نقش پروتئینها و آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در متابولیسم ارس *Juniperus* spp.

پروین صالحی شانجانی، سودابه علی‌احمدکروری، حسن ابراهیم‌زاده معبود

چکیده

در پژوهش حاضر نقش پروتئینها و آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در متابولیسم ارس بررسی شده است. بدین منظور تغییرات کمی و کیفی فصلی (ایزوآنزیمی) پروتئینها، آنزیمهای پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز اندامهای مختلف شاخه، سرشاخه‌های سبز، مخروط نر و مخروط ماده پایه‌های مختلف نر، نرماده و ماده ارس با روشهای الکتروفورز و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به رغم تفاوتهای فردی در هریک از پایه‌ها، روند فعالیت هر آنزیم مشخص است وهیچ تفاوتی از نظر کمی و کیفی در پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در پایه‌های مختلف نر، ماده و نر – ماده ارس مشاهده نشده است و کلیهٔ پایه‌ها الگوی یکسانی را به نمایش گذاشته‌اند. در اصل بیشترین فعالیت پراکسیداز در سرشاخه‌های سبز و شاخه‌های ارس در فصل بهار و پاییز و کمترین فعالیت آن در تابستان و زمستان مشاهده شده است. میزان فعالیت پلی فنل‌اکسیداز در سرشاخه‌های سبز، از شروع فصل رویشی افزایش یافته و بیشترین مقدار آن در زمستان صورت گرفته است. فعالیت پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و پروتئینهای محلول مخروط نر در زمستان کاهش بسیار محسوسی را نشان داده است. مقایسهٔ فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در طول تکامل مخروط ماده نشان می‌دهد که بیشینه فعالیت پلی فنل اکسیداز در مرحلهٔ اول نمو (سال اول) و بیشینه فعالیت پراکسیداز در مرحلهٔ دوم نمو (سال دوم) صورت گرفته است.

این نتایج نشان می‌دهند که آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز نقش‌های قابل توجهی در متابولیسم گیاهی از جمله رشدونمو ،فتوسنتز، تعادل هورمونی، اندام‌زایی و ریخت‌زایی ،مقاومت در برابر شرایط حاد محیطی و...دارند. باتوجه به شباهت‌های ریختاری، تشریحی و بیوشیمیایی در هر سه پایهٔ ارس (نر، ماده و نرماده)، جداسازی آنها براساس صفات متأثر از محیط (تک‌پایه یا دوپایه بودن و تعداد دانه در میوه) مورد تردید است. به همین جهت از نظر ترجیحی ارسهای موجود در ایران را می‌توان براساس نامگذاری قدیمی در گونهٔ *Juniperus excelsa* قرار داد.

مقدمه و هدف

منابع طبیعی هر جامعه، ذخایری به شمار می‌روند که فقط به نسل حاضر تعلق ندارند، بلکه میراثی محسوب می‌شوند که باید برای آیندگان حفظ شوند. یکی از مشکلات محیط زیست در دنیای امروزین از بین رفتن منابع طبیعی از جمله جنگلها و مراتع است. جنگلها و مراتع عوامل اصلی حفاظت خاک، تغذیهٔ دام و طیور، طراوت و پاکیزگی هوا، تنظیم رطوبت و نفوذپذیری آب، زیستگاه حیوانات و گیاهان و زیبایی و چشم‌نوازی محیط به شمار می‌روند.

حدود نیمی از جنگلهای جهان در مناطق کوهستانی واقع شده‌اند. خاک و پوشش گیاهی در چرخهٔ زیست‌محیطی کوهستان نسبت به مناطق گرمتر و کم‌شیب‌تر نواحی پست از ارزش بسیار والاتری برخوردارند و به دلیل شرایط خاص حاکم بر محیط، نظیر پایین بودن دما، برای تولید یک سانتیمتر مکعب خاک یا رشد هر بوته و گیاه، نسبت به پایین دست به زمانی به میزان چندین ده برابر نیاز است و پوشش گیاهی و خاک (به علت جایگزین نشدن در کوتاه مدت) به حفاظت بیشتری نیاز دارند. در نواحی کوهستانی به دلیل تغییر سریع وضعیت حاکم بر محیط و نیز افزایش ارتفاع، کاهش دما، پایین آمدن فشار هوا، افزایش میزان اشعه ماوراء بنفش (به دلیل رقیق شدن هوا) و عوامل دیگر، تنها گیاهان و درختانی رشد می‌کنند که توان سازگاری را با شرایط سخت موجود داشته باشند.

ارس به عنوان یکی از مقاوم‌ترین درختان در برابر سرماهای شدید (بیش از ۴۰ درجهٔ سانتیگراد زیر صفر) و خشکی، جایگاه ویژه‌ای در نواحی کوهستانی ایران دارد. این گیاه از جمله درختانی است که می‌تواند در حفاظت خاک، جلوگیری از فرسایش و خطرات ناشی از سیل و بهمن نقشی اساسی بازی کند. ارزش پوشش گیاهی در این نواحی علاوه بر حفاظت خاک در دامنه‌های پرشیب و جلوگیری از فرسایش، از نظر اقتصادی نیز درخور اهمیت است. فرسایش خاک در قسمتهایی که فاقد پوشش گیاهی هستند یا سپر

سبز حفاظتی طبیعی خود را از دست داده‌اند عوارضی بسیار منفی دارند، به‌طوری که باعث ورود خاکهای فرسایش یافته به رودخانه‌ها و افزایش غلظت و گل‌آلود شدن آب می‌شود که نه‌تنها شرایط زندگی موجود در اکوسیستم آب و حیات ماهیان را مورد تهدید قرار می‌دهد، بلکه عمر مفید سدها را نیز کوتاه کرد. و میزان سیل و فرود بهمن را افزایش می‌دهد.

بنابراین در مقاله حاضر سعی براین است با مطالعه اثر عوامل محیطی بر تغییرات کمی و کیفی پروتئینی، آنزیمی و ایزوآنزیمی پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز، گامی در جهت بررسی مقدماتی اکوفیزیولوژی، بیوشیمیایی و گیاه‌شناسی ارس برداشته شود و راه برای پژوهشهای بعدی به سوی احیای جنگلهای ارس گشوده گردد.

سابقهٔ تحقیق

نامگذاری درختان ارس همچون سایر گیاهان ریشه تاریخی دارد. بیبراشتاین[۱] (۱۸۰۸) درختان ارس را از لحاظ قراردادی *Juniperus excelsa* معرفی نمود. کخ[۲] (۱۸۴۹) نام *J.polycarpos* و سپس بواسیه[۳] نام *J.macrocarpa* را معرفی کرد. Takhtazhyan (۱۹۷۲) *J.polycarpos* را زیرگونه *J.excelsa* دانست و به صورت *J.excelsa ssp. polycarpos (k.koch) Takht]* معرفی نمود(۹).

آزمایشهای اخیر در مورد نمونه‌های ارس در باغ گیاه‌شناسی کیو نشان داد که *J.excelsa* نسبت به *J.excelsa ssp. polycarpos* برگینه‌های باریکتر و ظریفتری داشته و تعداد دانه‌ها در مخروط آنها بیشتر است، به‌طوری که در *J.excelsa* ۴-۶ عدد و در *J.excelsa ssp. polycarpos* ۲-۴ عدد بوده است(۹).

گولاتی[۴] و همکاران (۱۹۸۰) در نواحی هیمالیا گونهٔ *J.excelsa* یا *J.polycarpos* را گزارش نکرده‌اند، در حالی که مهرا[۵] (۱۹۷۶) از *J.excelsa* به عنوان یکی از ۵ ارس بومی غرب هیمالیا نام برده بود(۹). ایلاهی[۶] (۱۹۸۶) فقط از چهارگونه ارس در مناطق هندوپاکستان نام می‌برد که یکی از آنها *J. polycarpos* است(۹). براساس گزارش وی میانگین تعداد بذر در مخروط ماده *J. polycarpos* ۲-۴ عدد است. آدامز[۷] (۱۹۹۲) ضمن اینکه توضیح مربوط به *J.excelsa* را که توسط مهرا ارائه شده بود با وضعیت *J.excelsa ssp. polycarpos* مطابقت می‌دهد. وی عقیده دارد که ارسهای موجود در یونان که تعداد دانه‌ها در مخروط مادهٔ آنها ۳-۲ عدد است (و مخروط ماده آنها کوچک است) از *J.excelsa* می‌باشد.از سوی دیگر آدامز با مقایسهٔ اطلاعات موجود در مورد ارس اظهار می‌دارد که پراکندگی (ارس *J.excelsa ssp. polycarpos* غرب هیمالیا بطرف

1- Bieberstein
2- Koch
3- Boissier
4- Gulati
5- Mehra
6- Ilahi
7- Adams

شرق تا افغانستان و ایران و عراق کشیده شده در حالی که *Juniperus excelsa M. Bieb.* یونانی) از شمال یونان به طرف شرق تا شبه جزیرهٔ بالکان و کریمه (در شمال دریای سیاه)، ترکیه و در نهایت در ایران تا ارتفاعات ۳۳۰۰ متر گسترده شده است و به عبارتی ارسها در اصل به جزء قسمتی که به نیمکره جنوبی کشیده شده‌اند، در نیمکرهٔ شمالی قرار دارند(۹).

