

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

پیشینه‌های علمی و پژوهشی

سال دوم - شماره اول (پیاپی ۳) - بهار ۱۳۸۹

مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران بر اساس ابلاغیه شماره ۳/۱۱/۵۵۸ مورخ ۱۳۸۸/۰۳/۲۵ کمیسیون بررسی نشریات علمی وزارت علوم تحقیقات و فناوری، دارای درجه علمی - پژوهشی و شماره استاندارد بین‌المللی ۸۲۴۶-۲۰۰۸ از سازمان اسناد و کتابخانه ملی جمهوری اسلامی ایران می‌باشد.

" این مجله حاصل فعالیت مشترک دانشگاه اصفهان و انجمن زیست‌شناسی ایران است."

متن کامل مجله در پایگاه‌های اطلاع‌رسانی زیر نمایه می‌شود:

http://www.ui.ac.ir/red/mainpage/f_rsrch.h

سایت اینترنتی دانشگاه اصفهان

<http://www.magiran.com>

بانک اطلاعات نشریات کشور

<http://www.SID.ir>

سایت اینترنتی جهاد دانشگاهی

<http://www.ISC.gov.ir>

پایگاه استنادی علوم جهان اسلام

چاپ و لیتوگرافی: انتشارات دانشگاه اصفهان

ناشر: دانشگاه اصفهان

قیمت: ۲۰۰۰۰ ریال

تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران (علمی - پژوهشی)

سال دوم - شماره اول (پیاپی ۳) - بهار ۱۳۸۹

شماره استاندارد بین‌المللی: ۲۰۰۸-۸۲۶۴

صاحب امتیاز: معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان و انجمن زیست‌شناسی ایران

مدیر مسئول: دکتر منصور شریعتی

سر دبیر: دکتر منصور شریعتی

اعضای هیأت تحریریه

دانشگاه اصفهان	دکتر علی اکبر احسانپور
دانشگاه اصفهان	دکتر محمدرضا رحیمی نژاد رنجبر
دانشگاه تهران	دکتر شاهین زارع مبارکه
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری	دکتر محمدرضا زمانی
دانشگاه اصفهان	دکتر منصور شریعتی
دانشگاه تربیت مدرس	دکتر فائزه قناتی
مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور	دکتر علی اصغر معصومی

مدیر اجرایی: فریبا هادیان

ویراستار تخصصی انگلیسی: فریدون پرویزیان

ویراستار ادبی: ناصر کریم‌پور

صفحه‌آرا: بهزاد حکیمی‌نیا

صفحه‌آرای تخصصی: فریبا هادیان

ناشر: انتشارات دانشگاه اصفهان

اصفهان - دانشگاه اصفهان - سازمان مرکزی - معاونت تحقیقات و فناوری - طبقه دوم - اداره چاپ، انتشارات و مجلات
کد پستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱ - دفتر مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران - نشانی پست الکترونیک IJPB@ui.ac.ir

هیأت داوران این شماره ((سال دوم- شماره اول (پیاپی ۳)- بهار ۱۳۸۹))

اعضای محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی کشور که در داوری و ارزیابی مقالات این شماره از مجله علمی- پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران همکاری داشته‌اند، معرفی شده و از خدمات علمی آنها تقدیر می‌گردد:

دانشگاه اصفهان	دکتر علی اکبر احسانپور
دانشگاه علوم پزشکی اصفهان	دکتر غلامرضا اصغری
دانشگاه شهرکرد	دکتر نواز خرازیان
دانشگاه اصفهان	دکتر محمدرضا رحیمی نژاد رنجبر
دانشگاه بوعلی سینا	دکتر مسعود رنجبر
دانشگاه صنعتی اصفهان	دکتر سید بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی
دانشگاه اصفهان	دکتر منصور شریعتی
دانشگاه تربیت مدرس	دکتر مظفر شریفی
دانشگاه اصفهان	دکتر سید مجید قادریان
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری	دکتر علی اصغر کارخانه
دانشگاه بوعلی سینا	دکتر رؤیا کرمان
دانشگاه شیراز	دکتر علی مرادشاهی
دانشگاه اصفهان	دکتر مهران میراولیایی

پیش از ارسال مقاله، روش تدوین و نگارش مقاله خود را به دقت با مطالب زیر مطابقت فرمایید.

نکات قابل توجه

- ۱- در مقاله، قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرد.
- ۲- مقالاتی که برای چاپ در این مجله ارسال می‌گردد نباید قبلاً چاپ شده باشد (مگر در شکل خلاصه در گردهمایی‌ها)، همچنین نباید به طور همزمان برای بررسی به مجلات دیگر ارائه شده باشد.
- ۳- مسئولیت مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسنده یا نویسندگان مقاله است.
- ۴- مجله در قبول، رد و اصلاح مقاله‌ها آزاد است.
- ۵- مقاله‌های دریافتی توسط متخصصان امر داوری می‌گردد و در صورت تصویب در هیأت تحریریه با رعایت نوبت به چاپ می‌رسد.
- ۶- عدم رعایت دستورالعمل نگارش مقاله باعث عدم پذیرش و یا کندی مراحل پذیرش مقاله خواهد شد.

روش تدوین مقاله

- ۱- مقاله‌ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد و خلاصه انگلیسی (Abstract) و واژه‌های کلیدی (Key words) در انتهای مقاله آورده شود.
- ۲- مقاله کامل (Full Paper) دارای خلاصه فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج (شامل شکل، جدول و ...)، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، خلاصه انگلیسی (Abstract) و واژه‌های کلیدی انگلیسی (Key words) باشد و حداکثر در ۱۵ صفحه در فرمت نهایی مجله تنظیم شود.
- ۳- مقاله کوتاه (Short Paper) کاملاً شبیه مقاله کامل دارای خلاصه فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج (شامل شکل، جدول و ...)، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، خلاصه انگلیسی (Abstract) و واژه‌های کلیدی انگلیسی (Key words) بدون بخش‌بندی و عنوان و حداکثر در ۴ صفحه تنظیم شود.
- ۴- شکل‌ها، نمودارها و جدول‌ها شماره‌گذاری شده و به همراه زیرنویس آنها در متن مقاله آورده شود؛ در نرم‌افزار Word، فرمت شکل‌ها در بخش Text Wrapping، به صورت In line with text انتخاب شود؛ از ارسال شکل‌های گروه‌بندی شده (Group) اکیداً خودداری شود؛ نمودارها به صورت دو بعدی و سیاه و سفید طراحی شوند و از حالت سه بعدی خارج شوند.
- ۵- مقاله‌ها بایستی با فاصله خطوط Single تایپ شود.
- ۶- تایپ مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word 2003، به صورت یک رو، در کاغذ A4، با حاشیه‌های متن ۳ سانتی‌متر و به صورت یک ستونی انجام شود.
- ۷- از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز در درون پراگماتر و در متن مقاله آورده شود.
- ۸- هر مقاله علمی - پژوهشی بایستی دارای قسمت‌های زیر باشد:

عنوان: فارسی: 16 B Lotus Bold و انگلیسی: 14 Times New Roman Bold

نام نگارندگان: فارسی: 14 B Lotus Bold و انگلیسی: 12 Times New Roman Bold

درج شماره مربوط به آدرس هر نگارنده بعد از نام نگارنده به صورت Superscript

علاوه بر درج شماره مربوط، یک ستاره برای نویسنده مسئول (Corresponding Author)

نشانی نگارندگان: فارسی: 12 B Lotus Bold و انگلیسی: 11 Times New Roman Bold

درج شماره مربوط به نشانی هر نگارنده قبل از نام نگارنده به صورت Superscript.

نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول: فارسی: 10 B Lotus Bold و انگلیسی: 10 Times New Roman Bold

نمونه:

اثر تنش شوری و خشکی بر رشد گیاه گندم در مناطق سردسیر

حسن مختار پناه^۱، علی اکبر مشتاقی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان، ^۲ مرکز تحقیقات زیستی

mokhtar-p@ui.ac.ir

خلاصه فارسی و انگلیسی: فارسی: 11 B Lotus و انگلیسی: 11 Times New Roman, شامل ۱۰۰ تا ۲۵۰ کلمه و بدون هر گونه کلمه اختصاری واژه‌های کلیدی فارسی و انگلیسی: حداکثر حاوی شش کلمه مرتب شده بر اساس حروف الفبا ترتیب بخش‌های مختلف مقاله: خلاصه فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، خلاصه انگلیسی (Abstract)، واژه‌های کلیدی انگلیسی (Key words): فارسی: 13 B Lotus و انگلیسی: 12 Times New Roman تذکر: عنوان جدول در بالای جدول و عنوان نمودار و شکل در زیر آنها با خط 11 B Lotus نوشته شود.

نحوه مرجع‌دهی:

الف) مرجع‌دهی در متن (References in text): در متن به صورت نام نویسنده و یا نویسندگان (بدون نام کوچک) و سال انتشار نوشته شود. نمونه فارسی: یک نویسنده: (قاسمی، ۱۳۸۸)، دو نویسنده: (اکبری و مشتاقی، ۱۳۶۵)، سه نویسنده و بیشتر: (پناهی و همکاران، ۱۳۷۶) نمونه انگلیسی: یک نویسنده: (Weston, 1996)، دو نویسنده: (Schopfer and Plachy, 1984)، سه نویسنده و بیشتر: (Kruse et al., 2000) کلمه *et al.* بایستی به صورت مورب نوشته شود (این کلمه لاتین است).

ب) مرجع‌دهی در بخش منابع (References in list): منابع بر اساس حروف الفبا مرتب و ابتدا منابع فارسی و سپس انگلیسی آورده شود. ب-۱) مرجع‌دهی به مقاله (Paper): به ترتیب شامل: نام نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان مقاله، نام مجله، شماره مجله، شماره صفحات. نام مجله به صورت کامل نوشته شود.

ب-۱-۱) مقاله با یک نگارنده

نمونه فارسی: ولی‌پور، ع. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران. مجله زیست‌شناسی ۳: ۷۵-۹۱.

نمونه انگلیسی:

Katz, A. D. (1985) Determination of intracellular osmotic volume and sodium concentration in *Dunaliella*. Plant Physiology 78: 817-820.

ب-۱-۲) مقاله با دو نگارنده:

نمونه فارسی: ولی‌پور، ع. و حسینی، ا. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران، مجله زیست‌شناسی ۳: ۷۵-۹۱.

نمونه انگلیسی:

Katz, A. D. and Brown, M. (1985) Determination of intracellular osmotic volume and sodium concentration in *Dunaliella*. Plant Physiology 78: 817-820.

ب-۱-۳) مقاله با سه نگارنده و بیشتر:

نمونه فارسی: ولی‌پور، ع، حسینی، ا. و امینی، ا. ر. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران، مجله زیست‌شناسی ۳: ۷۵-۹۱.

نمونه انگلیسی:

Cowan, A. K., Rose, P. D. and Horne, L. G. (1992) A model system for studying the response of plant cells to stress. Journal of Experimental Botany 43: 1535-1547.

ب-۲) مرجع‌دهی به کتاب (Book): به ترتیب شامل: نام نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان کتاب، شماره Edition در صورت وجود، نام مؤسسه انتشاراتی، نام اولین شهری که انتشار در آن انجام گرفته است.

نمونه فارسی: کردوانی، س. ح. (۱۳۷۳) اکوسیستم‌های طبیعی. جلد ۶، مرکز فرهنگی و انتشارات پائیز، تهران.

نمونه انگلیسی:

Rizvi, S. J. H. and Rizvi, V. (1992) Allelopathy in plants: Basic and applied aspects. Chapman and Hall, London.

Rice, E. L. (1984) An introduction to microbiology. 2nd Ed, Academic Press, New York.

مرجع‌دهی به ترجمه فارسی کتاب:

نمونه فارسی: نوگل، جی. ر. و فریتز، ت. (۱۳۸۰) مقدمه‌ای بر فیزیولوژی گیاهی. ترجمه لاهوتی، م. و رحیم‌زاده، ر. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد.

ب-۳) مرجع‌دهی به بخشی از کتاب (Chapter in Book) که هر بخش دارای نویسنده جداگانه باشد:

نمونه انگلیسی:

Chou, C. H. (1990) The role of allelopathy in agroecosystems. In: Researching the ecology basis for sustainable agriculture (ed. Gliessman, S. R.) 105-121. Springer Verlag, Berlin.

Blum, U. (1995) The value of model plant-microbe-soil system for understanding processes associated with allelopathic interaction. In: Organisms, processes and applications (eds. Jnderjit, K. M., Dakshini, M. and Einhelling, F. A.) 127-131. American Chemical Society, Washington D. C.

ب-۴) مرجع‌دهی به پایان‌نامه کارشناسی ارشد یا دکترا: نام نویسنده، سال، عنوان پایان‌نامه، مقطع تحصیلی، نام دانشگاه، نام شهر، نام کشور.
نمونه فارسی: ظهراپی، م.ع. (۱۳۸۸) بررسی اثر شوری بر رشد و میزان پرولین گیاه گندم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

نمونه انگلیسی:

Lawlor, H. J. (1989) Tissue culture of Australian brown seaweeds and an assessment of their tocopherol content. PhD Thesis, Murdoch University, Perth, Australia.

ب-۵) مرجع‌دهی به Patent:

Suzuki, T., Ohishi, N. and Yagi, K. (2000) Methods of obtaining a composition 9-cis β -Carotene in high purity. US Patent 6057484.

ب-۶) مرجع‌دهی به اینترنت: مرجع‌دهی به آدرس‌های اینترنتی تقریباً فاقد اعتبار بوده و پیشنهاد می‌شود استفاده نگردد. در مواقعی که ناگزیر از استفاده محدود از آن باشد نام نویسنده، زمان چاپ و در انتها نیز زمان استخراج از اینترنت درج گردد.

نمونه:

Rotblat, J. (2000) Fifty Pugwash conferences: a tribute to Eugene Rabinowitch. Retrieved from <http://www.pugwash.org/reports/pac/pac256/otblat.htm>. On: 22 June 2001.

تذکر: درستی نام علمی گونه‌های گیاهی از لحاظ صفت گونه‌ای و نام آتور در سایت اینترنتی www.ipni.org بررسی شود.

نحوه ارسال مقاله

مقالات به صورت فایل word به صورت ضمیمه (attachment) به نشانی پست الکترونیک ijpb@ui.ac.ir ارسال گردد.

تماس با ما

شماره تماس: ۰۳۱۱-۷۹۳۴۱۶۴

دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۱۷۷

نشانی پست الکترونیک: ijpb@ui.ac.ir

اصفهان- خیابان هزار جریب- دانشگاه اصفهان- سازمان مرکزی- طبقه دوم- اداره چاپ، انتشارات و مجلات

دفتر مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، کدپستی: ۷۳۴۴۱-۸۱۷۴۶

مجله علمی - پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران
سال دوم - شماره اول (پیاپی ۳) - بهار ۱۳۸۹
شماره استاندارد بین‌المللی: ۸۲۴۶-۲۰۰۸

فهرست مطالب

- ۱-۱۲ ■ ریزازدیادی گیاه فلفل دلمه‌ای در شرایط کشت درون شیشه
محمود اطرشی، کوثر مرادی و مجتبی خیام نکوئی
- ۱۳-۲۴ ■ جداسازی و همسانه‌سازی (cloning) cDNA ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*) از قارچ
خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، مقدمه‌ای بر دست‌ورزی ژنتیکی
جواد حسن‌جانپور و محمد فارسی
- ۲۵-۳۴ ■ تغییرات بیوشیمیایی میزان ترپنوئیدهای موجود در اسانس گیاه دارویی نعناع سبز
(*Menta spicata* L.) در پاسخ به تیمار مقدار اضافی روی (Zn)
سعید زارع ده‌آبادی، زهرا اسرار و میترا مهربانی
- ۳۵-۴۸ ■ اثر محلول‌پاشی روی (Zn) و اکسین (IBA) بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت
در ذرت دانه‌ای
بهنام زند، علی سروش‌زاده، فائزه قناتی و فؤاد مرادی
- ۴۹-۶۲ ■ استخراج و بررسی مشخصات آنزیم تایروزیناز بادام زمینی شمال ایران
معصومه فریدی، ریحانه سریری، وهب جعفریان و حبیب‌الله ناظم
- ۶۳-۷۶ ■ بررسی مقایسه‌ای تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موین تراریخت و گیاهچه‌های
شابیزک (*Atropa belladonna* L.) تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید
نجمه احمدیان چاشمی، مظفر شریفی، فرح کریمی و حسن رهنما
- ۷۷-۹۰ ■ مشخصات کاربوتیپی گونه‌های جنس *Papaver* در رویشگاه‌های استان اردبیل
فرزانه عظیمی مطعم، ژیرایر کاراپتیان، غلامرضا بخشی خانیکی و رضا طلایی

ریزادیدای گیاه فلفل دلمه‌ای در شرایط کشت درون شیشه

محمود اطرشی^{۱*}، کوثر مرادی و مجتبی خیام نکوئی^۱

^۱ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (ABRII)، اصفهان، ایران

چکیده

اثر هورمون‌های مختلف رشد و زغال فعال بر روی ریزادیدای فلفل دلمه‌ای (گلد فلیم) با استفاده از کشت تک گره بررسی گردید. نتایج نشان داد اضافه نمودن زغال فعال به محیط کشت، روشی مفید جهت رشد گیاهچه‌ها و ریشه‌دار کردن آنها بوده، از طرف دیگر، مانع تشکیل کالوس در انتهای ریزنمونه‌ها می‌شود. همچنین نشان داده شد که بهترین تیمار برای ریزادیدای فلفل دلمه‌ای، محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA است. ریزنمونه‌های رشد کرده در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار شدند. ۷۰ تا ۹۰ درصد از گیاهچه‌های منتقل شده به گلخانه زنده مانده، رشد نمودند.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزادیدای، زغال فعال، کشت تک گره، فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annum* L.)

مقدمه

فلفل دلمه‌ای با نام علمی (*Capsicum annum* L.) گیاهی یکساله متعلق به خانواده Solonaceae است که زیستگاه اصلی آن کشور مکزیک و آمریکای جنوبی است (Sanatombi and Sharma, 2007). این گیاه دارای خواص دارویی بسیار ارزشمند بوده، در درمان بسیاری از بیماری‌ها، از جمله: بیماری‌های قلبی، فشار خون بالا، چاقی، دیابت و افزایش اشتها کاربرد دارد

(Nuez et al., 1996). در رویکرد سنتی، این گیاه به وسیله بذر تکثیر می‌گردد. تکثیر و ازدیاد فلفل در ایران معمولاً از طریق کاشت بذرهای وارداتی از دیگر کشورها صورت می‌گیرد که این بذرهای، با قیمت بالا وارد شده، ضمن تحمیل هزینه بر اقتصاد، کشور را با مشکلات و محدودیت‌های وارداتی نیز مواجه می‌کند. به همین جهت، استفاده از تکنیک‌های مختلف کشت بافت در جهت تکثیر فلفل و تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل

بار شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۲۰٪) به همراه یک قطره تویین ۲۰٪ قرار گرفتند. در مرحله بعد بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای جوانه‌زنی، بذرها در یک ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) استریل کشت داده شده، در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۴۰۰ لوکس و دمای ۲۴°C به مدت ۵ هفته نگهداری شدند.

کشت تک گره

ظروف حاوی گیاهچه‌های ۴-۵ هفته‌ای (با اندازه تقریبی ۱/۵-۱ سانتی‌متر) حاصل از کشت بذرها در شرایط استریل از ارلن خارج شدند. در مرحله بعد، ساقه آنها به شیوه‌ای برش داده شد که هر ریزنمونه حاصل دارای ۱ گره باشد. سپس هر ۵ ریزنمونه به صورت عمودی در ظروف کشت حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد گیاهی واکشت شدند. این تنظیم‌کننده‌های رشد شامل سیتوکینین‌های BAP (۲-۱-۰ میلی‌گرم بر لیتر) و Kin (۲-۱-۰ میلی‌گرم بر لیتر) و اکسین‌های IBA (۵-۰/۲-۰ میلی‌گرم بر لیتر) و یا NAA (۵-۰/۲-۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند (جدول ۱).

بیماری‌زا می‌تواند گامی مهم در جهت رفع مشکلات موجود در مسیر تولید و تکثیر آن، کاهش هزینه‌های اولیه کشت و کار این گیاه، ترغیب تولیدکنندگان به سرمایه‌گذاری در این زمینه و در نهایت، ایجاد زمینه مناسب اشتغال کشاورزی گردد. تاکنون پژوهشگران مختلفی در سطح دنیا تلاش کرده‌اند تا از طریق تکنیک‌های مختلف کشت بافت، روش مناسب و مقرون به صرفه‌ای برای ازدیاد فلفل دلمه‌ای پیدا کنند (Phillips and Hustenberger, 1985; Harini, 1993; Christopher and Rajam, 1996; Hyde and Phillips, 1996; Hussain *et al.*, 1999). تکثیر این گیاه با استفاده از تکنیک کشت بافت از قسمت‌های مختلف گیاه، از جمله: جوانه‌های انتهایی، جوانه‌های جانبی، ساقه، هیپوکوتیل و کوتیلدون گزارش شده است (Agrawal *et al.*, 1989)، ولی اکثر روش‌های ریزازدیاد فلفل به شدت وابسته به رقم (*C. baccatum*, *C. frutescens* and *C. praetermissum*) خاصی بوده و در مورد ارقام دیگر کارایی چندانی نداشته است (Agrawal *et al.*, 1989).

در این تحقیق، برای اولین بار تکثیر فلفل دلمه‌ای و ریزازدیاد آن از طریق کشت ریزنمونه حاصل از میانگره در رقم مورد اشاره در ایران، انجام گردید. همچنین، ریشه‌دار شدن شاخساره‌های تولیدی، مقاوم‌سازی گیاهچه‌ها جهت سازگاری با محیط طبیعی و انتقال آنها به شرایط گلخانه نیز ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کشت بذرها

در ابتدا به منظور ضدعفونی نمودن سطحی، بذور به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۹۶٪ غوطه‌ور گردیده، پس از سه

جدول ۱- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در آزمایش

NAA (میلی گرم بر لیتر)	IBA (میلی گرم بر لیتر)	BAP (میلی گرم بر لیتر)	محیط کشت پایه
-	۰	۰	MS
-	۰/۲	۱	MS
-	۰/۵	۲	MS
۰	-	۰	MS
۰/۲	-	۱	MS
۰/۵	-	۲	MS
Kin (میلی گرم بر لیتر)			
-	۰	۰	MS
-	۰/۲	۱	MS
-	۰/۵	۲	MS
۰	-	۰	MS
۰/۲	-	۱	MS
۰/۵	-	۲	MS

سازگارسازی و انتقال به گلخانه

قبل از کشت گیاهچه‌های حاصل در شرایط گلخانه، عمل سازگارسازی آنها در فیتوترون صورت گرفت. برای این کار، گیاهچه‌ها در شرایط *in vitro* به گلدان‌های حاوی ترکیب پیت‌ماس و کوکوپیت با نسبت ۳/۱ منتقل شده و در فیتوترون تحت شرایط رطوبت نسبی ۷۵ درصد، دمای ۲۵°C و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس برای مدت ۲۰ روز نگهداری شدند. در مرحله بعد، گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه منتقل گردیده، تحت شرایط درجه حرارت شب ۱۲ درجه سانتی‌گراد، طول روز ۱۶ ساعت و طول شب ۸ ساعت قرار گرفتند.

علاوه بر هورمون‌های یاد شده، همه محیط کشت‌ها دارای ۳ درصد ساکارز، ۶ گرم در لیتر آگار و ۰/۴٪ زغال فعال نیز بودند. pH محیط‌ها در ۵/۸ تنظیم شده، عمل سترون‌سازی آنها در اتوکلاو با فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱°C برای مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. ریزنمونه‌های کشت شده در اتاق رشد با شرایط ذکر شده در بالا و به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. پس از آن که گیاهچه‌ها به مطلوب رشد خود رسیدند، برای انجام دور بعدی کشت تک‌گره استفاده شدند و یا مقاوم‌سازی شده، به گلخانه انتقال داده شدند.

ترکیب با هورمون‌های اکسین (IBA، NAA) به محیط پایه MS در رشد ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای حاصل از تک‌گره بررسی گردید. در شروع کار، از محیط کشت MS به همراه BAP و IBA بدون زغال فعال استفاده شد، نتیجه نشان داد ریزنمونه‌ها، ۲ هفته پس از کشت در این محیط بدون تولید ریشه در انتها کالوس دار شدند (شکل ۱) (جدول ۲).

این طرح به صورت چند آزمایش فاکتوریل مجزا با طرح پایه کاملاً تصادفی و ۳ تکرار به اجرا در آمد. ظروف حاوی گیاهچه‌های کشت شده به صورت تصادفی (نقشه چیدن تصادفی ظروف با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Excel تهیه گردید) در داخل اتاق رشد قرار گرفتند.

نتایج

در این مطالعه، اثر افزودن غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین (Kin، BAP) به تنهایی، یا در

جدول ۲- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پارامترهای رشد در ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای

تعداد ریشه در هر ریزنمونه	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	تعداد شاخه فرعی	زغال فعال ٪۰/۴	IBA (میلی‌گرم بر لیتر)	BAP (میلی‌گرم بر لیتر)
۱/۱۳	۳/۰۰	۱/۱۳	۰/۰۴	+	۰	۰
۰/۷۸	۰/۲	۰/۷۸	۰/۰۲۷	-	۰	۰
۱/۲۰	۴/۰۰	۱/۲۰	۰/۲۹	+	۰	۱
۰/۸۳	۰/۳۵	۰/۸۳	۰/۰۹	-	۰	۱
۱/۱۸	۶/۰۰	۱/۱۸	۰/۴۴	+	۰	۲
۰/۸۱	۰/۳	۰/۸۱	۰/۲	-	۰	۲
۱/۱۴	۲/۰۰	۱/۱۴	۰/۳۴	+	۰	۰
۰/۸۶	۰/۲	۰/۸۶	۰/۰۴	-	۰	۰
۱/۱۹	۳/۰۰	۱/۱۹	۰/۱۸	+	۰/۲	۱
۰/۸۱	۰/۳	۰/۸۱	۰/۰۵	-	۰/۲	۱
۱/۱۸	۳/۰۰	۱/۱۸	۰/۲۶	+	۰/۵	۲
۰/۷۵	۰/۳۵	۰/۷۵	۰/۰۷	-	۰/۵	۲

+ : زغال فعال اضافه شده به محیط

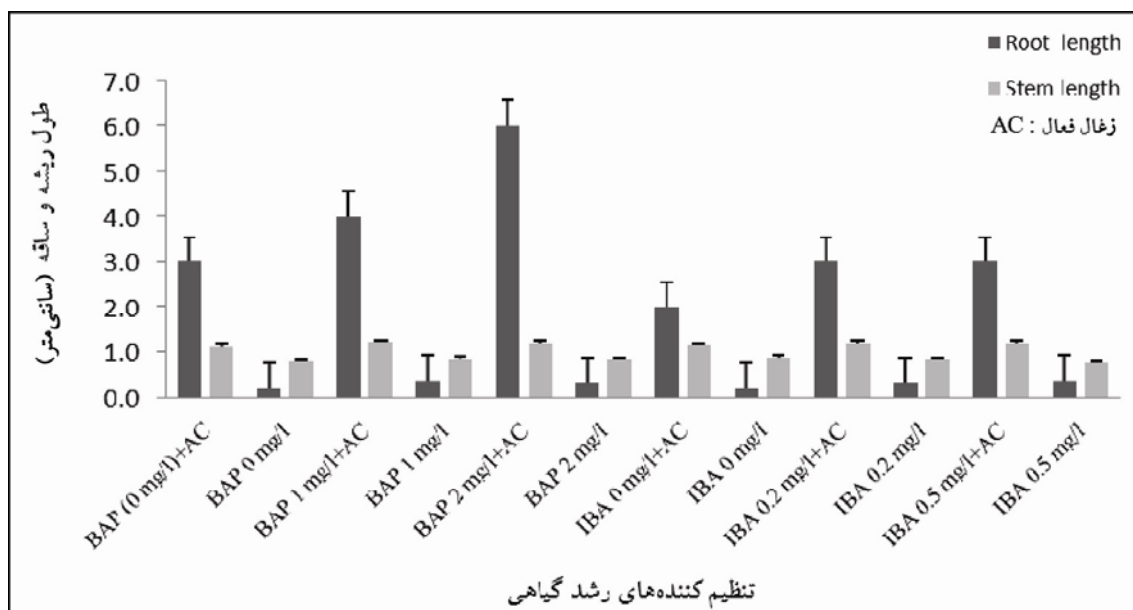
- : فاقد زغال فعال



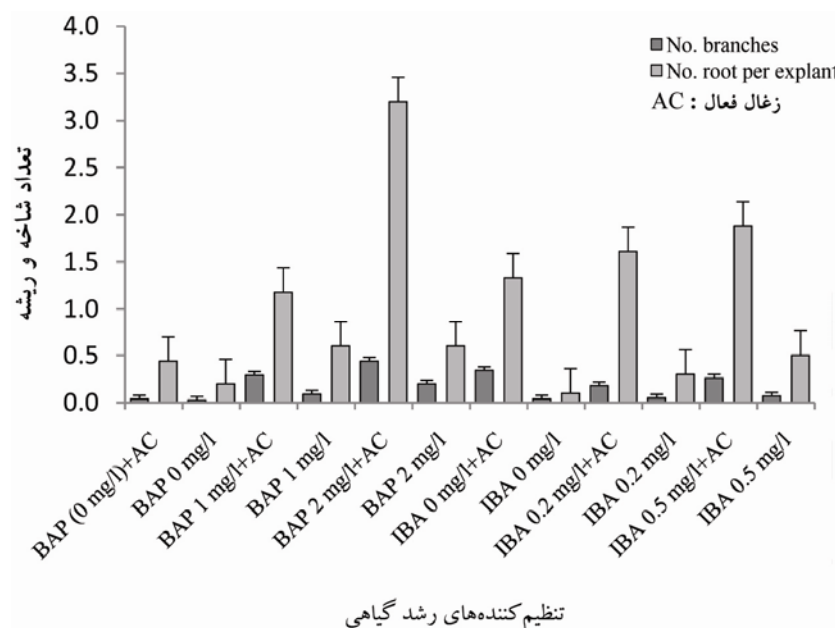
شکل ۱- تولید کالوس در انتهای ریزنمونه تک گره فلفل دلمه‌ای، ۲ هفته پس از کشت در محیط MS با ترکیبات هورمونی مختلف از BAP و IBA، فاقد زغال فعال

انتهای آن‌ها مشاهده شود، بخوبی رشد کرده، حتی برخی از آنها ریشه‌دار هم شدند (جدول ۴). مقایسه میان تأثیر حضور و عدم حضور زغال فعال بر پارامترهای باززایی در گیاه فلفل در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

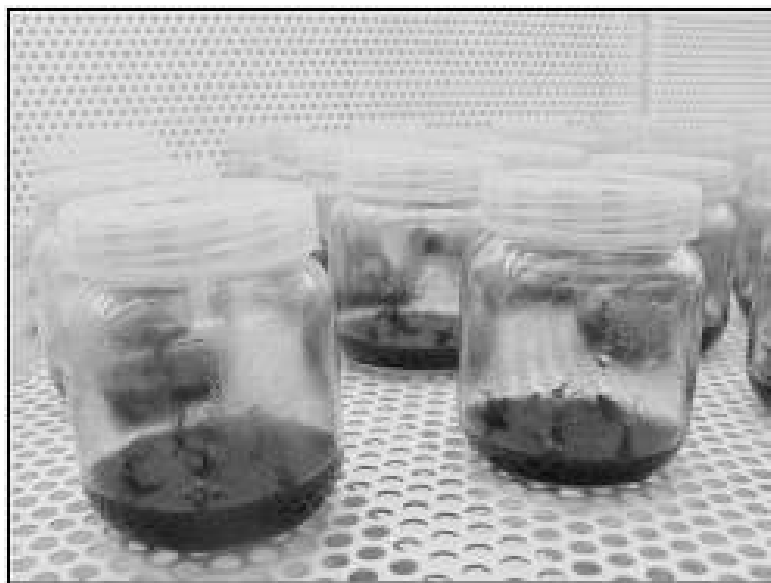
برای رفع این مشکل، در مرحله بعد، ۴٪ زغال فعال به محیط‌های کشت باززایی اضافه شد. پاسخ ریزنمونه‌ها به این محیط مثبت بود و همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده، این ریزنمونه‌ها بدون اینکه هیچ حالت کالوسی در



شکل ۲- اثر زغال فعال در محیط باززایی فلفل بر پارامترهای رشد (طول ریشه و ساقه)



شکل ۳- اثر زغال فعال در محیط باززایی فلفل بر پارامترهای رشد (تعداد شاخه و ریشه) تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی



شکل ۴- رشد مناسب ریزنمونه‌های فلفل حاصل از تک گره در محیط باززایی حاوی زغال فعال با ترکیب هورمونی BAP ۲ میلی‌گرم بر لیتر و IBA ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۳۰ روز پس از کشت

طول ساقه، تعداد شاخه فرعی، برگ و ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده فلفل داشته است (جدول ۳).

با گذشت ۳۵ روز از کشت تک گره‌های فلفل دلمه‌ای در محیط‌های مختلف، هر گیاهچه ۲-۳ شاخه تولید نمود. آزمایش‌ها نشان داد که نوع هورمون‌ها و غلظت‌های مختلف آن‌ها تأثیرات متفاوتی بر پارامترهای رشدی، چون:

جدول ۳- اثر تنظیم‌کننده‌های گیاهی (NAA، IBA، Kin، BAP) حاوی زغال فعال بر میانگین اندازه‌های پارامترهای رشدی در ۴ ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای پس از ۳۵ روز

هورمون‌های رشد	تعداد شاخه فرعی	طول ساقه (cm)	تعداد برگ	فاصله میانگره (cm)	ریشه‌زایی (%)	تعداد ریشه در هر ریزنمونه	طول ریشه (cm)
BAP	**۰/۰۸	**۸/۲۹	**۳۰/۴۸	**۰/۱۹	**۱۰۰۰/۲۶	**۳۶/۲۹	**۱۹۷/۰۳
Kin	ns۰/۰۰	**۶/۸۱	ns۱۴/۳۶	*۰/۰۸	ns۲۷۱/۸۵	ns۱/۹۱	ns۱۱/۸۷
IBA	ns۰/۰۰	ns۰/۲۵	ns۹/۶۲	ns۰/۰۰	**۴۹۸/۵۲	**۲۰/۸۹	**۲۲/۹۵
NAA	ns۰/۰۰	ns۰/۹۱	ns۴۷/۶۱	ns۰/۰۱	*۴۸۷/۸۶	ns۰/۱۴	ns۲/۹۴
BAP+IBA	ns۰/۰۰	ns۰/۵۹	ns۴/۷۵	*۰/۰۶	*۱۱۲۷/۸	*۱۲/۰۹	ns۷/۳۵
BAP+NAA	ns۰/۰۰	ns۱/۴۷	ns۴۰/۴۳	*۰/۰۲	**۱۶۹۱/۸	*۶/۹۳	*۲۰/۰۸
Kin+IBA	*۰/۰۰	ns۰/۵۷	ns۱/۱۸	ns۰/۰۲	**۵۵۱/۸۵	ns۱/۳۷	*۷/۹۱
Kin+NAA	ns۰/۰۰	ns۰/۵۴	*۶/۳۱	ns۰/۰۴	*۴۴۴/۰۷	ns۳/۲۹	*۱۶/۳۵

ns: معنی دار نیست.

*: در سطح $p \leq 0.05$ معنی دار است.

** : در سطح $p \leq 0.01$ معنی دار است.

معنی دار از IBA بر روی تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی مشاهده نگردید، لیکن حضور IBA در محیط کشت افزایش طول ریشه را باعث گردید (جدول ۴).

به‌عنوان یک نتیجه مهم، در آزمایش ما نشان داده شد که در هفته چهارم پس از کشت تک‌گره، حداکثر تعداد جوانه‌ها در محیط پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و فاقد هر گونه اکسین به دست آمد. در این مطالعه، تأثیر

جدول ۴- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به همراه زغال فعال بر پارامترهای مختلف رشد ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای ۳۵ روز پس از کشت در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی

درصد ریشه‌زایی (%)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه در هر ریزنمونه	فاصله میانگره (cm)	تعداد برگ	IBA (میلی‌گرم بر لیتر)	BAP (میلی‌گرم بر لیتر)
e۱۱/۳۳	e۲/۲۰	f۱/۶۷	abc۰/۲۵	۲/۹۳h	۰	۰
de۲۲/۶۷	e۲/۰۷	d۲/۴۷	c۰/۱۷	۳/۷۳gh	۰/۲	۰
de۲۵/۳۳	abc۴/۸۰	c۳/۴۷	bc۰/۱۸	۴/۸۰dg	۰/۵	۰
de۲۳/۳۳	bcd۴/۴۷	d۲/۲۷	abc۰/۲۵	۵/۱۳d	۰	۱
de۲۱/۶۰	bcde۳/۳۳	d۲/۶۷	abc۰/۲۹	۵/۲۰cd	۰/۲	۱
cd۳۶/۰۰	cde۳/۰۷	b۴/۰۷	bc۰/۲۲	۵/۰۷d	۰/۵	۱
ab۵۰/۶۷	de۲/۴۷	c۳/۶۰	a۰/۳۶	۸/۰۷a	۰	۲
abc۴۰/۶۷	a۸/۸۷	b۴/۱۷	bc۰/۲۲	۶/۸۷ab	۰/۲	۲
a۵۴/۰۰	ab۵/۴۰	a۵/۰۷	ab۰/۳۱	۶/۴۰bc	۰/۵	۲

داده‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی دار نیستند.

لیتر) منتقل شدند. حدود ۸۰٪ از ریزنمونه‌ها در این محیط ریشه‌دار شدند (جدول ۵).

ریزنمونه‌های ریشه‌دار نشده حاصل از مرحله باززایی جهت القای ریشه‌زایی به محیط پایه حاوی هورمون‌های IBA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) یا NAA (۰/۵ میلی‌گرم بر

جدول ۵- اثر نوع اکسین بر ریشه‌دهی در محیط حاوی ۰/۴٪ زغال فعال

ریشه‌زایی (%)	طول ریشه (cm) در هر ریزنمونه	تعداد ریشه در هر ریزنمونه	نوع و غلظت اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)
			IBA
-	-	-	۰
-	-	-	۰/۲
۸۴/۴	۵/۲۲	۱/۶۱	۰/۵
			NAA
-	-	-	۰
۴۸/۵	-	-	۰/۲
-	۴/۰۲	۲/۷۱	۰/۵

گلخانه منتقل شدند (شکل ۵). حدود ۷۰-۹۰٪ از گیاهچه‌های تولید شده در شرایط کشت بافت مورد اشاره، در شرایط گلخانه نیز زنده مانده، رشد مطلوبی از خود نشان دادند.

