعالیت SPS است. عوامل زیادی روی فعالیت آنزیم SS دخالت دارند. گزارش‌های زیادی نشان داده فعالیت آنزیم SS در بعضی شرایط هم جهت با فعالیت SPS و در بعضی موارد برخلاف SPS فعالیت دارد (۱۲).

تحقیقات نشان داده شکستن ساکارز در واکنش توسط انورتاز اسیدی شکسته شده که به قندهای شش کربنه می‌انجامد در نتیجه انواع قندهای هگزوز صادر می‌شوند. برخی گیاهان اسیمیلانها را به صورت قندهای الکلی یا الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز از منبع به اندامهای مقصد صادر می‌کنند (۱۸)

میزان فعالیت آنزیمهای اینورتاز قلیایی ALk و اینورتاز اسیدی AI که در کاتابولیسیم ساکارز دخالت دارند در منبع و مقصد اندازه‌گیری شدند. میزان فعالیت آنزیم اینورتاز اسیدی AI که در تجزیه ساکارز دخالت دارد در برگهای پیر افزایش یافت، بطوریکه مقدار پروتئین آنزیم بعد از اعمال تیمار دوده دهی به ۱۰ به ۱۳ $\mu\text{g protein h}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{glucose}$ افزایش یافت. میزان فعالیت آنزیم اینورتاز اسیدی AI ابتدا افزایش، و در ادامه کاهش یافت بطوریکه غلظت پروتئین آنزیم از ۱۳ به ۶/۱ $\mu\text{g protein h}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{glucose}$ کاهش یافت.

میزان فعالیت آنزیم اینورتاز Alk که در شکستن ساکارز دخالت دارد در منبع و مقصد افزایش یافت. غلظت پروتئین آنزیم در برگهای جوان بیش از ده برابر برگهای پیر است، بطوریکه مقدار پروتئین آنزیم در برگ جوان از ۰/۴۲ به ۱/۴ $\mu\text{g protein h}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{glucose}$ افزایش یافت. روند افزایش فعالیت اینورتاز Alk در برگهای پیر بصورت خطی است و غلظت پروتئین آنزیم از ۰/۰۸ به ۰/۳ $\mu\text{g protein h}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{glucose}$ به تدریج افزایش یافت. انواع انورتاز وجود دارند فعالیت انورتاز قلیایی در غلظت بالای فروکتوز ۲۰-۳۰ mM باز داشته می‌شود پیروی می‌کند.

۱۰) میزان فعالیت این آنزیم در منبع بیشتر از مقصد است $P \leq 0.05$. میزان فعالیت این آنزیم در منبع و مقصد با افزایش زمان دوده دهی ۹ ساعت افزایش یافت، بطوریکه مقدار پروتئین آنزیم در منبع از ۱/۲ به ۲/۵ $\mu\text{g protein h}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{sucrose}$ و در ادامه با افزایش زمان دوده دهی کاهش یافت $P \leq 0.05$. رگرسیون بین فعالیت آنزیم SPS و سنتز ساکارز در مقصد و منبع به ترتیب $R^2 = 0.52$ و $R^2 = 0.18$ و منبع همبستگی نشان داد (نمودار ۱۸). بنابراین با افزایش زمان دوده دهی میزان فعالیت آنزیم SPS در برگهای پیر بیشتر از برگهای جوان آسیب می‌بیند. بنابراین سنتز ساکارز در منبع اساساً دچار مشکل شده و میزان انتقال آن در ساقه کاهش یافته است. آنزیم های SPS و SS آنزیمهای هستند که در سیتوپلاسم از منبع هگزوز منو فسفات در واقع تبدیل مواد فتوسنتزی به ساکارز و رشد گیاه نقش اساسی دارند. باتوجه به تحقیقات Salerno و همکاران (۲۰۰۳) و Turgeon و همکاران (۲۰۰۹) میزان تولید ساکارز از الگوی تعادل بین میزان سنتز و مصرف آن پیروی می‌کند. در مقایسه آنزیم های SPS و SS، نتایج نشان داد افزایش زمان دوده دهی سبب شده میزان همبستگی بین فعالیت SPS و تولید ساکارز در منبع بیشتر از مقصد آسیب ببیند و این روند برای SS عکس هست که با نتایج Kleines و همکاران (۱۹۹۹) مطابقت دارد. نتایج نشان داد بخش بیشتر ساکارز توسط SPS تولید می‌شود و در منبع سنتز ساکارز دچار مشکل شده است. افزایش ساکارز در مقصد با مصرف آن ارتباط دارد. از آنجائیکه تولید ساکارز توسط آنزیم SPS با مصرف انرژی بیشتری همراه است، احتمالاً کاهش تولید انرژی در منبع سبب کاهش فعالیت SPS شده است. البته با توجه به ضرائب همبستگی فعالیت آنزیم SS و SPS در منبع و مقصد دوده دهی الگوی بین میزان سنتز و مصرف ساکارز را در منبع و مقصد تغییر داده به طوریکه فعالیت آنزیم SPS بیشتر از SS متناسب با کاهش سنتز ساکارز در منبع هست. با این تفاوت که میزان فعالیت آنزیم SS