پراکسیدازها

۱- *نشانویژگیهای عام*

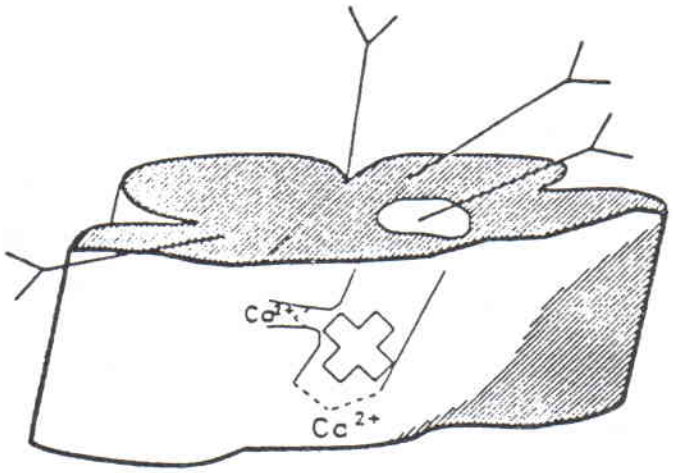
پراکسیداز ملکول پیچیده‌ای است که از مدتها قبل مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است و هنوز هم مطالعات زیادی در مورد جزییات ساختمان پراکسیداز و گروههای پروستتیک آن و نیز سنتز این بخشها صورت می‌گیرد.

پراکسیداز هموپروتئینی است که وجود هِم برای فعالیت آنزیمی آپروتئین ضرورت دارد، بعلاوه ثابت شده است که پراکسیدازهای گیاهان عالی گلیکوپروتئین و کلسیو پروتئین هستند، ولی هنوز اهمیت اتصال زنجیر گلیکانی یا کلسیم در عمل پراکسیداز به‌درستی شناخته نشده است(۵۱).

۰/۲ درصد از کل سنتز پروتئین در برگ، به سنتز پراکسیدازها اختصاص دارد. ایزوآنزیمهای پراکسیدازی براساس نقطه ایزوالکتریکی‌شان در گروههای کاتیونی و آنیونی دسته‌بندی می‌شوند. اگرچه میزان سنتز ایزوآنزیم آنیونی با کاتیونی پراکسیداز برابر است، ولی مقدار ایزوآنزیم آنیونی در محیط کشت سلولی و سیتوپلاسم سلولها کمتر گزارش شده است. علت این پدیده هنوز به درستی شناخته نشده است، ولی احتمالاً مقادیر پایین ایزوآنزیم آنیونی ممکن است به دلیل نیمه‌عمر کوتاه آن باشد(۵۱).

مطالعات نشان داده‌اند که پراکسیداز ساختمان گلبولی داشته و کانال جایگاه فعال هم، دارای دهانه است. کلسیم با اتصال درون پپتیدی در اطراف جایگاه فعال قرار دارد.

همان‌گونه که در بالا هم ذکر شد پراکسداز بدون هِم فاقد فعالیت آنزیمی است و الیگوساکاریدها عوامل محافظت‌کنندهٔ پروتئین هستند. حذف یا تغییر زنجیر فرعی گلیکوزیدی در پایداری آنزیم موثر است. در برخی آنزیم‌ها از دست‌دادن زنجیر گلیکانی نیز می‌تواند باعث تغییر محلولیت آنها گردد. کلسیم برای انتقال پراکسیداز از عرض غشاء ضروری بوده و احتمالاً برای اتصال درون ملکولی اجزای پراکسیدازی لازم است (۵۱) (شکل ۱).



شکل ۱ـ نمایش پراکسیداز بادام‌زمینی

پراکسیداز، آنزیم اکسیدو ردوکتازی است که کد آن EC 1.1.11.1.X است (X با نوع احیاءکنندهٔ بیولوژیکی آن تعیین می‌گردد). تجزیهٔ پراکسیدازهای گیاهی (لیگنین پراکسیداز، Mn پراکسیداز، سیتوکروم c پراکسیداز و...) و جانوری (لاکتوپراکسیداز[1]،

1- Lactoperoxidase

تیروپراکسیداز[۱]، میلوپراکسیداز[۲] و ...) نشان می‌دهد که آنها از دو شاخهٔ جداگانه تشکیل شده‌اند و شاخهٔ پراکسیدازهای جانوری هیچ ارتباط ساختمانی با شاخه پراکسیدازهای گیاهی ندارد.

تلاش برای رده‌بندی پراکسیدازها و بررسی تفاوتهای آنها ادامه دارد. معتبرترین رده‌بندی بوسیلهٔ ولیندر (۱۹۹۲)[۳] پیشنهاد شده است. پراکسیدازها براساس شباهت توالی ژنی و ویژگیهای دگرگونیهای ترجمه‌ای به ۳ رده تقسیم می‌شوند.

رده I :پراکسیداز ـ کاتالاز باکتریای (EC 1.11.1.6)

سیتوکروم C پراکسیداز مخمر (EC 1.11.1.5)

آسکوربات پراکسیداز گیاهی (EC 1.11.1.11)

ردهٔ I شامل پراکسیدازهایی می‌شود که پروتئین آن گلیکوزیلی نبوده و اغلب از نوع پروکاریونی هستند. پراکسیداز ـ کاتالازهای باکتریایی، آنزیمهای دی و تترامری هستند که وزن ملکولی هر زیر واحد آن ۶۰ـ۸۰ کیلو دالتون است. این آنزیم هر دو فعالیت پراکسیدازی و کاتالازی را دارد. فعالیت اختصاصی پراکسیدازی آن به نحو معمول ۲ بار کمتر از پراکسیدازهای گیاهی است.

سیتوکروم C پراکسیداز مخمر با وزن ملکولی ۳۴KD دارای ۲۹۴ اسید آمینه است.

آسکوربات پراکسیداز گیاهی یک آنزیم همودیمری به شمار می‌رود که وزن هر زیر واحد آن ۳۰KD است. نوع کلروپلاستی آن فقط بر روی آسکوربات فعالیت می‌کند، درحالی‌که نوع سیتوسولی آن اکسیداسیون گایاکل و پیروگالال را نیز کاتالیز می‌کند.

ردهٔ II، شامل پراکسیدازهای قارچی خارج سلولی (با وزن ملکولی ۳۶ ـ ۴۲ KD و PI ۳ـ۴/۱)، لیگنین پراکسیداز و Mn پراکسیداز می‌شود. اعضای این رده گلیکوپروتئینهای ترشحی نوع گیاهی هستند.

1- Thyroperoxidase
2- Myeloperoxidase
3- Welinder

رده III پراکسیدازهای گیاهی متداول با وزن ملکولی در حدود ۳۱-۳۶ KD را شامل می‌شود. ظرفیت الیگوساکاریدی آن از ۰ تا ۲۵٪ در انواع مختلف تفاوت دارد و به همین جهت ممکن است وزن ملکولی آن تا بیش از ۴۸ KD نیز افزایش یابد. پراکسیدازهای گیاهی ایزوآنزیمهای کاتیونی (۷/۵ - ۱۲ PI) آنیونی متوسط (۵ - ۷/۵ PI) و آنیونی (۳/۵-۵ PI) دارند.

پراکسیدازهای قارچی و گیاهی (اکسین)، (EC 1.11.1.7) با تعدادی از الکترون‌دهنده‌ها برهم کنش دارند. پراکسیدازهای گیاهی در زیوه دیواره سلولی، (in vivo) در دکربوکسیلاسیون IAA بیوسنتز اتیلن، چوبی‌شدن، پاسخ به تنش و غیره شرکت می‌کنند. پراکسیدازهای قارچی به‌طور مستقیم در تجزیهٔ زیستی لیگنین دخالت می‌نمایند.

کلیهٔ پراکسیدازهای هم‌دار، ۱۰ مارپیچ آلفا حفاظت شده دارند که ۲ قلمرو[1] را تشکیل می‌دهند. جزء هِم به صورت غیرکووالانتی در داخل شکاف بین قلمروها قرار گرفته است. توالی آمینواسیدی پراکسیداز بین رده‌های مختلف ۸-۱۲٪ شباهت داشته و شباهت درون رده‌ای آنها به بیش از ۴۵ - ۹۷٪ بالغ می‌شود. طول زنجیره پلی‌پپتیدی پراکسیداز -کاتالاز باکتریایی به علت دوتاشدگی ژنی -دو برابر است (۲۴).

در تمام ژنهای پراکسیدازی تاگ‌سازی شده[2] نشانه‌های N انتهایی وجود دارد وبه علت وجود آن، پراکسیدازها وارد مسیر ترشحی می‌شوند، یعنی پراکسیداز همزمان با ترجمه در شبکه آندوپلاسمی وارد می‌شود. در آنجا پلهای دی‌سولفید تشکیل شده و پیشازگلوکانی $Glc_3Mang\ Glc\ NAc_2$ بیشتر به توالیهای Asn.z.Thr/Ser متصل می‌شود. جذب یونهای کلسیم پایدارکننده باعث تشکیل آپوپراکسیداز بسیار پایداری می‌شود. اگر مقدار هِم نیز کافی باشد هلوپراکسیداز تشکیل می‌گردد. آپوپراکسیداز یا

1- Domain
2- Cloning

هلوپراکسیداز به دستگاه گلژی رفته و پردازش بیشتر گلیکانها در آنجا انجام می‌شود.