جهت واکشت نمودن گیاهچه‌ها از بهترین محیط حاصل از نتایج به دست آمده استفاده گردید. این امر باعث شد که در مدت زمان نسبتاً کوتاهی تعداد زیادی گیاهچه باززایی شده فلفل دلمه‌ای تولید شود. این گیاهچه‌ها پس از سازگاری در فیتوترون، به



شکل ۵- گیاهچه حاصل از محیط کشت MS به همراه ۲ میلی‌گرم BAP بر لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم IBA بر لیتر سازگار شده در فیتوترون، آماده انتقال به محیط طبیعی

بحث

تاکنون مطالعاتی در زمینه باززایی فلفل دلمه‌ای و اثر هورمون‌های مختلف بر ریزازدیای آن در خارج از کشور گزارش شده است (Arroyo and Revilla, 1991; Christopher and Rajam, 1994; Ezura *et al.*, 1993; Phillips Szasz *et al.* 1995; Gunay and Rao, 1978 and Hubstenberger, 1985; Agrawal *et al.*, 1988) در این مطالعات، اثر ارقام، هورمون‌ها و ریزنمونه‌های مختلف، از جمله: ریشه، کوتیلدون، هیپوکوتیل و ساقه بر باززایی این گیاه بررسی و مطالعه شده است. در مجموع، به نظر می‌رسد، که کارا بودن روش‌های ارائه شده در این مقالات، به شدت به رقم مورد مطالعه بستگی داشته است. در مراحل ابتدایی آزمایش از محیط‌های بدون زغال فعال برای باززایی ساقه دارای تک‌گره استفاده گردید که نتیجه آن عدم رشد مناسب شاخه، کالوسی شدن قاعده ریزنمونه و عدم تولید ریشه بود (به دلیل فنل تولید شده توسط ریزنمونه است، که از رشد گیاه ممانعت می‌کند). برای حل این مشکل، زغال فعال به میزان ۰/۴٪ به محیط کشت باززایی حاوی هورمون‌های رشد اضافه شد. زغال فعال اثر قابل ملاحظه‌ای در رشد ریزنمونه‌ها و القای تولید ریشه در آنها داشت، ضمن این که مانع تولید کالوس در قاعده ریزنمونه‌های کشت شده در محیط شد. از آنجا که زغال فعال بعنوان یک ماده جاذب رنگ و متابولیت‌های مختلف شناخته می‌شود، احتمال می‌رود افزودن آن به محیط باعث جذب ترکیبات فنلی و دیگر مواد بازدارنده رشد از محیط کشت شده باشد اثر مثبت زغال فعال بر تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت توسط دانشمندان، همچون Pan و Van Staden (۲۰۰۴) و Dennis (۲۰۰۸) تأیید شده است. اثر زغال فعال احتمالاً نتیجه‌ای است از خصوصیات این ماده مؤثره برای باند شدن و جذب فنولیک‌ها و دیگر

عواملی که می‌تواند از تکثیر ریزنمونه‌ها ممانعت کند، این مواد اکسید شده سمی بوده، منجر به قهوه‌ای یا کالوسی شدن بافت گیاهی و محیط کشت می‌گردند و موجب کاهش سرعت رشد و در نهایت در رشد گیاه به صورت محرک و یا بازدارنده نقش مهمی دارند.

در این مطالعه، بهترین تیمار جهت باززایی ریزنمونه‌های گیاه فلفل محیط پایه دارای سیتوکینین BAP (۲ میلی گرم در لیتر) بود که اثر مثبتی بر پارامترهای باززایی نظیر شاخه‌زایی، تولید برگ و حتی القای ریشه‌زایی در هر ریزنمونه داشت. در این مطالعه تأثیر معنی‌داری از IBA بر روی تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی مشاهده نگردید، لیکن حضور IBA در محیط کشت افزایش طول ریشه را باعث گردید.

این نتیجه، با نتایج سایر مطالعات انجام شده توسط دیگر پژوهشگران مطابقت دارد. در این راستا، نشان داده شده است که استفاده از BAP در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر بهترین تیمار جهت باززایی فلفل از ریزنمونه‌های نوک ساقه است (Christopher and Rajam, 1994). در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده که بهترین تیمار برای تولید انبوه فلفل با استفاده از جوانه‌های رأسی، استفاده از محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر BAP بوده است (Sanatombi and Sharma, 2007). مشخص شده است که استفاده از سیتوکینین دیگر؛ یعنی Kin به تنهایی یا در ترکیب با هورمون‌های دیگر به اندازه BAP در باززایی گیاه نقش نداشته است و تنها تعداد کمی از ریزنمونه‌های گیاه فلفل در محیط‌های حاوی این تنظیم‌کننده رشد گیاهی باززایی شده‌اند (Phillips and Hubstenberger, 1985; Agrawal *et al.*, 1989). در این مطالعه، اگر چه تأثیر مثبتی از NAA در القاء ریشه‌دهی در مرحله بعد از باززایی

- hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports* 10: 414-416.
- Christopher, T. and Rajam, M. V. (1994) *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 38: 25-29.
- Christopher, T. and Rajam, M. V. (1996) Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 46: 245-250.
- Ezura, H., Nishimiya, S. and Kasumi, M. (1993) Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* 12: 676-680.
- Gunay, A. L. and Rao, P. S. (1978) *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Science Letters* 11: 365-372.
- Harini, I. and Sita, G. (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annum* L.). *Plant Science* 89: 107-112.
- Hussain, S., Jain, A. and Kothari, S. L. (1999) Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annum* L. *Plant Cell Reports* 19: 64-68.
- Hyde, C. L. and Phillips, G. C. (1996) Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chilli pepper (*Capsicum annum* L.) via organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 32:72-80.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Nuez, F., Gil-Ortega R. and Costa, J. (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. *Mundi-Prensa, México D. F.*
- Pan, M. J. and Van Staden, J. (2004) The use of charcoal in *in vitro* culture. A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Phillips, G. C. and Hubstenberger, J. F. (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 261-269.
- Sanatombi, K. and Sharma, G. J. (2007) Micropropagation of *Capsicum annum* L. using axillary shoot explants *Scientia Horticulturae* 113: 96-99.

مشاهده گردید، لیکن در مقایسه با IBA از تأثیر کمتری برخوردار بود، دیگر تحقیقات انجام شده (Husain *et al.* 1999) نیز نتایج مشابهی را بیان نموده‌اند که مؤید نتایج این مطالعه است.

ریز نمونه‌های باززایی شده پس از ریشه‌زایی در محیط حاوی IBA، جهت مقاوم‌سازی به فیتوترون و سپس به محیط گلخانه منتقل شدند. حدود ۷۰-۹۰٪ از گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت در گلخانه ماندگاری خوبی نشان داده و رشد مطلوبی داشتند. گیاهان رشد یافته پس از طی مراحل رویشی گل داده و میوه نیز تولید نمودند. در مجموع، روش به کار گرفته شده در این تحقیق که از طریق کشت ساقه دارای تک‌گره از گیاهان حاصل از بذر یا حاصل از تک‌گره‌های با واکشت متوالی صورت گرفت، روش مناسبی جهت ریزازدیادی و کشت انبوه این رقم است.

تشکر و قدردانی

شایسته است از آقای مهندس اسماعیل روح‌الامینی که در ایجاد زمینه علمی و امکان اجرای این طرح همکاری صمیمانه‌ای داشتند و همچنین از آقای دکتر سید علی حسینی تفرشی جهت ارائه برخی از پیشنهادهای علمی سپاسگزاری و قدردانی نمایم.

منابع

- Agrawal, S., Chandra, N. and Kothari, S. L. (1988) Shoot-tip culture of pepper for micropropagation. *Current Science* 57: 1347-1349.
- Agrawal, S., Chandra, N. and Kothari, S. L. (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annum* L. cv. *Mathania*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 16: 47-55.
- Arroyo, R. and Revilla, M. A. (1991) *In vitro* plant regeneration from cotyledon and

- Szasz, A., Nervo, G. and Fari, M. (1995) Screening for *in vitro* shoot forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant Cell Reports* 14: 666-669.
- Dennis, T. T. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.

Micropropagation of *Capsicum annuum* L. *in vitro*

*** Mahmoud Otrshy, Kosar Moradi and Mojtaba Khayam Nekouei**

Agricultural Biotechnology Research Institute, Center of Iran (ABRII), Isfahan, Iran

Abstract

The effects of activated charcoal and different combinations of plant growth regulators for micropropagation of using nodal culture were investigated. Adding activated charcoal improved growth and root system of plantlets; on the other hand, on the bottom of explants, no callus was formed. The best response was observed on medium containing 2 mg/l BAP and 0.5 mg/l IBA, with respect to the number of buds per explant and percentage of rooting. The explants grown on the medium containing IBA 0.5 mg/l were rooted. 70-90% of transferred plantlets to the greenhouse were survived and grown.

Key words: Plant Growth Regulators, Micropropagation, Activated charcoal, Nodal cutting, *Capsicum annuum* L.

جداسازی و همسانه‌سازی cDNA (cloning) ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*) از قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، مقدمه‌ای بر دست‌ورزی ژنتیکی

جواد حسن‌جانپور^۱ و محمد فارسی^۱

^۱ گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

چکیده

تولید و پرورش قارچ خوراکی، یکی از کاربردهای تجاری فناوری‌های میکروبی به منظور تبدیل زیستی ضایعات بخش کشاورزی به فرآورده‌های با ارزش غذایی است. در قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) آنزیم‌های مختلفی از ابتدای رشد میسلومی تا انتهای دوره میوه‌دهی، تجزیه ترکیبات لیگنینی را در محیط کمپوست برعهده دارند. یکی از مهمترین این آنزیم‌ها، آنزیم منگنز پراکسیداز است که سهم عمده‌ای در تجزیه ترکیبات لیگنینی دارد. به منظور انجام مطالعات ملکولی بر روی آنزیم منگنز پراکسیداز در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید نژاد IM008 و آماده نمودن زمینه برای افزایش تولید این آنزیم در قارچ خوراکی دکمه‌ای، اقدام به جداسازی و همسانه‌سازی cDNA ژن کدکننده آنزیم منگنز پراکسیداز گردید. برای این منظور استخراج RNA از میسلوم‌های رشد یافته قارچ خوراکی بر روی محیط کشت مایع عصاره کمپوست انجام شد و cDNA آن به وسیله آنزیم رونوشت بردار معکوس ساخته شد. پس از تکثیر قطعه مورد نظر به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، قطعه تکثیرشده در ناقل pTZ57R/T قرار گرفت و سپس به باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل گشت. پس از استخراج پلاسمید از باکتری‌های تراریخته، پلاسمید استخراج شده مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و در مرحله آخر قطعه تکثیرشده تعیین توالی شد. در نتایج، بلاست توالی نوکلئوتیدی در مکان‌های بازهای نوکلئوتیدی با شماره‌های ۶۵۷ و ۸۵۰ با توالی ژن *mnp* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI تفاوت داشت که به ترتیب، سبب تغییر اسید آمینه ایزولوسین به والین و اسید آمینه سرین به آلانین در توالی اسید آمینه قطعه cDNA همسانه شده، می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم رونوشت بردار معکوس، ضایعات کشاورزی، ناقل pTZ57R/T، همسانه‌سازی

مقدمه

یا توقف تولید در برداشت‌های دوم به بعد است که بنظر می‌رسد عامل اصلی این مشکل، اتمام مواد غذایی برای مصرف قارچ دکمه‌ای و ناتوانی در استفاده بهینه و کامل از

یکی از مشکلات موجود در صنعت پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، کاهش و

لیگنینی در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید محسوب می‌شود (Moloy, 2004). این آنزیم برون سلولی معمولاً دارای جرم مولکولی ۴۰-۵۰ kDa (حداکثر ۶۲-۳۸) است و pI معمولاً حدود ۳-۴ است (Hofrichter, 2002).

قارچ‌های مختلفی از دسته بازیومیست‌ها دارای آنزیم‌هایی برای تجزیه ترکیبات لیگنینی هستند. تحقیقات مختلفی برای شناسایی، تعیین خصوصیات و همچنین توالی یابی ژن‌های دخیل در تجزیه لیگنین در این قارچ‌ها انجام شده است (Ma et al., 2004). بنابراین، با دست‌ورزی ژن‌های دخیل در تولید آنزیم‌های مؤثر در فرآیند تجزیه لیگنین و همچنین بهینه نمودن شرایط مناسب برای عمل این آنزیم‌ها می‌توان بستر مناسبی را برای فعالیت بیشتر قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) و استفاده بیشتر آن از کمپوست تهیه شده فراهم نمود.

اطلاعات اندکی در مورد چگونگی تولید آنزیم منگنز پراکسیداز در بازیومیست‌ها در مقایسه با دیگر قارچ‌های پوسیدگی سفید وجود دارد (Chen et al., 2001)، اما تعدادی از گزارش‌ها تولید آنزیم منگنز پراکسیداز توسط قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست را تأیید می‌کنند. مهمترین قارچ تجزیه‌کننده کمپوست که آنزیم منگنز پراکسیداز را هم تولید می‌کند، قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) است (Lankinen et al., 2001). همچنین گونه‌هایی از خانواده قارچ‌های کوپرینوس، مانند *Paneolus sphinctrinus* (Heinzkill et al., 1998) و از قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات گیاهی، مانند *Marasmius quercophilus* (Tagger et al., 1998)، نیز آنزیم منگنز پراکسیداز را تولید می‌کنند.

ژن اصلی تولیدکننده آنزیم منگنز پراکسیداز از قارچ خوراکی صدفی توسط Irie و همکاران (۲۰۰۱)

کمپوست تولید شده باشد. با افزایش دما در انتهای مراحل اولیه (فاز I) تهیه کمپوست قارچ دکمه‌ای، میکرواورگانیزم‌های گرمادوست (قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها) به میزان زیادی تکثیر می‌شوند، اما این توده زنده میکروبی تنها ۱۰ درصد نیاز غذایی قارچ دکمه‌ای را می‌تواند تأمین کند (Moloy, 2004).

محققان دریافته‌اند که در قارچ خوراکی دکمه‌ای، آنزیم‌های مختلفی از ابتدای رشد میسلیمی تا انتهای دوره میوه‌دهی تجزیه ترکیبات لیگنینی را در محیط کمپوست بر عهده دارند. پس از اتمام فرآیند کمپوست‌سازی، اساساً کمپوست شامل دو ترکیب اصلی غذایی، لیگنوسلولز و بیومس میکروبی است. محتوای لیگنوسلولز شامل لیگنین، سلولز و همی سلولز با نسبت ۳:۳:۱ است. در نتیجه، استفاده قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) از کمپوست، نیازمند توانایی تولید مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنینی است (Moloy, 2004).

مطالعات انجام شده توسط محققان مختلف تأثیر آنزیم‌های لاکاز، منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و گلی اکسال اکسیدازها را در فرآیند تجزیه ترکیبات لیگنینی در محیط / این ویترو در قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنین اثبات کرده است. البته، فعالیت این آنزیم‌ها به نوع قارچ مورد مطالعه بستگی دارد (Kamitsuji et al., 2004). از این بین آنزیم منگنز پراکسیداز، یکی از عمومی‌ترین و اصلی‌ترین پراکسیدازهای تخریب‌کننده لیگنین است که با قدرت بالا در اکسیده کردن ترکیبات گیاهی توسط اکثر قارچ‌های تجزیه‌کننده چوب و نیز بسیاری از قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست از جمله قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) تولید می‌شود. آنزیم منگنز پراکسیداز قدرتمندترین آنزیم برون سلولی اکسیده‌کننده ترکیبات

بنابراین، با شناسایی هر چه بیشتر ژن‌های تجزیه‌کننده ترکیبات گیاهی و لیگنینی، تولید نژادی هیبرید (بین گونه‌های با قدرت بیشتر تجزیه‌کنندگی و نژادهای دارای کیفیت) و یا تراریخته (انتقال ژن‌های تولید آنزیم‌های تجزیه ترکیبات گیاهی به گونه‌هایی با تجزیه‌کنندگی پایین) از قارچ خوراکی که به دلیل تولید آنزیم‌های مؤثر و با قدرت تجزیه‌کنندگی بیشتر توانایی استفاده بهتر از کمپوست آماده شده را دارند، می‌توان انتظار داشت که عملکرد قارچ خوراکی در واحد سطح تا چندین برابر مقدار کنونی افزایش یابد، در حالی که از کیفیت و خصوصیات مطلوب آن کاسته نشده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از قارچ خوراکی دکمه‌ای نژاد IM008 که در گروه پژوهشی قارچ‌های خوراکی و صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد اصلاح شده است، استفاده گردید. روش کشت بافت قارچ خوراکی از میسلیم تازه مطابق با روش بیان شده توسط فارسی و گردان (۱۳۸۶) بود. برای این منظور، قطعه‌ای از میسلیم رشد یافته قارچ خوراکی در محیط کشت جامد به یک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت تازه منتقل گردید. محیط کشت در دمای $23 \pm 1^\circ\text{C}$ در تاریکی به مدت حدود ۱۰ روز نگهداری شد. کشت مایع قارچ خوراکی دکمه‌ای نیز مطابق با روش تشریح شده توسط قربانی فعال (۱۳۸۷) با کمی تغییرات انجام گرفت. از یک کشت ۱۴-۱۰ روزه جامد میسلیمی قطعه مثلی شکلی به طول اضلاع ۲۵ میلی‌متر با کمترین میزان آگار جداسازی گردید. در هر ویال، یک برش میسلیمی به صورت غوطه‌ور در محیط کشت مایع قرار داده

جداسازی و تعیین توالی گردید. جداسازی و خصوصیت‌یابی ژن منگنز پراکسیداز از قارچ خوراکی دکمه‌ای نژاد ATCC 62459 در سال ۲۰۰۵ توسط Lankinen و همکاران انجام شد. در این مطالعه ۱۴ اینترون در ژن منگنز پراکسیداز شناسایی شده و تعداد نوکلئوتیدها در ژن کامل ۱۸۲۱ bp مشخص گردیده است. در پژوهش مذکور عنوان شده است که گمان می‌رود ژن منگنز پراکسیداز جداسازی و کلون شده و یکی از زیرواحدها و یا یکی از نسخه‌های ژن منگنز پراکسیداز شناسایی شده است. همچنین Lankinen و همکاران (۲۰۰۵) بر لزوم انجام تحقیقات بیشتر در این خصوص اشاره کرده‌اند. جداسازی و خصوصیت‌یابی ژن کدکننده آنزیم منگنز پراکسیداز از قارچ خوراکی شی تا که نیز در سال ۲۰۰۷ توسط Nagai و همکاران صورت گرفت.

هدف از اجرای این پژوهش، جداسازی و همسانه‌سازی ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*)، از قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) نژاد IM008 (از نژادهای هیبرید اصلاحی در جهاد دانشگاهی واحد مشهد) است. بهینه‌سازی مراحل استخراج RNA و تهیه cDNA از قارچ خوراکی دکمه‌ای به منظور هموار نمودن مسیر برای انجام دست‌ورزی‌های ژنتیکی و انتقال ژن به قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) نیز از اهداف پیگیری شده در این پژوهش است. کاهش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید به دلیل اتمام مواد غذایی و یا عدم استفاده بهینه از کمپوست آماده شده، از جمله مواردی است که خسارت‌های زیادی را متوجه پرورش‌دهندگان قارچ خوراکی می‌کند (Nagai et al., 2007).

به صورت میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. پس از استخراج RNA کل و برای حصول اطمینان از نبودن DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با استفاده از آنزیم DNase تیمار گردیدند و سپس برای ساخت cDNA از آن استفاده گردید.

برای ساختن cDNA از دستورالعمل کیت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمنتاز استفاده گردید. ساخت cDNA با استفاده از آغازگر الیگو 18(dT) انجام گرفت. از آنجایی که حضور ژن *mnp* در قارچ‌های خوراکی مختلف شناسایی و توالی آن در برخی از گونه‌های شبیه قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) تعیین شده بود، در واکنش‌های RT-PCR از آغازگرهای استفاده شده توسط Lankinen و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییرات در تعداد و توالی نوکلئوتیدها استفاده شد. توالی آغازگرهای بهینه شده به صورت زیر است:

آغازگر رفت:

5' ATGGCTTTCAAAATTCTTCTCA 3'

آغازگر برگشت:

5' TCAGAGGTGGGAAGTGGC 3'

برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آنزیم *Taq* پلیمرز به صورت، چرخه نخست: ۳ دقیقه در دمای ۹۴ °C، ۳۵ چرخه بعدی: ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و چرخه نهایی: ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. مخلوط استفاده شده در واکنش PCR در جدول ۱ مشخص شده است.

محصولات واکنش PCR در دمای ۴ °C و در یخچال نگهداری شدند. برای مشاهده و بررسی محصولات تکثیر شده، از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و بافر TAE

شد و به منظور رشد میسلیم‌ها، محیط‌های کشت در دمای ۱°C±۲۳ و در تاریکی نگهداری شدند.

استخراج RNA کل سلول با استفاده از کیت تجاری RNA-X plus شرکت سیناژن، روش مبتنی بر گوانیدین تیوسیانات-فنل-کلروفرم (AGPC) (Chomyszynski and Sacchi, 1987) و روش مبتنی بر کلرید لیتیم (Sreenivasaprasad, 2000) انجام شد. کلیه مراحل در کیت مورد استفاده مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده و در روش‌ها بر اساس منابع ذکر شده انجام گرفت. در ادامه کیفیت و کمیت RNA به دست آمده بررسی گردید.

برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده عمل الکتروفورز به دو روش ژل آگارز و ژل فرم آلدئید-آگارز انجام گرفت که در الکتروفورز با ژل آگارز از ژل یک درصد و بافر TBE (0.5X) و یا TAE (1X) برای بافر تانک و ژل استفاده شد. سپس ۴ میکرولیتر از نمونه RNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر از لودینگ بافر (Loading Buffer) مخلوط شده، درون چاهک‌های ژل ریخته شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید.

از آنجایی که RNA به سرعت توسط آنزیم RNase موجود در محیط تجزیه می‌شود، در الکتروفورز RNA با استفاده از ژل فرم آلدئید-آگارز، معمولاً از آب مقطر تیمار شده با DEPC و بافر MOPS استفاده می‌گردد. در این روش، از ژل آگارز یک درصد و بافر MOPS (1X) استفاده شد. در ادامه، پس از آماده شدن ژل، همانند ژل آگارز، نمونه‌های RNA درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل فرم آلدئید-آگارز اضافه گردید. سنجش کمیت RNA استخراج شده با بررسی جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با استفاده از فرمول "فاکتور رقت × A₂₆₀ × ۴۰"

UV-ترانسلومیناتور باند مربوطه مشاهده و اندازه آن تخمین زده شد. قطعه تکثیر شده ژن *mnp* با استفاده از دستورالعمل کیت خالص‌سازی DNA از ژل شرکت Bioneer (K-3035-1) جدا و خالص‌سازی گردید.

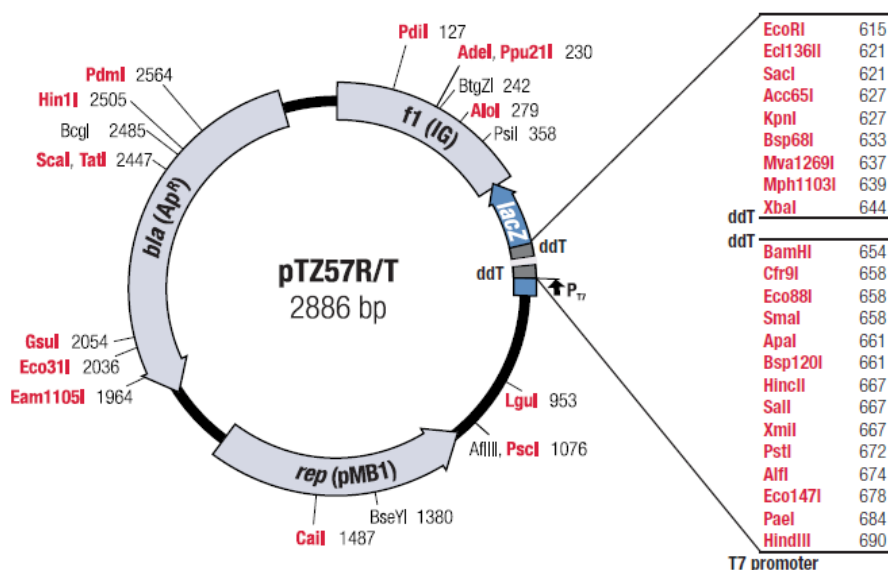
(TBE) با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت استفاده شد و رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. پس از الکتروفورز محصولات PCR همراه با سایز مارکر *Lambda DNA/EcoRI+ Hind III*، با استفاده از دستگاه

جدول ۱- اجزای مخلوط واکنش PCR

غلظت نهایی (در حجم ۲۵ μl)	مقدار مصرف در هر واکنش (μl)	موارد مورد نیاز
۱ X	۲/۵	بافر PCR (۱۰ X)
۱ mM	۱/۲۵	کلرید منیزیم (۵۰ mM)
۰/۲ mM هر نوکلئوتید	۰/۵	دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ mM)
۰/۴ pmol/μl	۱	آغاز گر رفت (۱۰ pmol/μl)
۰/۴ pmol/μl	۱	آغاز گر برگشت (۱۰ pmol/μl)
-	۵	cDNA الگو
۱/۵ U/۲۵ μl	۰/۳	DNA پلیمرز <i>Taq</i> (۵ U/μl)
-	۱۳/۴۵	آب مقطر دیونیزه استریل

تکثیر شده به باکتری اشرشیاکولی نژاد DH5α وارد شد. بعد از ۱۶ ساعت از کشت سلول‌های مستعد شده بر روی پلیت محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک پنی‌سیلین، کلنی‌های کوچکی نمایان شدند. در این مرحله، کلونی‌های سفید باکتری‌های نوترکیب به محیط کشت مایع انتقال داده و به آنها اجازه داده شد تا رشد کرده، به OD حدود ۰/۷ برسد. سپس با استفاده از دستورالعمل Maniatis و همکاران (۱۹۸۹) اقدام به استخراج پلاسمید از باکتری‌های نوترکیب برای تأیید ترانسفورماسیون گردید.

همسانه‌سازی ژن *mnp* با استفاده از *InsT/AcloneTM* PCR Product Cloning Kit به شماره کاتالوگ K1214 انجام شد. باکتری مورد استفاده اشرشیاکولی از نژاد DH5α بود. مراحل انجام همسانه‌سازی به این ترتیب بود: در مرحله اتصال، T/A و کتور مورد استفاده pTZ57R/T با اندازه ۲۸۸۶ جفت باز بود (شکل ۱). نسبت DNAهای مورد استفاده از ۱:۱ تا ۱:۶ (DNA مورد نظر: و کتور) متغیر بود. در ادامه، با استفاده از دستورالعمل Maniatis و همکاران (۱۹۸۹) با اعمال تغییراتی ژن *mnp*



شکل ۱- نقشه هضم آنزیمی در ناقل pTZ57R/T

جدول ۲- ترکیبات هضم آنزیمی

ترکیبات	هضم با آنزیم <i>Hind III</i> (μl)	هضم با آنزیم <i>kpn I</i> (μl)	هضم مضاعف (μl)
آنزیم (<i>Hind III</i>)	۱	-	۱
آنزیم (<i>kpn I</i>)	-	۱	۱
DNA (پلاسمید + ژن <i>mnp</i>)	۵	۵	۵
بافر Tango (۱۰X)	۲	۲	۲
آب	۱۲	۱۲	۱۱
کل	۲۰	۲۰	۲۰

برای تأیید اندازه پلاسمید نوترکیب، نخست پلاسمید به صورت خطی درآمد. برای این منظور، پلاسمید نوترکیب با آنزیمی که تنها دارای یک سایت برشی در پلاسمید نوترکیب است، برش داده شد. آنزیم انتخاب شده *Hind III* بود که هیچ گونه سایت برشی در ژن *mnp* نداشته، تنها دارای یک سایت برشی در پلاسمید pTZ57R/T است. برای تأیید الگوی هضمی پلاسمید استخراج شده با الگوی هضمی پلاسمید نوترکیب مورد انتظار (بر اساس توالی

از هضم مضاعف با آنزیم‌های *Hind III* و *kpn I* که کل ژن را از ناقل جدا می‌کنند، استفاده شد (جدول ۲). از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برای بررسی نتایج هضم استفاده گردید. در مرحله آخر، برای تأیید نهایی این که قطعه وارد شده به پلاسمید همان ژن *mnp* است، پلاسمید نوترکیب برای تعیین توالی فرستاده شد.

نتیجه‌گیری و بحث

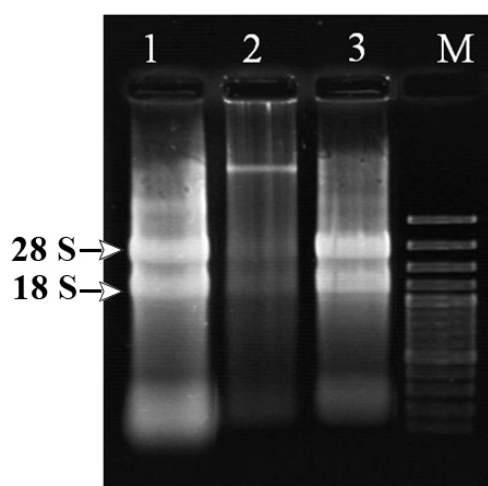
نسبت A_{260}/A_{280} در نمونه‌های استخراج‌شده، با استفاده از سه روش گوانیدین تیوسانات-فنل-کلروفرم (AGPC)، مبتنی بر کلرید لیتیم و کیت تجاری RNA-X plus به ترتیب، $۱/۴ \pm ۱$ ، ۲ ± ۱ و $۱/۹ \pm ۱$ بود (جدول ۳). وضوح و شدت باندهای $^{۱۸}\text{SrRNA}$ در RNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز و یا فرم آلدئید-آگارز نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج‌شده است (شکل ۲). کیفیت این باندها مطابق با شکل ۱ در روش‌های گوانیدین تیوسانات-فنل-کلروفرم و کیت

تجاری RNA-X plus به مراتب بهتر از روش مبتنی بر کلرید لیتیم بود. بهترین نسبت برای A_{260}/A_{280} در مورد RNA عددی بین $۱/۸$ تا ۲ است که نسبت‌های بیشتر از ۲ و کمتر از $۱/۸$ نشان‌دهنده آلودگی‌های فنلی و پروتئینی هستند. بر این اساس، در روش مبتنی بر کلرید لیتیم، بیشترین میزان ناخالصی‌های پروتئینی دیده می‌شود، اما روش‌های گوانیدین تیوسانات-فنل-کلروفرم و کیت تجاری RNA-X plus سیناژن از نظر عملکرد و کیفیت RNA حاصله برتر از روش اول هستند (جدول ۳).

جدول ۳- عملکرد RNA و نسبت A_{260}/A_{280} در سه روش AGPC، روش مبتنی بر کلرید لیتیم و کیت تجاری RNA-X plus

A_{260}/A_{280}	عملکرد RNA ($\mu\text{g/ml}$)	روش جداسازی RNA
۲ ± ۱	۲۲ ± ۳	AGPC
$۱/۴ \pm ۱$	۱۷ ± ۲	روش مبتنی بر کلرید لیتیم
$۱/۹ \pm ۱$	۵۴ ± ۶	کیت تجاری RNA-X plus سیناژن

* هر یک واحد از A_{260} معادل با $۴۰ \mu\text{g/ml}$ ملکول RNA برآورد شده است.

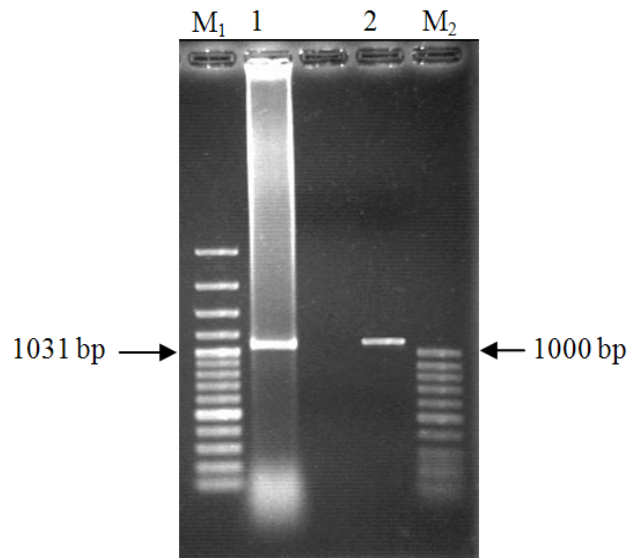


شکل ۲- RNA کل استخراج‌شده بر روی ژل فرم آلدئید-آگارز (۱٪)

- 1 RNA استخراج‌شده با دستورالعمل Chomczynski and Sacchi (1987).
 - 2 RNA استخراج‌شده با دستورالعمل Sreenivasaprasad (2000).
 - 3 RNA استخراج‌شده به وسیله کیت تجاری RNA-X plus.
- M سایز مارکر DNA (۱۰۰ bp).

می‌رفت، اما برای حذف مواد زائد به جای مانده از PCR و همچنین آغازگرهای استفاده نشده، قطعه ۱۰۶۵ bp از روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت تجاری خالص‌سازی ژل شرکت Bioneer (K-3035-1) جداسازی شد. تکرار عمل الکتروفورز بر روی نمونه خالص‌شده از روی ژل، کیفیت و مقدار قطعه جدا شده را برای انجام فرایند توالی‌یابی تأیید کرد (شکل ۳).

از آنجایی که هدف تکثیر یک قطعه اختصاصی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بود، RNA استخراج شده مستقیماً برای تهیه cDNA استفاده گردید. اندازه قطعه تکثیر شده توسط PCR با مراجعه به بانک‌های اطلاعاتی (NCBI، expasy و ebi) حدود ۱۰۶۵ جفت باز گزارش شده است. با اینکه برای تکثیر از آغازگرهای اختصاصی استفاده می‌شد و انتظار مشاهده تک‌باند بر روی ژل آگارز



شکل ۳- تکثیر ژن *mnp* با استفاده از آنزیم پلیمرز *Taq* بر روی ژل آگارز ۱٪

1- محصول PCR با بهینه‌سازی چرخه‌های دمایی

2- PCR خالص‌سازی شده با استفاده از کیت تجاری خالص‌سازی DNA از ژل (Bioneer)

M₁- سایز مارکر ۱۰۰ bp

M₂- سایز مارکر ۵۰ bp

محصول اتصال حاصل از نسبت ۷ به ۱ (DNA به ناقل) بهترین نتیجه را به واکنش اتصال داد و کلونی‌های سفید رنگ که نشان‌دهنده ورود ژن به پلاسمید (در سیستم تشخیص سفید/آبی) است، در این نسبت بیشترین میزان را شامل می‌شد.

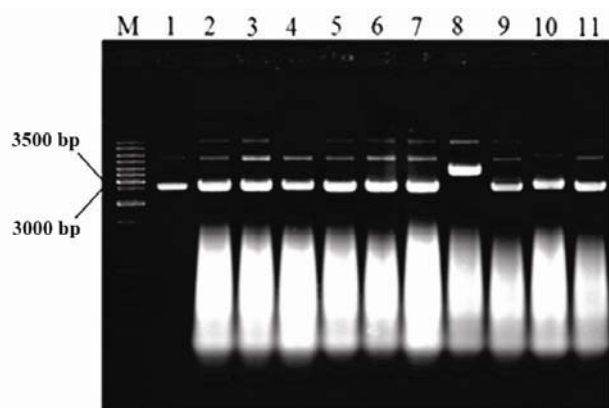
پس از انجام ترانسفورماسیون و کشت باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG و ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، کلونی‌های آبی و سفید ظاهر گردیدند (شکل ۴-۶). برای انجام عمل اتصال (Ligation) مقدار DNA به ناقل با نسبت‌های ۳، ۵ و ۷ استفاده شد.

بدون قطعه مورد نظر که به‌عنوان شاهد استفاده شده بود، صحت آزمایش‌های ورود قطعه ژن *mnp* را در پلاسمید تأیید کرد.

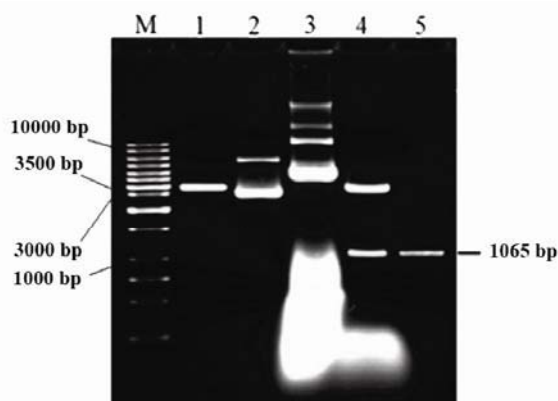
توالی‌یابی و اطلاعات ملکولی تکمیلی

قطعه ویرایش شده نهایی، در بانک اطلاعاتی NCBI برای بررسی همولوژی آن در میان موجودات دیگر بررسی شد. نتایج این بررسی‌ها نشان داد، که قطعه توالی‌یابی شده در بین بسیاری از موجودات مختلف، از جمله: باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان دارای قسمت‌های مشابهی است. میزان این تشابه در موجوداتی، مانند برخی از قارچ‌ها و باکتری‌ها بسیار زیاد بود. براساس اطلاعات دریافت شده از سایت www.ebi.ac.uk آنزیم منگنز پراکسیداز (MnP) جزو خانواده پراکسیدازهای گیاهی و زیر مجموعه لیگنینازها طبقه‌بندی شده است.

استخراج پلاسمید از تمام کلونی‌های سفید انجام شد، اما در شکل ۴ قسمت (الف)، تنها در یکی از کلونی‌های انتخاب شده پلاسمید ترا ریخته وجود داشت. اسمیر انتهای ژل نیز نمایانگر آلودگی‌های پروتئینی به‌جا مانده از استخراج پلاسمید است (شکل ۳-الف). پس از هضم پلاسمیدها، برش‌های منفرد و مضاعف به‌وسیله آنزیم‌های برشی *Kpn I* و *Hind III* انجام گرفت. در برش‌های منفرد، با توجه به اندازه پلاسمید خطی بدون قطعه وارد شده که حدود ۲۸۸۶ bp است (شکل ۳-ب، چاهک ۱)، باند پلاسمید مشاهده شده در صورت داشتن قطعه ژن *mnp* باید اندازه‌ای معادل $2886 + 1065 = 3951$ bp مشاهده گردد. باند مذکور در شکل ۳ قسمت ب در چاهک شماره ۳ مشاهده می‌شود. برش مضاعف پلاسمید دارای قطعه مورد نظر نیز باعث جدایی ژن *mnp* از پلاسمید شده، این قطعه را به صورت باندهای جداگانه قابل مشاهده کرد (شکل ۳-ب، چاهک ۴). الگوی هضم پلاسمید حلقوی و خطی شده



(ب)



(الف)

شکل ۳ الف) هضم پلاسمید دارای ژن همسانه شده (۱- پلاسمید خطی شده pTZ57R/T، ۲- پلاسمید طبیعی pTZ57R/T، ۳- پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه خارجی؛ ۴- هضم مضاعف پلاسمید نوترکیب یا استفاده از آنزیم‌های *Hind III* و *kpn I*؛ ۵- ژن *mnp* پس از خالص‌سازی از ژل، M- مارکر وزن ملکولی DNA (۱ kb))
 ب) استخراج پلاسمید با روش Maniatis و همکاران (۱۹۸۹)؛ ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱: نمونه‌های پلاسمید فاقد قطعه خارجی (ژن مورد نظر)، ۸- پلاسمید نوترکیب، M- مارکر وزن ملکولی DNA (۱ kb))

مذکور و در قسمت مربوط به توضیحات آنزیم منگنز پراکسیداز آورده شده است که این آنزیم یک همو پروتئین است که توسط قارچ‌های بازیدیومیست تولید شده، توانایی تجزیه ترکیبات لیگینی را دارد.