دهی میزان کاهش استاکیوز بیشتر از ساکارز است. می‌توان گفت ساکارز بیشتر از استاکیوز و سایر قندها فرم انتقالی قند در گیاه ملیس است. البته در برخی از گیاهان علاوه بر این قند، بسته به گونه گیاهی تری و تراساکاریدها و یا قندهای الکلی هم یافت می‌شوند. کربوهیدراتها بیشتر به شکل پلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا به ویژه به صورت رافینوز، نشاسته و یا فروکتانها و همچنین به صورت الیگوساکاریدهای با وزن مولکولی پیر ذخیره شوند (۶).

نتایج نشان داد با افزایش مدت دوده دهی مقدار قندهای محلول در برگهای نوک ساقه افزایش یافت $P \leq 0.05$. اساساً افزایش قندها در برگهای نوک حاصل تجمع قندهای ورباسکوز، گلوکز و فروکتوز است. تقریباً از کل قندهای محلول برگهای نوک حدوداً ۹۵ درصد آن را گلوکز و فروکتوز تشکیل می‌دهند و قندهای الیگوساکاریدی مانند رافینوز و ورباسکوز ۵ درصد بقیه را تشکیل می‌دهند. فرایند تنفس که بیش از نصف کربن تثبیت شده در فتوسنتز را مصرف می‌کند در پاسخ به افزایش آلودگی افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد این افزایش تنفس فرایندهای آسیب دیده را ترمیم می‌کند. هرچند این فرایندها مقدار بیشتری از کربن تثبیت شده را مصرف می‌کند و از طرفی از انتقال کربن ساخته شده ممانعت می‌نماید (۲) آنزیم‌های مختلفی که در متابولیسم کربوهیدراتها نقش دارند احتمالاً اهداف مختلف آلاینده در برگها هستند.

میزان فعالیت آنزیم استاکیوز سنتتاز STS که در تشکیل قندهای چهارتایی دخالت دارد در منبع و مقصد اندازه گیری شد. میزان فعالیت آنزیم STS در برگهای پیر بسیار بیشتر از برگهای جوان است و با افزایش دوده دهی مقدار پروتئین آنزیم از $1/2$ به $1/9 \mu\text{mol inositol h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ افزایش یافت. و در ادامه با افزایش زمان دوده دهی کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم STS در برگهای جوان روند افزایشی داشت، بطوریکه غلظت پروتئین آنزیم از $0/4$ به $0/9 \mu\text{mol inositol h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ افزایش یافت. ذخایر قندی در گیاهان متفاوت است و در بیشتر گیاهان به صورت نشاسته، آمیلوز و انواع فروکتانها هستند (۲۰).