پراکسیدازها هم در واکوئلها و هم در خارج سلول وجود دارند. اخیراً مشخص شده است که وجود یک پروپپتید اسیدی در پایانه کربنی برای جورسازی[۱] یک لکتین[۲] جو به واکوئل ضروری است. پروپپتید فوق در واکوئل حذف می‌گردد (۵۲).

پژوهشهای بسیاری نشان می‌دهند که در اصل ایزوآنزیمهای آنیونی توتون در دیواره‌ها و پراکسیدازهای کاتیونی در واکوئلها متمرکز می‌شوند، ولی وجود پراکسیدازهای کاتیونی در موقعیتهای خارج‌سلولی بسیاری از بافتهای گیاهی در محیط کشت تعلیقی سلولی و در عصاره‌های بین‌سلولی بافتهای گیاهی (با جداسازی با خلاء) نیز ثابت شده است (۱۸). بین پراکسیدازهای دیواره سلولی نیز تفاوت‌هایی از نظر تمرکز آنها وجود دارد، به‌طوری‌که پراکسیدازهایی که در تشکیل H_2O_2 و اتصال عرضی پلیمرهای دیواره شرکت می‌کنند به دیواره اولیه متصل هستند، درحالی‌که پراکسیدازهایی که در چوبی‌شدن و ضخیم‌شدن دیواره‌های ثانوی دخالت می‌کنند می‌توانند در فضاهای دیواره سلولی نیز آزاد باشند (۲۹).

پژوهشهای بسیاری پراکسیدازهای متصل به دیوارهٔ سلولی را در سه گروه قرار می‌دهند:

۱ـ آنزیم‌هایی که با پیوند یونی به دیواره متصل می‌شوند. آنها را می‌توان با استفاده از کاتیونهای فلزی استخراج نمود.

۲ـ آنزیم‌هایی که با پیوند کووالانتی به دیواره متصل می‌شوند. آنها به‌وسیله گلیکانازهای تجزیه‌کننده دیواره آزاد می‌گردند.

۳ـ آنزیم‌هایی که با پیوند کووالانتی به دیواره متصل شده و به صورت متصل با باقیمانده‌های نامحلول دیواره باقی می‌مانند.

1- Sorting

2- Lectin

این پراکسیدازهای متصل به دیواره ۲ واکنش انتهایی خارج سلولی را در تشکیل لیگنین کاتالیز می‌کنند. این دو واکنش عبارتنداز:

۱ـ اکسیداسیون منولیگنالها به رادیکالهای فنوکسی

۲ـ اکسیداسیون NADH (نیکوتین آمید دی نوکلئوتید احیا شده) و تولید H_2O_2 (۵۲).

تعداد ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی، مکان تمرکز و نقش هر یک از ایزوآنزیم‌ها از موضوعهایی هستند که هنوز به بررسی و مطالعه بسیاری نیاز دارند. به‌طوری‌که الگوی بیان آنها در بافتها، اختصاصی است و به‌وسیلهٔ مراحل رشد و نموی و تحریکات محیطی کنترل می‌شود. نمونه‌های بافت برگ، ریشه، مغز و کالوس توتون الگوهای ایزوآنزیمی مختلفی نشان می‌دهند. در توتون ۱۲ ایزوآنزیم مشاهده می‌شود که در ۳ زیرگروه آنیونی (اسیدی)، کاتیونی (بازی) و آنیونی میانه طبقه‌بندی می‌شوند. به‌نظر می‌رسد که هر زیرگروه در سلولها عملکردهای متفاوتی دارند. ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی کاتیونی (PI ۸/۱-۱۱) در واکوئل مرکزی متمرکز شده و سنتز H_2O_2 را از واکنش NADH با H_2O کاتالیز می‌کنند. این ایزوآنزیم‌ها در حضور H_2O_2 دارای فعالیت اندول استیک اسید اکسیدازی (اکسین اکسیدازی) داشته و احتمالاً H_2O_2 را برای سایر ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی تهیه می‌کنند، ولی هنوز نقش واقعی آنها در گیاه مشخص نشده است. ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی میانه در دیواره‌های سلولی متمرکز شده و در جهت سنتز پیشسازهای لیگنینی فعالیت می‌کنند. براساس مشاهدات، این ایزوآنزیم‌ها در مناطق زخم شده ساقه توتون به‌طور وسیعی مجتمع می‌شوند. از میان این سه گروه نقش ایزوآنزیم‌های آنیونی بهتر شناخته شده است. این ایزوآنزیم‌ها نیز به دیوارهٔ سلولی متصل بوده و فعالیت زیادی در پلیمریزاسیون سینامیل الکلها دارند(۱۶). مشاهدات نشان می‌دهند که بهبود یافتن زخم غده‌های سیب‌زمینی با تجمع این ایزوآنزیم‌ها همراه است. تجزیهای ایمنوسیتوشیمیایی با استفاده از پادتن(آنتی‌بادی)های خاص برای یک

پراکسیداز آنیونی معین نشان داد که تجمع این آنزیم با فرایند چوب‌پنبه‌ای شدن مرتبط بوده و فقط کناره داخلی دیواره‌های سلولی اپیدرم بافت غده سیب‌زمینی نشان‌دار می‌شوند. این مسأله حاکی از این است که هر اندام گیاهی با یک واکنش عام یعنی تشکیل پریدرم چوب‌پنبه‌ای یا چوبی به زخم پاسخ می‌دهند. چوب‌پنبه با تشکیل سدی از رسیدن آب به زخم جلوگیری می‌کند و بدین‌ترتیب باعث خشک‌شدن زخم می‌شود (۱۶).

به‌طورکلی پراکسیدازها اکسیداسیون تعداد زیادی از ترکیبهای آروماتیک را با احیای پراکسید ئیدروژن کاتالیز می‌کنند:

$$E - \overset{(1)}{Fe}\ (III) + H_2O_2 \longrightarrow \overset{(2)}{\text{compound I}} + H_2O$$

$$\text{compound I} + \overset{(3)}{AH_2} \longrightarrow \overset{(4)}{\text{compound II}} + AH^{\cdot}$$

$$\text{compound II} + AH_2 \longrightarrow E - Fe\ III + AH^{\cdot} + H_2O \qquad (۲۴)$$

(۱)

۲ـ *جایگاه پراکسیدازها در دیوارهٔ سلولی:*

آنزیم‌های متعددی در دیواره‌های سلولی گیاهان عالی مشخص شده‌اند که ممکن است هریک در قسمتی از متابولیسم دیواره سلولی نقش داشته باشند. این آنزیم‌ها به نحو معمول ساختمان گلیکوپروتئینی دارند. از میان تمام گلیکو آنزیم‌ها، پراکسیدازها بیشتر مطالعه شده‌اند. در سال ۱۹۶۲ تحقیقات سیگل[۲] نشان داده بود که این آنزیم‌ها در سنتز لیگنین مشارکت دارند. با این همه دو ژون[۳] در ۱۹۶۷ مشاهده می‌نماید که فعالیت پراکسیدازی در بافتهای چوبی نشده شدید است، درصورتی که آوندهای چوبی بافت گزیلم، فاقد فعالیت پراکسیدازی هستند. تحلیلهای نخستین در مورد نقش

۱- پراکسیداز طبیعی دارای آهن III است. ۲ـ ترکیب I دارای آهن IV به صورت گروه Fe IV=0

۳ـ دو ملکول الکترون‌دهنده AH_2 به صورت رادیکالی آزاد می‌شوند ۴ـ آنزیم فرو دارای آهن II است.

2- Siegel 3- De Jongh

پراکسیدازها حاکی است که پراکسیدازها در ساخته شدن مواد تشکیل دهنده دیواره دخالت داشته و بعلاوه این آنزیم‌ها اثر اکسینها را در ارتباط با اتساع‌پذیری غشاهای اسکلتی و در مرحله کاتابولیسم آنها با ایفای نقش اکسین اکسیدازی، کنترل می‌نمایند. از سوی دیگر هیدروکسی پرولین (اسیدآمینه غالب اکستانسین) در مجاورت برخی از ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی، هیدروکسی پرولین ـ O ـ آرابینوزیدها را تشکیل داده و به این ترتیب در به ظهور رسانیدن اکستانسین مشارکت می‌کنند. پراکسیدازها می‌توانند اتصال عرضی فنلها را بین ماکرو ملکولهایی مثل لیگنین، پروتئین، همی سلولز و فرولیک اسید کاتالیز کنند. پراکسیداز احتمالاً اتصال عرضی پروتئین را به‌وسیله دِآمیناسیون اکسیداتیولیزین عملی می‌سازد(۱۶).