با توجه به نتایج حاصله در multiple alignment نوکلئوتیدی مبنی بر اینکه در توالی‌های مشابه در گونه‌های نزدیک به *A. bisporus*، در این دو مکان نوکلئوتیدی متفاوت بوده و در نتایج multiple alignment پروتئینی توالی‌های مشابه در گونه‌های نزدیک به *A. bisporus*، تغییر در نوکلئوتیدهای ۶۵۷ و ۸۵۰ به ترتیب باعث تبدیل اسید آمینه‌های ایزولوسین و سرین به والین و آلانین شده است، می‌توان حدس زد که این توالی آمینواسیدی ژن *mnp*، توالی ثانویه برای آنزیم منگنز پراکسیداز گونه *A. bisporus* (دارای دو موتاسیون نقطه‌ای) باشد. این احتمال وجود دارد که این موتاسیون نتیجه به کارگیری از نژاد IM008 اصلاح شده در جهاد دانشگاهی مشهد باشد، اما این موضوع در حد یک احتمال بوده، باید مورد تحقیقات بیشتری قرار گیرد.

نژاد قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* با استفاده از نشانگرهای AFLP، مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی) ۶۷-۵۸: ۲۲.

Chomyszynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.

پس از تعیین ترتیب صحیح نوکلئوتیدها در توالی شناسایی شده و بررسی منحنی‌های حاصل از توالی‌یابی ژن *mnp* در قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*)، مشابه‌ترین توالی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، با استفاده از نوکلئوتید بلاست بررسی شد. توالی شناسایی شده با مورد موجود در بانک اطلاعاتی NCBI تطبیق داده شد و مشخص گردید که بجز نوکلئوتیدهای ۶۵۷ و ۸۵۰ در بقیه نوکلئوتیدها مشابه هستند. ویژگی‌ها و توالی رشته پلی‌پپتیدی حاصل از توالی دو رشته مشابه با استفاده از سایت www.expasy.org/tools تعیین گردید (شکل ۶). ژن *mnp1* به‌عنوان ژن ثبت شده و توالی *mnp* به‌عنوان ژن توالی‌یابی شده بیان می‌شود.

mnp1: Theoretical pI/Mw: 4.18 / 37636.22

mnp: Theoretical pI/Mw: 4.33 / 32686.23

بر اساس اطلاعات مندرج در سایت www.ebi.ac.uk

آنزیم منگنز پراکسیداز (EC 1.11.1.13) به نام‌های دیگری Mn-dependent (NADH-oxidizing) peroxidase, Peroxidase-M2 and Mn-dependent peroxidase نیز شناخته می‌شود. همچنین، این آنزیم به کوفاکتور آهن نیز برای انجام فعالیت‌های خود نیازمند است. در سایت

منابع

فارسی، م. و گردان، ح. ر. (۱۳۸۶) پرورش و اصلاح قارچ‌های خوراکی با تأکید بر قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران.

قربانی‌فعال، پ.، فارسی، م.، پوریان‌فر، ح. ر.، محمودنیا میمند، م. و ذوالعلی، ج. (۱۳۸۷) تهیه شناسنامه ملکولی برای ۱۲

Chen, D. M., Taylor, A. F. S., Burke, R. M., and Cairney, J. W. G. (2001) Identification of genes for lignin peroxidases and manganese peroxidases in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 152:151-158.

- Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 55: 170-176.
- Ma, B., Mayfield, M. B., Godfrey, B. J. and Gold, M. H. (2004) Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. Eukaryotic Cell 3: 579-588.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ndEd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Moloy, S. (2004) Sugar transport and water relations of *Agaricus bisporus*. Ph.D Thesis, Cranfield University, United Kingdom.
- Nagai, M., Sakamoto, Y. and Nakade, K. (2007) Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*. Mycoscience 48: 125-130.
- Sreenivasaprasad, S. (2000) Isolation of fungal nucleic acids. In: The nucleic acid protocols handbook (ed. Rapley, R.), Humana Press, New Jersey.
- Tagger, S., Perissol, C., Gil, G., Vogt, G., and Le Petit, J. (1998) Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). Enzyme and Microbial Technology 23: 372-379.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., and Anke, T. (1998) Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). Applied and Environmental Microbiology 64: 1601-1606.
- Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology 30: 454-466.
- Irie, T., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2001) Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 55: 566-570.
- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2004) Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Apply Microbiology and Biotechnology 65: 287-294.
- Lankinen, P., Hilden, K., Aro, N., Salkinoja-salonen, M. and Hatakka, A. (2005) Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization, Apply Microbiology and Biotechnology 66: 401-407.
- Lankinen, V. P., Bonnen, A. M., Anton, L. H., Wood, D. A., Kalkkinen, N., Hatakka, A., and Thurston, C. F. (2001) Characteristics and N-terminal amino acid sequence of manganese peroxidase from solid substrate cultures of

Isolation and cloning of cDNA manganese peroxidase gene (*mnp*) from white button Mushroom (*Agaricus bisporus*), introduction to genetic manipulation

* Javad Hassan Janpoor and ¹ Mohammad Farsi

¹ Department of Biotechnology and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

Mushrooms, in addition to their nutritional values, are currently considered as useful tools for biological of agricultural wastes to useful food products. In the button mushroom (*Agaricus bisporus*), there are several enzymes which catalyze lignin compounds of the compost during the mycelia growth and the fructification phases. Manganese Peroxidase (MnP), as one of the most important lignin-degrading enzymes, plays a key role in degradation of lignin compounds in the button mushroom. To achieve a high yield of MnP in the *A. bisporus*, the gene encoding MnP was isolated, characterized and cloned. The total RNA was extracted from the mycelium growing on the liquid compost extract medium, followed by construction of its cDNA by reverse transcriptase. The PCR products were then inserted into the pTZ57R/T cloning vector, and transferred into *E. coli* (the DH5 α strain). Finally, the plasmid was extracted from the transgenic bacteria, followed by enzymatic digestion and nucleotide sequencing. The BLAST analysis revealed two different nucleotides (657 and 850) between the cloned fragment (generated in this research) and the *mnp1* (available in the gene bank of NCBI). The difference in the nucleotide positions of 657 and 850 subsequently changed Isoleucine to Valine and Serin to Alanine, respectively.

Key words: Reverse transcriptase enzyme, Agriculture wastes, pTZ57R/T vector, Molecular cloning

تغییرات بیوشیمیایی میزان ترپنوئیدهای موجود در اسانس گیاه دارویی نعناع سبز (*Mentha spicata* L.) در پاسخ به تیمار مقدار اضافی روی (Zn)

سعید زارع ده‌آبادی^۱، زهرا اسرار^۱، میترا مهربانی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

^۲ مرکز تحقیقات فرماسوتیکس، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

چکیده

عنصر روی نقش‌های ساختاری و عملکردی فراوانی را در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاهان بر عهده دارد، ولی مقدار اضافی آن در خاک‌ها به عنوان فلز سنگین، یک فاکتور محدودکننده رشد برای گیاهان محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت بالای گیاه نعناع در زمینه‌های دارویی و صنعتی، در این تحقیق اثر غلظت‌های متفاوت روی بر این گیاه مطالعه شد. نمونه‌های گیاهی در اتاقک رشد با شرایط کاملاً استاندارد و تحت تیمار غلظت‌های مختلف عنصر روی تا رسیدن به مرحله گلدهی کامل نگهداری شدند. از دستگاه کلونجر به منظور استخراج اسانس و از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (GC-Mass) برای شناسایی ترکیبات اسانس استفاده شد. در بررسی‌های بیوشیمیایی انجام شده در این تحقیق مشخص گردید، قسمت اعظم اسانس گیاه نعناع سبز را ترکیبات مونوترپنی تشکیل می‌دهند و سز کوئی ترپن‌ها درصد کمتری از مواد موجود در اسانس را به خود اختصاص می‌دهند. همچنین، مقایسه میزان ترکیبات ترپنی نشان داد، تیمار گیاه نعناع با عنصر روی موجب کاهش میزان مونوترپن‌های اکسیژنه موجود در اسانس شده، ولی مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه را افزایش داده است. مقدار کلی مونوترپن‌ها با افزایش کاربرد روی در محلول غذایی افزایش، ولی مقدار سز کوئی ترپن‌ها-اعم از اکسیژنه و هیدروکربنه- در همه نسبت‌های فلز روی کاهش یافت. به‌طور کلی، از نتایج به‌دست آمده چنین برمی‌آید که، مقدار مونوترپن‌های اکسیژنه در مقایسه با سز کوئی ترپن‌ها بیشتر تحت تاثیر تیمار عنصر روی قرار گرفته و کاهش آن چشمگیرتر است و این ممکن است به دلیل تغییرات بیوانرژتیک سلول‌های گیاه نعناع سبز در پاسخ به تنش فلز سنگین روی باشد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فرار، مونوترپن‌ها، سز کوئی ترپن‌ها، نعناع سبز، روی

مقدمه

تولید و میزان مواد مؤثره گیاهان دارویی، به عنوان یک متغیر تحت تأثیر بسیاری از عوامل محیطی قرار می‌گیرد. کشف و دستیابی عوامل مؤثر در جهت افزایش خواص دارویی و میزان مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی، همواره مد نظر متخصصان صنایع داروسازی بوده است. از جمله این موارد می‌توان به نقش تغذیه و کودهای شیمیایی بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان اشاره کرد (نیاکان و همکاران، ۱۳۷۹). از آنجا که گیاه مورد استفاده در این تحقیق یک محصول کشاورزی مهم است که از نظر اسانس و ترکیبات دارویی حائز اهمیت است و از طرف دیگر، عنصر غذایی روی به عنوان کوفاکتور در فعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارد، در این پژوهش تأثیرات عنصر روی بر تغییرات میزان اسانس در گیاه نعناع سبز بررسی گردید.

نعناع از جمله گیاهانی است که به علت اهمیت اقتصادی و دارویی آن توجه بیشتر محققان را به خود جلب نموده تا از طریق شناخت عوامل مؤثر بر کمیت و کیفیت اسانس بازدهی این گیاه دارویی را افزایش دهند (زرگری، ۱۳۷۶). نعناع خوراکی (*Mentha spicata* L.) متعلق به خانواده Lamiaceae (Labiatae)، گیاهی است چند ساله، علفی، پایا، با ساقه‌های چهار گوش و برگ‌های متقابل و دنداندار که پوشیده از کرک و بدون دم‌برگ هستند. گل‌ها به صورت سنبله‌های باریک و نوک‌دار، سیستم ریشه‌ای خزننده است و تکثیر گیاه معمولاً از طریق ساقه‌های زیر زمینی یا ریزوم‌ها صورت می‌گیرد. گیاه نعناع در خاک‌های شنی اسیدی رشد بهتری داشته، شرایط نوری متوسط و رطوبت بالای خاک را ترجیح می‌دهد (امیدبیگی، ۱۳۷۶).

بخش‌های هوایی گیاه، به خصوص برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار آن معطر بوده، مصارف صنعتی و دارویی فراوانی دارد (میرزا و همکاران، ۱۳۷۵). از اسانس این گیاه نیز در زمینه تهیه لوازم آرایشی، تهیه داروهای مسکن در درمان تب، سردرد، سرماخوردگی و غیره و در صنایع غذایی به عنوان طعم‌دهنده غذاها و شیرینی‌جات استفاده می‌شود (Diaz-Marota et al., 2003).

غلظت عناصر میکرو و فلزات سنگین در خاک، یکی از معیارهای اساسی در تولید ترکیبات دارویی موجود در گیاهان تازه کشت شده است. این نشان‌دهنده این حقیقت است که، مقدار جذب و ورود آنها متناسب با غلظت بوده، در بیوسنتز ترکیبات دارویی تأثیر زیادی دارند (Weckx and Clijsters, 1997). عنصر روی (Zn) در مقدار کم به عنوان یک ریزمغذی ضروری برای رشد و نمو گیاهان بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش دارد. این فلز به عنوان فعال‌کننده و کوفاکتور برخی آنزیم‌های حیاتی گیاه از جمله کربونیک انیدرازها، دهیدروژنازها، آلکالین فسفاتازها، فسفولیپازها و RNA پلیمرازها در متابولیسم پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین به عنوان یک هورمون محرک رشد ایفای نقش می‌کند، در حالی که همین عنصر در غلظت‌های بالا به عنوان یک فلز سنگین، موجب اختلالات متابولیکی و در نهایت، بازدارندگی رشد در اکثر گونه‌های گیاهی می‌شود (Rout and Das, 2003).

فلزات سنگین اغلب در قالب آلاینده‌های محیطی، از جمله آلودگی‌های جوی مراکز صنعتی، استفاده افراطی از کودهای کشاورزی و فاضلاب‌های شهری و صنعتی به صورت برگشت‌ناپذیر وارد خاک می‌شوند (Rout and

مواد و روش‌ها

کشت گلدانی

برای اطمینان از یکسان بودن شرایط گیاه اولیه همه ریزوم‌ها از یک گیاه مادری جدا شدند. بستر کشت ورمیکولیت برای کشت گلدانی گیاهان انتخاب گردید. ریزوم‌های نعنای سبز (اسپرمنت) پس از شستشو با آب مقطر به گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴×۱۲ سانتی‌متر حاوی ورمیکولیت منتقل شدند. در هر گلدان ۴ عدد ریزوم با طول ۴ سانتی‌متر قرار گرفته، گلدان‌ها در اتاق رشد با شرایط کنترل شده تحت دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/نور)، دوره دمایی ۲۸/۱۸ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و رطوبت نسبی ۶۰-۵۰ درصد نگهداری شدند. در طول دو هفته اول گلدان‌ها با آب مقطر و محلول غذایی هو گلند با pH تقریبی ۵/۷±۱ آبیاری گردیدند. سپس برای تهیه محلول‌های تیمار (۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار)، بسته به تیمار مورد نظر از استوک‌های تهیه شده برای روی (Zn) به مقدار مناسب به محلول غذایی پایه اضافه نموده، هفته‌ای ۲ مرتبه استفاده گردید. تیمار صفر از روی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. منظور از غلظت صفر به عنوان شاهد، این است که در مقایسه با محلول‌های تیمار هیچ یونی اضافه نشده است، در حالی که، مقدار پایه فلز روی در هو گلند در همه محلول‌ها وجود دارد. در فواصل بین تیمارها به منظور مرطوب نگه داشتن بستر خاک و ممانعت از تجمع بیش از حد نمک در گلدان‌ها از آب مقطر استفاده می‌گردید. پس از ۲۰ هفته پارامترهای مورد نظر در نمونه‌های گیاهی مورد سنجش قرار گرفتند.

(Das, 2003). گونه‌های مختلف گیاهی در برابر آلودگی خاک با فلزات سنگین واکنش‌های متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. برخی از گونه‌های گیاهی به مقدار معینی از فلزات سنگین در خاک مقاوم بوده، توانایی جذب و تثبیت آنها در بافت‌های درونی خود را دارند. گاه در برخی از گیاهان آثار مسمومیت چندان بارز نیست، ولی میزان محتوی فلزی موجود در گیاه سلامت انسان و یا دام‌هایی را که از آن تغذیه می‌کنند، به خطر می‌اندازد (Arduini et al., 1994). پژوهش‌های بسیاری پیرامون مقدار و نوع ترکیبات اسانس موجود در گیاهان دارویی در پاسخ به عوامل محیطی مختلف صورت گرفته است. تأثیر زمان‌های مختلف برداشت بر محصول و ترکیبات اسانس نعنای سبز توسط Kizil و Toncer (۲۰۰۶) بررسی گردید. این محققان پیشنهاد کردند، بیشترین میزان رشد و اسانس‌دهی زمانی است که گیاه در مرحله گلدهی کامل باشد. در پژوهش، برخی محققان اثر نحوه خشک کردن بر کیفیت و کمیت اسانس گیاه نعنای سبز را بررسی نموده، دریافته‌اند، خشک کردن به روش فریز درای (Freeze Drying) بازدهی بیشتری داشته، خسارت کمتری به ترکیبات موجود در اسانس وارد می‌کند (Diaz-Marota et al., 2003). با این وصف، در این روش میزان ترپن‌های اکسیژنه و سزکوئی‌ترین‌ها کاهش می‌یابد. در این پژوهش نیز با توجه به نقش بالای عنصر روی در مسیرهای متابولیسمی سنتز ترکیبات دارویی در گیاه نعنای سبز (خوراکی)، تأثیر غلظت‌های مختلف عنصر روی بر تغییرات ترپنوئیدهای اسانس این گیاه بررسی گردید.

اسانس‌گیری و شناسایی ترکیبات فرار گیاه

در این تحقیق، برای مطالعه دقیق ترکیبات اسانس نعناع از نمونه گیاهی تازه استفاده گردید. از دستگاه کلونجر (Clevenger) مدل BP جدید با سوپاپ اضافی مطابق با روش تقطیر با آب برای استخراج اسانس استفاده شد (امیدبگی، ۱۳۷۶). برای شناسایی ترکیبات موجود در اسانس گیاه، اجزای متشکله اسانس گیاه به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Shimadzu-QP5050 متصل به طیف سنج جرمی مدل Shimadzu-QP5050 بررسی شدند. در تجزیه اسانس توسط دستگاه GC-Mass به دلیل شباهت طیف جرمی بسیاری از ترکیبات تریپنی موجود در اسانس و همچنین در اثر مشابهت بسیار ساختمانی و شکست‌های متنوع و بازآیی بعد از یونیزاسیون، استفاده تنها از طیف جرمی برای شناسایی هر یک از اجزای اسانس دقت کافی را نخواهد داشت. به همین دلیل، برای افزایش دقت در شناسایی ترکیبات همراه با طیف جرمی از ارزش بازدارندگی نسبی (اندیس کوتاس) جهت صحت‌گذاری بر شناسایی توسط طیف جرمی استفاده شد. اندیس کوتاس یا بازدارندگی برای هیدروکربن نرمال، ۱۰۰ برابر عدد اتم کربن آن است و به ستون و یا شرایط مورد استفاده در آنالیز بستگی ندارد. با استفاده از رابطه زیر می‌توان اندیس بازدارندگی یا عدد کوتاس هر یک از اجزای جدا شده را محاسبه نمود:

$$RI_x = 100i \frac{\log(t_s)_x - \log(t_s)_z}{\log(t_s)_{(z+i)} - \log(t_s)_z} + 100z$$

(x = ضریب بازدارندگی جسم مورد نظر، (ts)x = زمان بازدارندگی جسم مورد نظر بر حسب ثانیه، z = زمان بازدارندگی آلکان قبل از جسم مورد نظر بر حسب ثانیه، (ts)z+i = زمان بازدارندگی آلکان بعد از جسم مورد نظر بر حسب ثانیه، i = تفاوت تعداد کربن دو آلکان پشت سرهم (معمولاً یک است)، z = تعداد کربن آلکان قبل از جسم مورد نظر)

آنالیز آماری

این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، ANOVA و نرم‌افزار MSTAT-C صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

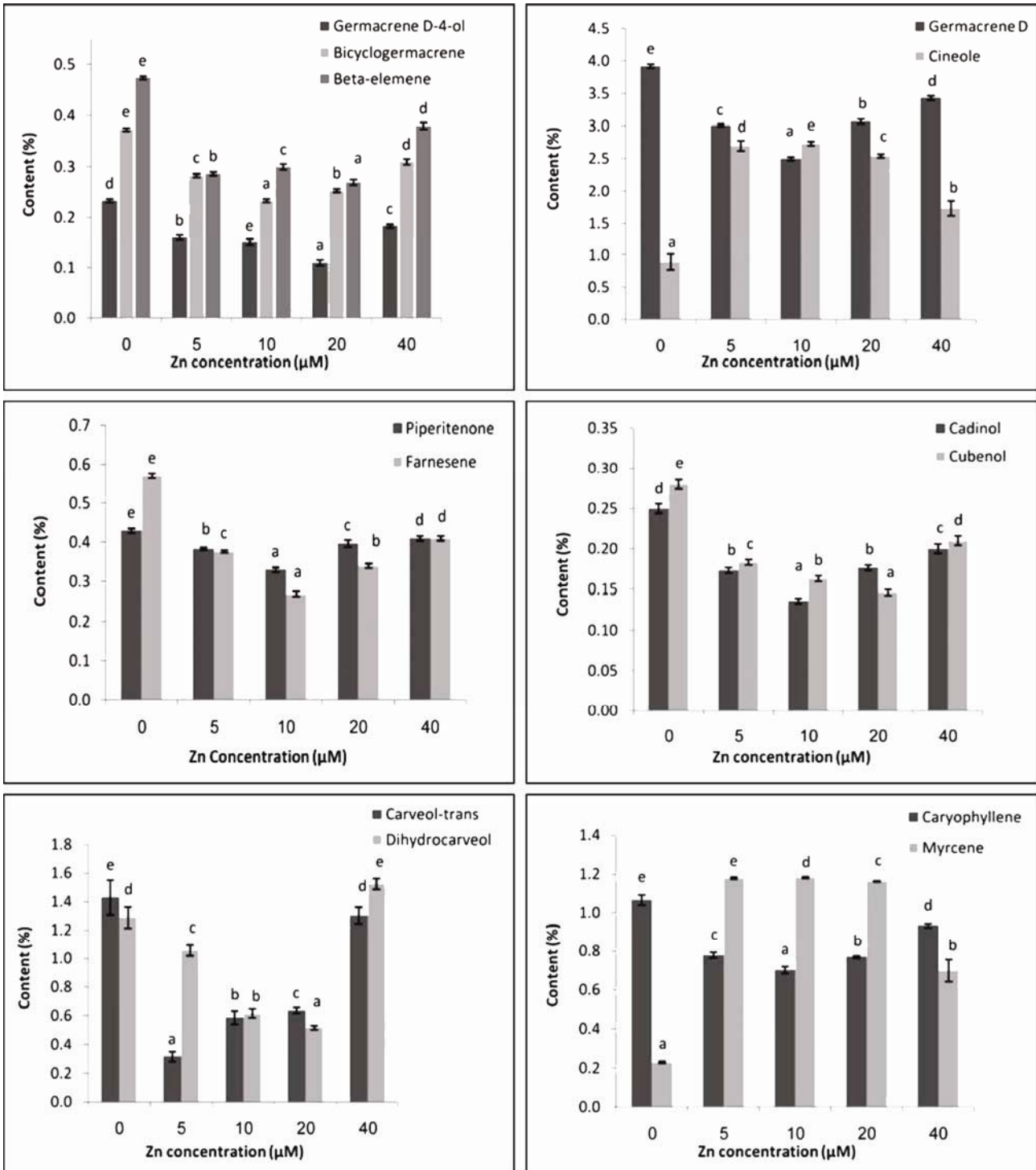
نتایج

تغییرات میزان ترکیبات اسانس در نسبت‌های مختلف روی

از آنالیز اسانس در دستگاه GC-Mass حدوداً ۲۴ ترکیب شناسایی گردید که از میان آنها به ترتیب کارون، لیمونن و ژرماکرن، کاروئول و کاریوفیلن، مهمترین و فراوانترین اعضای تشکیل‌دهنده اسانس بودند (جدول ۱). مقدار ژرماکرن در اسانس با افزایش غلظت روی رو به کاهش رفت. بیشترین مقدار این ترکیب در گیاه شاهد و کمترین مقدار آن در غلظت ۲۰ میکرومولار روی مشاهده شد. بر اساس نتایج، بیشترین مقدار کاریوفیلن در گیاه شاهد با ۱/۰۹ درصد و کمترین مقدار آن در تیمار ۱۰ میکرومولار روی با ۰/۶۷ درصد بود. مقدار ۸۰۱- سینئول در گیاهان تیمار شده با روی در مقایسه با گیاه شاهد افزایش نشان داد. کمترین مقدار آن در گیاه شاهد با ۰/۷۱ درصد و بیشترین مقدار آن در غلظت ۱۰ میکرومولار روی با ۲/۷۳ درصد بود. ترکیب میرسن در تیمار پایین روی رو به افزایش رفت، ولی در غلظت ۴۰ میکرومولار از مقدار آن کاسته شد. بیشترین مقدار این ترکیب در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار روی بود. مقدار کاروئول و دهیدروکاروئول در اسانس با افزایش غلظت روی در

و کمترین مقدار آنها در تیمار ۲۰ میکرومولار به ترتیب با ۰/۵۸ و ۰/۵۲ درصد بود (شکل ۱).

محلول آبیاری کاهش یافت، به طوری که بیشترین مقدار این ترکیبات در گیاه شاهد به ترتیب با ۱/۷۸ و ۱/۴۳ درصد



شکل ۱- مقایسه ترکیبات موجود در اسانس برگ و سرشاخه‌های گل دار گیاه نعناع سبز تحت تیمار غلظت‌های مختلف عنصر روی ($p < 0.05$)

جدول ۱- مقایسه ترکیبات اسانس گیاه *M. spicata* در نسبت‌های مختلف عنصر روی (Zn)
(زمان بازداری: RT، اندیس کوتاس استاندارد: KI، اندیس کوتاس به دست آمده: RI)

Compound	Retention Index (DB5 column)	Zinc concentration in treatments									
		0 μ M		5 μ M		10 μ M		20 μ M		40 μ M	
HEXENOL<3Z->	859	a	0.0025±0.00250	c	0.5025±0.00250	a	0.0075±0.00479	a	0.0025±0.00250	b	0.2150±0.00250
PINENE<ALPHA->	939	a	0.0075±0.00479	d	0.3925±0.00250	c	0.3775±0.00629	e	0.5025±0.00629	b	0.2100±0.00010
SABINENE	975	a	0.0025±0.00250	c	0.4125±0.00250	d	0.4275±0.00479	e	0.4450±0.00289	b	0.2600±0.00010
PINENE<BETA->	979	a	0.0025±0.00250	e	0.6425±0.00250	c	0.6475±0.00479	d	0.7325±0.00479	b	0.4125±0.00250
MYRCENE	991	a	0.2150±0.00500	d	1.1775±0.00250	d	1.1700±0.00577	c	1.1600±0.00577	b	0.8025±0.00250
LIMONENE	1029	a	3.9375±0.00250	e	17.5075±0.00250	c	16.7750±0.00500	d	17.1700±0.0001	b	10.1375±0.00250
CINEOLE <1,8->	1031	a	0.7075±0.00250	d	2.6875±0.00250	e	2.7225±0.00479	c	2.5475±0.04922	b	1.9875±0.00250
LINALOOL	1097	b	0.2475±0.00250	d	0.2675±0.00250	c	0.2625±0.00629	a	0.2125±0.00408	c	0.2575±0.00250
BORNEOL	1169	b	0.3025±0.00250	c	0.3125±0.00250	d	0.3175±0.00629	a	0.2800±0.00408	c	0.3125±0.00250
DIHYDROCARVEOL<N EO->	1194	d	1.4325±0.00250	c	0.9925±0.00250	b	0.5975±0.00479	a	0.5200±0.00408	e	1.4525±0.00250
CARVEOL <TRANS->	1217	e	1.7825±0.00250	a	0.2625±0.00250	b	0.5775±0.00408	c	0.6025±0.00250	d	1.2325±0.00250
CARVEOL <CIS->	1229	a	0.0025±0.00250	d	1.0325±0.00250	a	0.0075±0.00479	c	0.2825±0.00250	b	0.2225±0.00250
CARVONE	1243	e	82.7075±0.00250	a	67.4075±0.00250	c	70.7225±0.00479	b	69.21500±0.0050	d	75.2150±0.00500
PIPERITENONE	1343	e	0.4275±0.00250	b	0.3875±0.00250	a	0.3325±0.00629	c	0.4000±0.0001	c	0.4000±0.0001
ELEMENE<BETA->	1391	e	0.4775±0.00250	b	0.2875±0.00250	c	0.2925±0.00479	a	0.2675±0.00250	d	0.3875±0.00250
CARYOPHYLLENE<E->	1419	e	1.0875±0.00250	c	0.7975±0.00250	a	0.6725±0.00629	b	0.7575±0.00250	d	0.9525±0.00250
FARNESENE<(Z)-BETA->	1433	e	0.5725±0.00250	c	0.3725±0.00250	a	0.2675±0.00629	b	0.3325±0.00250	d	0.4025±0.00250
MUUROLA-3,5-DIENE<CIS->	1450	e	0.4625±0.00250	b	0.3725±0.00250	a	0.3675±0.00479	d	0.4225±0.00250	c	0.4125±0.00250
MURROLA-4(14),5-DIENE<CIS->	1467	e	0.5125±0.00250	b	0.3625±0.00250	a	0.2975±0.00629	c	0.4075±0.00479	d	0.4300±0.00408
GERMACRENE D	1485	e	3.9725±0.00250	c	3.0125±0.00250	a	2.4650±0.00289	b	3.0500±0.0500	d	3.3925±0.00250
BICYCLOGERMACRENE E	1500	e	0.3775±0.00250	c	0.2875±0.00250	a	0.2325±0.00479	b	0.2525±0.00500	d	0.3050±0.00500
GERMACRENE D-4-OL	1576	d	0.2375±0.00250	b	0.1625±0.00250	b	0.1600±0.00408	a	0.1075±0.00250	c	0.1775±0.00250
CUBENOL<1,10-DI-EPI->	1619	e	0.2750±0.00289	c	0.1850±0.00500	b	0.1600±0.00707	a	0.1475±0.00250	d	0.2125±0.00750
CADINOL<ALPHA->	1654	d	0.2475±0.00250	b	0.1750±0.00500	a	0.1400±0.00408	b	0.1825±0.00250	c	0.2100±0.00010

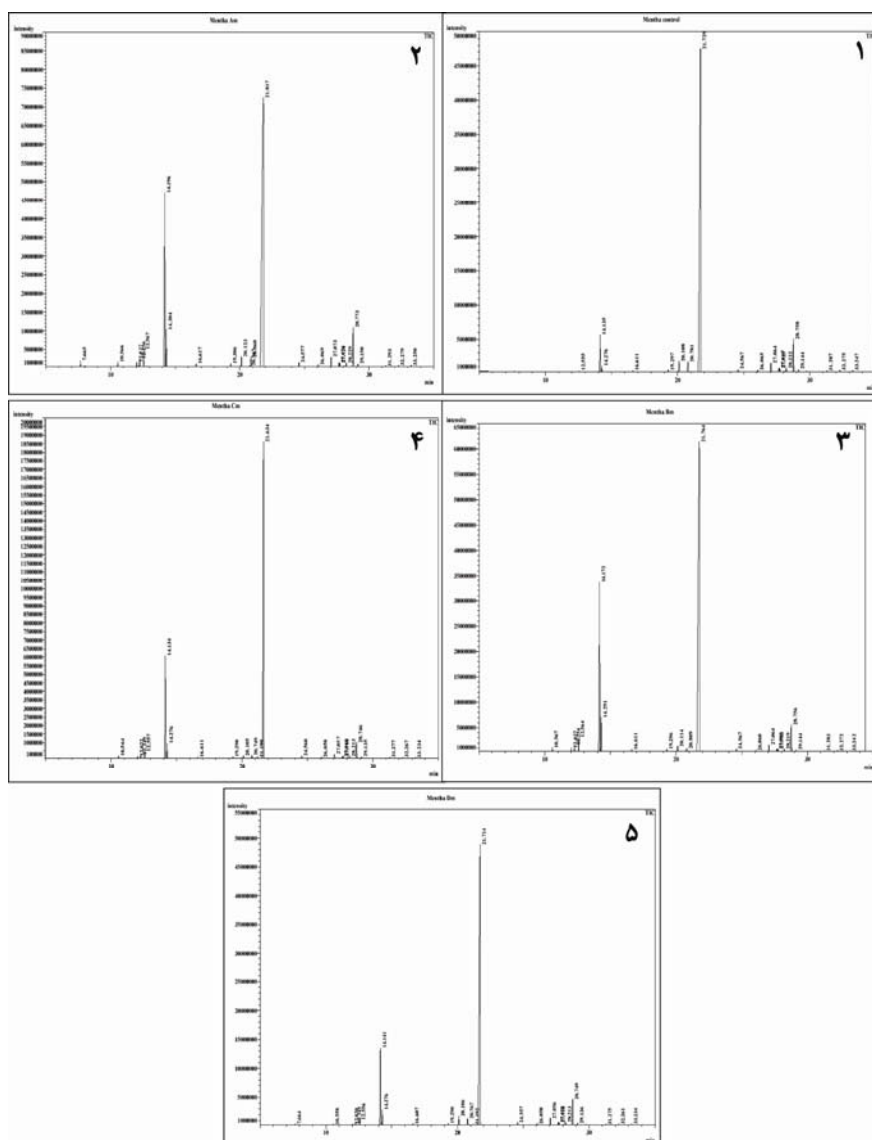
افزایش یافته، ولی مقدار مونوترپن‌های اکسیژنه از ۸۷/۶۱ درصد در گیاه شاهد به مقدار ۷۴/۱۱ درصد در تیمار ۴۰ میکرومولار کاهش نشان داده است. این در حالی است که، مقدار کل مونوترپن‌ها با افزایش کاربرد روی در محلول غذایی به طور غیر معنی داری افزایش داشته است. مقدار کلی سز کوئی‌ترین‌ها- اعم از هیدروکربنه و اکسیژنه- در همه نسبت‌های فلز روی کاهش نشان داده است (جدول ۲ و شکل ۲).

تغییرات مقدار ترپن‌های موجود در اسانس در پاسخ به تیمار روی

مقایسه میزان ترکیبات ترپنی موجود در اسانس در نسبت‌های مختلف روی نشان می‌دهد، تیمار گیاه با عنصر روی موجب کاهش میزان مونوترپن‌های اکسیژنه موجود در اسانس شده، ولی مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه موجود در اسانس را افزایش می‌دهد؛ بدین صورت که، مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه از ۴/۱۴ درصد در گیاه شاهد به ۲۰/۰۱ درصد در نسبت ۴۰ میکرومولار روی

جدول ۲- مقایسه مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها در اسانس گیاه نعنای تحت تیمار روی (درصد ترکیبات)

Compounds of essential oil	Zinc concentration in treatments				
	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM
Hydrocarbonate Monoterpenes	4.14	20.13	19.39	11.55	20.01
Oxygenate Monoterpenes	87.61	73.85	75.54	81.08	74.11
Total Monoterpenes	91.75	93.98	94.93	92.63	94.12
Hydrocarbonate Sesquiterpenes	3.11	2.19	1.9	2.58	2.18
Oxygenate Sesquiterpenes	5.12	3.83	3.17	4.31	3.7
Total Sesquiterpenes	8.23	6.02	5.07	6.89	5.88



شکل ۲- طیف GC-Mass اسانس گیاه نعنای (*M. spicata*) در نمونه شاهد (۱)، نمونه تیمار ۵ میکرومولار روی (۲)، نمونه تیمار ۱۰ میکرومولار روی (۳)، نمونه تیمار ۲۰ میکرومولار روی (۴)، نمونه تیمار ۴۰ میکرومولار روی (۵)

نتیجه‌گیری و بحث

شرایط استفاده شده برای رشد نعناع در این تحقیق به منظور به دست آوردن غلظت بهینه فلز روی برای رشد مناسب گیاه و مطالعه میزان تطابق این گیاه دارویی در معرض غلظت‌های بالای فلز روی بود. کارون با نام کامل ۲-متیل ۵-متیل اتیل ۲-سیکلو هگزان به عنوان یک مونوترپن اکسیژن‌دار حلقوی فراوانترین و مهمترین ترکیب موجود در اسانس گیاه اسپرمینت است (Akhila *et al.*, 2001).

در بررسی‌های انجام شده در این پژوهش مشخص گردید که قسمت اعظم اسانس گیاه نعناع سبز را ترکیبات مونوترپنی تشکیل می‌دهند و سزکوئی‌ترین‌ها درصد کمتری از مواد موجود در اسانس را به خود اختصاص می‌دهند (جدول ۲). بر اساس گزارش‌ها، سزکوئی‌ترین‌ها کمتر از ۲ درصد از مواد مؤثره اسانس نعناع را تشکیل می‌دهند، در حالی که، مونوترپن‌ها بیش از ۹۸ درصد از این ترکیبات را شامل می‌شوند (Croteau *et al.*, 1972). نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میزان ترکیبات مونوترپنی اسانس در مقایسه با ترکیبات سزکوئی‌ترینی به میزان بیشتری در اثر تیمار روی کاهش یافته است.

مطالعه پیرامون انباشتگی مواد مؤثره اسانس تحت شرایط کاهش اکسیژن و نیز بازدارنده متابولیکی نشان داده است که بخشی از مسیر بیوسنتز ترکیبات اسانس یک فرآیند غیرهوازی بوده که در سازش با محدودیت اکسیژن رخ می‌دهد (Croteau *et al.*, 1972). در بررسی تریکوم‌های غده‌ای ترشح‌کننده اسانس در نعناع، یک نوع سازگاری از نظر تماس با اتمسفر دیده می‌شود. بنابراین، بیوسنتز ترکیبات ترپنی در مرحله‌ای از مسیر به انرژی حاصل از فرآیند تخمیر نیاز دارد و کاهش در عملکرد

میتوکندری و محدودیت فتوسنتز بر اثر برخی از تنش‌های محیطی، از جمله حضور فلزات سنگین در خاک منجر به کاهش انرژی در دسترس گیاه و تغییر در مسیرهای بیوسنتز این ترکیبات فرار می‌شود (Dudareva *et al.*, 2004). گزارش شده است، جایگاه بیوسنتز مونوترپن‌ها در مقایسه با سزکوئی‌ترین‌ها بر اثر تنش بیشتر دچار کاهش انرژی شده، خسارت بیشتری می‌بیند (Turner and Croteau, 2004).