کربوهیدراتها حاصل از فتوسنتز از راه آوندهای آبکشی به بافت ها و اندامهای مختلف گیاه راه می‌یابند. در بیشتر گونه های گیاهی بیشترین قند انتقالی ساکارز است. در بعضی رافینوز و مانیتول و سوربیتول هم است. نتایج نشان داد مقدار گلوکز و فروکتوز در آوند آبکش کم بود. به نظر می‌رسد که قندهای احیائی در شرایط دوده کمتر وارد عناصر آبکش می‌شوند که با نتایج McLaughlin و همکاران مطابقت دارد. کربوهیدرات اصلی انتقالی در گیاه ملیس ساکارز است. نتایج نشان داد مقدار ساکارز از قندهای دی ساکاریدی بیشترین مقدار در ساقه وجود دارد و در برگهای مقصد کمتر از منبع است. البته مقدار ساکارز و استاکیوز که در شیره آوندی ساقه است و با افزایش دوده

منابع

- 1- Anderson, L.E., Muschinek, G., and Marques, I., 1988. Effects of SO_2 and sulfite on stromal metabolism, In *Air Pollution and Plant Metabolism*, ed. S., Schulte-Hostede, N.M., Darrall, L.W., Blank & A.R., Wellburn, Elsevier Applied Science, London and New York, PP: 134-147.
- 2- Azcón-Bieto, J., 1983. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves., *Plant Physiol.*, 73, PP: 681-686.
- 3- Bunce, J.A., 1990. Short-and long-term inhibition of respiratory carbon dioxide efflux by elevated carbon dioxide, *Annals of Botany*, 65, PP: 637-642.
- 4- Bu chi, R., Bachmann, M., and Keller, F., 1998. Carbohydrate metabolism in source leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.), a starch-storing and stachyose-translocating labiate., *J. Plant Physiol.*, 153, PP: 308-315.
- 5- Counce, P.A., and Gravois, K.A., 2006. Sucrose Synthase Activity as a Potential Indicator of High Rice Grain Yield, *Crop Science*, 46, PP:1501- 1508.
- 6- Gao, Z.F., and Schaffer, A.A., 1999. A novel alkaline a-galactosidase from melon fruit with

- substrate preference for raffinose, *Plant Physiol*, 119, PP: 979–987.
- 7- Gobbet, F., Jackson, P., Deery, M.J., and Dupree, P., 2002. Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: a method to study plant cell wall polysaccharides and polysaccharide hydrolases, *Anal. Biochem*, 300, PP: 53–68.
- 8- Ho, L.C., 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs relation to sink strength. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 39, PP: 355–378.
- 9- Huber, J.L.A., Pharr, D.M., and Huber, S.C., 1990. Partial purification and characterization of stachyose synthase in leaves of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*: utilization of a rapid assay for myo-inositol, *Plant Sci*, 69, PP: 179–188.
- 10- Kleines, M., Elster, R.C., Rodrigo, M.J., Blervacq, A. S., Salamini, F., and Bartels, D., 1999. Isolation and Expression Analysis of Two Stress-responsive Sucrose-synthase Genes from the Resurrection Plant *Crater stigma plantagineum* (Hochst.), *Planta* 209, PP: 13–24.
- 11- Lorenc-Plucinska, G., 1982. Influence of SO₂ on CO₂ assimilation and carbon metabolism in photosynthetic processes in Scots pine. *Arboretum Kornickie, rocznik XXVII*, PP: 285–310 (In Pol.).
- 12- Miao, M.M., Xu, X.F., Chen, X.H., Xue, L.B., and Cao, B.S., 2007. Cucumber carbohydrate metabolism and translocation under chilling night temperature, *Journal Plant Physiol*, 164, 621–628.
- 13- McLaughlin, S.B., 1985. Effect of chronic air pollution on forests: a critical review. *J. Air. Pollut. Control Assoc.*, 35, PP: 511–534.
- 14- McLaughlin, S.B., MacConathy, R.K., Dervick D., and Mann, L.K., 1982. Effects of chronic air pollution stress on photosynthesis, carbon allocation and growth of white pine trees. *For. Sciences*, 28, PP: 60–70.
- 15- Marschall, M., Proctor, M.C.F., and Smirnoff, N., 1988. Carbohydrate Composition and Invertase Activity of the Leafy Liverwort *Porella platyphylla*. *New Phytol*, 138, PP: 343–353.
- 16- Sayed, A.I., Rafudeen, M.S., and Gollmack, D., 2014. Physiological Aspects of Raffinose Family Oligosaccharides in Plants: Protection against Abiotic Stress, *Plant Biol*, 16, PP: 1–8.
- 17- Salerno, G.L., and Curatti, L., 2003. Origin of Sucrose Metabolism in Higher Plants: When, How and Why? *Trends Plant Sciences*. 8, PP: 63–69. (Cross Ref).
- 18- Turgeon, R., and Wolf, S., 2009. Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 60, PP: 207–221. [Cross Ref]
- 19- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., and Kobayashi, M., 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*. 29, PP: 417–426.
- 20- Winter, H., and Huber, S.C., 2000. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and regulation of Activity of Key Enzymes, *Crit. Rev. Plant Sciences* 19, PP: 31–67.
- 21- Wang, F., Sanz, A., Brenner, M.L., and Smith, A., 1993. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength, *Plant Physiol*, 101, PP: 321–327.