پلیمرهای دیواره سلولی گیاهان درحال رشد، زنجیره‌های جانبی فنلی دارند. به عنوان مثال می‌توان از باقیمانده‌های تیروزین اکستانسین، باقیمانده‌های اسیدفرولیک و P- کوماریک‌اسید متصل به پلی ساکاریدها، آرابینوگالاکتان پکتیکی در دو لپه‌ایها و آرابینوگزیلانهای همی سلولزی در تک لپه‌ایها نام برد. باوجود اینکه مقدار این زنجیره‌های کناری فنلی در دیواره کم است، ولی آنها با ایجاد اتصالهای عرضی بین پلی‌مرها در معماری دیواره شرکت می‌کنند. تشکیل این نوع اتصال عرضی در شیشه (in vitro) ثابت شده است. به‌طوری که پراکسیداز ترب کوهی در pH پایین و حضور H_2O_2 دیمریزاسیون باقیمانده‌های تیروزین، که به صورت یونی به اکستانسین دیواره‌های سلولی اتصال داشته را به صورت ایزودی تیروزین کاتالیز می‌کند. به همین ترتیب پراکسیداز در حضور H_2O_2 می‌تواند اکسیداسیون زنجیره‌های جانبی فرولویل[1] (موجود در ساختمان پلی ساکاریدها) را به صورت اتصالات عرضی دی فرولویلی کاتالیز نماید. وجود دی فرولات و ایزو دی‌تیروزین در بعضی بافتهای گیاهی،

1- Feruloyl

حضور واکنشهای اکسیداتیو جفت[1] را ثابت می‌کند. براساس این نتایج پراکسیدازهای متصل به دیواره می‌توانند اتصال عرضی اکستانین را به‌وسیله ایزو دی‌تیروزین و اتصال قطعات پکتیکی را به‌وسیله پلهای دی فرولویل انجام دهند(۱۶).

احتمال ایجاد اتصالهای عرضی فنلی بین پلیمرهای ماتریکس دیواره می‌تواند قابلیت انبساط دیواره سلولی در حال رشد را کاهش دهد و در واقع این اتصالها میزان رشد سلولی را کنترل می‌کنند. چنانچه بین فعالیت پراکسیدازی دیواره و میزان رشد رابطه‌ای منفی وجود دارد. به عنوان مثال، اسید ژیبرلیک توسعه سلولهای اسفناج را در کشت تعلیقی تسریع می‌کند و همزمان ترشح پراکسیداز متوقف گردیده، فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز کاهش یافته و به تجمع فرولات استری شده دیواره کمک می‌کند. پراکسیداز احتمالاً رشد را با سخت کردن دیواره محدود می‌نماید(۱۶).

مطالعات انجام شده در مورد تمایز مزوفیل Zinnia به عناصر تراکئیدی (در شیشه) نشان می‌دهند که ایزوپراکسیداز یک نشانگر اولیه است به‌طوری که ۳۶ ساعت بعد از القای سلولهای مزوفیل به عناصر تراکئیدی فعالیت هردو پراکسیدازهای دیواره‌ای و محلول تسریع می‌شود. ممانعت کننده‌هایی که بر تمایز تراکئیدها صحه می‌گذارند. اگرچه هنوز نحوهٔ عمل ایزوپراکسیدازها در تمایز سلولهای مزوفیل به عناصر تراکئیدی را مسدود می‌کنند و یا به تاخیر می‌اندازند ولی مقدار این آنزیم را نیز کاهش می‌دهند. این نتایج بر ارتباط بین تعدیل سطح ایزوپراکسیدازهای مخصوص تمایز با تشکیل عناصر تراکئیدی به خوبی شناخته نشده است، ولی نقش سیستم دیواره سلولی در تنظیم تمایز مسلم است(۱۶).

مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت پراکسیداز خامه در واکنشهای ناسازگاری باروری پتونیا دخالت دارد به این ترتیب که خامه انواعی که گرده‌افشانی دگرلقاحی دارند فاقد

1- Couple

پراکسیدازهای دیواره بوده، درحالی که در بخش خارجی بافت انتقالی خامه‌های انواعی که گرده‌افشانی خودلقاحی و یا انواعی که فاقد گرده‌افشانی هستند پراکسیدازهای دیواره‌ای دارند و می‌توانند لوله‌های گرده ناسازگار را رد کنند.

پراکسیدازها همچنین در القای بیوسنتز دیواره سلولی جدید که ممکن است یک پاسخ دفاعی مهم به حمله پاتوژن باشد، دخالت می‌کنند. آنها همچنین با ایجاد زخم، القاء شده و احتمالاً در ترمیم دیواره‌های آسیب‌دیده دخالت می‌کنند. این عمل را با تشکیل یک سد آبی انجام می‌دهند. پراکسیدازها این سد را به‌وسیله تخریب ترکیبهای (پلیمری) آلیفاتیک و آروماتیک بوجود می‌آورند. به این ترتیب از رسیدن آب و مواد غذایی به سلولهای فوق جلوگیری کرده و با خشک نمودن بافت آسیب دیده از پیشرفت آسیب جلوگیری می‌کنند (۱۶).

۳ـ نقش پراکسیدازها در کنترل رشد سلول گیاهی

یکی از نقشهای مهم پراکسیدازها کنترل رشد سلول است. پراکسیداز به‌وسیله تغییر مقدار اندول ۳ـاستیک اسید (IAA) و به عبارت دقیق‌تر به‌وسیله کاتابولیسم اکسیداتیو IAA، رشد را تنظیم می‌کند. به علاوه پراکسیداز با ایجاد اتصال عرضی بین پلیمرهای فنلی دیواره سلولی، ارتجاع‌پذیری دیواره سلولی را کاهش می‌دهد. این فرایند باعث سخت شدن غیرقابل برگشت دیواره شده و سلول را در برابر فشار تورژسانس مقاوم می‌سازد. بنابراین پراکسیداز با تنظیم سطوح درون‌زا (آندوجنوس) عامل تسریع‌کننده رشد (IAA)، رشد سلولی را که ناشی از فرایند بیوفیزیکی توسعه سلول است، کنترل می‌کند.

کاتابولیسم IAA در زیوه (in vivo) احتمالاً یا به صورت نسبتاً غیراختصاصی به‌وسیله سیستم پراکسیدازی و یا به صورت اختصاصی به‌وسیله سایر آنزیم‌ها انجام می‌گیرد، ولی هنوز مشخص نیست که چگونه و کجا کاتابولیسم IAA در تنظیم رشد

(رشد به واسطه IAA کنترل می‌شود) دخالت می‌کند. اخیراً سطوح IAA در گیاهان توتون تراژنی[۱] با توان تولیدی بیشینه یا کمینه ایزو پراکسیدازهای اسیدی[۲] (در مقایسه با گیاهان وحشی) بررسی شدند. مطالعات حاکی است که هیچ تغییر ویژه‌ای در سطوح IAA در گیاهان تراژنی مشاهده نمی‌شود. این نتایج و نتایج دیگر نشان دادند که کاتابولیسم IAA در گیاه به ظاهر به‌وسیله ایزوپراکسیدازهای بازی (احتمالاً محلول) انجام می‌گیرد، به‌طوری که بین تغییرات پراکسیدازهای بازی و تغییرات غلظت IAA درون‌زا ارتباط محسوسی وجود دارد. به علاوه پراکسیدازهای بازی سطوح اکسین را درطول انتقال قطبی IAA از رأس به قاعده گیاه کنترل می‌کنند(۴۴).

پراکسیدازهای محلول (ایزو پراکسیدازهای بازی در **Lupinus**) در حضور فنلها باعث تشکیل اندول ـ ۳ ـ کربونیل از IAA می‌شوند. براساس گزارش سندبرگ[۳] و همکاران (۱۹۹۰) اندول ـ ۳ ـ کربونیل، کاتابولیت اصلی متابولیسم دکربوکسیلاسیون IAA در بافتهای گیاهی است (۴۶).

۴ـ *پراکسیدازهای گیاهی و تمایز سلولی*

پراکسیدازها توسط دو مکانیسم اصلی بر تمایز سلولهای گیاهی اثر می‌گذارند. اولاً پراکسیدازها می‌توانند غلظت هورمونهای گیاهی را که روی سلولها و یا بافتهای خاصی عمل می‌کنند تغییر دهند، یعنی حساسیت آن سلولها یا بافتها را در برابر هورمون گیاهی میزان نمایند. ثانیاً پراکسیدازها می‌توانند با کاتالیزنمودن واکنش اتصال عرضی ترکیبهای دیواره سلولی، شکل یا اندازه نهایی سلول راکنترل کنند(۴۱).

پراکسیدازها علاوه بر دخالت در تجزیه IAA، در تشکیل اتیلن نیز دخالت می‌کنند.

1- Transgenic

2- Over Produce or under produce acidic Isoperoxidases

3- Sandberg

تشکیل اتیلن در بافتهای گیاهی به‌وسیله پیشسازهای بلافصل سنتز اتیلن یعنی ۱ـ آمینو ـ سیکلو پروپان ۱ـکربوکسیلیک اسید (ACC) محدود می‌شود. در حضور ACC برونزا، اتیلن در بسیاری از بافتها به‌وسیله یک آنزیم نهادی[۱] تشکیل می‌شود. ماهیت آنزیم تشکیل دهندهٔ اتیلن[۲] (EFE) هنوز شناخته نشده است، ولی به علت نیاز آن به o_2 و ممانعت آن به‌وسیله زداینده‌های[۳] رادیکال آزاد در زیوه (in vivo) نقش پراکسیدازی برای آنها پیشنهاد می‌شود (۴۱).