این موضوع به طور دقیق به اثبات رسیده است که، تنش فلز سنگین روی منجر به تخریب ساختار میتوکندری و راندمان فتوسنتز و در نتیجه کاهش محتوای انرژی در گیاهان می‌شود (Bonnet *et al.*, 2000). فلز روی از طریق تأثیر بر میزان جذب و جابه‌جایی عناصر ضروری و نیز اثر بر میزان فعالیت برخی از آنزیم‌ها در جایگاه عملکردشان موجب اختلال در متابولیسم گیاهان می‌شود. دستگاه فتوسنتزی در دو بخش فتوشیمیایی و تثبیت کربن در مقابل فلزات سنگین آسیب‌پذیر است. در مورد بخش نوری فتوسیستم II نسبت فتوسیستم I آسیب‌پذیرتر است. مکانیسم اثر تخریبی فلز روی بر دستگاه فتوسنتزی به صورت جانشینی فلز سنگین در ساختار کلروفیل است که به صورت Zn-Chls در می‌آید. فلز روی به جای منیزیم در ساختار کلروفیل قرار می‌گیرد. در نتیجه عملکرد صحیح آنتن کمپلکس جمع‌آوری‌کننده نور (LHCs) دچار اختلال می‌شود. جایگزینی عنصر روی به جای منیزیم اجازه باند شدن کلروفیل را به لیگاند‌های مهم نمی‌دهد و در نتیجه، ساختار فضایی مناسب کمپلکس کلروفیل- پروتئین ایجاد نمی‌شود (Rout and Das, 2003). دلیل دیگر اینکه کلروفیل تغییر یافته Zn-Chls در حالت تحریک شده، الکترونی بسیار ناپایدار است و به سرعت به حالت آرامش می‌رسد؛ به طوری که در محیط آزمایشگاهی فلورسانس

دلایل اختلاف در مقدار و نوع برخی از مواد مؤثره در اسانس گیاه مورد آزمایش مربوط به اختلاف جایگاه‌های بیوسنتزی ترکیبات از نظر بهره‌گیری از اکسیژن و منابع انرژی باشد. به طور کلی، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مقدار کلی مونوترپن‌های اکسیژنه در مقایسه با سزکوئی‌ترین‌ها بیشتر تحت تأثیر عنصر روی قرار گرفته، کاهش آنها چشمگیرتر است.

انجام نیافته، در شرایط طبیعی هم نمی‌تواند الکترون‌هایی به مرکز واکنش بفرستد و فتوسنتز مهار می‌شود (Candan and Tarhan, 2003).

بنابراین، کاهش بیشتر ترکیبات مونوترپنی به ویژه مونوترپن‌های اکسیژنه نسبت به سزکوئی‌ترین‌ها در این تحقیق ممکن است به دلیل تغییرات بیوانرژتیک سلول در پاسخ به فلز سنگین روی باشد و به نظر می‌رسد یکی از

منابع

- امیدبیگی، ر. (۱۳۷۶) رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات طراحان نشر، تهران، ایران.
- زرگری، ع. (۱۳۷۶) گیاهان دارویی. جلد پنجم. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- میرزا، م. سفیدکن، ف. و احمدی، ل. (۱۳۷۵) اسانس‌های طبیعی؛ استخراج، شناسایی کمی و کیفی و کاربرد آنها، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ایران.
- Akhila, A., Banthorpe, D. V. and Rowan, M. G. (2001) Biosynthesis of carvone in *Mentha spicata*. *Phytochemistry* 19: 1433-1437.
- Arduini, I., Godbold, D. A. and Onnis, A. (1994) Cadmium and Copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedling. *Physiologia Plantarum* 92: 675-680.
- Bonnet, M., Camares, O. and Veisseire, P. (2000) Effects of zinc and influence of *acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*lolium perenne* L. cv Apollo) *Experimental Botany* 51: 945-953.
- Candan, N. and Tarhan, L. (2003) Change in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Mentha pulegium*. *Turkish Journal of Chemistry* 27: 21-30.
- Croteau, R., Burbott, A. J. and Lommis, W. D. (1972) Biosynthesis of mono and sesquiterpenes in peppermint from glucose-C₁₄ and CO₂. *Photochemistry* 11: 2459-2462.
- Diaz-Marota, M. C., Perez-Coello, M. S., Gonzalez-Vinas, M. A. and Cabezudo, M. D. (2003) Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Agricultural and Food Chemistry* 51: 1265-1269.
- Dudareva, N., Picheresky, E. and Gershenzon, J. (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* 134: 1893-1902.
- Kizil, S. and Tonçer, O. (2006) Influence of different harvest times on the yield and oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L. var. *spicata*). *Food Agricultural Environment* 4: 135-137.
- Rout, G. R. and Das, P. (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism; Zinc. *Agronomy Journal* 23: 3-11.
- Turner, G. W. and Croteau, R. (2004) Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*: Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiology* 136: 4215-4227.
- Weckx, J. E. J. and Clijsters, H. M. M. (1997) Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 35: 405-410.

Biochemical changes in terpenoid compounds of *Mentha spicata* essential oils in response to excess zinc supply

* Saeid Zare Dehabadi,¹ Zahra Asrar and ² Mitra Mehrabani

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

² Pharmaceutics Research Center, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Iran

Abstract

Zinc plays an important role in many structural and biochemical functions in plants. However, excess amount of this element as heavy metal is one of the limiting factors for plants. Spearmints were grown in green house at nutrient solution containing different concentration of zinc until the flowering stage. The essential oils from fresh spearmint samples were isolated by water distillation (clevenger) and analyzed by gas chromatograph-mass spectrophotometer (GC-Mass). In this research, results indicated that, monoterpenes were major parts of essential oils in *M. spicata* and low percent of these compounds were sesquiterpenes. In comparative investigation, content of oxygenate monoterpenes decreased with employing zinc in nutrient solution but, hydrocarbonate monoterpene contents of essence were increased. Total monoterpene contents of essence increased significantly by zinc treatment. However, with increasing Zn concentration, sesquiterpene contents such as hydrocarbonates and oxygenates reduced gradually. It was concluded that, total oxygenate monoterpenes were more affected by Zn treatment and its reduction was remarkable. This could be due to bioenergetical changes in plant cells in response to heavy metal stress.

Key words: Essential oil, Monoterpenes, Sesquiterpenes, *Mentha spicata*, Zinc

اثر محلول پاشی روی (Zn) و اکسین (IBA) بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ذرت دانه‌ای

بهنام زند، علی سروش‌زاده^{۱*}، فائزه قناتی^۲ و فؤاد مرادی^۳
^۱ گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۲ گروه علوم گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۳ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

به منظور بررسی سطح فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه ذرت در واکنش به محلول پاشی عنصر روی و ماده تنظیم‌کننده رشد اکسین (ایندول بوتریک اسید) طرحی با استفاده از ۸ ترکیب محلول پاشی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار به اجرا در آمد. در این مطالعه سطوح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و اکسین اکسیداز بررسی شد. نتایج نشان داد که کاربرد ترکیبات مختلف عنصر روی و همچنین تنظیم‌کننده رشد اکسین، موجب افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های ذکر شده گردید و بنابراین محلول پاشی دو ترکیب سولفات و کلات روی با اکسین و حتی بدون اکسین، قادر است سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی گیاه را تقویت نموده، گیاه را نسبت به بروز شرایط تنش، مانند تنش کمبود آب متحمل‌تر سازد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، آنتی‌اکسیدانت، اکسین، ذرت، روی، محلول پاشی

مقدمه

ویژه‌ای داشته و کمبود آن در کنار برخی دیگر از ریزمغذی‌ها، مانند آهن در مقیاس جهانی قابل مشاهده است (Malakoti and Tehrani, 2001). از سوی دیگر، در میان گیاهان زراعی، ذرت از جمله گیاهانی است که بیشترین حساسیت را به کمبود عنصر روی به دلیل نیازهای بیوشیمیایی دارد (Marschner, 1995). از تأثیرات معمولی تنش خشکی همانند سایر تنش‌های محیطی ایجاد

هر یک از عناصر کم مصرف نقش خاصی را در گیاه ایفا می‌کنند و وجود این عناصر در حد کفایت برای کامل کردن چرخه زندگی و رشد گیاه لازم است. نقش این عناصر از واکنش‌های بسیار ساده تا خیلی پیچیده را در بر می‌گیرد و نقش یک عنصر ریزمغذی را عنصر دیگر نمی‌تواند به عهده بگیرد. در این میان، عنصر روی جایگاه

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در واکنش به محلول‌پاشی‌ها بررسی گردید.

اکسین‌ها گروه کوچکی از هورمون‌های گیاهی هستند که نقش محوری در تنظیم رشد و نمو گیاه ایفا می‌کنند (Sen, 2000) و با توجه به اینکه رشد و نمو ریشه تحت تاثیر هورمونی است و رشد طولی محور اصلی و آغاز رویش ریشه‌های فرعی در درجه نخست به‌وسیله اکسین سرچشمه گرفته از بخش هوایی گیاه تحریک می‌گردد (Marschner, 1995)، از این رو، با توسعه سیستم ریشه، گیاه قادر خواهد بود نسبت به جذب بهینه عنصر روی که در شرایط کمبود رطوبت با کاهش تحرک روبه‌رو بوده، اقدام نماید و از سوی دیگر، به ذخایر بیشتر رطوبتی خاک دسترسی داشته باشد.

عنصر روی برای ساخت اکسین (IAA) از اسید آمینه تریپتوفان و از راه تریپتامین مورد نیاز است و از سویی میزان تریپتوفان در گیاهانی که دچار کمبود عنصر روی باشند، در حد پایینی قرار دارد، که پایین بودن میزان اکسین در گیاهانی که کمبود عنصر روی دارند، ممکن است در نتیجه فعالیت زیاد آنزیم IAA-اکسیداز باشد. ایندول بوتریک اسید (IBA) نیز از جمله اکسین‌های طبیعی است که ابتدا صرفاً به عنوان یک ترکیب ساختگی شناخته می‌شد، ولی این ترکیب از بذر و برگ‌های ذرت و برخی گونه‌های گیاهی استخراج شده است (Epstein et al., 1980).

اندول بوتریک اسید (IBA) به طور گسترده‌ای به عنوان یکی از ترکیبات اکسین جهت القای ریشه‌دهی در گیاهان و قلمه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا:

۱- به علت توانایی بالای این ترکیب در القای ریشه‌زایی (Weisman et al., 1988)

آسیب‌های اکسیداتیو است. از جمله خسارت‌های اکسیداتیو که بر اثر رادیکال‌های اکسیژن ایجاد می‌گردد، می‌توان به خسارت اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA اشاره نمود و در این خصوص تولید گونه‌های اکسیژن فعال منجر به پراکسیداسیون لیپیدها (Chen et al., 2000) و از بین رفتن پروتئین (Jiang and Huang, 2001) می‌گردد، اما در برابر بروز چنین خسارت‌هایی، گیاهان به منظور حفاظت در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، به دفاع آنتی‌اکسیدانتی مانند ترکیبات آنزیم‌های سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) مجهز هستند (Agarwal et al., 2005).

در گیاهان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) برای تطابق و سازگاری و تحمل آنها به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده به شمار می‌روند (Dat et al., 2009) و در این میان، فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپر اکسید دسموتاز (SOD) موجب خنثی سازی فعالیت ROS تولید شده در سلول‌ها می‌گردد و تولید ROS در سلول‌های گیاهی موجب تحریک و افزایش فعالیت آنزیم‌های اشاره شده، شامل: کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دسموتاز و اسکوربات پراکسیداز می‌شود (Dat et al., 2009).

مصرف خاکی ریز مغذی‌ها، علاوه بر پایین بودن راندمان انتقال آن به گیاه، از لحاظ اقتصادی نیز بسیار پرهزینه است و از این رو، می‌توان از روش‌های جایگزین مانند محلول‌پاشی بهره جست. همچنین، در بخشی از مطالعه نگارندگان بر روی تأثیرات محلول‌پاشی عنصر روی و اکسین بر برخی صفات کمی و کیفی ذرت دانه‌ای در شرایط کمبود آب افزایش احتمالی سطح فعالیت برخی از

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیرات ناشی از محلول پاشی عنصر روی و تنظیم کننده رشد اکسین (اندول بوتریک اسید) در بخش هوایی گیاه (برگ‌ها) بر روی تغییرات برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاه ذرت دانه‌ای، طرحی در شرایط گلخانه با استفاده از ۸ تیمار به شرح جدول ۱ در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار به اجرا درآمد.

۲- مسمومیت ضعیف و همچنین پایداری بالای این ترکیب در مقایسه با سایر ترکیبات اکسین، مانند نفتالین استیک اسید و اندول استیک اسید. (Blazich, 1988, Hartmann *et al.*, 1990).

اگر چه اکسین‌ها به طور گسترده‌ای جهت ریشه‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی اطلاعات ناچیزی پیرامون نحوه عمل اختصاصی آنها و تأثیرات متقابل آنها با دیگر ترکیبات داخلی گیاه وجود دارد (Gaspar *et al.*, 1997).

جدول ۱- تیمارهای محلول پاشی در مطالعه فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاه ذرت دانه‌ای

شماره تیمار	تیمار محلول پاشی
۱	سولفات روی + اکسین (IBA) + Tween 20
۲	سولفات روی + Tween 20
۳	کلات روی + اکسین (IBA) + Tween 20
۴	کلات روی + Tween 20
۵	اکسین (IBA) + Tween 20
۶	ماده مومی (سورفکتانت) Tween 20
۷	آب
۸	بدون محلول پاشی

همچنین، جهت انحلال بهتر تنظیم کننده اندول بوتریک اسید در آب از الکل استفاده شد. محلول پاشی تیمارهای مختلف عنصر روی در ساعات اولیه صبح صورت گرفت؛ یعنی در زمانی که درجه حرارت پایین بوده، ترکیبات بلافاصله تبخیر نگردند و از سوی دیگر، با توجه به تأثیرات سوء عامل نور بر روی تنظیم کننده اکسین، محلول پاشی‌ها در آستانه غروب خورشید و حداقل شدت روشنایی صورت گرفت تا بدین شکل هم از تأثیرات سوء نور جلوگیری شده باشد و هم تا هنگام صبح مدت زمان مناسبی جهت جذب بهینه محلول توسط گیاهان وجود داشته باشد. جهت نمونه گیری از بوته‌ها، ۲ هفته پس از

محلول پاشی در آستانه ظهور گل‌های تاجی؛ یعنی در مرحله ۳/۵ بر اساس تقسیم‌بندی هانوی (Hanway, 1971) در سه نوبت با فواصل زمانی ۲ روز تکرار گردید. غلظت عنصر روی در محلول به صورت ۵ در هزار (۵ گرم در لیتر) و غلظت اندول بوتریک اسید نیز ۱۰ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد. محلول پاشی عنصر روی و اندول بوتریک اسید با فاصله زمانی ۲۴ ساعت و به صورت غیرمخلوط انجام شد تا از احتمال اختلال در جذب جلوگیری گردد. به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری ترکیبات مختلف محلول پاشی بر روی بوته‌ها، از ماده‌ای چسبنده و مومی به نام توین ۲۰ با نسبت ۰/۵ درصد حجمی استفاده گردید و

دور 12000×20 دقیقه سانتریفیوژ شد (مراحل فوق در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد). از این عصاره برای سنجش آنزیم‌های زیر استفاده شد. با استفاده از روش فتوشیمیایی (Cakmak and Horst, 1991) سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به ترتیب در طول موج‌های ۲۴۰ و ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) نیز با استفاده از روش فتوشیمیایی (Morita *et al.*, 2006) با جذب نوری ۴۷۰ نانومتر تعیین شد. در نهایت، برای سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) از روش (Khan, 1975) استفاده شد که جذب نوری عصاره آنزیمی نیز در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. جهت سنجش آنزیم اکسین-اکسیداز (IAA-Oxidase) از روش (Beffa *et al.*, 1990) با جذب نوری ۵۳۵ نانومتر استفاده شد.

انجام محلول‌پاشی برگ‌های ۳ بوته از هر یک از تیمارهای مختلف از ساقه جدا و از آنها نمونه‌ای مرکب تهیه گردید و از این نمونه‌ها جهت سنجش سطوح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت استفاده شد. با توجه به اینکه انجام هر یک از مراحل سه‌گانه محلول‌پاشی احتمالاً بر روی سطوح فعالیت و مقادیر آنزیم‌ها مؤثر است، لذا پس از هر یک از نوبت‌های محلول‌پاشی، نمونه‌گیری از بوته‌ها تهیه شد و بلافاصله آنها در مخزن نیتروژن مایع قرار گرفته و سپس به آزمایشگاه منتقل و در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش عصاره‌گیری و استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

نمونه‌های فریز شده (200 میلی‌گرم وزن تر)، در 3 میلی‌لیتر بافر تریس 0.1 میلی‌مولار ($\text{pH}=7.5$) ساییده و با

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر محلول‌پاشی عنصر روی و تنظیم‌کننده رشد اکسین بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برگ ذرت

میانگین مربعات (MS)					درجه آزادی	منبع تغییرات
اکسین اکسیداز (Aux-Oxi)	پلی فنل اکسیداز (PPO)	فعالیت سوپراکسید دسموتاز (SOD)	فعالیت پراکسیداز (POD)	فعالیت کاتالاز (CAT)	d.f	S.O.V
۰/۳۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۲ ^{ns}	۲۴/۳۷ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}	۰/۰۳۰۱ ^{ns}	۲	تکرار
۱/۸۳ ^{**}	۰/۰۰۰۰۰۸ ^{**}	۳۵/۶۷ ^{**}	۴/۷۲ ^{**}	۰/۵۷۵ ^{**}	۷	نوع محلول‌پاشی
۰/۱۹۶۳	۰/۰۰۰۰۰۰۶	۶/۳۲	۰/۲۸۵	۰/۰۱۴	۱۴	تکرار \times نوع محلول‌پاشی
۳۱/۲۰ ^{**}	۰/۰۰۰۰۰۴ ^{**}	۱۰۴۲/۵۴ ^{**}	۶/۴۳ ^{**}	۳/۰۲ ^{**}	۲	نوبت محلول‌پاشی
۱/۲۴۴ ^{**}	۰/۰۰۰۰۰۴ ^{**}	۲۲/۱۰ ^{**}	۲/۰۸ ^{**}	۰/۴۷۵ ^{**}	۱۴	نوع محلول‌پاشی \times نوبت
۰/۰۹۹	۰/۰۰۰۰۰۱	۷/۵۷	۰/۳۶	۰/۰۲۹	۴	محلول‌پاشی
۸/۸۷	۳۹/۲۷	۷/۱۶	۱۳/۰۹	۱۹/۵۱	-	تکرار \times نوبت محلول‌پاشی
ضریب تغییرات (% CV)						

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیر معنی‌دار

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر نوع محلول پاشی عنصر روی و تنظیم کننده رشد اکسین بر روی فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برگ‌های ذرت دانه‌ای

نوع تیمار محلول پاشی spraying treatments no.	کاتالاز (CAT) Δ Abs ۲۴۰/mg protein	پراکسیداز (POD) Δ Abs ۴۷۰/mg Protein	سوپراکسید دسموتاز (SOD) Δ Abs ۵۶۰/mg protein	پلی فنل اکسیداز (PPO) Δ Abs ۴۱۰/mg protein	اکسین اکسیداز (Aux-Oxi) Δ Abs /mg protein
سولفات روی + اکسین + توین ۲۰	۰/۹۲۱ a	۴/۸۰۲ a	۲۰/۹۵ c	۰/۰۰۰۹ c	۳/۸۵ e
سولفات روی + توین ۲۰	۰/۶۷۶ b	۵/۲۳۹ a	۲۴/۰۸ ab	۰/۰۰۳۲ a	۴/۹۵ a
کلات روی + اکسین + توین ۲۰	۱/۱۰۶ a	۴/۸۱۹ a	۲۴/۳۸ ab	۰/۰۰۳ a	۴/۹۰ ab
کلات روی + توین ۲۰	۰/۵۴۴ bc	۴/۷۰۴ a	۲۳/۸۵ ab	۰/۰۰۱۳ c	۳/۷۵ e
اکسین + توین ۲۰	۰/۴۹۰ bc	۵/۱۸۰ a	۲۳/۹۷ ab	۰/۰۰۳ a	۴/۱۱ cde
توین ۲۰	۰/۵۸۰ bc	۳/۵۳۰ b	۱۹/۷۴ c	۰/۰۰۲۴ ab	۴/۵۹ abc
آب	۰/۹۵۰ a	۳/۷۰۰ b	۲۵/۹۶ a	۰/۰۰۱۵ bc	۴/۵۸ abc
بدون محلول پاشی	۰/۴۰۲ c	۳/۵۶۰ b	۲۳/۳۵ b	۰/۰۰۰۶ c	۴/۳۷ bcd

میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح احتمال آزمون F تفاوت معنی دار ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تعداد نوبت محلول پاشی عنصر روی و تنظیم کننده رشد اکسین بر روی فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در برگ‌های ذرت دانه‌ای

تعداد نوبت محلول پاشی spraying times	فعالیت پراکسیداز (POD) Δ Abs 470/mg protein	فعالیت سوپراکسید دسموتاز (SOD) Δ Abs 560/mg protein	فعالیت اکسین اکسیداز (Aux-Oxi) Abs /mg protein Δ	فعالیت کاتالاز (CAT) Δ Abs 240/mg protein
۱	۴/۰۲ b	۱۹/۵۴ b	۴/۰۰ b	۰/۴۴ c
۲	۴/۲۹ b	۱۹/۴۲ b	۳/۴۹ c	۰/۵۷ b
۳	۵/۰۲ a	۳۰/۹۰ a	۵/۶۷ a	۱/۱۱ a

میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح احتمال آزمون F تفاوت معنی دار ندارند.

نتیجه‌گیری و بحث

محلول پاشی نیز بر روی فعالیت آنزیم‌ها به استثنای سطح فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تأثیرات معنی داری داشته است. اثر متقابل نوع و نوبت محلول پاشی نیز بر روی فعالیت کلیه آنزیم‌های مورد مطالعه معنی دار بود. بنابراین، در خصوص آنزیم‌های مورد بررسی سطوح فعالیت آنها عموماً متأثر از تیمارهای محلول پاشی و همچنین دفعات محلول پاشی گردیده است و در این میان، تنها سطوح فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز است که نسبت به نوبت‌های محلول پاشی واکنشی نشان نداده است.

با توجه به جدول تجزیه واریانس اثر تیمارهای محلول پاشی عنصر روی (Zn) و تنظیم کننده رشد اکسین (IBA) بر روی صفات مورد بررسی، چنین مشاهده می‌گردد که اثر نوع محلول پاشی بر روی سطوح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز، پلی فنل اکسیداز و اکسین اکسیداز اثر معنی دار داشت. در میان آنزیم‌های مورد بررسی، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نسبت به سایر آنزیم‌های مطالعه شده کمتر تحت تأثیر قرار گرفته است؛ هر چند این اثر معنی دار بود. نوبت‌های

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و نوبت محلول‌پاشی عنصر روی و تنظیم‌کننده رشد اکسین بر روی تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برگ‌های ذرت دانه‌ای

نوع محلول‌پاشی spraying treatments	نوبت محلول‌پاشی spraying times	کاتالاز (CAT) ΔAbs 240/mg protein	پراکسیداز (POD) ΔAbs 470/mg protein	سوپر اکسید دسموتاز (SOD) ΔAbs 560/mg protein	پلی فنل اکسیداز (PPO) ΔAbs 410/mg protein	اکسین اکسیداز (AUX-OXI) ΔAbs /mg protein
سولفات روی + اکسین + توین ۲۰	۱	۰/۸۷ cde	۴/۳۷ Cde	۱۷/۶۶ f	۰/۰۰۵ a	۳/۸۷ ef
سولفات روی + اکسین + توین ۲۰	۲	۰/۹۸ cd	۴/۰۴ Cdef	۱۷/۹۱ F	۰/۰۰۲ b.g	۳/۲۹ f
سولفات روی + اکسین + توین ۲۰	۳	۰/۹۱ cd	۵/۹۹ ab	۲۷/۲۸ cd	۰/۰۰۰۴fg	۴/۴۰ cde
سولفات روی + توین ۲۰	۱	۰/۲۸ h	۴/۴۴ Cde	۱۷/۹۲ F	۰/۰۰۲ b.g	۳/۹۰ ef
سولفات روی + توین ۲۰	۲	۰/۸۶ cde	۵/۲۶ abc	۲۰/۹۶ ef	۰/۰۰۲ b.g	۳/۵۸ ef
سولفات روی + توین ۲۰	۳	۰/۸۹ cde	۵/۰۲ ab	۳۳/۳۷ B	۰/۰۰۲ b.g	۷/۳۸ a
کلات روی + اکسین + توین ۲۰	۱	۰/۴۳ gh	۴/۸۸ bcd	۲۱/۴۷ Ef	۰/۰۰۳b..e	۳/۹۴ ef
کلات روی + اکسین + توین ۲۰	۲	۰/۵۱ fgh	۴/۴۲ cde	۱۹/۶۴ ef	۰/۰۰۲ b.g	۳/۶۱ ef
کلات روی + اکسین + توین ۲۰	۳	۲/۳۷ a	۵/۱۶ bcd	۳۲/۰۳ b	۰/۰۰۴b	۷/۱۴ a
کلات روی + توین ۲۰	۱	۰/۲۲ h	۳/۹۶ defg	۲۰/۳۷ Ef	۰/۰۰۲۴ b..f	۳/۷۰ ef
کلات روی + توین ۲۰	۲	۰/۳۶ gh	۴/۹۰ bcd	۲۰/۰۳ Ef	۰/۰۰۱۳ d..g	۳/۳۹ ef
کلات روی + توین ۲۰	۳	۱/۰۶ c	۵/۲۶ abc	۳۱/۱۴ bc	۰/۰۰۰۴ fg	۴/۱۷ ef
اکسین + توین ۲۰	۱	۰/۴۶ fgh	۳/۹۹ cdefg	۱۸/۶۵ f	۰/۰۰۱۱ efg	۳/۸۷ ef
اکسین + توین ۲۰	۲	۰/۳۱ h	۵/۱۰ abcd	۱۹/۱۸ Ef	۰/۰۰۳b..e	۳/۳۰ f
اکسین + توین ۲۰	۳	۰/۶۹ defg	۶/۴۴ a	۳۴/۰۸ ab	۰/۰۰۳۵bc	۵/۱۵ bcd
توین ۲۰	۱	۰/۴۸ fgh	۲/۷۸ fg	۱۷/۴۷ f	۰/۰۰۳۲ bcd	۴/۰۸ ef
توین ۲۰	۲	۰/۴۶ fgh	۴/۰۸ cdef	۱۷/۶۳ F	۰/۰۰۱۲d.g	۳/۶۲ ef
توین ۲۰	۳	۰/۸۰ cdef	۳/۷۵ defg	۲۴/۱۳ De	۰/۰۰۳b..e	۶/۰۵ b
آب	۱	۰/۵۲ fgh	۲/۸۰ fg	۲۰/۹۷ Ef	۰/۰۰۱۶ c..g	۴/۲۸ def
آب	۲	۰/۵۶ efg	۳/۳۵ efg	۱۸/۵۰ f	۰/۰۰۰۶fg	۳/۷۲ ef
آب	۳	۱/۷۶ b	۴/۹۴ bcd	۳۸/۴۰ A	۰/۰۰۲ b.g	۵/۷۶ b
بدون محلول‌پاشی	۱	۰/۲۷ h	۴/۹۳ bcd	۲۱/۸۰ ef	۰/۰۰۰۷fg	۴/۳۹ cde
بدون محلول‌پاشی	۲	۰/۵۳ fgh	۳/۱۷ efg	۲۱/۵۲ ef	۰/۰۰۰۹fg	۳/۴۱ ef
بدون محلول‌پاشی	۳	۰/۴۱ gh	۲/۵۹ g	۲۶/۷۴ cd	۰/۰۰۰۲g	۵/۳۱ bc

میانگین‌های دارای حرف مشترک از نظر آماری در سطح احتمال آزمون F تفاوت معنی‌دار ندارند.

داده‌اند و در واقع، تیمارهای محلول‌پاشی ذکر شده قادرند با افزایش سطح فعالیت این آنزیم سطح تحمل گیاه ذرت را نسبت به بروز شرایط کمبود آب ارتقا دهند که در این رابطه Jung و همکاران (۲۰۰۶) به نقش CAT در افزایش سطح تحمل به تنش در موتانت‌های ذرت در مواجهه با تنش پس از گرده‌افشانی اشاره داشته‌اند و در تحقیقی

بر اساس جدول ۳ اثر محلول‌پاشی عنصر روی و تنظیم‌کننده رشد اکسین (IBA) چنین مشاهده می‌گردد که در رابطه با سطوح فعالیت آنزیم کاتالاز تیمارهای محلول‌پاشی کلات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار ۳)، آب (تیمار ۷) و تیمار سولفات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار ۱) به ترتیب، بیشترین سطح فعالیت این آنزیم را نشان

تعدادی از پراکسیدازهای سطحی نیز به گونه‌ای مستحکم با غشای پلاسما پیوند برقرار نموده‌اند (Matters and Scandalios, 1987). البته، اعتقاد بر این است که بیوسنتز و تراوش پراکسیدازها ایوپلاستی که در ابتدا موجود است، امکان دارد از طریق تغییر شرایط محیطی تنظیم گردد (Dat et al., 2000).

به نظر می‌رسد پراکسیدازها عموماً به عنوان آنزیم‌های مسمومیت زدای گونه‌های اکسیژن فعال عمل می‌کنند، زیرا هیدروژن پراکسید (H_2O_2) ماده‌ای است که برای دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های وابسته به پراکسیداز به عنوان ماده پذیرنده الکترون عمل می‌کند.

در این میان، پراکسیدازها در امر شکستن H_2O_2 از طریق چندین ساز و کار مختلف عمل می‌کنند (Kawano, 2003). بنابراین چنین استنباط می‌گردد که محلول پاشی تیمارهای برتر از لحاظ سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول خواهد شد. بدین شکل از تولید ROS ها جلوگیری می‌نماید و بنابراین، با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم گیاه کمتر مورد تهاجم ROS ها قرار می‌گیرد، زیرا اصولاً آنزیم‌های CAT و POD به عنوان اصلی‌ترین آنزیم‌های از بین برنده H_2O_2 شناخته شده‌اند.

نوع تیمارهای محلول پاشی که بیشترین سطح فعالیت POD را نشان دادند، حاکی از آن است که اکسین و ترکیبات آن بر فعالیت POD اثرگذار است و برعکس سطوح فعالیت POD نیز در تنظیم سطوح اکسین دخالت دارند. از سوی دیگر، به علت نقش اکسین در امر ریشه‌زایی در گیاه و به ویژه ریشه‌های جانبی، این امکان وجود دارد که تغییر در فعالیت‌های آنزیمی با تجمع مواد سنتزی در

دیگر، بالا بودن سطح CAT و SOD در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس گندم در برابر شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Feng et al., 2004).

Jiang و Huang (۲۰۰۱) در بررسی اثر آبسیسیک اسید (ABA) بر گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی و خسارت اکسیداتیو در برگ گیاهچه‌های ذرت را با غلظت‌های مختلف ABA بررسی و چنین مشاهده نمودند که با افزایش سطح غلظت ABA مقادیر فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، اسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ریداکتاز افزایش نشان داده که در واقع، نقش تعدیل کنندگی خسارت را بر عهده دارند. با این دیدگاه، چنین استنباط می‌گردد که ۳ تیمار محلول پاشی مورد اشاره توانسته‌اند با افزایش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) گیاه را در سطح مطلوبتری از تحمل به کمبود آب قرار دهند. در واقع CAT به عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانت به سرعت H_2O_2 را از بین می‌برد و این در شرایطی است که افزایش غلظت اکسین (اندول بوتریک اسید) می‌تواند از طریق اثر بر غلظت ABA در بافت گیاهی اثر گذار باشد.

تیمارهای سولفات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار یک)، سولفات روی + توین ۲۰ (تیمار دو)، کلات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار سه)، کلات روی + توین ۲۰ (تیمار چهار) و اکسین + توین ۲۰ (تیمار پنج) در مجموع به‌طور مشابهی به ترتیب بالاترین سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان دادند. ظاهراً دیواره سلولی محل اصلی تجمع تعدادی از ایزوآنزیم‌های پراکسیداز است. در این میان، برخی از ایزوآنزیم‌های پراکسیداز نیز با سطح سلول پیوند برقرار نموده‌اند که می‌توانند به سادگی تحت شرایط مختلف تنش آزاد شده، وارد محلول آپوپلاست گردند.

روی + اکسین + توین ۲۰ نسبت به سایر تیمارهای اعمال شده، بالاترین سطح را نشان داده و در گروه‌بندی جداگانه‌ای نیز قرار گرفته است و سایر تیمارهای محلول‌پاشی تفاوتی از لحاظ سطح فعالیت این آنزیم نشان نداده‌اند. پلی فنل اکسیداز در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌گردد و وظیفه اصلی آن کاتالیز نوعی کوئینون از فنل‌ها و در مجاورت مولکول اکسیژن است. البته، هم شرایط رشد (مانند بروز شرایط تنش) و هم نوع ژنوتیپ بر فعالیت پلی فنل اکسیداز اثر می‌گذارد.

از جمله نقش‌های اصلی این آنزیم، تأثیرات آن بر تشکیل ریشه‌های نابجا و سازماندهی و نمو ریشه است که در این رابطه (Yilmaz *et al.*, 2003) در مطالعه‌ای بر روی فعالیت پلی فنل اکسیداز در طی مراحل ریشه‌دهی در قلمه‌های انگور به آن اشاره داشته‌اند. همچنین، از نقش‌های حساس این آنزیم در تقسیم سلولی، تمایز و نمو اولیه است (Huystee and Cairns, 1982).

Basak و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی واکنش ریشه‌دهی در قلمه‌های ساقه از ۵ گونه درختان مانگرو با محوریت اثر اکسین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها چنین نتیجه گرفتند که افزایش چشمگیر صورت گرفته PPO با ریشه‌دهی برخی از این گونه‌ها ارتباط داشته است. آنها همچنین اظهار داشته‌اند که قابل استفاده بودن IAA داخلی گیاه که بستگی به سطح فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز (IAA-Oxidase) در آن بافت گیاهی دارد، ممکن است از طریق عمل دو آنزیم اکسیداتیو POD و PPO به صورت پنهان باقی بماند.

با توجه به جدول‌های ۲ و ۳ چنین مشاهده می‌گردد که تأثیرات نوع محلول‌پاشی بر روی سطوح فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز اثرگذار بوده است و در میان تیمارهای

ساقه در مراحل پس از محلول‌پاشی تنظیم‌کننده رشد اکسین (IBA) در ارتباط باشد (Quddoury and Amssa, 2004). اصولاً آنزیم‌های اکسیداتیو مانند POD که به‌طور گسترده‌ای در گیاهان عالی وجود دارند، اثر غیرمستقیمی بر طی مراحل آغازین ریشه‌زایی دارند. قابلیت اثرگذاری کاربرد خارجی اکسین (IBA) که خود بستگی به سطح فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز (Aux. Oxi.) دارد، ممکن است از طریق عمل دو آنزیم اکسیداتیو POD و پلی فنل اکسیداز (PPO) پنهان باقی بماند (Basak *et al.*, 2000)، بنابراین، با اعمال تیمارهای محلول‌پاشی با ترکیبات اشاره شده، انتظار می‌رود بر میزان تحمل گیاه با فعالیت بیشتر آنزیم‌های دفاعی و مقادیر بالاتر آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی افزوده گردد. نتایج مشابهی بر روی گیاهان ذرت، خیار، ارزن و سیب‌زمینی نیز مشاهده شده است و در ارقام حساس به سرمازدگی فعالیت این گروه از آنزیم‌ها در طی ساعات اولیه بروز تنش به‌طور درخور توجهی کاهش یافته است (Liu *et al.*, 1996).

علاوه بر تیمارهای محلول‌پاشی محتوی اکسین، کلیه تیمارهای محتوی عنصر روی اعم از سولفات و کلات روی هم در حضور و هم در غیاب تنظیم‌کننده رشد اکسین موجب افزایش سطوح فعالیت پراکسیداز گردیده‌اند.

SOD دارای ایزوزایم‌های مختلفی است که شامل SOD-1 (در کلروپلاست)، SOD-2 و SOD-4 در سیتوزول و SOD-3 در میتوکندری قرار دارد و با افزایش اکسیژن در این اندامک‌ها تولید می‌شوند (Matters and Scandalios, 1987).

بر طبق جدول ۲ اثر نوع محلول‌پاشی بر روی سطوح فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO)، چنین مشاهده می‌گردد که سطوح فعالیت این آنزیم با اعمال محلول‌پاشی سولفات

افزایش در سطوح اکسین درونی گیاه گویای آن است که اکسین جهت القای ریشه‌دهی ضروری است (Lukatkin, 2002).

اثر نوبت‌های محلول پاشی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

با توجه به نتایج تجزیه واریانس و مقایسه‌های میانگین نوبت‌های محلول (جدول ۴) حاکی از عدم واکنش سطوح فعالیت آنزیم PPO نسبت به تعداد نوبت محلول پاشی است، اما سایر آنزیم‌های مورد بررسی به تعداد محلول پاشی واکنش نشان داده اند، بویژه آنکه در خصوص آنزیم‌های CAT، POD، SOD و AUO تعداد حداکثر نوبت محلول پاشی (۳ نوبت) توانسته است حداکثر فعالیت را در کلیه آنزیم‌های مورد بررسی القا نماید. بنابراین، به احتمال زیاد تکرار تعداد دفعات محلول پاشی توانسته است با افزایش غیرمستقیم در غلظت محلول پاشی، موجب تشدید فعالیت آنزیم‌های فوق گردد، بویژه آنکه کلیه آنزیم‌ها به استثنای AUO به‌طور مستقیم تحت تأثیر تعداد نوبت‌های محلول پاشی قرار گرفته اند و تعداد ۱، ۲ و ۳ نوبت محلول پاشی به ترتیب بیشترین سطح فعالیت آنزیم‌ها را ایجاد نمودند.