The effect of environmental pollution smoke on the change of carbohydrates and activity of dependent enzymes in the source Source, stem and Sink in Melissa plant (*Melissa-Officinalis*)

Malmir H.A. and Kaviani moghaddas E.

Biology Dept., Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Source and sink allocation organs play an important role in the balance between sugar production and consumption. In this experiment, the metabolism of carbohydrates and

the activities of enzymes related to them were investigated in young leaves (sink), old leaves (source) and stems of Melissa plant after several plants were treated with smoke. The results showed that with the increase of smoke time the fructose sugars in the source and sink decreased. The amount of sucrose decreased in the stem and the source and increased in the sink. The amount of verbascose, glucose, and fructose sugars increased in the source and decreased in the sink and stem. The amount of starch, raffinose, maltose increased in the sink and decreased in the source and stem. Comparing the change process of starch and sucrose, smoking increased the amount of sucrose in the destination and decreased the amount of starch. In fact, soot pollution has increased the amount of soluble sugar in the destination. The smoking has changed the amount of sucrose and stachyose more compared to polysaccharides such as maltose, raffinose and verbascose. The amount of SS enzyme activity in the source is more than the activity of this enzyme in the sink, and with the increase of smoking, the amount of SS enzyme activity in the sink and source first increased and then decreased. The regression between SS enzyme activity and sucrose synthesis in sink and source is correlated with $R^2=0.22$ and $R^2=0.65$ respectively. Therefore, the activity of SS enzyme in old leaves is more than that of young leaves that are damaged or due to the reduction of sucrose in the destination. The regression between SPS enzyme activity and sucrose synthesis in sink and source showed a correlation of $R^2=0.52$ and $R^2=0.18$, respectively. Therefore, the level of SPS enzyme activity in old leaves is higher than that of young leaves, or it is due to the lack of reduction of sucrose in the sink. Therefore, the decrease is due to the fact that the amount of sucrose production follows a pattern of balance between the amount of synthesis and its consumption. In the comparison of SPS and SS enzymes, the results showed that the sooting activity of SPS has decreased more than that of SS. The activity level of AI acid invertase enzyme, which is involved in breaking down sucrose, increased in the source, also the activity level of Alk invertase enzyme, which is involved in breaking down sucrose, increased in the source and destination. By comparing SPS and SS enzymes, the results showed that the sooting activity of SPS has decreased more than that of SS. The activity level of AI acid invertase enzyme, which is involved in breaking down sucrose, increased at the source, and the activity level of Alk invertase enzyme, which is involved in breaking down sucrose, increased at the source and destination. The level of STS enzyme activity in old leaves is much higher than that of young leaves, and with the increase of soot formation, the amount of enzyme protein first increased and then decreased. Sucrose and stachyose are transfer form of sugar while raffinose, maltose and verbascose are more storage form of sugar. It seems that with the increase of pollution time, the production and loading of sucrose in the source has a problem, that is why the amount of sucrose in the source and stem decreased. Maybe the metabolism of sucrose is more damaged at the destination. In comparing the types of sugars, the amount of stachyose is more than raffinose and raffinose, and as a transition sugar it is comparable to sucrose, and with the increase of the smoking time, the amount of stachyose decrease is more than that of sucrose, $P \leq 0.05$, therefore, the increase of the smoking time balances the balance between the types of sugars or the different allocations of carbon for Growth has changed in source and sink.

Key words: pollution of smokes, source and sink relation, carbohydrate change, the sucrose metabolism enzymes