دیواره سلولی گیاه حداقل ۲ نوع دیمرفنلی دارد که به پلیمرها متصل می‌شوند. ایزو دی‌تیروزین دیمری از تیروزین است که به‌وسیله پل دی‌فنیل اتر (به صورت اکسیداتیو) اتصال می‌یابد. این ایزودی تیروزین مسئول اتصال عرضی اکستانسین است. در اکستانسین پلهای ایزودی تیروزین درون پپتیدی و بین پپتیدی وجود دارد. برخلاف ایزو دی تیروزین که باعث اتصالهای عرضی پروتئینها می‌شود، پلهای دی فرولویل[۴] و دی ـ P ـکوماریل[۵] در همی سلولزها و اجزای اسیدی و خنثی پکتینها تشکیل می‌گردند. این زنجیرهای فنلی موجود در ترکیبهای ماتریکس دیواره سلولی، به عنوان نقاط مرکزی تجزیه لیگنین‌ها نیز عمل می‌کنند (۴۴).

۵ـ *پراکسیدازها و تنش*

بسیاری از فیزیولوژیستهای محیطی و بیوشیمی‌دانان، پاسخهای گیاه به تنش را برای درک چگونگی عملکرد گیاهان در محیط طبیعی‌شان مطالعه می‌نمایند. لویت[۶] (۱۹۸۰) واژه تنش را بدین صورت تعریف کرد: هر عامل محیطی یا فیزیوشیمیایی که می‌تواند فشار خاصی به موجود زنده تحمیل کند تنش است. در حقیقت تمام پاسخهای

1- Constitutive
2- Ethylene - forming enzqme
3- Scavenger
4- Di Feroloyl
5- Di - P - Coumaroyl
6- Levitt

متابولیسمی نشان دهندهٔ آسیب به گیاه نیستند، بلکه برخی از پاسخها شایع آسیب وارده به گیاه در شرایط تنش آسیب می‌رسانند و برخی برای سازگاری گیاه به شرایط تنش ایجاد می‌شود. تشخیص میان پاسخها به عهده بیوشیمی‌دانان است.

بررسی تنش تا حدودی دشوار است، زیرا پاسخهای گیاه، به شدت تنش، زمان تحمیل تنش و میزان صدمه وارده مربوط هستند. برای نمونه در این جا نحوه پاسخ پراکسیدازها به تنش سرما توصیف می‌گردد.

تعدادی از گیاهان مانند گیاهان مناطق گرمسیری در هنگام کاهش دما (دمایی کمی بیش از نقطهٔ انجماد) آسیب می‌بینند. دماهای بسیار پایین موجب ضایعاتی در بافتها، سلولها و اندامهای گیاهی می‌شوند. آسیب به‌طور مستقیم به صورت یکی از اشکال زیر از قبیل پوسیدگی، زرد شدن، تجزیه بافتی، قهوه‌ای شدن، کاهش رشد و عدم توان جوانه‌زنی دانه، بروز می‌کند. البته ممکن است آسیبهای غیرمستقیمی نیز مانند کاهش دانه‌بندی، به تأخیر افتادن فصل برداشت، کاهش فتوسنتز و جذب ممکن است اتفاق بیافتد. برعکس بسیاری از گیاهان به‌وسیله تعدیل عمومی متابولیسم و عملکردهای سلولی پایه، فشارهای بیوفیزیکی ناشی از دمای پایین را تحمل می‌کنند.

در پاییز و بهار که دوره‌های گذاری[1] آب و هوای سرد است، وضعیت متابولیسمی گیاهان عالی به صورت متفاوتی عمل می‌کند. برای مثال فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم گلوتاتیون و آسکوربات افزایش می‌یابد که نقش آنها حذف آنیونهای سوپراکسیدها در طول زمستان است. کورودا[2] و همکاران (۱۹۹۱) ارتباط بین سیستمهای حذف پراکسید و آب و هوای سرد را در کالوس بررسی نمودند. آنها مشاهده کردند که با انتقال نمونه‌ها به سرما، سرعت فعالیت آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز افزایش یافته و تغییرات سیتولوژیکی مشخصی بوقوع می‌پیوندد که حادترین آنها

1- Transitional Periods 2- Kuroda

تقسیم واکوئل و ضخیم شدن دیواره سلولی است.

کروری[۱] و همکاران نشان دادند که بین فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز و سازگاری به سرما در گیاهان مختلف ارتباط مثبتی وجود دارد (۱، ۲، ۳۰، ۳۱ و ۳۲).[۲] کامرر و همکاران (۱۹۹۳) تغییرات فصلی آنزیم پراکسیداز را در سه گیاه سیب زمینی ترشی (*Jerusalem artickoke*)، کوکب (dahlia) و سیر (garlic) بررسی نمودند که الگوی ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی در زمستان و پاییز تغییرات فاحشی نشان داده است. آنها اعتقاد دارند که دمای پایین تشکیل الگوهای ایزوآنزیمی تندرونده را بیشتر القاء می‌کند. علاوه بر این بیشترین فعالیت پراکسیدازی در ابتدای فصل زمستان رخ می‌دهد. براساس نتایج فوق می‌توان اظهار داشت که بین فعالیت پراکسیداز و درجه پلیمریزاسیون کربوهیدراتهای ذخیره‌ای رابطهٔ معکوسی وجود دارد، به‌طوری که در تابستان کربوئیدراتهای سنگین و در پاییز کربوهیدراتهای سبک تولید می‌شود (۳۲).

ادروا[۳] و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که نه تنها فعالیت پراکسیداز، بلکه تعداد ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی برگهای گیاه گندم به‌وسیله تنش دمای پایین (۱۰- درجه سانتیگراد) افزایش می‌یابند. چنین دمائی به برگ گیاه آسیب می‌رساند. آسیبی که در سطح بافتی و فراساختاری مشاهده می‌شود با القای پراکسیداز در برگهای گندم رابطه دارد و در اصل القای پراکسیداز به ایجاد آسیب در گیاه وابسته است. آزادسازی الیسیتور(تازن)های درونزاد به‌وسیله مسیرهای انتقال علائم، پیشنهاد می‌کند که آسیب و القای پراکسیداز اساس ملکولی دارد. به‌طوری که ارتباطی منفی بین نرخ رشد و فعالیت پراکسیداز ناشی از دخالت پراکسیداز در تنظیم سختی دیواره سلول وجود دارد (۲۱).

این نتایج نشان می‌دهند که افزایش سرما سیستمهای متابولیسمی بسیاری را در گیاه متأثر می‌کند که یکی از آنها افزایش سیستمهای حذف کننده پراکسیدازی است. این

1- Korori
2- Kammerer
3- Edreva

سیستم در دو مرحله بروز می‌کند در طول اولین مرحله، فعالیتهای آنزیمی درگیر در تجزیه پراکسیدها (برای مثال فعالیت آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز) افزایش می‌یابد. در مرحله دوم، سیستم آنزیمی که برای سمیت‌زدایی پراکسیدها توسعه یافته است به چرخه پنتوز فسفات متصل می‌شود (۱۷).

پلی فنل اکسیدازها

۱ـ *نشانویژگیهای عام*

پلی فنل اکسیدازها جزء اکسیدازهایی هستند که از دیرباز در موجودات زنده به ویژه گیاهان عالی شناخته شده‌اند. نقش این آنزیم گسترده است و گهرمایه‌های بسیاری را اکسیده می‌کنند. به همین علت نیز با اسامی متفاوتی نامگذاری می‌شوند. پلی فنل اکسیدازها می‌توانند برروی فنلهای واجد یک، دو، سه و بیشتر عامل هیدروکسیل در ساختمانشان، عمل نمایند و نام پلی فنل اکسیداز به عنوان یک نام عام برای آنها درنظر گرفته شده است. این آنزیم‌ها قادر به اورتوهیدروکسیلاسیون منوفنلها و تبدیل آنها به دی فنلها و سپس اکسیداسیون مواد حاصل به اورتو ـ کوئینونها[۱] هستند.

تبدیل دی فنلها به کوئینونهای مورد اشاره نیز به‌طور مستقیم انجام می‌شود و جزئی از اعمال اصلی آنزیم (های) پلی فنل اکسیداز به شمار می‌رود. ولی این عمل به‌وسیله آنزیم با ویژگی بیشتری انجام می‌گیرد، به‌طوری که دسته‌ای از آنزیم‌ها اورتو ـ دی‌فنلها و پارا ـ دی‌فنلها را اکسیده می‌کنند در حالیکه گروه دیگر قادر به اکسیداسیون پارا ـ دی فنلها نیستند به همین دلیل آنزیم (های) پلی فنل اکسیداز را در سه گروه دسته‌بندی نموده‌اند:[۲]

1- O- quinones

۲ـ کاتکول اکسیدازها به نامهای پلی فنل اکسیدازها، دی فنل اکسیدازها، اورتو دی فنلاز، فنلاز وتیروزینار نامیده می‌شوند. در برخی موارد فعالیت منوفنلازی و دی فنلازی را با استفاده از نام یا اصطلاح به ترتیب کروزولاز و کتکولاز از هم جدا می‌کنند. به هرحال، نام سیستماتیک این آنزیم 1,2 - Benzendiol: oxygen

لاکـازها[۱] (EC.1.10.3.2) کـاتکول اکسـیدازهـا (EC. 1.10.3.1) و مـنوفنل ـ منواکسیژنازها (EC. 1.14.18.1) (۳۹، ۴۰ و ۴۳).