تأثیرات متقابل نوع محلول پاشی و نوبت‌های محلول پاشی بر میزان فعالیت آنزیم‌ها

جدول‌های ۲ و ۵ به ترتیب نتایج تجزیه واریانس و مقایسات میانگین اثر متقابل نوع محلول پاشی و نوبت محلول پاشی را بر روی سطوح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را در برگ ذرت دانه‌ای نشان می‌دهد. بر این اساس، اثر متقابل دو عامل ذکر شده بر روی فعالیت

مورد بررسی، تیمارهای سولفات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار یک)، کلات روی + توین ۲۰ (تیمار چهار) و اکسین + توین ۲۰ (تیمار پنج) در مقایسه با سایر تیمارهای محلول پاشی، پایین‌ترین سطح فعالیت این آنزیم را نشان داده‌اند. با توجه به تأثیرات اکسیدکنندگی و تجزیه‌کنندگی این آنزیم بر روی مقادیر IAA در بافت‌های گیاهی تیمارهای محلول پاشی فوق بیشترین سطح هورمون IAA را نشان دادند. با توجه به گروه‌بندی صورت گرفته بر روی سطوح فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز چنین مشاهده می‌گردد که تیمار محلول پاشی سولفات روی + اکسین + توین ۲۰ پایین‌ترین سطح فعالیت این آنزیم را نشان داد و از سوی دیگر، همین تیمار بالاترین غلظت تجمع هورمون IAA را در مطالعات تکمیلی نشان داد. بنابراین، در مقایسه بین غلظت IAA تیمارهای مختلف و سطوح فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز نشان‌دهنده رابطه عکس آنهاست. در این رابطه Amssa و Quddoury (۲۰۰۴) در بررسی تأثیرات محلول پاشی اندول بوتریک اسید بر تشکیل ریشه و پراکسیداز و فعالیت آنزیم AUO و میزان ترکیبات فنولیک در قلمه‌های خرما به این نکته اشاره می‌نمایند که کاربرد خارجی IBA ممکن است تغییراتی را در آنزیم‌های POD و AUO ایجاد نماید که این تغییرات به تعادل هورمونی داخلی گیاه کمک می‌نماید. بعلاوه، این نکته مورد تأکید بسیاری از محققان قرار گرفته است که کاربرد اکسین‌ها تغییراتی را در متابولیسم خود این هورمون در گیاه القا نموده است که عمده آن از طریق پیوندهای هورمونی و از طریق دیگر هورمون‌ها مانند سیتوکینین ایجاد می‌شود (Gaspar et al., 1997). کاهش در فعالیت AUO و

تیمارهای محتوی عنصر روی و تنظیم‌کننده اکسین این برتری به روشنی قابل مشاهده است، به ویژه آنکه در بیشتر موارد، تکرار سه نوبت محلول‌پاشی به‌طور مؤثری سطح فعالیت آنزیم POD را افزایش داده است.

در خصوص سطوح فعالیت آنزیم SOD نیز محلول‌پاشی با آب و محلول‌پاشی با تنظیم‌کننده رشد اکسین + توین ۲۰ در نوبت سوم محلول‌پاشی موجب افزایش سطح فعالیت SOD شده است.

واکنش میزان فعالیت آنزیم PPO نشان‌دهنده تأثیرات بسیار چشمگیر محلول‌پاشی سولفات روی + توین ۲۰ (تیمار ۲ محلول‌پاشی) در نوبت سوم بر میزان فعالیت این آنزیم است و سایر تیمارهای مورد مقایسه اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

تیمار محلول‌پاشی کلات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار ۳ محلول‌پاشی) نیز در نوبت سوم محلول‌پاشی به همراه تیمار محلول‌پاشی سولفات روی + توین ۲۰ (تیمار ۲ محلول‌پاشی) در نوبت سوم به‌طور مشابهی موجب بالاترین سطح فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز گردید و بنابراین، چنین انتظار می‌رود که این دو تیمار محلول‌پاشی موجب کاهش سطح غلظت هورمون IAA در بافت گیاهی گردد که علت آن تجزیه هورمون IAA ناشی از فعالیت آنزیم AUO است.

فعالیت دو آنزیم CAT و POD به‌عنوان دومین سازوکار تدافعی در برابر تنش اکسیداتیو مطرح هستند (Sanita and Gabrieli, 1999) عنصر روی می‌تواند به عوان تثبیت‌کننده و محافظ غشاهای حیاتی در برابر تنش اکسیداتیو و خسارت پراکسیداتیو عمل کند. همچنین، از

کلیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مورد بررسی معنی‌دار بوده است که در واقع، بیان‌کننده نوعی رابطه میان دو صفت نوع و نوبت محلول‌پاشی است.

با توجه به جدول ۵ مقایسه‌های میانگین اثر متقابل نوع و نوبت محلول‌پاشی چنین برداشت می‌گردد که تیمار محلول‌پاشی کلات روی + اکسین + توین ۲۰ (تیمار ۳ محلول‌پاشی) در نوبت سوم بالاترین سطح فعالیت آنزیم CAT را نشان داده است و پس از آن تیمار محلول‌پاشی با آب در نوبت سوم قرار دارد. در واقع، عامل تکرار محلول‌پاشی همان‌گونه که پیشتر به آن اشاره شد، با افزایش غیرمستقیم در غلظت تیمار محلول‌پاشی قادر به تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاه گردید.

در خصوص تیمار محلول‌پاشی با آب به علت تکرار در نوبت‌های محلول‌پاشی، جذب آب از سطح اپیدرمی گیاه موجب افزایش پتانسیل آب شده است و به همین جهت، گیاه از لحاظ محتوای نسبی آب در شرایط بهینه ای قرار می‌گیرد. در رتبه بعد، تیمار محلول‌پاشی کلات روی + توین ۲۰ (تیمار ۴ محلول‌پاشی) در نوبت سوم بیشترین سطح فعالیت آنزیم CAT را نشان داده است که از این رو حاکی از کارایی بهتر کلات روی در مقایسه با سولفات روی است. همچنین، با بررسی اثر نوبت‌های محلول‌پاشی که پیشتر در رابطه با اثرات منفرد نوبت‌های محلول‌پاشی به آن پرداخته شد، گویای تأثیرات مهم تکرار محلول‌پاشی است.

فعالیت آنزیم POD نیز بر اثر محلول‌پاشی تنظیم‌کننده اکسین + توین ۲۰ (تیمار ۵ محلول‌پاشی) در نوبت سوم بالاترین میانگین را نشان داده است و در خصوص

کاربرد عنصر روی، موجب بهبود سطح فعالیت آنزیم‌های CAT، POD، SOD و PPO شد، که به نظر می‌رسد با افزایش غلظت این عنصر در برگ‌های گیاه ذرت در ارتباط باشد. این نکته در خصوص رابطه افزایش غلظت عنصر آهن و سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اشاره شده مورد توجه برخی محققان نیز قرار گرفته است (Kumawat *et al.*, 2006; Sitbone and Parrot, 1997).

جمع‌بندی

بنابراین، در یک جمع‌بندی کلی، کاربرد ترکیبات مختلف عنصر روی و همچنین، تنظیم‌کننده اکسین موجب افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردیده، با علم به اینکه اکثر بخش‌های سلولی پتانسیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از شرایط تنش را دارد، لذا اعمال تیمارهای این مطالعه توانست موجب تقویت سیستم تدافعی در گیاه گردد و از این رو، می‌توان انتظار داشت که با کاربرد این تیمارها سطوح تحمل گیاه در برابر انواع تنش‌ها بهبود یابد.

طریق عدم پیوستگی غشای پلاسما و همچنین تغییر نفوذپذیری غشاء تأثیرات عنصر روی (Zn) اعمال می‌گردد (Hassan *et al.*, 2005).

با توجه به اینکه SOD رادیکال‌های هیدروکسیل را خنثی می‌نماید، CAT و POD آنزیم‌های اصلی سم زدایی H_2O_2 در گیاهان است و بنا به اظهارات (Tewari, 2005) آنزیم SOD در گیاه ذرت با کمبود عنصر آهن رابطه مستقیم داشته، در واقع با افزایش غلظت آهن مصرفی میزان فعالیت SOD کاهش می‌یابد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که کاربرد عنصر روی با ایجاد اثر بر روی جذب و غلظت سایر عناصر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را تحت تأثیر قرار دهد.

با توجه به اینکه عنصر روی در میان آنزیم‌های مختلف SOD در گیاه ذرت در ساختمان این آنزیم (Cu/ZnSOD) شرکت دارد لذا می‌تواند بر فعالیت آن تأثیر بگذارد. بنابراین، کمبود عنصر روی (Zn) در گیاهان می‌تواند موجب تولید ROS گردیده، از سنتز پروتئین جلوگیری نماید.

منابع

- auxin-oxidases and peroxidases from maize roots. *Plant Physiology* 94: 485-491.
- Cakmak, I. and Horst, W. J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) *Plant Physiology* 83: 463-468.
- Chen, W. P., Li, P. H. and Chen, T. H. H. (2000) Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environment* 23: 609-618.
- Agarwal, S., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. and Meena, R. C. (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 49 (4): 541-550.
- Basak, U. C., Das, A. B. and Das P. (2000) Rooting response in stem cuttings from five species of mangrove trees: effect of auxins and enzyme activities. *Marine Biology* 136: 185-189.
- Beffa, R. Martin, H. V. and Pilet. P. E. (1990) *In vitro* oxidation of indoleacetic acid by soluble

- Kumawat, R. N., Rathore, P. S., Nathawat, N. S. and Mahata, M. (2006) Effect of sulfur and iron on enzymatic activity chlorophyll content of Mungbean. *Journal of Plant Nutrition* 29: 1451-1467.
- Liu, Z. H., Hsiao, I. C. and Pan, Y. W. (1996) Effect of naphthalene-acetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyls cuttings of soyebean during root formation. *Botanical Bulletin of Academia Sinia* 37: 247-253.
- Lukatkin, A. S. (2002) Contribution of Oxidative stress to the Development of cold-Induced Damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. the Activity of Antioxidant Enzymes during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 6: 782-788.
- Malakoti, M. J. and Tehrani, M. M. (2001) Effects of micronutrients on the yield and quality of agricultural products. *Micro-nutrients with macro-nutrients*. 2nd Ed, Tarbiat Modarres University Press, Tehran.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Ed, Academic Press, London.
- Matters, G. L. and Scandalios, J. G. (1987) Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O₃SO₂ and elevated O₂. *Journal Experimental Botany* 38: 842-852.
- Mika, A., and Luthje, S. (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology* 132: 1489-1498.
- Minibayeva F., Mika, A. and Luthje, S. (2003) Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Protoplasma* 22: 67-72.
- Quddoury, A. and Amssa, M. (2004) Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date palm offshoots. *Botanical Bulletin Academic Sinia* 45: 127-131.
- Roy, B. N. Basu, R. N, Bose, T. K. (1972) Interaction of auxins with growth-retarding, inhibiting and ethylene-producing chemicals in rooting of cuttings PI. *Cell Physiology* 13: 1123-1127.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2000) Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 779-795
- Fecht-Christoffers M. M., Braun H. P, Lemaitre-Guiller C., Van Dorsslaer A., Horst, W. J. (2003) Effect of manganese toxicity on the proteom of leaf apoplast in cowpea. *Plant Physiology* 133: 1935-1946.
- Feng, Z., Jin-Kui, G., Ying-Li, Y., Wen-Liang, H. and Li-in, Z. (2004) Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum* 3: 345-352.
- Gaspar, T., Kevers, C. and Hausman, J. F. (1997) Indissociable chief factors in the in ductive phase of adventitious rooting. In: *Biology of Root Formation and Development* (eds. Altman A. and waisel, Y.) 55-63. Plenum Press, New York.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Hanway, J. J. (1971) How a corn plant develops. Iowa State University Coop. Extension Service Special Report 48.
- Hassan , M. J., Zhang, G., WU, F., Wei, K., and Chen, Z. (2005) Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. *Journal of Plant Nutrition Soil Science* 168: 255-261.
- Huystee, R. B. and Cairns, W. L. (1982) Progreo and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochemistry* 21:1843-1847.
- Jiang, Y. and Huang, B. (2001) Drought and heat stress injury to two coll-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science* 41: 436-442.
- Jung, S., Chon, S. U. and Kuk, Y. I. (2006) Differential antioxidant responses in catalase deficient maize mutants exposed to norflurazon. *Biologia Plantarum* 50 (3): 383-388.
- Kawano, T. (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth in duction. *Plant Cell Reproduction* 21: 829-837.
- Khan, V. (1975) Polyphenol oxide activity and browning of three Avocado varieties. *Journal of Food Agriculture* 26: 1319-1324.

- Tiwari, R. K., Kumar, P., Neetu, and Sharma, P. N. (2005) Sign of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. *Plant Science* 169: 1037-1045.
- Yilmaz, H. Taskin, T. and Otludil, B. (2003) Polyphenol oxidase activity during rooting in cuttings of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Turkish Journal of Botany* 27: 495-498.
- Sanita di Toppi, L. and Gabbrieli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
- Sen Raychaudhuri, S. (2000) The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants, *Botany Review* 66: 89-98.
- Sitbone, F. and Parrot-Rechenmann, C. (1997) Expression of auxin-regulated genes. *Physiologia Plantarum* 100: 443-455.

Effect of zinc and auxin foliar application on some anti-oxidant enzymes activity in corn leaf

Behnam Zand, ^{1*}Ali Soroosh zadeh, ²Faezeh Ghanati and ³Foad Moradi

^{1*} Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University of Tehran, Iran

² Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University of Tehran, Iran

³ Institute of Agriculture Biotechnology, Karaj, Iran

Abstract

An experiment (under controlled condition) was implemented applying randomized complete block design in three replications and eight spraying compound treatments at the agricultural experiment center of Tehran located in Varamin region, in order to investigate the effects of zinc and auxin (IBA) foliar on some anti-oxidant activity, consisting of catalase, super oxide dismutase, peroxidase, poly phenol oxidase and auxin oxidase. Results showed that, of various compounds of zinc (Zinc Sulphate and Zn EDTA) and auxin foliar application were increased level of anti-oxidant enzymatic activities, so it seems that foliar application of zinc and auxin enhance corn tolerance against drought stress via promoting of root growth.

Key words: Enzyme, Anti-oxidant, Auxin, Corn, Zinc, Spraying

استخراج و بررسی مشخصات آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی شمال ایران

معصومه فریدی، ریحانه سریری^{۱*}، وهب جعفریان^۱، حبیب‌الله ناظم^۲

^۱ بخش زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ بخش زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای به وسیله آنزیم تایروزیناز، یکی از مهمترین علت‌های تغییر رنگ میوه‌ها و سبزی‌ها و در نتیجه کاهش کیفیت آنهاست. این آنزیم در مراکز تحقیقاتی، صنایع دارویی و آرایشی کاربرد فراوان داشته، در حال حاضر تنها منبع آنزیم مذکور تایروزیناز قارچ خوراکی است. از آنجایی که بادام‌زمینی از محصولات مهم کشاورزی استان گیلان است و از طرفی، با توجه به تجربه و تخصص گروه ما در مورد تایروزیناز، هدف این تحقیق بررسی امکان جایگزینی تایروزیناز بادام‌زمینی با نوع قارچی در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و تحقیقاتی است. در این پروژه، آنزیم مذکور از دانه بادام‌زمینی استخراج و خالص‌سازی و خواص آن از جمله فعالیت بیولوژیکی، دما و pH بهینه تعیین گردید و با تایروزیناز سایر منابع مقایسه شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی دارای دو ایزوform با اوزان مولکولی بیشتر از تایروزیناز قارچ بوده، دما و pH بهینه فعالیت آنزیم به ترتیب ۴۰°C و ۵/۲ است. مقادیر ثابت میکائیلیس متن ۲۵۷/۵ میلی‌مولار و سرعت ماکزیمم ۰/۰۴۲۱ میلی‌مولار بر دقیقه محاسبه گردید.

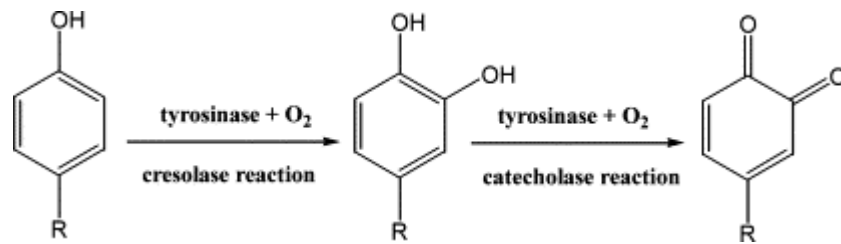
واژه‌های کلیدی: استخراج، خالص‌سازی، تایروزیناز، ثابت‌های میکائیلیس

مقدمه

ناپایدار بوده، متعاقبا با خودشان، آمینو اسیدها یا پروتئین‌ها، فنل‌ها و دیگر ترکیبات سلولی اتصال عرضی برقرار می‌کنند و سبب ایجاد پلیمرهای غیر همگون قرمز، سیاه و قهوه‌ای می‌شوند. تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای به وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز، یکی از مهمترین واکنش‌هایی است که در انسان و برخی جانوران عالی موجب کدر و

پلی فنل اکسیدازها (Polyphenol Oxidases: PPOs) دسته وسیع و مهمی از متالو پروتئین‌ها هستند با شماره کمیته آنزیمی (EC 1.14.18.1) که واکنش تبدیل هیدروکسی فنل‌ها را به مشتقات کوئینون کاتالیز می‌کنند (Van Gelder *et al.*, 1997). اورتو کوئینون‌ها به شدت واکنش‌گر و

کاتکولاز، لاکاز و کرسولاز (Garcia-Borrón and Solano, 2002). آنزیم تایروزیناز حداقل دو نوع واکنش را کاتالیز می‌کند که در هر دو نوع واکنش از اکسیژن مولکولی و ترکیبات فنلی به عنوان سوپسترا استفاده می‌کند. این واکنش‌ها عبارتند از هیدروکسیله کردن منوفنل‌ها به ارتو-دی فنل‌ها (فعالیت مونو فنلاز یا کاتالاز) و اکسید کردن ارتو-دی فنل‌ها یا پارا-دی فنل‌ها به ارتو-کوئینون (فعالیت دی فنلاز یا کاتکولاز). شکل ۱ این دو نوع واکنش را در حضور تایروزیناز به عنوان سوپسترا نشان داده است.



شکل ۱- فعالیت کرسولازی و کاتکولازی آنزیم تایروزیناز (Julivet *et al.*, 1998)

خوراکی (Nakamura *et al.*, 1966; Strothkamp *et al.*, 1976) و یا سایر قارچ‌ها است (Fan *et al.*, 2004)، ولی در حد تحقیقاتی نیز تاکنون این آنزیم را از منابع گوناگون جانوری (Garcia Borrón *et al.*, 1985; Kwon *et al.*, 1987) و گیاهی مانند سیب‌زمینی (Matheis and Belitz, 1977) و توتون (Sariri *et al.*, 2007) و یا میوه‌ها مانند هلو (Wong *et al.*, 1971)، گلابی (Espin *et al.*, 2001) و سیب (Rocha and Morais, 2001) استخراج نموده و خواص آن را بررسی کرده‌اند. از طرف دیگر، مطالعات در مورد سینتیک واکنش آنزیم و اثر کننده‌های آن نیز بیشتر

لکه‌دار شدن پوست (Del Marmol and Beermann, 1996) و در گیاهان موجب تغییر رنگ آنها شده، عامل از دست رفتن کیفیت در بیشتر غذاهاست (Fraignier, 1995). بنابراین، بررسی انواع، ویژگی‌های مربوطه و بازدارنده‌های این آنزیم می‌تواند از نظر اقتصادی و همچنین از جنبه‌های تحقیقاتی حایز اهمیت زیادی باشد (Espin and Witchers, 1999; Espin *et al.*, 1999; Espin *et al.*, 2000a). تشکیل کوئینون در محصولات کشاورزی بسیار اهمیت دارد و این امر مهمترین علت تمایل گسترده و روز افزون دانشمندان برای مطالعه ویژگی‌های پلی فنل اکسیداز است. پلی فنل اکسیدازها دارای سه نوع فعالیت شناخته شده هستند که عبارتند از: فعالیت‌های

چنانکه در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، در هر دو واکنش فوق اکسیژن ملکولی نقش کمک کننده سوپسترا را دارد. در واقع، آنزیم تایروزیناز یک آنزیم دو سوپسترای است و این که چگونه یک سیستم آنزیمی قادر است هر دو فعالیت مونو و دی فنل اکسیدازی را انجام دهد، تا مدت‌ها نامشخص و موضوع تحقیق برخی دانشمندان بوده است (Friedman and Daron, 1977).

آنزیم تایروزیناز برای استفاده تحقیقاتی در صنایع دارویی و آرایشی کاربرد فراوان داشته، در هر حال، برای اغلب کاربردهای فوق، منبع آنزیم مذکور تایروزیناز قارچ

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانتی در پوسته آن (Lou *et al.*, 2004) | را می‌توان نام برد.

هدف

از آنجایی که بادامزمینی از محصولات مهم کشاورزی استان گیلان بوده، با توجه به تجربه و تخصص گروه ما در دانشگاه گیلان در مورد تایروزیناز، عزم بر این شد که آنزیم این گیاه بررسی و با منابع دیگر مقایسه شود. به علاوه، بر اساس تحقیق از تولیدکنندگان محلی و مشاهدات و بررسی‌های طولانی مدت توسط نویسندگان، مشخص شده است که بادامزمینی دارای عمر کوتاهی بوده، بررسی ارتباط عمر بادام با میزان آنزیم تایروزیناز، در بازار پسند تمودن محصول و افزایش بهره‌وری می‌تواند موثر باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که تولید فرآورده‌های بادامزمینی، از قبیل روغن، کره و یا استخراج مواد بیوشیمیایی مهم آن، مانند تایروزیناز بتواند در این منطقه از کشور سبب تحول اقتصادی گردد. با توجه به فاکتورهای ذکر شده، هدف این تحقیق استخراج آنزیم تایروزیناز از انواع بادامزمینی تازه و یک ساله و بررسی خصوصیات آن در مقایسه با تایروزیناز قارچ - که مصرف تجاری فراوانی دارد - بوده است.

روش کار

عصاره‌گیری از دانه بادامزمینی

دانه‌های سالم و بدون پوست بادامزمینی، ابتدا درون یک هاون چینی تمیز کمی خرد و سپس با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر در آورده شدند. در مرحله بعدی، ۰/۵ گرم از پودر حاصل در ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=6/8$ همراه با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۱ میلی‌مولار) به مخلوط

در مورد تایروزیناز قارچ بوده است (Hsu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003). این در حالی است که آنزیم تایروزیناز موجود در حبوبات کمتر مطالعه شده است. جستجو در مورد وجود و یا بررسی آنزیم تایروزیناز در میان حبوبات به یافتن تنها یک گزارش قدیمی (Miller, 1929) | برای استخراج آنزیم تایروزیناز کم محلول از برگ‌های پهن نوعی لوییا انجامید. از طرفی، چند مقاله جدید نیز در مورد حبوباتی، از قبیل باقلا (Waliszewski, 2000; Paul and Gowda, 2009; *et al.*) | و جوانه نخود (Marcio and Fabricio, 2008) اخیراً چاپ شده است. در هر صورت، بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط گروه ما، تاکنون در مورد پلی فنل اکسیداز بادامزمینی تحقیقات کمتری صورت گرفته است.

بادامزمینی با نام علمی *Arachis Hypogaea* گیاهی است از تیره نخود (Leguminosae)، کوتاه و یک ساله که، چنانچه در ناحیه‌های فاقد یخبندان باشد، ظرفیت چند ساله شدن را دارد. میوه بادامزمینی به طول تقریبی ۴ سانتی‌متر بوده، در یک پوسته شکننده به رنگ خاکستری مایل به زرد قرار دارد. بر روی پوسته یک تا سه برجستگی مشاهده می‌شود که هر یک محل دانه‌ها را نشان می‌دهد. دانه بادامزمینی تقریباً مانند فندق به رنگ سفید مایل به زرد بوده ولی تخم‌مرغی شکل است. پوسته نازکی دانه را پوشانده که به رنگ قرمز قهوه‌ای است. بادامزمینی در طب قدیم ایران برای تقویت ریه و طحال، افزایش کلسترول خوب خون، کاهش درد معده و ناراحتی‌های گوارشی، بر طرف کردن سرفه خشک، ازدیاد شیر در مادران شیرده، به عنوان ملین و تقویت قوای دماغی مفید استفاده می‌شده است. به علاوه، برخی خواص دیگر این گیاه دارویی نیز مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است که از جمله آنها

مدل BIORAD و ستون (UNO-Q1) که فاز ثابت (رزین) آن Q- سفاروز بود، استفاده شد. برای انجام این کروماتوگرافی، از دو نوع بافر A و B استفاده شد و سرعت جریان (Flow Rate) بافر یک میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید. بافر A شامل تریس با غلظت ۲۰ میلی‌مولار $pH=7/2$ و بافر B متشکل از تریس با غلظت ۲۰ میلی‌مولار و NaCl یک مولار $pH=7/2$ است. پس از انجام کروماتوگرافی، فعالیت آنزیم تیروزیناز در فراکشن‌های هر پیک سنجیده شده، فراکشن‌هایی که حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز بودند برای انجام مراحل بعدی در دمای $20^{\circ}C$ منتقل شدند.

تغلیظ به روش اولترافیلتراسیون

با توجه به اینکه نمونه پروتئین خارج شده از FPLC رقیق شده، جهت تشخیص میزان خلوص، بر روی ژل SDS-PAGE قابل رؤیت نخواهد بود، بنابراین، بعد از انجام کروماتوگرافی تبادل یونی فراکشن‌های حاوی آنزیم تیروزیناز که با سنجش فعالیت آنزیمی مشخص شده بودند، به وسیله روش اولترافیلتراسیون با میکروتیوب سنتریکون تغلیظ گردید. برای تغلیظ در این روش از سانتریفیوژ با سرعت چرخش 12000 rpm در دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد.

سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز SDS-PAGE

به منظور مشاهده ایزوفرم‌های آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) و میزان خلوص آنزیم از عمل الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد. الکتروفورز SDS-PAGE از نمونه‌های تغلیظ شده پس از انجام کروماتوگرافی تبادل آنیونی انجام گردید. پس از انجام

تبدیل و مدت ۱۵ دقیقه در 14000 rpm در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا شده، دوباره به مدت ۵ دقیقه در 14000 rpm در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز به آرامی با سمپلر برداشته و در میکروتیوب‌های جدید ریخته شد.

رسوب‌گیری با سولفات آمونیم

برای رسوب دادن پروتئین‌ها از سولفات آمونیوم ۸۵ درصد استفاده شد. نمونه‌های استخراجی درون استوانه مدرج ریخته شد و روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و با قرار دادن در یخچال، سولفات آمونیوم طی شش مرحله ۱۰ دقیقه‌ای به محلول پروتئینی افزوده شد. بعد از انحلال کامل سولفات آمونیوم، محلول در دمای $4^{\circ}C$ و با دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب پروتئینی در حداقل بافر فسفات حل گردید.

دیالیز

دیالیز با استفاده از کیسه دیالیز با اندازه منافذ ۱۲ کیلو دالتون جهت حذف نمک آمونیوم سولفات از رسوب پروتئینی و همچنین جدا کردن پروتئین‌هایی با اوزان مولکولی بیشتر از ۱۲ کیلو دالتون انجام شد. پس از آماده‌سازی کیسه‌ها، دیالیز در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار با $pH=6/8$) بر روی استیرر در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد با سه بار تعویض بافر انجام شد (Scotter *et al.*, 2006).

تخلیص تیروزیناز

برای تخلیص آنزیم تیروزیناز از کروماتوگرافی تبادل آنیونی استفاده شد. برای انجام این کار از دستگاه FPLC

شد. ابتدا یکی از میکروتیوب‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شده و سپس سنجش آنزیمی سه بار انجام گردید. میکروتیوب دوم در دمای ۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد و مانند روش قبل سه بار سنجش آنزیمی روی آن انجام گرفت و به همین ترتیب، بر روی مابقی میکروتیوب‌ها دمای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه با مدت زمان ۲۰ دقیقه اعمال نموده، مورد سنجش قرار گرفتند. سپس با مقادیر جذب‌های به دست آمده، از طریق رسم نمودار در برنامه Excel میزان دمای بهینه فعالیت آنزیم محاسبه گردید.

اندازه‌گیری pH بهینه

برای تعیین pH بهینه آنزیم ابتدا با استفاده از منوهیدروژن دی سدیم فسفات، سیتریک اسید و آب دیونیزه، بافرهایی با pHهای مشخص تهیه شدند (جدول ۱) و سپس فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با استفاده از سوبسترای دوپامین هیدروکلرید طبق روش فوق حداقل ۳ بار در هر یک از این بافرها اندازه‌گیری شد.

تعیین غلظت پروتئین و محاسبه فعالیت ویژه

برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. بعد از هر مرحله جدا سازی، تغلیظ و تخلیص، غلظت پروتئین محاسبه شد و همچنین در هر مرحله از جداسازی، تغلیظ و تخلیص، فعالیت پلی فنل اکسیداز در یک مخلوط سنجش یک میلی‌لیتری با روش اسپکتروفتومتری از طریق اندازه‌گیری افزایش جذب در طول موج ۵۰۵ نانومتر در یک دوره زمانی ۲ دقیقه‌ای بررسی گردیده، فعالیت ویژه پروتئین در هر مرحله به دست آمد (Mayer and Staples, 2002).

الکتروفورز، ژل حاصل با روش کوماسی بریلینانت بلو G-250 رنگ آمیزی گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم از سوبسترای دوپامین هیدروکلراید با غلظت ۵۵ میلی‌مولار، ۳-متیل-۲-بنزوتیازولینون هیدرازون (MBTH) (Merek) با غلظت ۵ میلی‌مولار، دی متیل فرم آمید (DMF) ۲ درصد حجمی و اسید فسفریک ۰/۰۸ درصد حجمی و بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۶/۸ استفاده شد (Sanchez-Ferrer, 1988). محلول سوبسترا به شدت، نسبت به نور حساس است، بنابراین، باید از تابش نور به آن جلوگیری نموده، در درون ظرف تیره نگهداری شود. با توجه به ناپایدار بودن این سوبسترا می‌باید برای هر نوبت سنجش فعالیت آنزیمی، محلول سوبسترای تازه تهیه نمود. محیط سنجش یک میلی‌لیتری حاوی ۹۹۰ μL سوبسترا و ۱۰ μL آنزیم (نمونه استخراجی) است. تغییرات جذب بر روی زمان در طول موج ۵۰۵ نانومتر در مقابل بلانک حاوی ۹۹۰ μL سوبسترا و ۱۰ μL بافر استخراج، بررسی شد.

محاسبه Km و Vmax

برای این آزمایش غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ میلی‌مولار از سوبسترای تایروزیناز تهیه شد. سوبسترای اصلی تایروزیناز دوپامین هیدروکلراید بود و نمونه آنزیمی بعد از FPLC جهت محاسبه Km و Vmax سه بار تکرار استفاده شد.

محاسبه دمای بهینه

ابتدا رقت مناسب نمونه آنزیمی تهیه شد و سپس در ۷ میکروتیوب ۴۰ میکرولیتر از آنزیم با رقت مناسب ریخته

زایموگرام تایروزیناز

به منظور انجام زایموگرام از روش Native gel electrophoresis استفاده شده است. بافرهای مورد نیاز در این نوع الکتروفورز، همانند بافرهای مربوط در روش SDS-PAGE بوده؛ با این تفاوت که در اینجا SDS به کار برده نشد. نمونه‌ها بدون اعمال حرارت در ته چاهک بارگذاری شدند و شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد برای نمونه‌ها در تمامی مراحل آزمایش فراهم گردید تا فعالیت آنزیم حفظ گردد. ولتاژ دستگاه نیز روی ۱۰۰ تنظیم شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل در محلول سوبسترای آنزیم غوطه‌ور و جهت رنگ‌آمیزی در شرایط دمایی ۴ °C قرار

داده شد. در ابتدا، دوپامین به سوبسترا اضافه نشد و ۱۵ دقیقه ژل در سوبسترای بدون دوپامین قرار گرفت و سپس در چند مرحله دوپامین به آن اضافه گردید. با این کار، از شدت رنگ گرفتن ژل (با رنگ‌آمیزی به روش روش کوماسی بریلیانت بلو G-250) جلوگیری شد. ژل در محلول سوبسترا به مدت ۱۰-۱۲ ساعت قرار گرفت. بر اثر واکنش بین آنزیم با سوبسترا باندهای پروتئین تایروزیناز گرفته، پس از ظهور اولیه باند به منظور کاهش رنگ‌پذیری ژل بافر فسفات بیشتری به سوبسترا اضافه گردید.

جدول ۱- روش تهیه بافر با pHهای مختلف استفاده شده برای تعیین pH بهینه آنزیم

pH	سیتریک اسید (میلی لیتر)	منوهیدروژن دی سدیم فسفات (میلی لیتر)	آب دیونیزه (میلی لیتر)
۹/۲	۰	۴۰	۱۰
۸/۱	۱	۵۰	۱۳
۷/۱	۲۰	۶۸	۲۲
۶/۱	۲۰	۴۰	۱۵
۵/۲	۲۰	۲۰	۱۰
۳/۹	۲۰	۱۰	۷/۵
۲/۵	۴۰	۰	۱۰

نتایج

در پایان هر مرحله هموژنیزاسیون، رسوب‌دهی و تخلیص پروتئین، مقدار پروتئین توتال، فعالیت آنزیمی توتال و فعالیت ویژه تایروزیناز، درجه تخلیص و میزان راندمان کار محاسبه گردید (جدول ۲). با توجه به داده‌های جدول ۲ ملاحظه می‌شود که با افزایش میزان تخلیص به حدود ۷ برابر مقدار شروع عمل، فعالیت ویژه آنزیم

تایروزیناز نیز به همین مقدار افزایش یافته است و این امر نشان‌دهنده راندمان بسیار خوب عمل خالص‌سازی است. از طرفی، با توجه به وجود دو باند مجزا در ژل زایموگرام الکتروفورز پلی آکریل آمید (شکل ۲)، حضور دو ایزوفرم برای آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام زمینی پیش‌بینی می‌شود. به منظور تعیین میزان تخلیص، فراکشن‌های تغلیظ شده حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز بعد از مرحله کروماتوگرافی

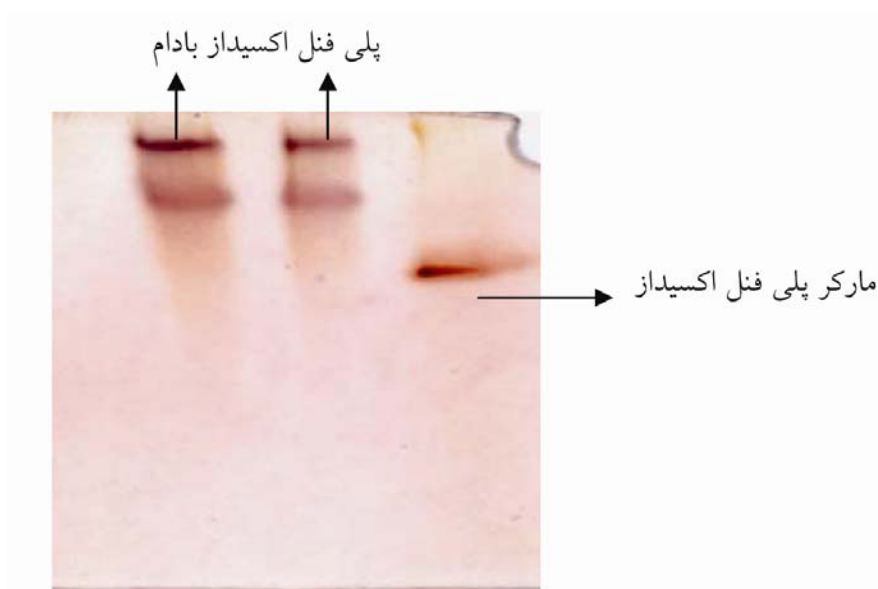
محدوده یک درجه است (شکل ۴). از طرفی، فعالیت آنزیم در pHهای اسیدی بالاتر از قلیایی بود و سنجش فعالیت آنزیم در بافرهایی با pHهای مختلف نشان داد که pH بهینه فعالیت آنزیم ۵/۲ است (شکل ۵).

تبادل آنیونی با استفاده از بافرهای احیایی و غیر احیایی الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از ژل ۱۲٪ انجام و ژل حاصل با کوماسی آبی جی-۲۵۰ رنگ آمیزی شد (شکل ۳).

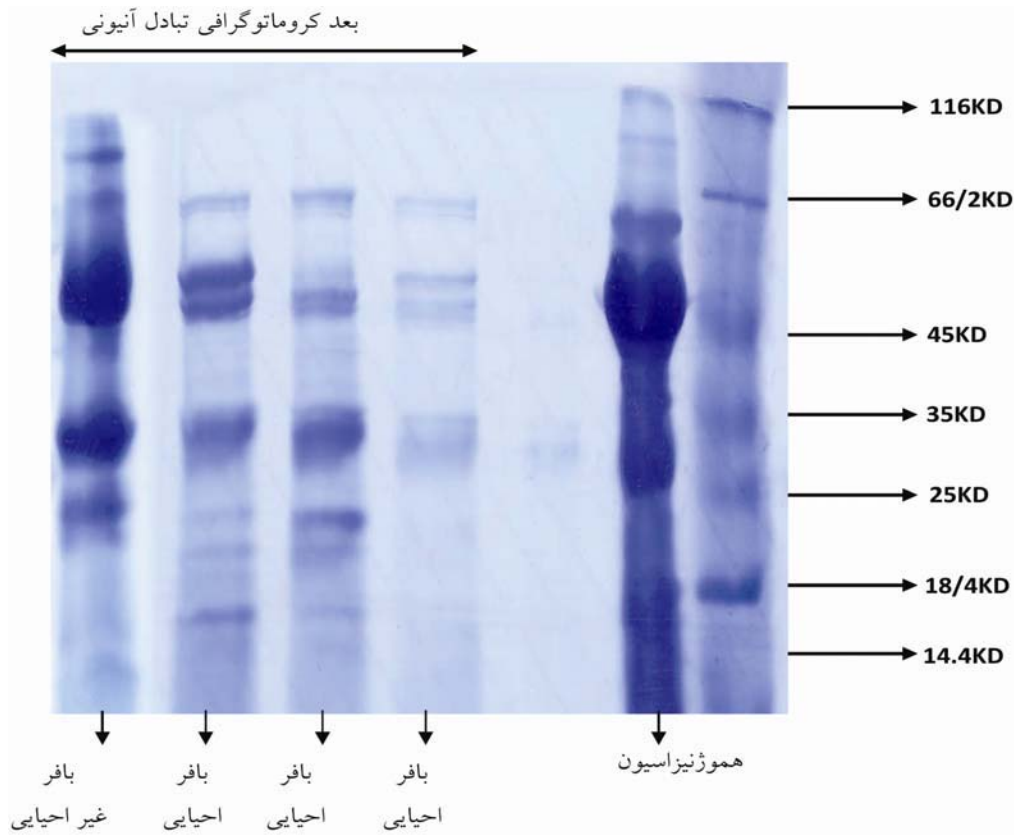
بررسی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف نشان داد که دمای بهینه فعالیت آنزیم در حدود ۴۰°C با تغییراتی در

جدول ۲- تغییرات فعالیت کل و فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز در مراحل مختلف جداسازی

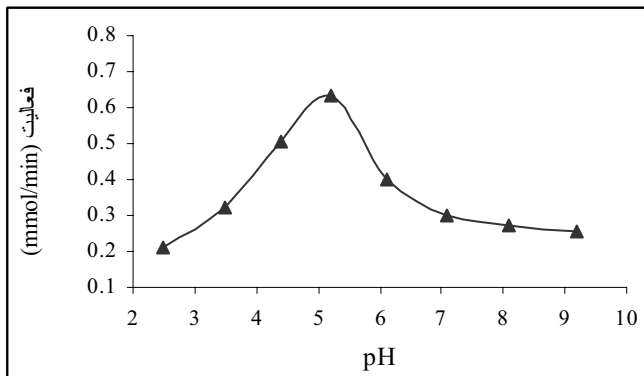
	A/minΔ	پروتئین کل mg/mL	فعالیت کل μmol/min	فعالیت ویژه μmol/min mg	راندمان	میزان تخلیص
هموژنیزاسیون	۰/۲۳۷	۳۴/۵	۰/۱۳۸	۰/۰۰۴	۱۰۰	۱
بعد از جداسازی نمکی	۰/۲۸۷	۴۰/۸۶	۰/۳۳۵	۰/۰۰۸۱	۲۴/۲۷	۲/۰۲۵
بعد از کروماتوگرافی تبادل آنیونی	۰/۱۳۶	۰/۵۷۳	۰/۰۱۵۹	۰/۰۲۷	۱۱/۵۲	۶/۹۲۵



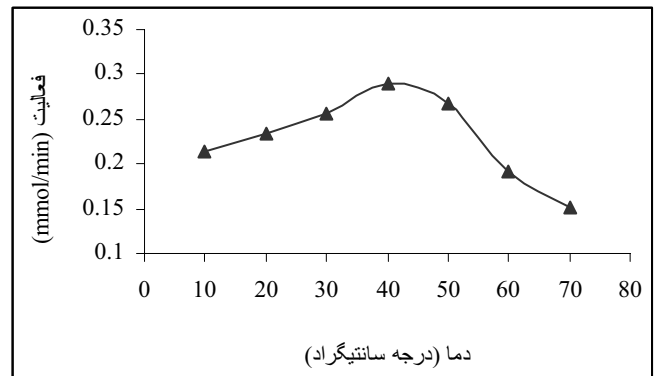
شکل ۲- زیموگرام حاصل از تایروزیناز بادام زمینی. استاندارد (مارکر پلی فنل اکسیداز) دارای وزن مولکولی ۵۸ کیلو دالتون است.



شکل ۳- الکتروفورگرام حاصل از عمل الکتروفورز SDS-PAGE بعد از انجام کروماتوگرافی آنیونی. نمونه سمت راست مربوط به مارکر وزن مولکولی است.



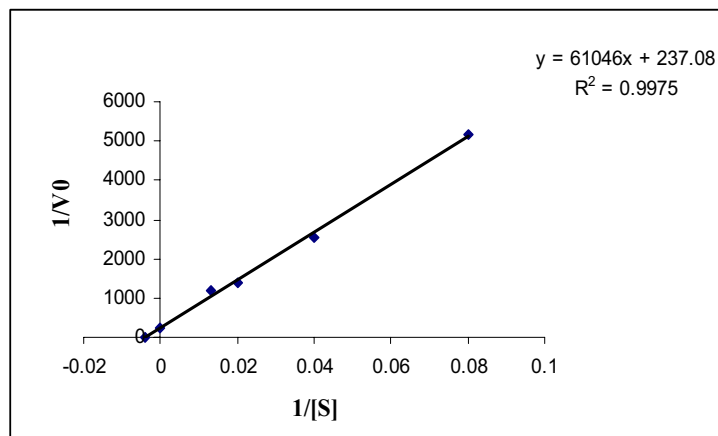
شکل ۵- نمودار تعیین pH بهینه آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام زمینی



شکل ۴- نمودار اثر دما بر آنزیم پلی فنل اکسیداز

$K_m = 257.5 \text{ mmol}$
 $V_{max} = 0.00421 \text{ mmol/min}$

پارامترهای سینتیکی، K_m و V_{max} برای آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام با استفاده از نمودار لاینویور برک (شکل ۶) به دست آمدند که عبارت بودند از:



شکل ۶- نمودار لاینویور برک فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

نتیجه گیری و بحث

بیشتری داشته باشد، محکم تر به ماتریکس متصل می شود و برای جدا شدن آن به درصد بالاتری از بافر B نیاز است. از طرفی، سنجش آنزیمی در فراکشن سوم نشان داد که این قسمت فاقد فعالیت پلی فنل اکسیدازی بود. در مرحله بعد، فراکشن دوم حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز توسط روش اولترافیلتراسیون با میکروتیوب سنتریکون که فقط پروتئین هایی با وزن ملکولی ۳۰ کیلو دالتون را از خود عبور می داد، تغلیظ شد. سپس از هر دو نمونه بالا و پایین صافی سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت و مشخص شد تنها محلول روی صافی فعالیت پلی فنل اکسیدازی دارد و بنابراین، از آن برای مراحل بعدی استفاده شد.

به منظور مشاهده حضور پلی فنل اکسیداز، الکتروفورز ژل پلی آکرلامید PAGE در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد و پس از اتمام الکتروفورز، ژل در مجاورت سوپسترا قرار گرفت و در نهایت، باندهای پروتئینی آن ظاهر شد. مارکر مورد استفاده تیروزیناز قارچ *Agaricus bisporus* با وزن ملکولی ۵۸ کیلو دالتون بود (شکل ۳). از آنجایی که آنزیم در فرم ساختمانی کامل خود با سوپسترا واکنش می دهد، بنابراین وجود دو باند در ژل ممکن است

بر اساس بررسی های انجام شده، با آن که آنزیم تایروزیناز از برخی میوه ها و سبزی ها جدا سازی و تخلیص شده (Rast *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 1995; Marcio and Fabricio, 2008)، ولی تاکنون در مورد پلی فنل اکسیداز بادام زمینی گزارشی موجود نبود. در این تحقیق، نتایج خالص سازی پروتئین با FPLC با استفاده از دتکتور ماورای بنفش ۳ فراکشن جداسازی شد. هر کدام از این پیک ها مربوط به پروتئین هایی هستند که در حدود درصد های خاصی از بافر B از ستون جدا شده اند. در فراکشن های جمع آوری شده سنجش فعالیت آنزیمی تایروزیناز به عمل آمد. در فراکشن های ۱ و ۲ فعالیت پلی فنل اکسیدازی مشاهده شد. فراکشن اول در ناحیه با گرادیان صفر بافر B قرار دارد که آنزیم این ناحیه با ستون اتصال برقرار نکرده است، بنابراین، در فراکشن دوم آنزیم جداسازی شده است و از آنجایی که در این فراکشن درصد بافر نمکی کم بوده است، بنابراین، نتیجه می شود که بار منفی روی سطح پروتئین ناچیز بوده است، زیرا با توجه به جنس ماتریکس، هر چه پروتئین مورد نظر بار منفی

از طرفی، pH بهینه آنزیم استخراج شده از بادام‌زمینی در حدود ۵/۲ تعیین گردید (شکل ۵). این نوع رفتار در مقابل pH در مقایسه با برخی تایروزینازهای گیاهی گزارش، اندکی تفاوت دارد. برای مثال، pH بهینه آنزیم پلی فنل اکسیداز گوجه فرنگی در محدوده کمی قلیایی است (Thipyapong and Steffen, 1997). از طرفی، آنزیم پلی فنل اکسیداز در نوعی لوبیا به نام *Vanilla bean* دارای pH بهینه در محدوده قلیایی (حدود ۸-۱۰) است (Waliszewski, et al., 2009)، ولی چنانکه ملاحظه می‌شود، pH بهینه آنزیم استخراج شده از بادام‌زمینی در محدوده اسیدی است که دال بر فعالیت بیشتر آنزیم در محیط‌های اندکی اسیدی در مقایسه با محیط‌های قلیایی است. این رفتار را می‌توان تا حدی بر اساس تغییر ماهیت ساختمان پروتئینی آنزیم در نواحی نزدیک به جایگاه فعال توجیه نمود. با توجه به شکل ۵ ملاحظه می‌شود که آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی در محیط‌های اندکی قلیایی تا قلیایی متوسط (pHهای ۲/۷ تا ۱۰) حدود ۶۰٪ فعالیت خود را از دست داده است و این در حالی است که در محیط اسیدی (pHهای ۴ تا ۵) بیش از ۸۰٪ فعالیت آنزیمی خود را حفظ نموده است. حفظ درصد بیشتری از فعالیت بیولوژیک آنزیم در محیط‌های اسیدی در مقایسه با محیط‌های قلیایی، می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات ساختمانی در اطراف جایگاه فعال آنزیم در محیط‌های قلیایی و مقاومت در مقابل محیط اسیدی باشد. مقادیر دما و pH بهینه یک آنزیم می‌توانند معیار مناسبی برای سنجش پایداری و یا حساسیت آن بوده، در نتیجه، تصمیم‌گیری در مورد کاربردهای طبیعی و صنعتی آن جنبه‌های علمی تری پیدا خواهند نمود.

مطالعات سینتیکی نشان داد که در غلظت‌های متفاوت سوبسترای دوپامین هیدروکلراید میزان Km و Vmax برای

نشان دهنده حضور دو ایزوform مختلف آنزیم پلی فنل اکسیداز در بادام‌زمینی باشد. موقعیت باندهای ظاهر شده بالاتر از باندهای مربوط به تایروزیناز قارچ است. بنابر این، وزن ملکولی تایروزیناز استخراج شده از بادام‌زمینی شمال کشور، اندکی بیشتر از ۵۸ کیلودالتون است. برای تعیین دقیقتر وزن مولکولی آنزیم استخراج شده، در مرحله بعدی الکتروفورز SDS-PAGE از این نمونه‌ها در حضور بافر نمونه‌های احیایی و غیر احیایی انجام گرفت و با روش کوماسی بلو شد. در اژل الکتروفورز PAGE حاصل جایگاه باندهای آنزیم پلی فنل اکسیداز مشخص است (شکل ۳). چنانکه در این شکل ملاحظه می‌گردد، باندهای هم‌ردیف مارکر با وزن ملکولی ۶۶/۲ کیلو دالتون متعلق به آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام‌زمینی هستند. وزن مولکولی تایروزیناز استخراج و تخلیص شده از انواعی قارچ به نام *Portabella mushrooms* حدود ۷۰ کیلو دالتون گزارش شده است که اندکی بیشتر از آنزیم بادام‌زمینی است (Fan and Flurkey, 2004).

دمای بهینه فعالیت برای این آنزیم ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (شکل ۴)، این مقدار مشابه با دمای بهینه آنزیم‌های تایروزیناز گیاهی، مانند توتون (Sariri et al., 2007 | و یا هلو (Wong, et al. 1971)، گلابی (Espin et al., 2001) | و سیب (Rocha and Morais, 2001) است. شکل ۴ نشان می‌دهد که دمای ۳۰-۵۰ درجه بهترین محدوده دمایی برای فعالیت آنزیم است و از طرفی، آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی در دماهای پایین تر از دمای بهینه در مقایسه با دماهای بالاتر از دمای بهینه فعالیت بیشتری نشان می‌دهد؛ به طوری که در دمای حدود ۷۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن تا حدود ۵۰٪ کاهش می‌یابد.

کاهش اندکی در کیفیت غذایی و ارزش‌های آنتی‌اکسیدانتی آن می‌گردد. چنین تغییراتی تحت شرایط موجود فرآوری مواد غذایی و در علوم تغذیه‌ای تا حدی اجتناب‌ناپذیر است و بهترین نظارت در این مورد، نمونه‌برداری و کنترل کیفیت محصول بسته‌بندی شده است. از طرفی، مطالعات مشابه در مورد مقایسه فعالیت و سینتیک بادامزمینی تازه و یک یا دو سال کهنه شده نیز انجام شد که نتایج جالب توجهی در جهت اثر گذشت زمان روی فاکتورهای مختلف آنزیم روشن کرد. تحقیق مذکور راه تازه‌ای برای استفاده صنعتی و تحقیقاتی از بادام‌های تاریخ گذشته و ارزان قیمت پیشنهاد می‌کند و نتایج آن به زودی منتشر خواهد شد.

تشکر و قدردانی

همکاری مؤثر دانشگاه پیام نور تهران و دانشگاه گیلان شایان تشکر و قدردانی است.

آنزیم پلی فنل اکسیداز به ترتیب $257/5$ mmol و $0/00421$ mmol/min محاسبه شد (شکل ۶).

در یک سری تحقیقات موازی، از دانه تفت داده بادامزمینی نیز توسط نیتروژن مایع عمل استخراج انجام گرفت و سپس مانند حالت قبل مورد سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز قرار گرفت، ولی این بار هیچ فعالیتی مشاهده نشد که نشان‌دهنده غیر فعال شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز در طی فرآیند به عمل آوری بادامزمینی است. بررسی‌های محلی نشان‌دهنده این واقعیت بودند که عمل فرآوری (تفت دادن) بادامزمینی در مرحله روی شن‌های داغ با دمای حدود 400 درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد. قرار گرفتن محصول بادامزمینی حدود 6 ساعت در چنین شرایطی به احتمال زیاد سبب تغییر ماهیت بسیاری از پروتئین‌ها و کاهش و از بین رفتن فعالیت برخی آنزیم‌ها می‌گردد. در هر صورت، مانند بسیاری از اعمال فرآوری مواد غذایی، عمل تفت دادن این محصول با ارزش موجب مناسب‌تر شدن و بازار پسندتر شدن محصول و به بهای

منابع

- Chemistry 47:3518-3525.
- Espin, J. C., Van Leeuwen, J. and Wichers, H. J. (1999) Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 3509-3517.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, S., Wichers, H. J. (2000a) Maturation and activation of latent tyrosinase from *Agaricus bisporus*. International Society Mushroom Science Proceeding. May 15-19.
- Fan, Y. and Flurkey, W. H. (2004) Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. Phytochemistry 65: 671-676.
- Fraignier, M. P., Marques, L., Fleuriet, A. and Chen, Q. X., Liu, X. D. and Huang, H. (2003) Inactivation kinetics of Mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution. Biochemistry (Moscow) 68(6): 644-649.
- Del Marmol, V. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. FEBS Letters 38:165-168.
- Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Gracia-Canovas, F. (1997) Monophenolase activity of polyphenol oxidase from blanquilla pear. Phytochemistry 44 (1): 17-22.
- Espin, J. C. and Wichers, H. J. (1999) Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium docecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. Journal of Agricultural and Food

- polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2058-2063.
- Matheis, G. and Belitz, H. D (1977) Studies on enzymic browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*) III. Kinetics of Potato Phenoloxidase. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und -Forschung A*. 163: 191 - 195.
- Miller, E. R. (1929) The insoluble tyrosinase of the Velvet bean seed coat. *Plant Physiology* 4(4): 507-517.
- Nakamura, T., Sho S. and Ogura Y. (1966) On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biochemistry* 59 (5): 481-486.
- Paul, B. and Gowda, L. R. (2000) Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(9): 3839-3846.
- Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C. and Hollenstein, G. O. (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64: 339-366.
- Rocha, A. M. C. N. and Morais, A. M. M. B. (2001) Characterization of polyphenol oxidase extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control* 12(2): 85-90.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J. and García-Carmona, F. (1988) Characterization of cresolase and catecholase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 27:319-321.
- Sariri, R., Mozafarzadeh, Z. and Jafarian, V. (2008) Extraction, purification and characterization of polyphenol oxidase from tobacco leaves grown in north of Iran. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2(2): 337-342.
- Scotter, A. J., Kuntz, D. A., Saul, M., Graham, L. A., Davies P. L. and Rose D. R. (2006) Expression and purification of sea raven type II antifreeze protein from *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Protein Expression and Purification* 47: 374-383.
- Strothkamp, K. G., Lolley, R. L. and Manson, H. S. (1976) Quaternary Structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical Biophysical Research*
- Macheix, J. J. (1995) Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2375-2380.
- Friedman, M. E. and Daron, H. H. (1977) Tyrosinase: An introductory experiment with enzymes. *Journal of Chemical Education* 4: 56.
- Garcia Borrón, J. C., Solano, F., Iborra J. L. and Lozano, J. A. (1985) Aggregation equilibria of tyrosinase of Harding-Passey mouse melanoma. *Biochemical Journal* 228: 95-101.
- Garcia-Borrón, J. and Solano, F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research* 15:162-173.
- Hsu, C. K., Chang, C. T., Lu, H. Y. and Chung, Y. C. (2007) Inhibitory effects of water extracts of *Lavendula* sp. on Mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry* 105: 1099-1105.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J. and Pellon, G. (1998) *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycological Research* 102: 1459-1483.
- Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H. and Halaban R. (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proceedings of National Academy of Science* 84 (21): 7473-7477.
- Lou, H., Yuan, H., Ma, B., Ren, D., Ji, M. and Oka, S. (2004) Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry* 65(16): 2391-2399.
- Marcio, S. T., and Fabricio P. (2008) A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48 (9): 3839-3846.
- Marques, L., Fleuriet, A. and Machiex, J. J. (1995) Characterization of multiple forms of polyphenol-oxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:193-200.
- Nunez-Delgado, E., Sojo, M. M., Garcia-Carmona, F. and Sanchez-Ferrer, A. (2003) Partial purification of latent persimmon fruit

Communication 70: 519-524.

- Thipyapong, P. and Steffen, J. C. (1997) Tomato polyphenol oxidase: Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology* 115(2): 409-418.
- Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. and Wichers, H. J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45:1309-1323.
- Waliszewski, K. N., Marquez, O. and Pardo, V. T. (2009) Quantification and characterization of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry* 117(2): 196-203.
- Wong, T. C., Luh, B. S. and Whitaker, J. R. (1971) Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiology* 48(1): 19-23.
- Mayer, A. M. and Staples, R. C. (2002) Laccase: New function for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.

Extraction and characterization of tyrosinase from peanut grown in north of Iran

Masoumeh Faridi,^{1*} Reyhaneh Sariri, Vahab Jafarian and ² Habiolah Nazem

^{1*} Department of Biology, Tehran Payame Noor University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Formation of brownish yellow pigments in damaged fruits and vegetables by tyrosinase enzyme is one of the main causes of their quality loss. Tyrosinase is a metalloprotein and is used in researches, regarding food, pharmacology and cosmetics. Peanut is one of the most important strategic agricultural products of northern Iran. In a general survey from the local farmers and producers, it was found that many of older peanuts lose their market and are reduced in quality and price when the new crop product is entered into the market. Considering the experience and the expertise within our group on tyrosinase extraction and characterization, the aim of this research was focused on peanut tyrosinase. Peanut was grounded in liquid nitrogen, followed by precipitation by ammonium sulphate and dialysis. Electrophoresis showed the presence of two possible isozymes. Enzyme activity was determined during various stages of purification. Some important physical properties of the enzymes were also measured. It was shown that the optimum pH for peanut tyrosinase was 5.2 and that optimum temperature was 40 °C. Kinetics studies determined the Michaelis-Menton constants, i.e. $K_m = 257.5$ mmol and $V_{max} = 0.00421$ mmol/min. The ultimate goal of this research was to investigate the possibility of replacing peanut tyrosinase for mushroom tyrosinase in various industrial and research applications.

Key words: Extraction, Purification, Tyrosinase, Michaelis constants

* Corresponding Author: sariri@guilan.ac.ir

بررسی مقایسه‌ای تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه‌های موین تراریخت و گیاهچه‌های شایزک (*Atropa belladonna* L.) تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید

نجمه احمدیان چاشمی، مظفر شریفی^{۱*}، فرح کریمی^۲، حسن رهنما^۳
^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
^۳ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، تهران، ایران

چکیده

اغلب گیاهان خانواده سیب‌زمینی دارای آلکالوئیدهای مهم زیستی، از جمله نیکوتین و تروپان آلکالوئیدهایی، مانند هیوسامین (آتروپین) و اسکوپولامین هستند. این آلکالوئیدها کاربردهای وسیعی در تهیه داروهای مهم و مصرف جهانی گسترده‌ای دارند. شایزک (*Atropa belladonna*) گیاهی دارویی، علفی از این خانواده است که مقدار زیادی از تروپان آلکالوئیدها را در ریشه خود تولید می‌کند. در این پژوهش، با استفاده از قطعات جداگشت حاصل از دانه‌رست‌های شایزک مربوط به دو جمعیت واز و گرمستان استان مازندران، در محیط کشت MS تغییر یافته، تعداد زیادی گیاهچه نوپدید یکسان تکثیر شدند. این گیاهچه‌ها در محیط MS جامد تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید شامل ۰، ۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱ میلی‌مولار، به مدت چهار هفته، کشت داده شدند. از طرفی دیگر نیز ریشه‌های موین تراریخت تولید شده توسط آگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) نیز تکثیر و تحت تأثیر غلظت‌های ذکر شده از سالیسیلیک‌اسید قرار داده شدند. سپس آتروپین و اسکوپولامین تولید شده در ریشه و اندام هوایی گیاهان نوپدید و ریشه‌های موین تراریخت، به وسیله HPLC سنجش و مقایسه شد. به طور کلی، مقدار آلکالوئیدهای حاصل از ریشه‌های موین بیشتر از اندام‌های گیاهچه‌های مورد مطالعه بود. از طرفی، مقدار آلکالوئیدها در ریشه گیاهچه‌ها از بخش هوایی بالاتر بود. همچنین، در ریشه‌های موینه نسبت آتروپین به اسکوپولامین بیشتر بود، در حالی که در گیاهچه‌ها نسبت اسکوپولامین به آتروپین بیشتر بود. در مجموع؛ استفاده از ریشه‌های موین و کشت آنها به جای گیاهان، به منظور مطالعات بیشتر و تولید این ترکیبات مهم در مقیاس وسیع قابل توجه است.

واژه‌های کلیدی: تروپان آلکالوئید، ریشه موین، سالیسیلیک‌اسید، شایزک (*Atropa belladonna*)

مقدمه

آلکالوئیدهای گیاهی، یکی از بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی و صنعتی هستند که در بسیاری از گیاهان بررسی شده‌اند. تعدادی از گیاهان خانواده سیب‌زمینی، از جمله شاییزک (*Atropa belladonna*)، تاتوره (*Datura stramonium*)، بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) و مهرگیاه (*Mandragora officinarum*) در ایران به حالت خودرو می‌رویند و به دلیل داشتن آلکالوئیدهای باارزش دارای خاصیت دارویی هستند (زرگری، ۱۳۷۵).

شاییزک یکی از گیاهان این خانواده، از قدیم در طب سنتی مورد توجه بوده است و این ویژگی به آلکالوئیدهای موجود در آن مربوط می‌شود. این گیاه دارای یک درصد آلکالوئیدهای مشتق از تروپان (هیوسامین و اسکوپولامین)، آتروپیک اسید و بلادونین است (زمان، ۱۳۷۰). هیوسامین، یکی از آلکالوئیدهای مهم این گیاه است که دارای اثر قوی آنتی‌کولینرژیک بر اعصاب پاراسمپاتیک است و در درمان دردهای حاد شکمی به کار می‌رود (زرگری، ۱۳۷۵). آتروپین با فرمول $C_{17}H_{23}NO_3$ ، فرم راسمیک هیوسامین است که در طول استخراج ایجاد می‌شود (Hashimoto and Yamada, 1986; Tahara et al., 1999; Miraldi et al., 2001). اسکوپولامین نیز فرم ۶، ۷- اپوکسید هیوسامین است (Hashimoto and Yamada, 1987; Matsuda et al., 1991). هر دو این ترکیبات بر سیستم عصبی پاراسمپاتیک تأثیر می‌گذارند (Zhang et al., 2004)، اما تفاوت این دو ترکیب در تأثیر آنها بر سیستم عصبی مرکزی است و از آنجا که اسکوپولامین نسبت به آتروپین تأثیر بیشتری بر روی سیستم عصبی

مرکزی دارد، تقاضا برای تولید این ترکیب بسیار بیشتر است (Rahman et al., 2006).

یکی از روش‌هایی که امروزه در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت یا سلول گیاهی است. محققان با استفاده از این روش سعی کرده‌اند تا تولید متابولیت‌های با ارزش در گیاهان را افزایش دهند. در کشت سلول و بافت، به ویژه در مراحل قبل از تمایز بافت‌ها و اندام‌ها، ممکن است میزان تشکیل برخی از متابولیت‌ها با گیاه کامل تفاوت داشته باشد و آنزیم‌هایی که مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها را در گیاه کنترل می‌کنند، در کشت سلول در مقایسه با گیاه فعالیت یکسانی نداشته باشند. از آنجایی که محل بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ریشه است، دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان دارای آنها با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز، در فنون کشت بافت و بیوتکنولوژی، برای تولید این متابولیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (Dechaux et al., 2005).

استفاده از ریشه‌های مویینه تراریخت از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه در مقادیر بسیار بالاتر از کشت‌های سلولی و کشت گیاه مناسب‌تر معرفی شده است. در این نوع کشت‌ها می‌توان متابولیت‌های ثانویه بیشتری نسبت به ریشه طبیعی گیاه تولید نمود. این ویژگی با ثبات ژنتیکی و رشد سریع ریشه در محیط ساده فاقد هورمون، آنها را به طور خاصی برای مطالعات بیوشیمیایی مناسب می‌سازد (Alvarez et al., 2000; Pinol et al., 1999)؛ اما در بیشتر مواقع، تولید آلکالوئیدها در مقیاس تجاری کم است و برای افزایش نیاز به تحریک تولید آنها است. از جمله اقداماتی که به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت در شیشه به کار می‌رود، استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی است. یک محرک ترکیبی است که نه

جغرافیایی به ترتیب: N:53°, E:36°, 20' و N:52°, 7', E:36°, 14'، به مدت ۷۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و ۲۰ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد ضد عفونی و در نهایت، چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذره‌های ضد عفونی شده در محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) بدون هورمون کشت و سپس در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی با شدت نور $42/6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ و دمای اتاق رشد روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور شاخه‌افزایی، ابتدا از اندام هوایی دانه‌رست‌های حاصل قطعات یک سانتی‌متری دارای یک جوانه جدا و در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین (BA) وارد شدند. بدین صورت، تعداد کافی از اندام هوایی نوپدید به دست آمد. به منظور بررسی اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید بر تولید تروپان آلکالوئیدها، قطعات یکسان از اندام‌های هوایی، در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA (جهت ریشه‌دار شدن) و دارای غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید کشت شدند. برای هر یک از غلظت‌ها، ۵ تکرار به طور مستقل (شیشه‌های مخصوص کشت) در نظر گرفته شد و در هر تکرار سه قطعه با اندازه مساوی و دارای یک جوانه استفاده گردید. سپس به مدت چهار هفته در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از چهار هفته، گیاهان برداشت شدند و طول اندام هوایی و ریشه‌ها، وزن تر آنها، میزان کلروفیل و آنتوسیانین اندازه‌گیری شد و اندام هوایی و ریشه‌ها به طور جداگانه برای سنجش آلکالوئید در فریزر نگهداری شدند.

تنها باعث تجمع فیتوالکسین‌ها در گیاهان می‌شود، بلکه هر نوع مسیر مربوط به پاسخ‌های دفاعی را نیز تحریک می‌کند که نتیجه آن سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است (Kang *et al.*, 2004).

ترکیباتی مانند سالیسیلیک‌اسید و جاسمونیک‌اسید، از جمله مولکول‌های مؤثر در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها هستند و به طور گسترده‌ای در این زمینه مطالعه شده‌اند. نقش سالیسیلیک‌اسید در مقاومت گیاه نسبت به پاتوژن‌ها و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده است. اخیراً نقش آن به عنوان یک ترکیب علامت‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان پر رنگ‌تر شده و همچنین گزارش شده است که باعث افزایش تولید آلکالوئیدها در کشت‌های تعلیقی ریشه‌های تراریخته می‌شود (Alvarez *et al.*, 2000).

در این تحقیق، با توجه به مطالعات گذشته و درصد پایین جوانه‌زنی بذره‌های شاییزک، چگونگی تولید تروپان آلکالوئیدها در گیاهچه‌های نوپدید که منشا بذر آنها از دو رویشگاه مختلف بود و همچنین ریشه‌های موبین که با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز سویه *ARI5834* تهیه شد، مورد بررسی قرار گرفت. سپس اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید در غلظت‌های مختلف بر میزان تولید آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین، به طور جداگانه در بخش هوایی و ریشه گیاهچه‌های نوپدید و ریشه‌های موبین تراریخت مقایسه و ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه قطعات جداکشت شاییزک و اعمال تیمار در کشت در شیشه

ابتدا دو جمعیت از بذره‌های شاییزک جمع‌آوری شده از دو منطقه واز و گرمستان واقع در مازندران (مختصات

تکثیر و اعمال تیمار بر ریشه‌های موین ترا ریخت

در این مرحله، از لاین ۷۳ ریشه موین که توسط آگروباکتریوم ریزوژنز سویه *ARI5834* از قطعات برگی شایزک مربوط به منطقه واز تهیه گردیده و ترا ریخت بودن آن به دو روش هیستوشیمیایی و مولکولی به اثبات رسیده بود، جهت مطالعه تولید تروپان آلکالوئیدها و تغییرات آنها توسط تیمار سالیسیلیک‌اسید استفاده شد (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۶). جهت اعمال تیمار، مقادیر هموزن از ریشه‌های موین (۴ گرم) وارد محیط‌های کشت مایع MS بدون هورمون و حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید شدند. سپس روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار دادند. بعد از دو هفته، ریشه‌ها توسط آب مقطر (۴ درجه سانتی‌گراد) و پمپ خلأ شستشو و به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر میزان رشد آنها، وزن شدند و برای انجام مراحل بعدی در فریزر نگهداری شدند. ریشه‌های ترا ریخت با ریشه‌های طبیعی گیاهچه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

سنجش کلروفیل برگ

کلروفیل برگ گیاهچه‌های نوپدید با منشا واز و گرمستان، به روش Arnon سنجش شد (Arnon, 1949). میزان کلروفیل a و b نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

$$a = [12.7(D_{663}) - 2.6(D_{645})] V/100W$$

$$b = [22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})] V/100W$$

(D: میزان جذب نور، V: حجم عصاره و W: وزن نمونه تر)

سنجش آنتوسیانین کل

برای سنجش آنتوسیانین کل، ۰/۲ گرم از اندام هوایی گیاهچه‌ها با ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و کلریدریک‌اسید به نسبت ۱:۹۹ عصاره‌گیری شد. سپس عصاره به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شد. محلول رویی به مدت یک شب، در تاریکی، در یخچال قرار داده شد. میزان جذب این توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی ($E = 33000 \text{ mol/cm}^2$) استفاده گردید (Krizek *et al.*, 1998).

استخراج آلکالوئیدها

استخراج آلکالوئید از اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و ریشه‌های موین، به طور جداگانه، انجام شد (Dashek, 1997; Lucio *et al.*, 1997). ۱/۵ گرم از بافت گیاهی با ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد سائیده و به مدت ۱۵ ساعت رفلاکس (تقطیر برگشتی) شد. عصاره حاصل توسط کاغذ صافی (واتمن ۱) صاف و توسط دستگاه Rotary evaporator خشک شد. به بقایای عصاره خشک شده، ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط حاصل از مقادیر مساوی از سولفوریک‌اسید ۵ درصد (V/V) و دی‌اتیل‌اتر اضافه شد. فاز آبی جمع و pH آن به وسیله سود ۱۰ نرمال تا حدود ۱۰ بالا برده شد. به محلول حاصل ۶۰ میلی‌لیتر کلروفرم در سه مرحله اضافه شد و فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئیدها توسط دستگاه Rotary evaporator خشک و باقیمانده در ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل گردید.

سنجش آلکالوئیدها به وسیله HPLC

عصاره آلکالوئیدی به روش Lau-Cam و Roos (۱۹۸۶) به وسیله دستگاه HPLC مدل Philips با S50DS1-8961 و ستون Pu 41110; UV/ Vis detector (C18: 250mm - 4 mm) مورد سنجش قرار گرفت. طول موج دستگاه روی $\lambda = 230 \text{ nm}$ تنظیم شد، سرعت جریان حلال نیز ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه و فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک، حاوی آب، متانول، استیک اسید و تری اتیل آمین (۸۳:۱۵:۱/۵:۰/۵ درصد) بود. میزان دو آلکالوئید آتروپین و اسکوپولامین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده (شکل ۵) با استفاده از منحنی استاندارد آنها محاسبه گردید. منحنی استاندارد نیز بر اساس سطح زیر منحنی دو ترکیب استاندارد، آتروپین سولفات و اسکوپولامین هیدروبروماید، در سه غلظت ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر رسم شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و آزمون دانکن جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p < 0/05$ و $p < 0/01$ انجام شد.

نتایج

اثر تیمار سالیسیلیک اسید بر رشد گیاهچه‌ها

افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا یک میلی مولار، به طور معنی دار موجب کاهش طول و وزن تر اندام هوایی هر دو گروه گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان گردید ($p < 0/05$). طول و وزن تر ریشه نیز در هر دو گروه واز و گرمستان با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید کاهش یافت و حتی در بالاترین غلظت سالیسیلیک اسید (۱ میلی مولار) میزان ریشه بسیار ناچیز بود (جدول ۱).

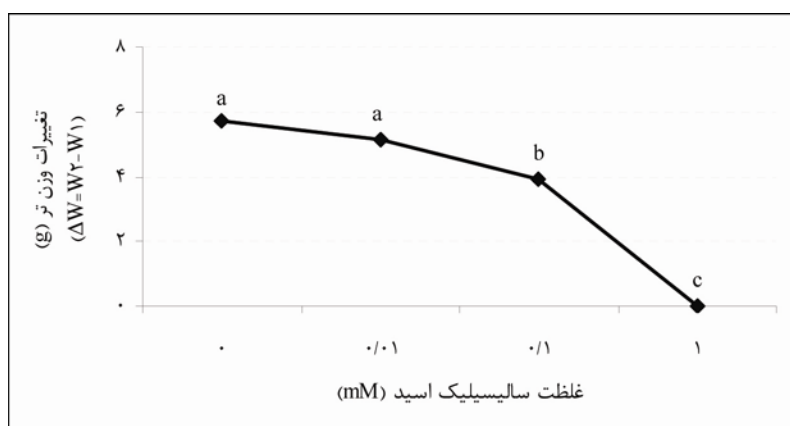
جدول ۱- مقایسه طول و وزن تر اندام هوایی و ریشه، کلروفیل a و b و آنتوسیانین کل در گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0/05$ است).

گیاه	سالیسیلیک اسید (mM)	اندام هوایی		ریشه		کلروفیل (mg g ⁻¹ FW)		آنتوسیانین (mmol g ⁻¹ FW)
		طول (cm)	وزن تر (g)	طول (cm)	وزن تر (g)	کلروفیل a	کلروفیل b	
واز	۰	ab2/698	a0/2758	a6/998	a0/2236	d0/455	c0/152	c0/07
	0/01	b1/898	abc0/1958	a7/064	b0/1576	c0/731	bc0/260	bc0/08
	0/1	bcd1/770	ab0/2552	b5/614	c0/0518	cd0/567	bc0/215	bc0/08
	۱	cd0/9760	c0/0324	d0	d0	-	-	-
گرمستان	۰	a3/444	a0/2844	a6/730	b0/1498	bc0/786	ab0/309	a0/11
	0/01	b2/112	abc0/2198	a6/964	b0/1522	a1/155	a0/407	ab0/10
	0/1	bc1/810	bc0/0744	c2/098	d0/011	ab1/024	a0/382	a0/11
	۱	d0/8900	c0/0338	d0	d0	-	-	-

گیاهان واز و گرمستان نداشته، اما به طور کلی مقدار آن در گیاهان گرمستان بیشتر از واز بوده است (جدول ۱).

اثر سالیسیلیک‌اسید بر رشد ریشه‌های موین ترا ریخت

نتایج حاصل از مطالعه اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر رشد ریشه‌های موین نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید رشد ریشه‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. ریشه‌ها در بالاترین غلظت سالیسیلیک‌اسید (۱ میلی‌مولار) نه تنها از خود رشد نشان ندادند، بلکه احتمالاً به دلیل تخریب بافتی رنگ آنها تیره شده و اغلب از وزن تر کمتری نسبت به وزن اولیه خود برخوردار بودند (شکل ۲).



شکل ۲- اثر سالیسیلیک‌اسید بر تغییرات وزن تر ریشه‌های موین ترا ریخت (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است).

طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۳)؛ به طوری که در حضور ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، مقدار آتروپین این ریشه‌ها به ۰/۳۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید. بیشترین مقدار اسکوپولامین ریشه‌های ترا ریخت در تیمار ۰/۰۱ سالیسیلیک‌اسید مشاهده شد که ۰/۲۳ میلی‌گرم در گرم

اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر میزان کلروفیل a و b و آنتوسیانین گیاهچه‌ها

در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید مقدار کلروفیل a نسبت به شاهد در هر دو گروه افزایش معنی‌دار داشت، اما با افزایش سالیسیلیک‌اسید به ۰/۱ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری در مقدار کلروفیل مشاهده نشد. میزان کلروفیل a بین گیاهچه‌های واز و گرمستان نیز اختلاف معنی‌دار داشت و در گیاهان گرمستان در تمام سطوح سالیسیلیک‌اسید نسبت به گیاهان واز بیشتر بود. مقدار کلروفیل b در بین تیمارهای سالیسیلیک‌اسید اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما سطح آن مشابه کلروفیل a در گروه گرمستان بالاتر از واز بوده است. تیمارهای سالیسیلیک‌اسید اثر معنی‌داری بر مقدار آنتوسیانین کل

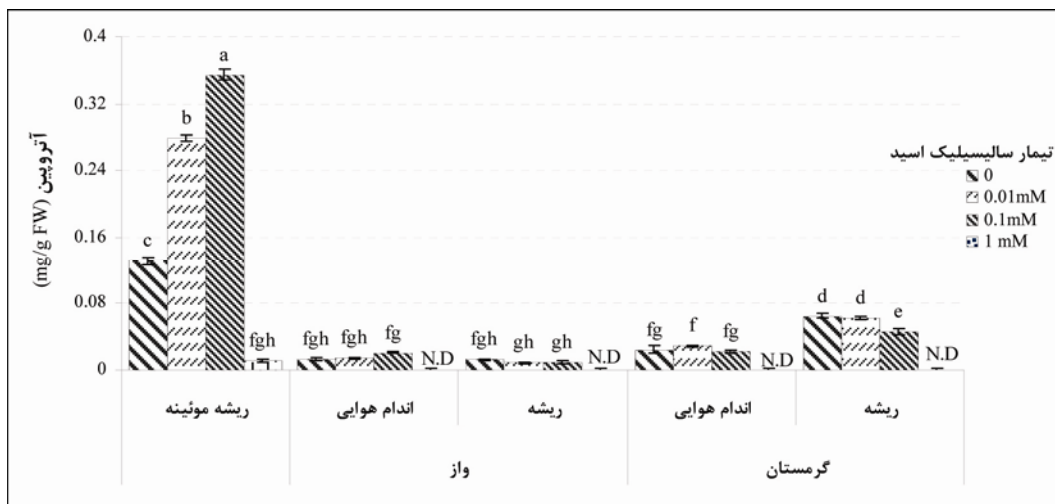
تولید آلکالوئید در ریشه‌های موین و اندام‌های گیاهچه‌ها

نتایج بررسی آتروپین و اسکوپولامین تولید شده تحت اثر تیمار سالیسیلیک‌اسید نشان داد که محتوای آتروپین ریشه‌های ترا ریخت با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید به

در بالاترین غلظت انتخابی سالیسیلیک‌اسید (۱ میلی‌مولار) به دلیل فقدان ریشه و عدم رشد مناسب گیاهچه‌ها امکان بررسی محتوای الکلونیدی وجود نداشت. به طور کلی، در حضور تیمارهای سالیسیلیک‌اسید، بیشترین مقدار آلکالوئیدها در ریشه‌های تراریخت و بعد از آن در ریشه‌های گیاهان جمعیت گرمستان مشاهده شد. مقدار آتروپین و اسکوپولامین موجود در ریشه‌های تراریخت به طور کاملاً معنی‌دار بیشتر از اندام‌های مختلف گیاهان بوده است که کمینه این اختلافات با گیاهچه‌های گرمستان و بیشینه آن با گیاهچه‌های واز بوده است. از طرفی، نتایج نشان داد که در ریشه‌های تراریخت مقدار آتروپین بیشتر از اسکوپولامین بوده، در حالی که در اندام‌های گیاهچه‌ها، سطح اسکوپولامین بالاتر از سطح آتروپین بوده است؛ اگر چه مقدار هر یک از این آلکالوئید به تنهایی در ریشه‌های موئین چند برابر بالاتر از گیاهچه‌ها بود (شکل‌های ۳ و ۴).