بسیاری از موجودات زنده این آنزیم دارند. در تعداد زیادی از باکتریها و قـارچـها، پسـتانداران، سـخت‌پوستان (مـثل میگوی سـفید *Penaeas setiferus* و خـرچـنگها *Panulirus argus*)، جلبکها (مانند Colechaete و Nitella)، بریوفیتها (نظیر مارکانسیا Marchantia از هـپاتیکها Hepatics، آنـتوسروس Anthoceros و نـوتوتیلوس Notothylus از آنتوسروتها Anthocerotes)، سـرخسـها و بـازدانگـان و بسـیاری از نهاندانگان مشخص شده‌اند (۲۷، ۳۹، ۴۰، ۴۳).

محل درون سلولی آنزیم در گیاهان پلاستها است. حضور این آنزیم در کلروپلاست با استفاده از روشهای میکروسکوپی، بیوشیمیایی و جداسازی بـه کـمک سـانتریفوژ در بسیاری از گیاهان گزارش گردیده است. براساس یافته‌های مایر[۲] و بیل[۳] (۱۹۸۹) در اسفناج آنزیم به تیلاکوئیدها متصل است و به هنگام پیری برگها، فـعالیت آن بـه دلیـل جداشدن آنزیم از تیلاکوئیدها افزایش می‌یابد(۳). شرمن[۴] و همکاران (۱۹۹۱) نـیز محل استقرار آنزیم را تیلاکوئیدها معرفی کردند. با وجود شناخت کلروپلاستی بودن و اتصال آن به تیلاکوئید، در مورد ساختار ملکولی این اتصال و یا اینکه در چه مکانی از غشای کلروپلاتی جای دارند اطلاعات محدودی وجود دارد (۳).

لاکس[۵] و هـمکاران بـا اسـتفاده از روشـهای مـختلف سـیتولوژیکی و بـا کـمک

---

oxidoreduetase است.

نام دیگر لاکاز اوریشیدول اکسیداز است. Urishidol oxidase بوده و نام سیستماتیک آن :Benzendiol oxygen oxidoreductase

منوفنل منواکسیژناز با نام سیستماتیک و نامهای Monophenol, L- Dopa: oxygen oxidoreductase با تیروزینار، فنلاز، منوفنل اکسیداز کرزولاز نیز شناخته می‌شود.

1- Laccase
2- Mayer
3- Biehl
4- Sherman
5- Lax

میکروسکوپ الکترونی و جداسازی بخشهای مختلف کلروپلاستی از هم، توانستند جایگاه آن را در کنار فتوسیستم ۲ تعیین کنند(۳۸).

پلی فنل اکسیداز به‌وسیله ژنهای هسته‌ای ابتدا در خارج از پلاستها ساخته شده و بعد مانند بسیاری از پروتئینهای کلروپلاستی به آن منتقل می‌شود. احتمالاً آنزیم به صورت پیش‌ماده‌ای تشکیل می‌شود که هنگام انتقال به کلروپلاست به شکل نهایی خود (با تغییرات پس ترجمه‌ای Post transcriptional) مبدل می‌شود (۲۲، ۲۳، ۳۸، ۳۹). پس آنزیم به هنگام ساخت در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود. این موضوع که آنزیم همیشه در کلروپلاستها بوده و آنجا عمل می‌کند یا در سیتوپلاسم نیز نقش دارد تنها هنگامی قابل پاسخگویی خواهد بود که اعمال فیزیولوژیکی آن مشخص شود. میزان و قدرت اتصال آنزیم به غشای کلروپلاستی به شرایط فیزیولوژیکی، سن گیاه، نوع گیاه و بافت بستگی دارد. به عنوان مثال، در زمان رسیدگی میوه سیب و انگور، محلولیت کاتکول اکسیداز افزایش می‌یابد. همچنین در زیتون سبز (green olive)، آنزیم به شدت به غشای کلروپلاستی پیوسته است که با کاربرد شوینده‌ها می‌توان آنزیم را محلول ساخت. اما در هنگام رسیدن (زیتون سیاه رنگ شده) آنزیم به طور کامل محلول شده و به تیمارهای خاصی برای محلول شدن نیاز ندارد (۴۰).

پلی فنل اکسیدازها در بخشهای مختلف گیاهان ازجمله: برگها، ساقه‌ها، گلها، دانه‌ها، لاتکس بعضی از گیاهان، بافتهای کرون گال (Crown - gall)، کرکهای سطح برگها و سلولهای محافظ روزنه مشاهده می‌شوند. در مراحل مختلف نموی و نیز در بافتها و اندامهای متفاوت، انواع متفاوتی از اشکال آنزیم معرفی می‌شوند که احتمالاً از عملکرد خاص آنزیم ناشی شده‌اند (۳۷، ۳۹، ۴۰ و ۵۰).

نقش فیزیولوژیکی پلی‌فنل اکسیداز در گیاهان

الف- عوامل بیماریزا و آنزیم(های) پلی فنل اکسیداز در گیاهان

فنلها دسته‌ای از مواد محافظت‌کننده در برابر میکروارگانیسمها هستند. اگرچه

میکروارگانیسمها در مقابله با آنها به ترفندهای ویژه‌ای دست می‌زنند، اما این مواد به عنوان توانهای بالقوه در مکانیسم دفاعی گیاهان محسوب می‌شوند. با تبدیل دی‌فنلها (یا منوفنلها) به شکل کوئینونی، موادی باسمیت زیاد حاصل می‌شوند که می‌توانند با پیوستن به ترکیبهای آمینی مانند اسیدهای آمینه، ترکیبهای سمی‌تری بوجود آورند. این مسأله را می‌توان در مورد مقاومت رقمهای مقاوم سیب در برابر انواع عوامل بیماریزای قارچی مشاهده نمود. بدین‌صورت که ۳ـ هیدروکسی فلورتین به‌وسیله آنزیم فنلاز اکسید شده و اورتوکوئینونن تشکیل می‌شود؛ ماده فوق مانع رشد و نمو بیشتر قارچ می‌شود (۳).

مثالهای بسیاری در افزایش فعالیت آنزیم در پی حملهٔ میکروارگانیسمها وجود دارد. کاتکول اکسیداز نهفته[۱] در گیاه گوجه‌فرنگی با حمله فوزاریوم[۲] و در ماش تحت آلودگی با Botrytis آزاد می‌شود. مقاومت ریواس به Sphaeotheca ناشی از مقدار و برهم‌کنش کاتکول اکسیداز، کلروژنیک اسید[۳] و عامل احیاکننده‌ای مثل اسید آسکوربیک است. مثالهای فوق نقش مثبت این آنزیم را نشان می‌دهند، اما مثالهای فراوانی نیز وجود دارند که خلاف این موضوع را نشان می‌دهند. در رقمهای زراعی حساس گوجه‌فرنگی نسبت به عامل بیماریزای Verticillium، مقدار مواد فنلی، فعالیت پراکسیدازی و پلی‌فنل‌اکسیدازی بیشتر از رقمهای زراعی مقاوم است. در آلودگی گوجه‌فرنگی به نماتدها، مقدار افزایش آنزیم در رقمهای زراعی حساس و مقام تفاوتی با هم ندارند. نژادهای حساس *Setaria italica* نسبت به نژادهای مقاوم، مقدار کاتکول اکسیداز بیشتری دارند (۴۰). از طرفی پژوهشها نشان می‌دهند که بین افزایش کاتکول اکسیداز و افزایش حساسیت در برابر بیماریها، رابطه مستقیمی وجود نداشته و ارتباط میان بخشهای پوسیده شده با آنزیم نیز از اثرات ثانوی محسوب می‌شود.

نوعی سیب‌زمینی وحشی به نام *(Solanum berthaulit) Hawkes* در برابر

1- Latent
2- Fusarium
3- Chlorogenic acid

حشراتی مثل شته‌ها (aphids)، Leaf hoppers، Flea beetles، Spider mites و سوسک سیب‌زمینی کلرادو (Colorado potato beetle) بسیار مقاوم است (۳۷). این مقاومت از وجود کرکهای غده‌ای برگی (Foliar glandular trichome) ناشی شده است. کرکها دو نوع هستند (A و B). طول نوع B ۶۰۰ - ۹۵۰ میکرومتر است و مخلوط چسبناکی از اسیدهای چرب (با زنجیرهٔ کوتاه و متوسط استری‌شده) و ساکارز ترشح می‌کنند که مانع تغذیه شته‌های سبز هلو می‌شوند. کرکهای نوع A با طول ۱۲۰-۲۱۰ میکرومتر، به شکل tetralobulate هستند.

کرکها هنگام شکسته‌شدن توسط حشرات موادی را ترشح می‌کنند که به‌وسیله آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز محلول پلیمریزه می‌شوند. پلی‌فنل‌اکسیداز ۷۰٪ کل پروتئینها را در این کرکها تشکیل می‌دهند (۳۴).

علاوه بر افزایش فعالیت کاتکول اکسیدازی در طی برهم کنش با عوامل بیماریزا، مقدار پلی فنل‌اکسیداز (کاتکول اکسیداز) در اثر ایجاد زخم یا طی تابش اشعه گاما نیز افزایش می‌یابد (۳۰).