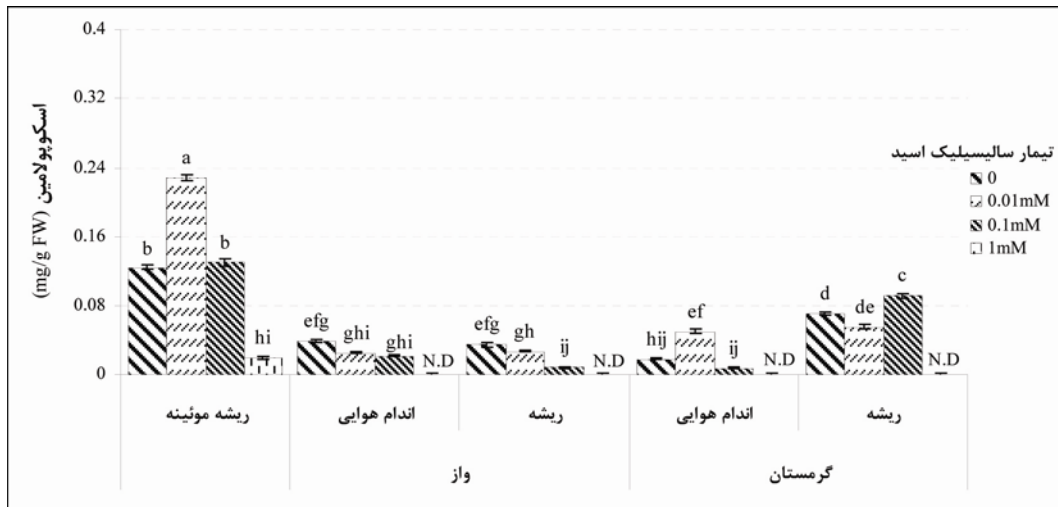
وزن تر بود و در تیمارهای بالاتر به شدت کاهش معنی‌دار نشان داد.

در اندام هوایی گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان و همچنین ریشه گیاهان واز اختلاف معنی‌داری در مقدار آتروپین تولید شده در تیمارهای مختلف سالیسیلیک‌اسید مشاهده نشد. بالاترین غلظت آتروپین در گیاهان، در ریشه‌های گیاهان گرمستان (۰/۰۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مشاهده شد که در این ریشه‌ها مقدار آتروپین در غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین مقدار اسکوپولامین در بین دو گروه گیاهی در ریشه گیاهان گرمستان مشاهده شد که ۰/۰۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. بخش‌های هوایی این گیاهان تنها در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری در میزان اسکوپولامین تولید شده نسبت به تیمار شاهد خود نشان دادند. در اندازه‌گیری مقدار اسکوپولامین تولید شده در اندام هوایی و ریشه‌های گیاهان واز نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

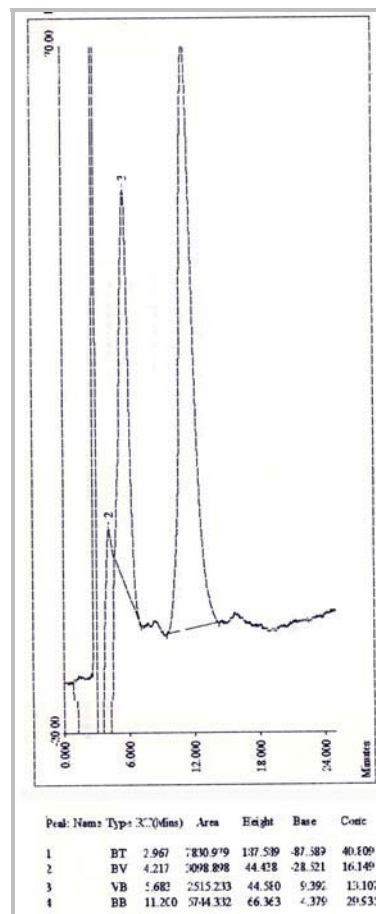


شکل ۳- تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید بر میزان آتروپین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و ریشه‌های موئین تراریخت

(حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است). N.D.: مقدار ناچیز.



شکل ۴- تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان اسکوپولامین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها و ریشه‌های مویین تراریخت (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است). N.D.: مقدار ناچیز.



شکل ۵- نمونه کروماتوگرام HPLC آتروپین و اسکوپولامین حاصل از ریشه‌های مویین تراریخت در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید (سطح زیر منحنی شماره ۳ مربوط به اسکوپولامین [RT = ۵/۵ ± ۵/۵ min] و شماره ۴ مربوط به آتروپین [RT = ۱۱/۵ ± ۵/۵ min] است).

بحث

تأثیر سالیسیلیک‌اسید بر رشد گیاهچه‌ها و ریشه‌های تراریخت

سالیسیلیک‌اسید به عنوان یک ملکول علامت‌رسانی در پاسخ‌های دفاعی گیاهان نقش دارد. استفاده از این اسید به عنوان محرک خارجی، بیان بسیاری از ژن‌های دفاعی، از جمله ژن‌های مسیر بیوسنتزی فیل پروپانوییدها را افزایش می‌دهد (Wen et al., 2005). در سال ۱۹۹۲، Manthe و همکاران گزارش دادند که رشد *Vicia faba* L. بعد از هفت روز تیمار با سالیسیلیک‌اسید حدود ۲۵ درصد کاهش می‌یابد. همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان داد، سالیسیلیک‌اسید تأثیر منفی بر رشد هر دو گروه گیاهچه‌ها و ریشه‌های موئینه شاییزک داشت. گزارش‌های مختلفی وجود دارد مبنی بر اینکه سالیسیلیک‌اسید، افزایش تولید فیتوالکسین‌ها را در کشت سلول، بافت و ریشه‌های موئینه باعث می‌شود (Lee et al., 2001 and Alvarez et al., 2000). سالیسیلیک‌اسید خارجی (در محیط) به عنوان یک سیگنال ملکول فعال‌کننده ژن‌های دفاعی است و همچنین به عنوان مهارکننده‌ای در بیوسنتز اتیلن است. بنابراین، سالیسیلیک‌اسید می‌تواند یا به طور مستقیم با مهار بیوسنتز اتیلن عمل کند و یا به طور غیر مستقیم با فعال کردن ژن‌های دفاعی منجر به القای تشکیل ترکیبات مختلف در گیاه گردد.

در ریشه‌های موئینه تراریخت نیز با توجه به اینکه تأثیر سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش رشد آنها در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و توقف رشد آنها در ۱ میلی‌مولار شد، می‌توان بیان کرد که در غلظت بالای این ترکیب، به علت ایجاد تنش و نیز آسیب شدید بافت ریشه موجب ممانعت رشد و کاهش متابولیسم سلول شده است. در سال ۲۰۰۴ نیز Kang

و همکاران گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید تأثیر منفی بر رشد ریشه‌های موئینه *Scopolia parviflora* دارد. کاربرد خارجی غلظت‌های پایین سالیسیلیک‌اسید موجب افزایش رشد ریشه‌های موئینه تراریخت گیاهانی مانند *Cataranthus roseus* شده است (Echevaria-Machado et al., 2007). اثر متفاوت غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید بر رشد ریشه‌های موئینه تراریخت می‌تواند به علت نقش آن در مسیر علامت‌رسانی سلولی باشد، زیرا سالیسیلیک‌اسید در غلظت پایین برای علامت‌رسانی سلول سودمند است، اما در غلظت بالا موجب اختلال در رشد می‌شود.

سنجش کلروفیل a و b و آنتوسیانین کل

در تحقیقی Moharekar و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که اضافه کردن سالیسیلیک‌اسید خارجی به محیط باعث کاهش نسبت کلروفیل a به b و افزایش کاروتنوئیدها در دانه‌رست‌های گندم و لویا می‌شود. سالیسیلیک‌اسید به عنوان یک ترکیب علامت‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاهان و تولید فیتوالکسین‌ها عمل می‌کند (Alvarez et al., 2000)، اما همان‌طور که در قسمت نتایج بیان شد، مقدار کلروفیل و آنتوسیانین کل در گیاهچه‌های جمعیت واز و گرمستان تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک‌اسید تفاوت چندانی را نشان نداد و حتی در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نسبت کلروفیل a به b در مقایسه با شاهد افزایش یافت. نتایج تحقیقی که توسط Šesták و Ullmann در سال ۱۹۶۰ انجام شد، نشان داد که حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه در محیط کشت بر مقدار آنتوسیانین و کلروفیل گیاهان گندم و جو تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش مقدار آنتوسیانین و افزایش کلروفیل

در تحقیق حاضر که بر مقایسه همزمان دو سیستم کشت گیاهچه نوپدید و ریشه‌های تراریخت متمرکز بود، ضمن تایید بالا بودن میزان تولید تروپان آلکالوئید در ریشه تراریخت شایبک، مشخص شد که در شرایط یکسان میزان تولید در ریشه‌های تراریخت نسبت به ریشه طبیعی یا اندام هوایی بسیار بالاتر است. برخلاف ریشه‌های مویین که در آنها مقدار آتروپین بیشتر از اسکوپولامین بوده، در گیاهان سطح اسکوپولامین بالاتر از سطح آتروپین است، اما با وجود این، باز هم مقدار این آلکالوئید در ریشه‌های مویین بالاتر بوده است.

در سال ۱۹۹۵، Mendoza و Vargas با آزمایش‌های خود نشان دادند که بین تولید اسکوپولامین و فعالیت فتوستتزی رابطه مستقیمی وجود دارد و در حقیقت، تولید اسکوپولامین با افزایش سطح کلروفیل (نسبت کلروفیل a به b) نسبت مستقیم دارد. از طرفی، احتمال می‌رود که فعالیت فتوستتزی، مرحله‌ای از سنتز اسکوپولامین را که به وسیله آنزیم هیوسیامین ۶-بتا هیدروکسیلاز کاتالیز می‌شود، تحریک نموده، یا سرعت تخریب اسکوپولامین را کاهش می‌دهد.

همچنین Palazon و همکاران در تحقیقی بر روی *Duboisia* در سال ۲۰۰۳، موفق به به‌دست آوردن لاین‌هایی از این گیاه شدند که تولید بالایی از اسکوپولامین را نشان داد. آنها پیشنهاد کردند که افزایش فعالیت هیوسیامین ۶-بتا هیدروکسیلاز در این گیاهان ممکن است به تبدیل بیشتر هیوسیامین به اسکوپولامین منجر شود و احتمال دارد هیوسیامین یک تنظیم‌کننده پس‌خوردی بر روی تجمع اسکوپولامین در گیاه داشته باشد که با افزایش آنزیم هیوسیامین ۶-بتا هیدروکسیلاز و با تولید اسکوپولامین این مهار پس‌خوردی نیز برداشته شود. در حقیقت بین فعالیت

می‌گردد. تأثیر 2,4-D در کشت بافت *Oxalis dispar* نیز مشابه این نتایج را نشان داد (Sunderland, 1966). بنابراین، در تحقیق حاضر نیز احتمالاً وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت (از جمله اکسین) اثر کاهشی سالیسیلیک‌اسید بر مقدار کلروفیل و همچنین اثر افزایشی آن بر آتوسیانین گیاه را از بین برده است.

مقایسه آلکالوئیدهای تولید شده در نمونه‌های مورد بررسی

همان‌طور که نتایج نشان داد با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید مقدار آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت افزایش می‌یابد، اما این افزایش رابطه خطی نداشت و در غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید مقدار آلکالوئیدها به شدت کاهش پیدا می‌کند. نتایج Lee و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ نشان داد که در غلظت بالای سالیسیلیک‌اسید با وجود کاهش شدید رشد ریشه‌های مویین *Atropa belladonna*، مقدار زیادی اسکوپولامین و هیوسیامین در محیط کشت آزاد می‌شود. این نتیجه بیانگر آن است که غلظت‌های بالای سالیسیلیک‌اسید، رشد ریشه‌ها را مختل می‌کند، اما فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوستتزی تروپان آلکالوئیدها همچنان ادامه دارد و این ترکیبات تولید و به محیط کشت ترشح می‌شوند. البته، این دانشمندان در غلظت‌های پائین سالیسیلیک‌اسید، تروپان آلکالوئیدها را در محیط کشت مشاهده نکردند. از طرفی، نتایج مطالعات Dhakulkar و همکاران در سال ۲۰۰۵ تولید میزان بالایی از متابولیت‌های ثانویه را در کشت ریشه‌های مویین *Datura innoxia* نسبت به کشت سلول، کالوس و گیاه نشان داد.

جمع‌بندی نهایی

استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها را سبب شد؛ به نحوی که بیشترین مقدار آتروپین در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار (۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در ریشه‌های موئین و بیشترین مقدار اسکوپولامین نیز در ریشه‌های موئین تراریخت در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار به مقدار ۰/۲۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر بوده است. در بین گیاهچه‌ها نیز، گیاهچه‌های گرمستان از نظر تولید آلکالوئیدها بهتر از گیاهان واز بودند که بیشترین آتروپین تولید شده مربوط به ریشه این گیاهان در غلظت‌های پایین و بیشترین اسکوپولامین تولید شده نیز در ریشه‌های گیاهان گرمستان در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد. این نتایج ممکن است نشان‌دهنده تثبیت ژنتیکی صفاتی باشد که هر یک از این دو جمعیت در محیط طبیعی خود کسب نموده‌اند. با وجود این محتوای آلکالوئیدی اندام‌های مختلف گیاهان قابل قیاس با محتوای آلکالوئیدی ریشه‌های موئین نیست. بنابراین، سالیسیلیک اسید می‌تواند به عنوان تیماری مناسب برای سیستم‌های کشت ریشه‌های موئین و استخراج آلکالوئیدهای مورد نظر از آنها استفاده گردد.

آنزیم یا آنزیم‌های مسؤول در تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین با محتوای هیوسیامین همبستگی وجود دارد (Dechaux et al., 2005; Palazon et al., 2003).

بررسی اکولوژیک دو منطقه واز و گرمستان از نظر رطوبت، بارندگی، بافت خاک، pH و عناصر موجود در خاک در مطالعات کریمی و همکاران (۱۳۸۳) نشان می‌دهد که این دو منطقه از نظر رطوبت، بارندگی و بافت خاک اندکی متفاوتند؛ به این صورت که از غرب به شرق رشته‌کوه‌های البرز از میزان بارندگی کاسته می‌شود و دمای محیط افزایش می‌یابد. بعضی از سازگاری‌هایی که این گیاهان با شرایط محیطی خود پیدا کردند، احتمال دارد به طور اکتسابی به نسل بعد منتقل شده باشد و در نسل‌های بعدی نیز ظاهر شود. در بررسی‌های ما نیز با وجود استفاده از کشت مشابه و شرایط یکسان، بروز این تفاوت‌ها در بذرها و جمعیت واز و گرمستان مشاهده شد، اما این که تفاوت‌ها تا چه زمانی باقی می‌مانند و چه زمانی این گیاهان نوپدید به شرایط یکسان محیط کشت بر می‌گردند، نامشخص است.

منابع

زمان، س. (۱۳۷۰) گیاهان دارویی با روش کشت، برداشت، داشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. انتشارات ققنوس، تهران.

کریمی، ف.، زینالی، ا.، امینی اشکوری، ط. و نظری، ف. (۱۳۸۳) بررسی اکولوژیک و تعیین درصد مواد مؤثره گیاهان واجد اولویت‌های دارویی - اقتصادی (گیاه شاییزک، *Atropa belladonna*). جهاد دانشگاهی، واحد شهید بهشتی، تهران.

احمدیان چاشمی، ن.، شریفی، م.، رهنما، ح. و کریمی، ف. (۱۳۸۶) بررسی تولید تروپان آلکالوئیدها از طریق کشت ریشه‌های تراریخته گیاه شاییزک (*Atropa belladonna*) با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* دومین همایش ملی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، کرمان، ایران.

زرگری، ع. (۱۳۷۵) گیاهان دارویی. جلد ۳. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

- belladonna* to salicylic acid stress. Journal of Bioscience and Bioengineering 91(6): 586-589.
- Lucio, D. R., Maria, E., Viana, C., Luiz, C., De Andrade, F., Marcello, B. and Giberto, B. (1997) Process for extraction and purification of alkaloid. United States Patent 5: 684-155.
- Manthe, B., Schulz, M. and Schnabl, H. (1992) Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L. evidence for salicylic acid metabolism. Journal of Chemical Ecology 18: 1525-1539.
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1991) Molecular cloning of hyoscyamine 6- β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Journal of Biological Chemistry 266(15): 9460-9464.
- Mendoza, M. I. E. and Vargas, L. V. M. (1995) Establishment and characterization of photosynthetic hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 197-208.
- Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S. and Comparini, I. (2001) Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. Fitoterapia 72: 644-648.
- Moharekar, S. T., Lokhande, S. D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A. and Chavan, P. D. (2003) Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. Photosynthetica 41(2): 315-317.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Palazon, J., Moyano, E., Cusidó, R. M., Bonfill, M., Oksman-Caldentey, K. M. and Piñol, M. (2003) Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the *h6h* gene. Plant Science 165: 1289-1295.
- Pinol, M. T., Palazon, J., Cusido, M. R. and Ribo, M. (1999) Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. Plant Science 141: 41-49.
- Rahman, L., Kitamura, Y., Yamaguchi, J., Mukai, M., Akiyama, K., Yamamoto, H., Muranaka, T. and Ikenaga, T. (2006) Exogenous plant H6H but not bacterial HCHL gene is expressed in *Duboisia leichhardtii* hairy roots and affects Alvarez, P. S., Spollansky, T. C. and Giulietti A. M. (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmensia candida*. Enzyme and Microbial Technology 26: 254-258.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.
- Dashek, W. V. (1997) Methods in plants biochemistry and molecular biology. 185-189. CRC Press, Boca Raton.
- Dechaux, C. and Boitel-Conti, M. (2005) A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. Acta biologica cracoviensia Series Botanica 47(1): 101-107.
- Dhakulkar, S., Bhargava, S., Ganapathi, T. R. and Bapat, V. A. (2005) Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. using *Agrobacterium rhizogenes*. Founder's Day Special Issue: 100-106.
- Echevarria-Machado, I., Escobedo-G. M., R. M. and Larque-Saavedra, A. (2007) Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. Plant Physiology and Biochemistry 45: 501-507.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1986) Hyoscyamine 6- β -hydroxylase, a 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures. Plant Physiology 81: 619-625.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1987) Purification and characterization of hyoscyamine 6- β -hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. European Journal of Biochemistry 164: 277-285.
- Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K. and Choi, M. S. (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science 166: 745-751.
- Krizek, D. T., Brita, S. J. and Miewcki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient level of solar UV-A and UV-B on growth of cv. New Red Fire lettuce. Plant Physiology 103: 1-7.
- Lee, K., Hirano, H., Yamakawa, T., Kodama, T., Igarashi, Y. and Shimomura, K. (2001) Responses of transformed root culture of *Atropa*

- (1999) Enantiomeric separation of atropine in Scopolia extract and Scopolia Rhizome by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A*. 848: 465-47.
- Wen, P., Chen, J., Kong, W., Pan, Q., Wan, S. and Huang, W. (2005) Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* 169: 928-934.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E. and Oksman caldentey, M. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus nigar* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101 (17): 6786-6791.
- tropane alkaloid production. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1183-1189.
- Roos, R. W. and Lau-Cam, C. (1986) General reversed-phase HPLC method for the separation of drugs using triethylamine as a competing base. *Journal of Chromatography* 370: 403-418.
- Šesták, Z. and Ullmann, J. (1960) Effect of gibberellic acid on the dynamics of chlorophyll synthesis in etiolated seedlings. *Biologia Plantarum* 2: 43-47.
- Sunderland, N. (1966) Pigmented plant tissues in culture. I. Auxins and pigmentation in chlorophyllous tissue. *Annals of Botany* 30: 253-268.
- Tahara, S., Okayama, A., Kitada, Y., Watanabe, T., Nakazawa, H., Kakehi, K. and Hisamatu, Y.

Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments

Najmeh Ahmadian Chashmi,^{1*} Mozafar Sharifi,² Farah Karimi and³ Hasan Rahnama

^{1*} Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University of Tehran, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

³ Agricultural Biotechnology Research Institute, Seed and Plant Improvement Institute, Tehran, Iran

Abstract

Most Solanaceae plants produce a range of biologically important alkaloids including nicotine and tropane alkaloids, such as hyoscyamine (atropine) and scopolamine. These alkaloids are used for their medicinal properties. *Atropa belladonna* is a medicinally important herbaceous plant that produces high amount of tropane alkaloids in roots. In this research, *Atropa belladonna* explants were obtained from sterilized seedlings in the modified Murashige and Skoog (MS) solid medium. The seeds were collected from Vaz and Garmestan regions of Mazandaran Province, Iran. Explants were cultured for four weeks on a modified MS solid medium, containing different concentrations of salicylic acid (0, 0.01, 0.1 and 1 mM). In addition, hairy roots of *Atropa belladonna* that was established by transformation with *Agrobacterium rhizogenes*, were cultured in MS medium for two weeks. Then the production of two tropane alkaloids, atropine and scopolamine, in different parts of neoformed plants were assayed by HPLC method. Generally, tropan alkaloids content in hairy roots was considerably higher compared to those contents in plants. Although Garmestan population was better than Vaz group, the amount of atropine in hairy roots was influenced by salicylic acid as high as 5 to 35 times of produced atropine in different parts of plants. The scopolamine content in the hairy roots was 2-30 times higher than in plant organs. In conclusion, it is suggested that, hairy root lines can be used as a replacement of plants in further studies and for tropane alkaloids production in economical and commercial scales.

Key words: Tropane alkaloids, Hairy roots, Salicylic acid, *Atropa belladonna*

* Corresponding Author: msharifi@modares.ac.ir

مشخصات کاربوتیپی گونه‌های جنس *Papaver* در رویشگاه‌های استان اردبیل

فرزانه عظیمی مطعم^{۱*}، ژیرایر کاراپنتیان^۲، غلامرضا بخشی خانیکی^۳، رضا طلایی^۱

^۱ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

^۳ دانشگاه پیام نور تهران، ایران

چکیده

پنج گونه از جنس *Papaver* L. متعلق به تیره Papaveraceae، به نام‌های *Papaver orientale* L.، *Papaver dubium* L.، *Papaver fugax* Poir. (با ۲ زیر گونه)، و *Papaver glaucum* Boiss. & Hausskn. و *Papaver gaubae* Cullen. & Rech. از رویشگاه‌های استان اردبیل جمع‌آوری شدند و از نظر صفات کاربوتیپی، از قبیل: طول بازوی بلند کروموزوم، طول بازوی کوتاه کروموزوم و طول ماهواره‌ها مطالعه شدند. بر اساس این اطلاعات، طول کل کروموزوم‌ها، نسبت طول بازوی بلند به کوتاه، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، اندیکس سانترومر، شکل کلی کاربوتیپ (TF/.)، طول ماهواره‌ها در صورت موجود بودن و مجموع طول کروموزوم‌ها برحسب میکرومتر محاسبه گردید. نتایج نشان داد که گونه‌های مورد مطالعه، دارای ۲ عدد پایه کروموزومی هستند که برای *Papaver gaubae* Cullen. & Rech. و *Papaver glaucum* Boiss. & Hausskn.، $x=4$ و برای سایر گونه‌ها $x=7$ تعیین گردید. عدد پایه کروموزومی $x=4$ اولین بار در این پژوهش گزارش می‌شود. گونه *Papaver fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. دارای کروموزوم B است. از نظر تکاملی *Papaver fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. نامتقارن‌ترین و متکامل‌ترین گونه تعیین گردید. دامنه طول کروموزوم‌ها در گونه‌های مورد بررسی بین $23/57 \pm 0/81$ و $7/53 \pm 0/64$ میکرومتر به دست آمد. تجزیه واریانس برای تمام صفات فوق در سطح ۱٪ نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها و صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها وجود دارد. در نتیجه، ویژگی‌های کاربوتیپی اختلاف بین گونه‌های مختلف را تأیید می‌کند. تجزیه خوشه‌بندی با تکیه بر این صفات، گونه‌ها را در ۴ گروه مجزا قرار داد.

واژه‌های کلیدی: اردبیل، تیره خشخاش، جنس خشخاش، کاربوتیپ، کروموزوم

مقدمه

جنس‌های این تیره به خود اختصاص داده است (قهرمان، ۱۳۷۲). گیاهان دارویی مهمی در این جنس وجود دارند که ارزش درمانی ارزنده آنها (آرام بخش، معرق،

جنس *Papaver* L. از خانواده Papaveraceae با بیش از ۴۰ گونه در ایران، بیشترین تنوع گونه‌ای را در بین

P. nudicaule L., *P. hybridum* L.,
P. pilosum Sibth. & Sm. *P. alpinum* L.
P. somniferum L.، *P. radicum* Rottb.
P. orientale L. و *P. rhoeas* L.، *P. dubium* L.
 نشان داد که بجز گونه‌های *P. somniferum* L. و
P. setigerum DC. که دارای عدد پایه کروموزومی $x=11$
 $(2n=2x=22)$ هستند، بقیه گونه‌ها، دارای عدد پایه
 کروموزومی $x=7$ هستند (Ljungdahl, 1922).
 برای گونه‌های *P. lateritium* Koch. و
P. bracteatum Lindl. و *P. orientale* L. عدد پایه
 کروموزومی $x=7$ و برای *P. somniferum* L. عدد پایه
 کروموزومی $x=11$ ارائه شده است (Yasui, 1991).
 برای گونه *P. rhoeas* L. عدد پایه کروموزومی $x=7$
 $(2n=2x=14)$ و $(2n=4x=28)$ گزارش شده است (Sugiura,
 1940).
 برای گونه‌های *P. rhoeas* L. و *P. commutatum*
 و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. و *Fische & Meyer*.
 توسط افراد مختلف، عدد پایه کروموزومی $x=7$ ارائه شده
 است (Löve and Löve, 1944; Sugiura 1937, 1940).
 مطالعات کاربیلوژیک بر روی گونه‌های
P. somniferum و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn.
 نشان داد که اولی دارای عدد پایه کروموزومی $x=7$ و
 دومی دارای عدد پایه کروموزومی $x=11$ هستند (Sugiura,
 1938).
 برخی معتقد بودند که *P. glaucum* Boiss. &
 Hausskn. و *P. gracile* Boiss. پروژنی‌تورهای
 (Progenitors) گونه *P. somniferum* L. هستند، چون که

خلط آور، مسکن، خواب آور، ملین و رفع کننده التهاب‌های
 پوستی) سبب گردیده که در مداوای بسیاری از بیماری‌ها
 (درمان بیماری قند، پایین آورنده فشارخون، صفرابر،
 تصفیه کننده قلب، ملین ملایم، رفع بی‌خوابی و ...) با اثر
 قاطع به کار روند. از بعضی از آنها، مواد مؤثره بسیار مهمی،
 مانند: تبائین، مورفین، کدئین و پاپاورین استخراج
 می‌گردند که در پزشکی اهمیت فراوان دارند. عده‌ای از
 گیاهان جنس *Papaver* L. زینتی هستند و به همین منظور
 پرورش داده می‌شوند (زرگری، ۱۳۷۱). در طی عملیات
 صحرایی مشاهده شد، که برخی از گونه‌های مرتعی جنس
 مذکور مانند: *P. orientale* L. (پس از خشک شدن)، به
 همراه یونجه و سایر علوفه‌ها، به منظور تغلیف دام استفاده
 می‌شوند (عظیمی، ۱۳۸۷).
 اندازه‌گیری دقیق نسبت بازوها و طول نسبت
 کروموزوم‌ها، محل قرار گرفتن سانترومرهای اولیه، ثانویه و
 ماهواره‌ها در کروموزوم‌های سلول‌های مرحله متافازی
 میتوزی مریستم نوک ریشه، می‌تواند در تعیین سطح
 پلوئیدی و شباهت‌های کروموزومی گونه‌ها، استفاده گردد
 (Sharma and Sharma, 1989).
 بر اساس مطالعات انجام شده، عدد پایه کروموزومی
 $x=7$ و $(2n=2x=14)$ و $(2n=4x=28)$ برای *P. rhoeas* L. عدد
 پایه کروموزومی $x=7$ و $(2n=3x=21)$ برای
P. orientale L. و عدد پایه کروموزومی $x=11$
 $(2n=2x=22)$ برای *P. somniferum* L. ارائه شده است
 (Tahara, 1915). نتایج مطالعات کاربوتیپی بر روی
 گونه‌های *P. lateritium*، *P. atlanticum* Bal Cos. و
P. tauricum Boiss.، *P. persicum* Lindl.، Koch.

و گونه‌های مورد نظر به ۵ گروه مجزا تفکیک شده‌اند (Lavania and Sangeeta, 1999).

هدف از چنین مطالعه‌ای، تعیین عدد پایه کروموزومی و بررسی صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها در گونه‌های جنس مورد نظر، در استان اردبیل، به منظور مقایسه گونه‌ها بر اساس صفات مذکور بود. شایان ذکر است که با توجه به فقدان پژوهش مشابه بر روی این گونه‌ها در داخل کشور، چنین مطالعه‌ای ضروری به نظر می‌رسید.

مواد و روش‌ها

با توجه به مطالعات انجام شده قبلی و منابع موجود در این زمینه، با مراجعه به محل‌های رویش گونه‌های مورد نظر در استان، نسبت به جمع‌آوری و شناسایی آنها اقدام گردید (جدول ۱). همچنین، به منظور مطالعات کاربوتیپی (میتوز) مقداری بذر از هر گونه نیز جمع‌آوری شد. برای مطالعات سیتوژنتیکی و کاربوتیپی، از مرحله میتوز در سلول‌های مریستم نوک ریشه استفاده شد. پس از آزمایش‌های متوالی، بهترین طول ریشه‌چه از ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر و بهترین زمان قطع ریشه‌چه و شروع پیش‌تیمار بین ساعت ۹ تا ۱۱ صبح تشخیص داده شد. در این پژوهش، از محلول کلشیسین ۰/۰۵ درصد جهت پیش‌تیمار و از محلول لویتسکی که مخلوطی از اسید کرومیک (۱٪) و فرمالدئید (۱۰٪) به نسبت ۱:۱ است، برای تثبیت مریستم‌ها استفاده شد (Agayev, 1996). هیدرولیز نمونه‌ها توسط هیدروکسید سدیم در دمای ۶۰°C انجام شد. برای رنگ‌آمیزی ریشه‌ها، محلول رنگی استو-آهن-هماتوکسیلین به آنها اضافه گردید. مدت نگهداری نمونه‌ها در رنگ، بین ۲۰-۱۶

P. glaucum Boiss. & Hausskn. دارای ۷ کروموزوم میوتیک (۴+۳) و *P. somniferum* L. دارای ۱۱ کروموزوم میوتیک (۴+۴+۳) بوده، از طرفی عدد پایه کروموزومی تیپه *Papaveraceae*، ۷ است (Tishchler, 1950). در بررسی گونه‌های *Papaver* L. ترکیه (۳۵ گونه) بر اساس نوع آلکالوئیدهای آنها، به عدد پایه کروموزومی ۷ برای چهارگونه: *P. orientale* L. ($2n=4x=28$)، *P. bracteatum* Lindl. ($2n=2x=14$ و $2n=6x=42$)، *P. pesudeo orientale* Goldblatt. و *lasiotrix* Fedde. (Sariyar, 2002) اشاره شده است.

بر اساس مطالعات آلکالوئیدی، مورفولوژیک و کروموزومی، تیره خشخاش را به دو بخش *Mecones* B. و *Ernh. Glauca* J. N. Ovak. تقسیم نمودند. بخش *Glauca* J. N. Ovak. شامل گونه‌هایی، مانند: *P. gracile* Boiss.، *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. و *P. decaisnei* H. Ochst. Et S. Teud. و بخش *Mecones* B. Ernh. فقط شامل گونه‌های *P. setigerum* DC. و *P. somniferum* L. است. آلکالوئیدهای مهمی چون مورفین و کدئین در گونه‌های بخش *Mecones* B. Ernh. بوده، این بخش دارای عدد پایه کروموزومی ۱۱ است. بخش *Glauca* J. N. Ovak. دارای روئیدن (Rhoibden) و با عدد پایه کروموزومی ۷ است (Preininger et al., 2008).

در مطالعه‌ای با عنوان توصیف کمی تنوع کاربوتیپی در *Papaver* برای تعیین تفاوت‌های فیلوژنتیکی و منشأ گونه‌ها، قرابت و دوری ۳۰ گونه از جنس مورد نظر با توجه به رده گونه‌ها که نشان‌دهنده تقارن و عدم تقارن است و صفات تاکسونومیکی و پراکنش جغرافیایی بررسی گردیده

ساعت در دمای 30°C متغیر بود. برای حذف دیواره سلولی و مشاهده بهتر کروموزوم‌ها، روی ریشه‌چه‌ها آنزیم سلولاز ۴٪ اضافه گردید. در مرحله آخر از سلول‌های متافازی مناسب عکس تهیه شد.

جدول ۱- موقعیت محل رویشی گونه‌های مورد مطالعه در استان اردبیل

ارتفاع از سطح دریا (متر)	محل جمع‌آوری	نام گونه گیاهی
۱۴۳۴	۳۰ کیلومتری اردبیل به طرف آستارا، جنگل فندق‌لو	<i>Papaver dubium</i> L.
۲۹۲۰	اردبیل، سرعین، نرسیده به پیست اسکی آلوارسی، منطقه گورگور	<i>Papaver orientale</i> L.
۲۵۰۰-۲۶۲۰	۴۵ کیلومتری اردبیل - خلخال، اطراف دریاچه نور	<i>Papaver fugax</i> Poir. var. <i>platydiscus</i> Cullen.
۹۵۳	جنوب خلخال، قزل‌اوزن	<i>Papaver gaubae</i> Cullen. & Rech.
۹۴۸	دشت مغان، قره‌آغاج	<i>Papaver glaucum</i> Boiss. & Hausskn.
۱۷۸۳	مشگین‌شهر، دامنه شمالی سیلان، آبگرم قینرجه	<i>Papaver fugax</i> Poir. var. <i>fugax</i> Cullen.

با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ، کروموزوم‌های همولوگ در کنار هم چیده شدند (شکل ۲) و سپس طول بازوی کوتاه و بازوی بلند کروموزوم‌ها توسط نرم‌افزار Micro measure اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۲- متغیرهای اندازه‌گیری شده با استفاده از نرم‌افزار Micro measure

طول کل هر کروموزوم (L)	طول بازوی بلند (Q)
نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه $R = (Q/P)$	اندیکس سانترومر (CI)
طول ماهواره‌ها	مجموع طول کروموزوم‌ها
طول بازوی کوتاه (P)	درصد شکل کلی کاربوتیپ (TF/%)

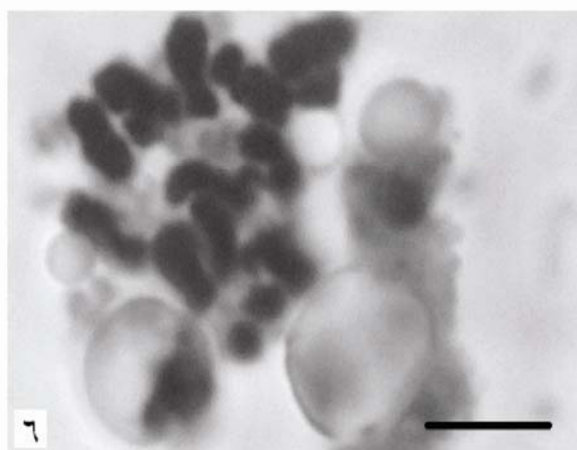
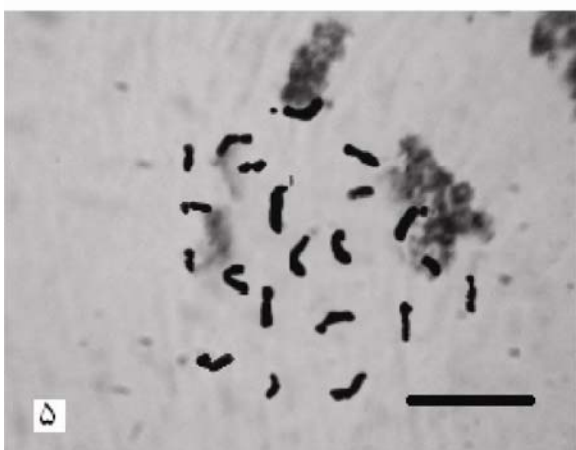
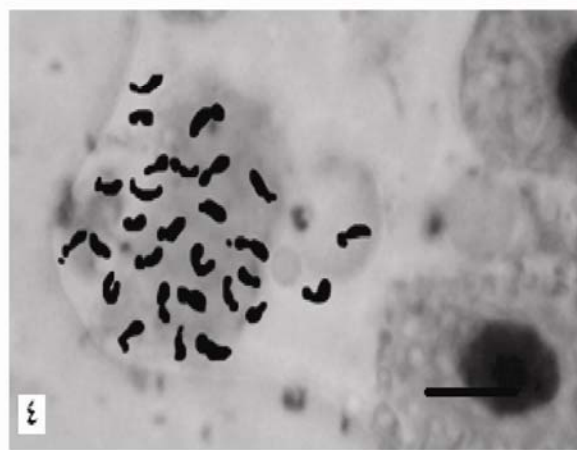
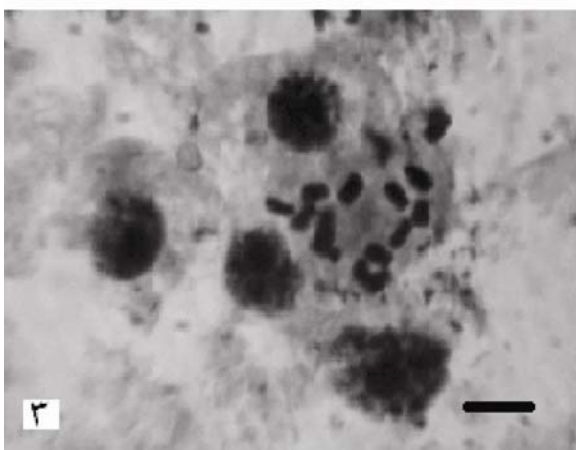
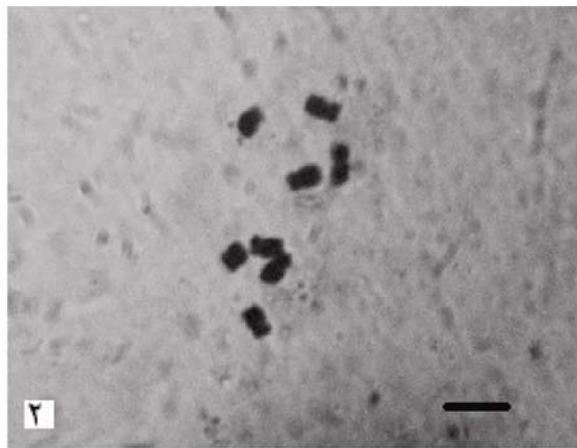
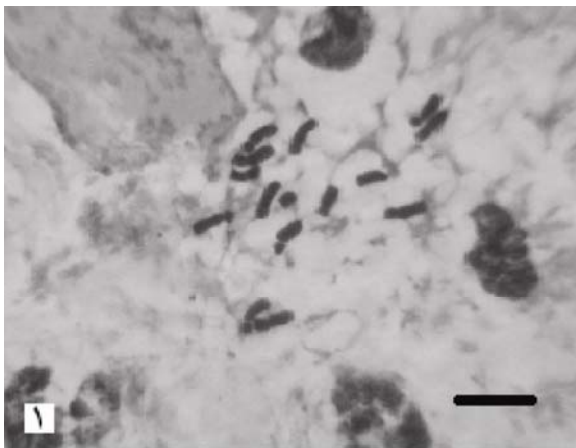
طریق مقایسه تقارن آنها انجام می‌گیرد (Lakshmi and Venkateswara, 1984). تجزیه و تحلیل داده‌های سیتوژنتیکی براساس تجزیه واریانس یک طرفه انجام گرفت، که در آن تنوع درون گروهی و بین گروهی محاسبه گردید (رضایی، ۱۳۷۴). گروه‌بندی گونه‌ها بر اساس صفات مورد مطالعه با استفاده از روش دندروگرام یا خوشه‌نگار Ward انجام گرفت.

بر اساس روش Levan و همکاران (۱۹۶۴)، فرمول کاربوتیپی گونه‌ها مشخص شد. از درصد شکل کلی کاربوتیپ، به عنوان شاخص دسته‌بندی کاربوتیپی، و از طول متوسط یک دسته کروموزوم هاپلوئید (X) نیز به منظور تعیین میزان تقارن کاربوتیپ استفاده شد (Huziwara, 1962). برای دسته‌بندی کاربوتیپ، از روش دو طرفه استینز استفاده شده است (Stebbins, 1950). در این روش، مقایسه کاربوتیپ‌ها بین گونه‌های یک جنس از

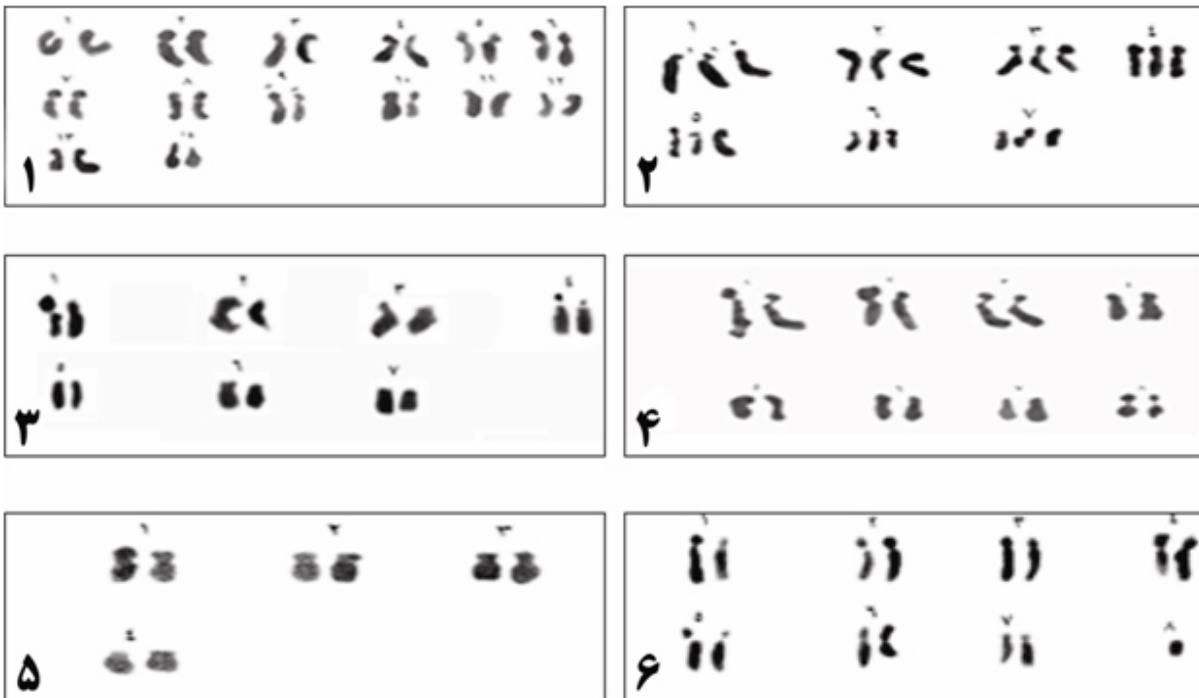
نتایج

پس از بررسی‌های کروموزومی گونه‌های مورد نظر، عدد پایه کروموزومی $x=4$ برای گونه‌های *P. glaucum* *P. gaubae* Cullen. و $(2n=2x=8)$ Boiss. & Hausskn. & Rech. و عدد پایه کروموزومی $x=7$ برای گونه‌های *P. dubium* L.، $(3n=3x=21)$ *P. orientale* L.، *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen.، $(2n=4x=28)$ *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. و $(2n=2x=14)$ *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. و $(2n=2x=14)$ تشخیص داده شد (شکل ۱). با مطالعه روی نمونه‌های متعدد از گونه *P. orientale* L. مشخص گردید که این گونه تری‌پلوئید بوده و با توجه به این که تقسیم میوز بررسی نشده است، نمی‌توان در مورد عقیم بودن یا نبودن این گونه، نظری داد. کاربوتیب گونه‌ها بر اساس اندازه و محل سانترومرها تهیه گردید (شکل ۲). بر روی کروموزوم شماره ۱ گونه *P. orientale* L. ماهواره‌ای به طول 0.24 ± 0.04 میکرومتر، بر روی کروموزوم شماره ۹ گونه *P. dubium* L. ماهواره‌ای به طول 0.24 ± 0.04

میکرومتر و بر روی کروموزوم شماره ۵ گونه *P. fugax* *P. gaubae* Cullen. var. *fugax* Poir. ماهواره‌ای به طول 0.19 ± 0.02 میکرومتر مشاهده شد (جدول ۱). در گونه‌های *P. gaubae* و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn.، Cullen. & Rech. *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. مشاهده نشد (شکل ۲). در بین گونه‌ها، فقط گونه *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. دارای کروموزوم B بود. گونه‌های مورد مطالعه از نظر تمامی صفات کاربوتیبی با هم کاملاً اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ داشتند (جدول ۵). محاسبه تقارن کاربوتیبی گونه‌ها بر اساس فرمول Stebbins (۱۹۵۸) و سایر فاکتورهای سنجش تقارن انجام شد. نتایج نشان داد که متقارن‌ترین گونه‌ها *P. dubium* L.، *P. orientale* L. و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. و نامتقارن‌ترین گونه *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. هستند (جدول ۳). در جدول ۳ و ۴ تمامی فاکتورهای کاربوتیبی مورد مطالعه نشان داده شده است.



شکل ۱- کروموزوم‌های متافازی گونه‌های مورد مطالعه: ۱- *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. ۲- *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. ۳- *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. ۴- *P. dubium* L. ۵- *P. orientale* L. و ۶- *P. gaubae* Cullen. & Rech. طول خطوط مقیاس در تمام تصاویر برابر ۱/۵ میکرومتر است.



شکل ۲- کاربوتیپ گونه‌های مورد مطالعه: ۱- *P. dubium* L.، ۲- *P. orientale* L.، ۳- *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen.، ۴- *P. gaubae* Cullen. & Rech.، ۵- *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. و ۶- *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen.

جدول ۳- خلاصه‌ای از خصوصیات کروموزومی گونه‌های مورد مطالعه

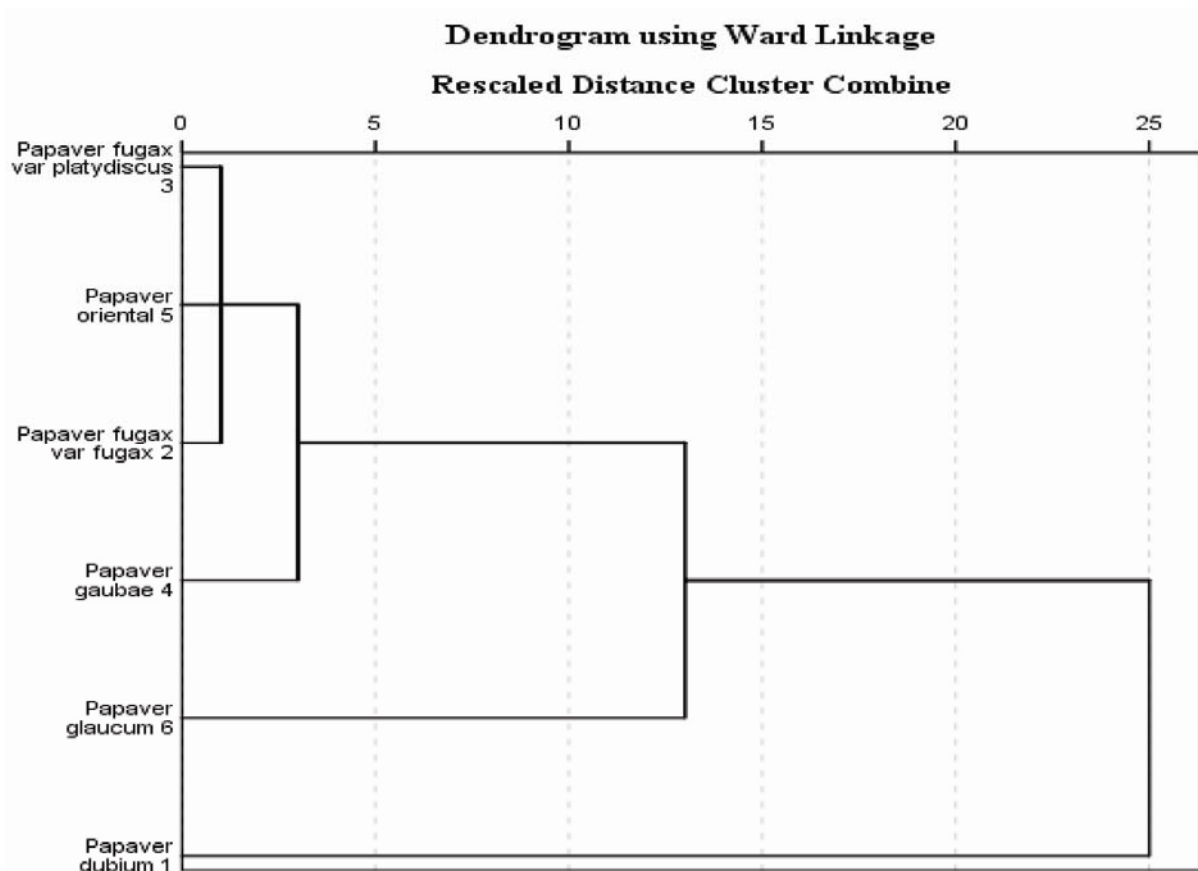
نام گونه	مجموع طول کل کروموزوم‌ها (μm)	مجموع طول کل بازوهای بلند (μm)	مجموع طول کل بازوهای کوتاه (μm)	نسبت کل بازوی بلند به کوتاه	مجموع شاخص سانترومری (μm)	بلندترین کروموزوم در هر متافاز (μm)	کوتاهترین کروموزوم در هر متافاز (μm)	عدد پایه کروموزومی	طول ماهواره (μm)
<i>Papaver dubium</i> L.	۲۳/۵۷±۰/۸۱۱	۱۶/۴۳±۱/۰۱۷	۷/۱۴±۰/۲۰۴	۳۳/۲۷±۳/۱۹۴	۴/۲۹±۰/۲۷۰	۲/۲۵±۰/۹۵۵	۱/۲۳±۰/۵۹۴	۷	۰/۲۴±۰/۰۴
<i>Papaver orientale</i> L.	۱۰/۶۴±۰/۹۰۷	۷/۳۱±۰/۷۵۳	۳/۲۵±۰/۱۹۸	۱۶/۶۳±۱/۵۷۲	۲/۲۰±۰/۱۳۵	۱/۹۶±۰/۲۶۳	۱/۰۶±۰/۰۹۱	۷	۰/۲۴±۰/۰۴
<i>Papaver fugax</i> Poir. var. <i>platydiscus</i> Cullen.	۷/۵۴±۰/۶۴۷	۵/۴۹±۰/۵۲۵	۲/۰۴±۰/۲۳۵	۱۵/۱۹±۲/۰۳۴	۱/۷۵±۰/۱۰۳	۱/۴۲±۰/۱۴۵	۰/۷۹±۰/۰۸۲	۷	-
<i>Papaver gaubae</i> Cullen. & Rech.	۱۵/۹۸±۱/۰۴۶	۱۱/۲۸±۰/۸۸۹	۴/۶۹±۰/۲۵۶	۱۹/۵۷±۱/۱۱۲	۲/۴۴±۰/۸۱۱	۳/۱۰±۰/۳۴۳	۱/۴۲±۰/۰۶۸	۴	-
<i>Papaver glaucum</i> Boiss. & Hausskn.	۸/۲۰±۱/۱۱۹	۵/۶۲±۰/۵۷۵	۳/۳۴±۱/۴۳۶	۹/۵۴±۱/۹۷۷	۱/۲۳±۰/۱۵۸	۲/۳۹±۰/۳۱۶	۰/۸۱±۰/۰۹۳	۴	-
<i>Papaver fugax</i> Poir. var. <i>fugax</i> Cullen.	۱۰/۵۸±۰/۸۴۷	۷/۷۸±۰/۷۷۸	۲/۸۰±۰/۲۳۱	۲۰/۴۵±۲/۴۹۰	۱/۸۷±۰/۱۷۰	۱/۶۶±۰/۹۳۹	۱/۱۵±۰/۱۳۷	۷	۰/۱۹±۰/۰۲

جدول ۴- آمارهای سنجش تقارن کاریوتیپی

نام گونه	فرمول کاریوتیپی	طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (μm)	طول کل یک دسته کروموزوم هاپلوئید (μm)	درصد شکل کلی کاریوتیپ (μm)	اختلاف مجموع طول کل دو بازو (μm)	کلاس گونه بر اساس روش استینیز
<i>Papaver dubium</i> L.	۱m+۱۳Sm	۱۱/۳۲±۰/۹۱۰	۳/۳۶±۰/۱۲۲	۳۰/۳۶±۱/۸۸۶	۹/۲۸±۱/۸۹۴	۲A
<i>Papaver orientale</i> L.	۲m+۴Sm+۱St	۱۰/۰۸±۰/۵۳۵	۱/۵۲±۰/۱۹۲	۳۰/۶۶±۲/۰۸۸	۴/۱۲±۰/۷۷۰	۲A
<i>Papaver fugax</i> Poir. var. <i>platydiscus</i> Cullen.	۲m+۴Sm+۱T	۸/۲۴±۰/۲۱۰	۱/۰۷±۰/۹۳۹	۲۷/۱۲±۲/۲۳۸	۳/۴۵±۰/۴۸۷	۳A
<i>Papaver gaubae</i> Cullen. & Rech.	۲m+۵Sm+۱St	۱۲/۳۷±۱/۷۵۹	۳/۹۹±۰/۵۴۲	۲۹/۴۳±۱/۳۴۷	۶/۵۸±۰/۷۸۵	۲B
<i>Papaver glaucum</i> Boiss. & Hausskn.	۳Sm+۱St	۱۰/۰۹±۰/۱۶۴	۲/۰۴±۰/۲۸۱	۴۱/۰۰±۱۸/۸۷۸	۲/۸۳±۰/۱۰۰	۲A
<i>Papaver fugax</i> Poir. var. <i>fugax</i> Cullen.	۳Sm+۴St+۱B	۱۰/۸۶±۰/۵۹۵	۱/۵۱±۰/۱۱۹	۲۶/۵۳±۲/۳۱۳	۴/۹۸±۰/۷۷۵	۲B

جدول ۵- نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه پیرامون صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها

سطح معنی داری (Sig)	میانگین مربعات		F	صفات
	درون گروه‌ها (df=۲۳)	بین گروه‌ها (df=۶)		
۰/۰۰۰	۰/۸۵	۱۵۳/۸۳	۱۸۰/۹۴۹**	مجموع طول کل کروموزوم‌ها
۰/۰۰۰	۰/۶۲	۷۳/۷۳	۱۱۷/۷۳۷**	مجموع طول کل بازوی بلند
۰/۰۰۰	۰/۰۹	۱۵/۰۰	۱۶۵/۱۹۴**	مجموع طول کل بازوی کوتاه
۰/۰۰۰	۴/۴۳	۲۶۴/۸۶	۵۹/۷۵۱**	مجموع کل نسبت بازوی بلند به کوتاه
۰/۰۰۰	۰/۰۲	۴/۶۹	۱۸۴/۲۷۵**	مجموع کل اندیکس سانترومر
۰/۰۰۰	۰/۰۵	۱/۴۷	۲۶/۳۱۹**	بلندترین کروموزوم در هر متافاز
۰/۰۰۰	۰/۰۰۷	۰/۱۹۰	۲۵/۷۰۴**	کوتاه‌ترین کروموزوم در هر متافاز
۰/۰۰۰	۰/۶۵	۲۴/۹۲	۳۸/۳۶۴**	طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم
۰/۰۰۰	۰/۰۳	۰/۵۶	۱۵/۷۲۶**	میانگین طول
۰/۰۰۰	۴/۳۶	۳۴۹/۲۲	۸۰/۰۷۱**	شکل کلی کاریوتیپ
۰/۰۰۰	۰/۶۱	۲۳/۷۴	۳۸/۵۰۸**	اختلاف مجموع طول کل دو بازو



شکل ۳- دندروگرام گونه‌های جنس خشخاش بر اساس صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها به روش آنالیز خوشه‌ای Ward

نتیجه‌گیری و بحث

نتایج نشان می‌دهد که گونه‌های مطالعه شده از نظر عدد پایه کروموزومی در دو دسته قرار می‌گیرند. گونه‌های *P. gaubae* و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. با Cullen. & Rech. با عدد پایه کروموزومی $x=4$ با سایر گونه‌ها که دارای عدد پایه کروموزومی $x=7$ هستند، قابل تفکیک‌اند. با توجه به این که فقدان پایه کروموزومی $x=4$ تا به حال در تیره *Papaveraceae* گزارش نشده بود، برای اطمینان حاصل کردن از این نتیجه، نمونه‌های متافازی بیشتری از این دو گونه بررسی گردید، که در همه آنها وجود چنین عدد پایه‌ای مشخص گردید. عدد پایه

کروموزومی $x=7$ برای *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. در مطالعات قبلی انجام شده گزارش شده است (Sugiura, 1937; Tischler, 1950; Löve & Löve, 1994).

پژوهش حاضر نشان داد که گونه *P. dubium* L. دارای عدد پایه کروموزومی $x=7$ و عدد کروموزومی سوماتیک $2n=4x=28$ است، که با نتایج مطالعات قبلی (Ljungdahl, 1922) انجام گرفته، کاملاً مطابقت دارد. برای *P. orientale* L. نیز عدد پایه کروموزومی $x=7$ گزارش شده است (Tahara, 1915; Ljungdahl, 1922; Yasui, 1991; Sariyar, 2002). در طی بررسی کاربوتیبی گونه اخیر مشاهده شد که این گونه تری‌پلوئید ($3n=3x=21$)

Cullen. بود. کروموزوم نوع تلوسانتریک با ۱۴ درصد، فقط در گونه *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. مشاهده شد.

بیشترین اختلاف در طول دو بازو مربوط به جفت کروموزوم شماره یک متعلق به گونه *P. dubium* L. با $9/28 \pm 1/89$ و کمترین اختلاف مربوط به جفت کروموزوم شماره شش گونه *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. با $2/83 \pm 0/10$ میکرومتر اختلاف است.

بیشترین میزان طول متوسط یک دسته کروموزوم هاپلوئید (X) مربوط به گونه *P. gaubae* Cullen. & Rech. با $3/99 \pm 0/542$ میکرومتر و کمترین آن متعلق به گونه *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. با میانگین $1/07 \pm 0/93$ میکرومتر بود. این نشان می‌دهد که این گونه نامتقارن‌ترین و در نتیجه تکامل‌یافته‌ترین گونه است. بررسی وضعیت تکاملی گونه‌های مختلف بر اساس جدول دو طرفه استیبنز (Stebbins, 1950) نیز نشان می‌دهد که گونه‌های مورد نظر در سه کلاس مختلف قرار می‌گیرند. *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. با قرار گرفتن در کلاس ۳A، در بین گونه‌های مطالعه شده نامتقارن‌ترین و تکامل‌یافته‌ترین گونه است و گونه‌های *P. gaubae* Cullen. & Rech. *P. dubium* L. و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. با قرار گرفتن در کلاس ۲A متقارن‌ترین کاریوتیپ را داشتند و از نظر تکاملی کمتر تکامل یافته هستند. گونه‌های *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. و *P. orientale* L. در کلاس ۲B قرار گرفتند که از نظر تکاملی بین دو رده ۳A و ۲A قرار دارند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش تقارن کاریوتیپ‌ها، مقدار میانگین طول کروموزوم، افزایش

است و این مسأله نیز قبلاً گزارش گردیده است (Tahara, 1915). عدد پایه کروموزومی $x=7$ برای دو زیر گونه *Pappaver fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. و *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. نیز به دست آمد. این عدد پایه قبلاً نیز برای گونه *P. fugax* Poir. گزارش شده است (Lavania and (Srivastava, 1999).

نتایج حاکی از آن است که بیشترین مقدار طول کل کروموزوم متعلق به گونه *P. dubium* L. با $23/57 \pm 0/81$ میکرومتر و کمترین آن مربوط به گونه *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. با $7/53 \pm 0/64$ میکرومتر است. با توجه به نسبت طول بازوی بلند به کوتاه و اختلاف طول دو بازوی بلند و کوتاه کروموزومی، و بر اساس روش Levan و همکاران (۱۹۶۴) فرمول کاریوتیپی گونه‌ها تعیین گردید. چهار نوع کروموزوم شامل متاسانتریک، ساب متاسانتریک، ساب تلوسانتریک و تلوسانتریک در گونه‌های مورد بررسی دیده شد. بیشترین فراوانی کروموزوم نوع ساب متاسانتریک با $92/8$ درصد متعلق به گونه *P. dubium* L. و کمترین آن با $42/8$ درصد مربوط به گونه *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. به همین ترتیب، بیشترین فراوانی کروموزوم نوع متاسانتریک با $28/5$ درصد متعلق به دو گونه *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. و *P. orientale* L. و کمترین آن با صفر درصد مربوط به گونه‌های *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. بود. بیشترین فراوانی کروموزوم نوع ساب تلوسانتریک با $57/2$ درصد متعلق به گونه *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. و کمترین آن با صفر درصد مربوط به گونه‌های *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* و *P. dubium* L.

گروه چهارم: *P. dubium* L.

مطالعه ارتباط گونه‌های جنس *Papaver* L. بر اساس توالی DNA نشان داده که سه گونه *P. orientale* L.، *P. dubium* L. و *P. glaucum* Boiss. & Hausskn. در سه گروه مجزا قرار می‌گیرند (James et al., 2006). در مطالعه‌ای که با عنوان توصیف کمی تنوع کاربوتیپی *Papaver* L. جهت تعیین تفاوت‌های فیلوژنتیکی و منشأ گونه‌ها صورت گرفته است (Lavania and Sangeeta, 1999)، قرابت و دوری ۳۰ گونه از جنس مورد نظر با توجه به تقارن و عدم تقارن گونه‌ای، صفات تاکسونومیکی و همچنین پراکنش جغرافیایی مورد بررسی شده و گونه‌های مورد نظر به پنج گروه مجزا تفکیک شده‌اند. در این گروه‌بندی، گونه *P. fugax* Poir. در یک گروه و گونه‌های *P. glaucum* Boiss. & *P. orientale* L. و *P. dubium* L. در گروه دیگری قرار گرفتند. مقایسه نتایج نشان داد که گروه‌بندی با استفاده از صفات کاربوتیپی در منطقه با نتایج گروه‌بندی بر اساس توالی DNA کاملاً مشابه بوده، اما با نتایج گروه‌بندی بر اساس ترکیب صفات کاربوتیپی، تاکسونومیکی و موقعیت جغرافیایی تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم مهندس ژیلای بالایی، محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی که در انجام این تحقیق از همراهیشان بهره بسیار برده‌ام، صمیمانه تشکر می‌کنم.

می‌یابد و گونه‌ها هرچه به طرف نامتقارن بودن پیش می‌روند، از میزان طول متوسط کروموزوم کاسته می‌شود. در نتیجه، در روند تکامل کاربوتیپی و تغییر از متقارن به نامتقارن در اندازه کروموزوم کاهش روی می‌دهد. با بررسی‌هایی که بر روی سویه‌های مختلف دو گونه شبلیله انجام شده (Lakshmi and Venkateswara, 1984) و بررسی سیتوژنتیکی بر روی ۸ گونه از شبلیله (ریاست، ۱۳۸۰) نشان داده است که مسیر تکاملی از کروموزوم‌های بلند به کوتاه و از کاربوتیپ‌های متقارن به نامتقارن است.

نتایج تجزیه واریانس برای تمام صفات فوق نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گونه‌ها از لحاظ صفات مورفولوژیک در سطح زیر ۱٪ وجود دارد. در نتیجه، صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها اختلاف بین گونه‌های مختلف را تأیید می‌کنند.

باید توجه داشت که نوع پارامترهای استفاده شده در کلاسترینگ، تعیین‌کننده نتایج آن است. در پژوهش حاضر، هدف گروه‌بندی گونه‌های مورد مطالعه فقط بر اساس صفات کاربوتیپی بوده است.

نتایج تجزیه خوشه‌ای Ward بر اساس صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها (شکل شماره ۴) در گونه‌های مورد بررسی نشان داد که این گونه‌ها بر مبنای این صفات و در فاصله بین ۵-۳ دندروگرام به چهار گروه اصلی تقسیم می‌شوند که عبارتند از:

گروه اول: *P. orientale* L.، *P. fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. و *P. fugax* Poir. var. *fugax* Cullen.

گروه دوم: *P. gaubae* Cullen. & Rech.

گروه سوم: *P. glaucum* Boiss. & Hausskn.

منابع

- رضائی، ع. (۱۳۷۴) مفاهیم آمار و احتمالات. نشر مشهد، مشهد.
- ریاست، م. (۱۳۸۰) مطالعه سیتوژنتیک برخی از گونه‌های شنبلیله (*Trigonella*) در ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه، ایران.
- زرگری، ع. (۱۳۷۱) گیاهان دارویی جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.
- chromosome numbers of Juncaceae. *Arkiv Botany* 1: 1-6.
- Preininger, V., Novak, J. and Santavy, F. (2008) Isolation and chemistry of the alkaloids from plants of *Papaver aceae*, Lxxxii *Glauc-a* a new Section of Genus *Papaver*. *Plant medicine* 41(2):119-23
- Sariyar, G. (2002) Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species. *Pure and Applied Chemistry* 74: 557-574.
- Sharma, A. K., and Sharma, A. (1972) *Chromosome Techniques Theory and Practice*. Butterworth Baltimore, University Park, London.
- Stebbins, G. L. (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Sugiura, T. (1937) Studies on the chromosome numbers in higher plants *cytologia*, Fujii Jub 2: 845-849.
- Sugiura, T. (1940) Chromosome studies on *Papaveraceae* with special reference to the phylogeny. *Cytologia* 10: 558-576.
- Sugiura, T. (1938) A list of chromosome numbers in angiospermous plants V. *Proceedings of the Imperial Academy, Tokyo* 10: 391-392.
- Tahara, M. (1915) The chromosomes of *Papaver* (Japanes). *Botany Magazine Tokyo* 29: 254-257.
- Tischler, G. (1950) Die chromosomenzahlen der Gefäßpflanzen Mitteleuropas. W. Junk. Gravenhage.
- Agayev, Y. M. (1996) Advanced squash method for investigation of plant chromosomes. Fourth Iranian congress in crop production and breeding sciences. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- Huziwara, Y. (1962) Karyotype analysis in some genera of compositae VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* 49:116-119.
- James, C., Ingrid, L., Mark, W., Joachim, W. and Trevor, R. (2006) Phylogenetics of *Papaver* and related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid *trnL* intron and *trnL-F* intergenic spacers. *Annals of Botany* 98: 141-155.
- Lakshmi, N., Rao, T. and Venkateswara, R. (1984) Karyological and morphological investigations on some inbred strains of *Trigonella*. *Genetica-Iberica* 36: 187-200.
- Lavana, U. C. and Srivastava, S. (1999) Quantitative delineation of karyotype variation in *Papaver* as a measure of phylogenetic differentiation and origin. *Current Science* 77: 429-435.
- Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas* 52:201-220.
- Ljungdahl, H. (1922) Zur Zytologie der Gattung *Papaver*. *Vor Lauffie Mitterilung Svensk Botany* 1: 103-114.
- Löve, A. and Löve, D. (1944) Cytotaxonomical studies on boreal plants. II. Some notes on the

Yasui, K. (1991) Cytogenetic studies in artificially raised interspecific hybrids of *Papaver* VII *P. somniferum* L. × *P. bracteatum* Lindl. *Cytologia* 8: 331-342.

Karyotypic characteristics of several *Papaver* species in Ardabil province

^{1*} Farzaneh Azimi Motem, ² Jirair Carapetian, ³ Gholamreza Bakhshi Khaniki and ¹Reza Talai

^{1*} Research Center Agriculture and Natural Source, Ardabil province, Iran

² Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, West Azarbaijan, Iran

³ Department of Biology, Faculty of Science, Payamenur University, Tehran, Iran

Abstract

Five species of *Papaver* L. genus, belonging to the Papaveraceae family, namely *Papaver dubium* L., *Papaver orientale* L., *Papaver fugax* Poir. (with two subspecies), *Papaver glaucum* Boiss & Hausskn. and *Papaver gaubae* Cullen. & Rech. were collected from rangelands across Ardabil province. Several karyotypic characteristics such as long arm, short arm and satellite length were studied then, total length of the chromosomes, long arm to short arm and others characteristics were estimated. Result showed that, there were two types of basic chromosome numbers, $x=4$ and $x=7$. This is the first record of basic chromosome numbers of $x=4$ observed on *Papaver glaucum* Boiss & Hausskn. and *Papaver gaubae* Cullen. & Rech.. The species *Papaver fugax* Poir. var. *fugax* Cullen. contained B-chromosome. From evolution point of view, *Papaver fugax* Poir. var. *platydiscus* Cullen. was considered as the most asymmetric and thus the most evolved species. The range of total chromosome length was 23.57 ± 0.81 to 7.53 ± 0.64 μm . Analysis of variance showed highly significant differences between the studied species for all of the traits at ($\alpha=0.01$). Based on these characteristics, cluster analysis classified the species in four distinct groups.

Key word: Ardabil, Papaveraceae, *Papaver*, Karyotype, Chromosome

فرم اشتراک مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران

نام و نام خانوادگی:

سمت: با ارسال فیش بانکی به مبلغ ۸۰۰۰۰ ریال (هزینه پست و اشتراک) به حساب شماره ۲۳۸۰۰۲۴۰۲۱۷۷۲۴ بانک ملی، شناسه پرداخت ۱۱۰۲۲۷، شعبه دانشگاه اصفهان، به نام درآمدهای اختصاصی دانشگاه اصفهان، متقاضی اشتراک یک ساله (چهار شماره) مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران می‌باشم. لطفاً مجله را از شماره به نشانی زیر ارسال نمایید.
نشانی:

.....

کد پستی: تلفن:

فیش بانکی به شماره (.....) ضمیمه است. تاریخ: امضاء

نشانی: اصفهان - دانشگاه اصفهان - معاونت تحقیقات و فناوری - دفتر مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران - امور مشترکین

✂ -----

فرم اشتراک مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران

نام و نام خانوادگی:

سمت: با ارسال فیش بانکی به مبلغ ۸۰۰۰۰ ریال (هزینه پست و اشتراک) به حساب شماره ۲۳۸۰۰۲۴۰۲۱۷۷۲۴ بانک ملی، شناسه پرداخت ۱۱۰۲۲۷، شعبه دانشگاه اصفهان، به نام درآمدهای اختصاصی دانشگاه اصفهان، متقاضی اشتراک یک ساله (چهار شماره) مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران می‌باشم. لطفاً مجله را از شماره به نشانی زیر ارسال نمایید.
نشانی:

.....

کد پستی: تلفن:

فیش بانکی به شماره (.....) ضمیمه است. تاریخ: امضاء

نشانی: اصفهان - دانشگاه اصفهان - معاونت تحقیقات و فناوری - دفتر مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران - امور مشترکین

Iranian Journal of Plant Biology
2nd Year, No. 1, Sequence 3, Spring 2010
ISSN: 2008-8246

Content

- | | |
|---|------------------|
| <p>■ Micropropagation of <i>Capsicum annuum</i> L. <i>in vitro</i>
Mahmoud Otroshy, Kosar Moradi and Mojtaba Khayam Nekouei</p> | <p>12</p> |
| <p>■ Isolation and cloning of cDNA manganese peroxidase gene (<i>mnp</i>) from white button Mushroom (<i>Agaricus bisporus</i>), introduction to genetic manipulation
Javad Hassan Janpoor and Mohammad Farsi</p> | <p>24</p> |
| <p>■ Biochemical changes in terpenoid compounds of <i>Mentha spicata</i> essential oils in response to excess zinc supply
Saeid Zare Dehabadi, Zahra Asrar and Mitra Mehrabani</p> | <p>34</p> |
| <p>■ Effect of zinc and auxin foliar application on some anti-oxidant enzymes activity in corn leaf
Behnam Zand, Ali Soroosh zadeh, Faezeh Ghanati and Foad Moradi</p> | <p>48</p> |
| <p>■ Extraction and characterization of tyrosinase from peanut grown in north of Iran
Masoumeh Faridi, Reyhaneh Sariri, Vahab Jafarian and Habiolah Nazem</p> | <p>62</p> |
| <p>■ Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of <i>Atropa belladonna</i> L. by salicylic acid treatments
Najmeh Ahmadian Chashmi, Mozafar Sharifi, Farah Karimi and Hasan Rahnama</p> | <p>76</p> |
| <p>■ Karyotypic characteristics of several <i>Papaver</i> species in Ardabil province
Farzaneh Azimi Motem, Jirair Carapetian, Gholamreza Bakhshi Khaniki and Reza Talai</p> | <p>89</p> |

Referees committee (2nd Year, No. 1, Sequence 3, Spring 2010)

We express our deep gratitude to the following faculty members of the universities and of educational-research Institutes who have cooperated in evaluation and assessment of the articles of this issue of Iranian Journal of Plant Biology (IJPB):

Dr. Gholam Reza Asghari
Isfahan University of Medical Science

Dr. Ali Akbar Ehsanpour
University of Isfahan

Dr. Seyed Majid Ghaderian
University of Isfahan

Dr. Roya Karamian
Bu-Ali Sina University

Dr. Ali Asghar Karkhane
National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

Dr. Navaz Kharazian
University of ShahrKord

Dr. Mehran Miroliaei
University of Isfahan

Dr. Ali Morad Shahi
University of Shiraz

Dr. Mohammad Reza Rahiminejad
University of Isfahan

Dr. Masoud Ranjbar
Bu-Ali Sina University

Dr. Seyed Badroddin Ebrahim Seyed Tabatabaee
Isfahan University of Technology

Dr. Mansour Shariati
University of Isfahan

Dr. Mozafar Sharifi
Tarbiat Modares University

Iranian Journal of Plant Biology (Scientific Research Journal)

2nd Year, No. 1, Sequence 3, Spring 2010

ISSN: 2008-8264

Managing Editor: Dr. Mansour Shariati

Editor-in-Chief: Dr. Mansour Shariati

Editorial Board

Dr. Ali Akbar Ehsanpour	University of Isfahan
Dr. Faezeh Ghanati	Tarbiat Modares University
Dr. Ali Asghar Maassoumi	Research Institute of Forests and Rangelands
Dr. Mohammad Reza Rahiminejad	University of Isfahan
Dr. Mansour Shariati	University of Isfahan
Dr. Shahin Zare Mobarakeh	University of Tehran
Dr. Mohammad Reza Zamani	National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

Executive and Manuscript Manager: Fariba Hadian

Scientific English Editor: Fereidoon Parvizian

Literary Editor: Naser Karimpoor

General Layout Designer: Behzad Hakiminia

Professional Layout Designer: Fariba Hadian

Publisher: University of Isfahan

University of Isfahan- Technology and Research Department- Iranian Journal of Plant Biology Office. Email: IJPB@ui.ac.ir

Iranian Journal of Plant Biology has been recognized and ranked as a *scientific-research* journal based on the document number 3/11/558 issued by the Evaluation Committee of Scientific Journals of Research and Technology Ministry in June, 2009; also it has been registered with *International Standard Serial Number (ISSN): 2008-8246* by National Library and Archives of Islamic Republic of Iran.

"This journal has been prepared through the cooperation of the University of Isfahan and Iranian Biology Society."

The complete text of the journal is available at the following sites:

http://www.ui.ac.ir/red/mainpage/f_rsrch.htm

<http://www.magiran.com>

<http://www.SID.ir>

<http://www.ISC.gov.ir>

Publication and Lithography: University of Isfahan Publications

Publisher: University of Isfahan

Price: 20000 Rials

Number of copies: 1000 Copies

Iranian Journal of Plant Biology

2nd Year, No. 1, Sequence 3, Spring 2010

**Published by
University of Isfahan Research Center**