در هرحال تاکنون مکانیسمی برای عمل آنزیم در طی برهم‌کنش با عوامل بیماریزا و به‌طورکلی تنش‌زا ارائه نشده است زیرا واکنش فوق فقط در موارد خاص اتفاق می‌افتد و تنها بخشی از سیستم دفاعی گیاهان به شمار می‌رود.

ب- *اثر کاتکول اکسیداز بر رشد و نمو*

در برخی از بررسیها مشخص شده است که پلی‌فنل اکسیدازها بر رشد و نمو موثر هستند. براساس گزارش پولگ[۱] و گلدن[۲] (۳۷) اکسین‌ها (IAA) از بر هم‌کنش کوئینونها با تریپتوفان حاصل می‌شوند و براساس نظر آنها این عمل تنها در بافتهای زخمی اتفاق می‌افتد. ولی اثر کاتکول اکسیداز بر مقدار IAA در گیاهان قطعی نیست (۳۹، ۴۰).

توانایی رأس ساقه‌های هلو برای پیوندزنی با فصلهای سال تغییراتی را نشان

1- Poleg 2- Golden

می‌دهد، ولی این توانایی ارتباطی با فعالیت کاتکول اکسیداز نشان نمی‌دهد. باسکوک[۱] و همکاران محصول اکسیداسیون فلوریدزین[۲] را که به‌وسیله آنزیم انجام می‌شود مسئول بوجود آمدن ترکیبهای موثر بر ریشه‌دهی قلمه‌های سیب معرفی کردند(۳۹).

به‌طورکلی نقش پراکسیدازها و پلی‌فنل اکسیدازها در تمایز سلول گیاه در ارتباط با اثر آنها در بیوسنتز لیگنین[۳] است. پلی‌فنل‌اکسیداز به‌طور غیرمستقیم قادر به تنظیم ساخت ترکیبهای فنلی است که در اندامزایی و نمو پریموردیوم ریشه نقش دارند. گونزالس[۴] و همکاران با اثر مواد بازدارنده و آزادکننده اتیلن فهمیدند که ریشه‌زایی در فندق با افزایش مقدار اتیلن (روی سیستم القایی اکسین ـ سیتوکینین اثر دارد)، پراکسیدازها و پلی‌فنل ـ اکسیدازها همراه است. افزایش این دو آنزیم به چوب‌سازی سلولهای پریمور ـ دیومی ریشه در لپه‌های فندق مربوط بوده است (۲۵).

شواهد دیگری در مورد عمل این آنزیم و درگیری آن در مراحل نموی گیاه وجود دارند. درکشت سلولی هویج، زمان ظهور کاتکول اکسیداز به رویان‌زایی مربوط است و این آنزیم درحقیقت شاخص مرحلهٔ نموی معینی محسوب می‌شود (۳۹). در سالهای اخیر نقش آنزیم در نمو گل بررسی گردیده است (۴۸). با جداسازی ژنی که مسئول ساخت پلی‌فنل‌اکسیداز در مریستم زایشی گیاه گوجه‌فرنگی است (مقدار زیادی پلی‌فنل اکسیداز تولید می‌کند) و بررسیهای بعدی به این نتیجه رسیده‌اند که این ژن در اندامهای گل در حال نمو به مقدار زیادی بیان شده و شاخص مرحله نموی است و می‌توان از آن به عنوان عاملی جهت تشخیص پریموردیوم زایشی و رویشی استفاده کرد (۳).

مواد و روشها

ویژگی گیاه‌شناختی

سرده ارس یا سروکوهی Juniperus در ایران گونه‌های متعددی ازجمله *J.excelsa*،

1- Bassuk
2- Phloridzin
3- Lignin
4- Gonzalez

J.foitidisima، *J.sabina*، *J.commonis* دارد. نام گونهٔ گیاه مورد بررسی، براساس نظر قهرمان (از دانشکده علوم دانشگاه تهران) *J.excela* است، ولی جوانشیر (از دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران) گیاه مورد بررسی را در دوگونه مجزا قرار می‌دهد و براساس تک پایه یا دوپایه بودن در گونه *J.excelsa* (تک پایه) و *J.polycarpos* (دو پایه) معرفی می‌نماید (مذاکرات حضوری). این سرده به تیرهٔ Cupressacea و از مخروطیان بومی ایران است. در این مقاله هرجا که کلمه ارس بکار رود منظور گونه مورد بررسی *J.excelsa* است.

ارس درختی با ارتفاع متوسط (در بعضی مواقع مرتفع) دوپایه یا یک پایه با تاجی بسیار متفاوت و شاخه‌هایی فراوان، مدور یا کمی زاویه‌دار و اغلب آویخته است. برگها، درگیاه با ساقهٔ جوان، کوچک، فاقد دمبرگ، در قاعده چسبیده و کشیده شده روی ساقه و در نوک تیز و نیشدار هستند. طرز قرارگیری آنها در چرخهٔ سه‌تایی است. برگها دو شکلی بوده به‌طوری که برگها در دانه رستها و نهالها، سوزنی و سه پهلو ولی در درختان فلسی و پولک مانند هستند. گلها تک جنس، مخروط یا سنبله نر کروی، تخم مرغی، شامل فلسهای مدور برگ لادنی، کمی روی هم قرار گرفته و حامل ۲، ۴، ۶ و ۸ پرچم (هر پرچم در سطح زیرین حامل بساک یا کیسه‌های گرده) هستند. مخروط ماده فلسهایی دارد که لبه‌های آن به هم چسبیده، فقط فلسهای بالایی آن بارور و هرکدام حامل یک یا دو تخمک ایستاده هستند. فلسهای پایینی باز و در لبه‌ها به‌طور کامل به هم پیوسته هستند. شکل مخروط ماده ستهٔ کروی یا شفت مانند، هنگام رسیدن کم و بیش آبدار و هریک ۳ تا ۸ فلس یا پولک کم و بیش به هم پیوسته دارند (هرگز از محور مخروط جدا نمی‌شوند). دانه‌ها ۳ تا ۶، گاهی ۹ عدد یا بیشتر (۱۲) عدد، فاقد باله هستند. گلها در بهار ظاهر می‌شوند و میوه در آبان سال دوم می‌رسد. در هنگام رسیدن، میوه به رنگ سیاه مایل به آبی است. عوامل محیطی از جمله دما، بارندگی و شرایط جغرافیایی بر تعداد دانه‌ها در مخروط نر اثر می‌گذارد. دانه‌ها به‌طور معمول یک رویان داشته که تا دوسال

بعد از لقاح زنده است. یکسال بعد از رسیدگی میوه، رویان چروک می‌خورد و خشک می‌شود(۸).

بررسیها نشان می‌دهند که قوهٔ نامیه یک رویان زنده در دانه، به شرایط محیطی و زیستگاه وابسته است (جدول شمارهٔ ۱). تلاشهایی برای رویاندن دانه‌های نارس (زرانکیوا[۱] ۱۹۷۷)(۲۸) در شرایط آزمایشگاهی و دانه‌ها در شرایط مختلف (کروری و همکاران ـ نتایج در آینده منتشر خواهد شد[۲]) و یا تحریک ریشه‌زنی بر قلمه‌های گیاه انجام شده است (رولر ۱۹۷۱)(۲۸).[۳]

جدول ۱ـ۱ـ تأثیر موقعیت جغرافیایی روی تولید دانه در هر میوه و درصد زنده مانی جنین در مناطق مختلف پاکستان

موقعیت	دانه در میوه	درصد زنده مانی دانه
کاچ مانجی	۲	۳
کوشنوب	۵	۲۵
ساسنامانا	۴	۱۷/۶
زیارت	۳/۸۸	۱۸/۵

این‌گونه به صورت طبیعی در ارتفاعات بالا رشد می‌کند. رویش روی شیب باعث محدودیت رشد این درخت می‌شود. در کشورهای پیشرفته، مهمترین استفاده اقتصادی ارس کاربردشان در صنعت مدادسازی است(۲۸). روغن استخراج شده از مخروطهای ماده ارس در صنعت داروسازی و در صنعت نوشابه سازی بکار می‌رود.

ارس ویژگی گز روفیتی داشته و روی صخره یا زمینهای سنگلاخی خشک و نواحی با

1- Zherankiva

۲- تحقیقات فوق در راستای طرح مطالعات اکوفیزیولوژی ارس در Juniperus و زیر طرحهای بسیاری‌سراسر ایران اجرا می‌گردد.

3- Ruller

بارندگی بسیار پایین رشد می‌کند. رشد درختان بسیار ناچیز و وضعیت تجدید حیات آنها محدود است. به این دلیل احیای مجدد جنگل به آسانی امکان‌پذیر نیست. این مسأله در کشورهایی که ارس بومی آنها است مانند کشورهای اتحاد جماهیر شوروی سابق (Vick, ۱۹۷۲؛ Chub, ۱۹۷۳)، ایران (Javanshir, ۱۹۷۴) و پاکستان (Khattak ۱۹۸۲ & shaikh,) و (Repp & Beg, ۱۹۶۶) وجود دارد(۲۸). کوششهای زیادی برای احیای نواحی کوهستانی بلوچستان پاکستان با ارسها انجام شده که نتیجه چشمگیری نداشته است (۲۸).

ارس به‌طور معمول به صورت توده‌های کوچک یا بزرگ در جنگلهای باز در ارتفاعات ۵۰۰ متر تا ۲۸۰۰ متر می‌روید. در ارتفاعات البرز (درحد ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ متر) در نواحی شمال شرقی در ارتفاعات گلستان، بین مینودشت و بجنورد، جنگلهای انبوهی تشکیل داده و در نواحی جنوبی نیز جنگلهای تنکی از آن همراه با پایه‌های بسیار قطور و قدیمی دیده می‌شود (۸).

قاسمی (۱۳۶۵) با کاشت نهالهایی در عرصه طبیعت و باغ، اثر آبیاری را بر رشد ارس بررسی نمود. نتایج حاکی از تأثیر مثبت آبیاری بر رشد ارس بوده‌اند (مذاکرات حضوری).

موقعیت منطقه مورد مطالعه

وضعیت جغرافیایی

منطقهٔ سیراچال در ۴۰ کیلومتری شمال کرج و در مسیر جاده کرج ـ چالوس قرار دارد. عرض جغرافیایی آن بین ′۳۵°۵۹ الی ′۳۶°۳ و طول جغرافیایی بین ′۵۱°۸ الی ′۵۱°۱۳ قرار دارد.

منطقه کوهستانی و وسعت آن حدود ۱۵۰۰ هکتار است. پست‌ترین نقطه آن ۱۷۸۰ متر و بلندترین قله آن ۲۹۱۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارد. جبهه یا جهت عمومی منطقه

به‌طور عمده شمالی و جنوبی بوده و در جهات جنوبی، شیب تندتر از جهات شمالی است. شیب بیشتر نقاط بین ۴۰ تا ۷۰٪ است. نقاطی که شیب آنها کمتر از ۲۰٪ و یا بیشتر از ۱۰۰٪ باشد، بسیار کم است.

زمین زراعتی در داخل محدوده مورد مطالعه بسیار کم بوده و اغلب در کف دره‌ها و یا نقاط کم شیب واقع شده است. در این محدوده دو روستا وجود دارد.

تعداد چشمه‌های موجود که آب به نسبت دائمی دارند، ۶ عدد است. تعدادی نیز آب فصلی دارند و در تابستان، یا خشک شده و یا سطح مرطوبی را تشکیل می‌دهند. رودخانه مورود از داخل منطقه عبور کرده و رودخانه کرج در ضلع شمالی و غربی آن جریان دارد.

وضعیت آب و هوایی

رژیم بارندگی منطقه، مانند اکثر نقاط ایران، تحت تأثیر مراکز کم‌فشار و بارانزای دریای مدیترانه به سمت شرق ایران قرار دارد. از طرفی نیز جبهه‌های حاصل از دریای مازندران پس از برخورد با ارتفاعات قسمت شمالی در صورت کافی بودن قدرت بارانزایی، تولید بارندگی می‌کنند. براساس آمار بارندگی ایستگاه آسارا (۷۴-۱۳۳۷) که نزدیکترین ایستگاه به منطقه است، متوسط بارندگی سالیانه ۵۳۱/۶ میلیمتر محاسبه شده است. تقریباً ۹۰٪ بارندگی در ۷ ماهه آبان تا اردیبهشت ماه نازل می‌شود.

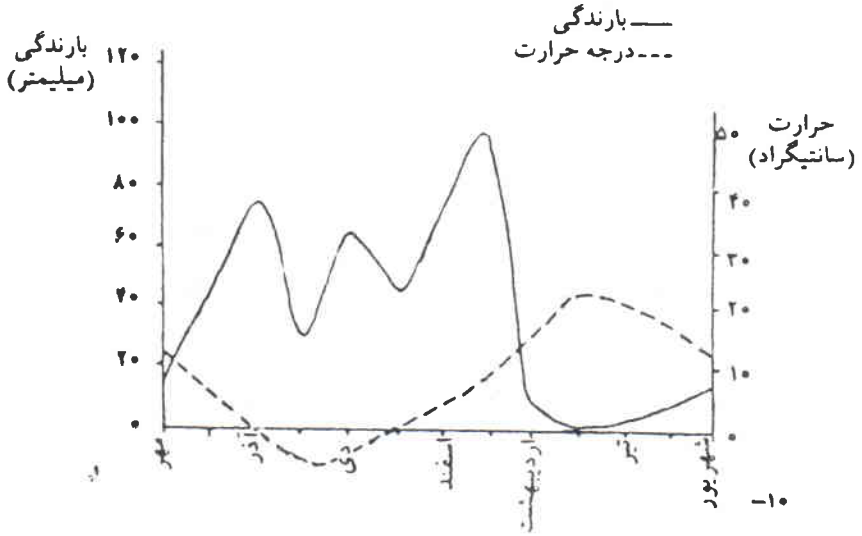
فروردین پربارانترین ماه و زمستان پربارانترین فصل سال است (جدول ۲). حداکثر و حداقل بارندگی سالیانه در طی دوره ۳۹ ساله فوق به‌ترتیب ۹۷۸ و ۲۴۳ میلیمتر بوده و طول فصل خشک در سالهای مختلف از ۳ تا ۵ ماه است (شکل شماره ۲).

جدول شماره ۲- توزیع فصل بارندگی سالیانه در ایستگاه آسارا (۷۴-۱۳۳۷)

	پاییز	زمستان	بهار	تابستان
بارشهای آسمانی ٪	۲۵/۱	۳۸/۲	۳۴/۲	۲/۵

بارشهای آسمانی برحسب ارتفاع تغییر می‌کند. تغییرات ارتفاعی آن در حوضه سد کرج براساس محاسبات انجام یافته از فرمول p=0.2h-80 پیروی می‌کند و آهنگ افزایش بارندگی را در هر کیلومتر ۲۰۰ میلیمتر نشان می‌دهد.

اقلیم منطقه براساس روش گوسن، استپی سرد بوده و در طبقه‌بندی آمبرژه در اقلیم نیمه‌مرطوب قرار می‌گیرد. در طی دوره ۳۹ ساله حداکثر مطلق دما، ۳۸/۲ درجه سانتیگراد در تیرماه سال ۱۳۶۰ و حداقل آن ۳۰/۵- درجه سانتیگراد در بهمن‌ماه سال ۱۳۶۱ بوده است. ماه دی سردترین ماه سال و ماه تیر گرمترین ماه سال است، میانگین تعداد روزهای یخبندان حدود ۱۳۹ روز گزارش شده است (۱).



شکل شمارهٔ ۲ـ منحنی آمبروترمیک ایستگاه آسارا

وضعیت زمین‌شناسی

تخریب سنگها که بیشتر توف و آهکی هستند، در حد مکانیکی است (به علت کوهستانی‌بودن آب و هوا)، تخریب مکانیکی که به‌طور دائم بر این سنگها اثر می‌گذارد، در ایجاد سنگهای گوشه‌دار موثر است. از نظر سنگ‌شناسی آغاز دوران سوم

زمین‌شناسی با فعالیت تکنونیکی و فورانهای آتشفشانی همراه بوده که نمونه آن تشکیلات سبز البرز یا توف‌ها است و قسمت اعظم منطقه را می‌پوشاند. توف مواد انفجاری آتشفشانی است که به طور مستقیم و یا غیرمستقیم به محیط رسوبی وارد شده و تشکیل توف را داده است. از نظر ضخامت سه نوع توف با لایه‌های نازک، ضخیم و متغیر در منطقه وجود دارد (۱).

وضعیت خاک

خاک منطقه را می‌توان خاکهای کوهستانی نامید که روی اراضی با شیب زیاد و مرتفع قرار دارند. باتوجه به ارتفاع از سطح دریا، مراحل تکمیل و دگرگونی خاک متغیر و غیریکنواخت بوده و دو عامل بارندگی و دما در تغییر و تحول آنها دخالت دارند. بیشتر جاها خاک در اثر فرسایش از بین رفته و سنگ مادری در آن ظاهر گشته است.

تشکیل خاک به دلیل سردی هوا و به ویژه در شیبهای تند جهات جنوبی که در آنها خاک و واریزه‌هایی که در اثر خردشدن سنگها بوجود آمده و شسته می‌شوند، خیلی کند است. از طرفی تراکم پوشش گیاهی روی شیبهای تند کم بوده و مواد آلی لازم برای مقاوم‌کردن خاکدانه وجود ندارند. درنتیجه خاک حالت ثابت خود را از دست می‌دهد (۱).

منابع گیاهی مورد استفاده

منابع گیاهی استفاده شده در این پژوهش شامل اندامهای مختلف درختان ۷۰ ـ ۸۰ ساله ارس موجود در منطقه براکنش طبیعی البرز جنوبی (ایستگاه تحقیقات سیراچال) می‌شود.

برای بررسی تغییرات کمی و کیفی پروتئینی و ایزوآنزیمی، ۴ درخت نر (M)، ۴ درخت نر ماده (FM) و ۴ درخت ماده (F) در ایستگاه تحقیقات سیراچال انتخاب

گردیده و علامت‌گذاری شدند. نمونه‌برداری جهت مطالعات کمی پروتئین، آنزیمی به صورت ماهانه و جهت مطالعات کیفی ایزوآنزیمی انجام گردیده است.

برای مطالعه ایزوآنزیمی از سرشاخه‌های سبز، شاخه (به قطر ۱-۰/۷ سانتیمتر)، مخروط نر، میوه یکساله، میوه دو ساله استفاده گردیده است.

روش مطالعه پروتئین و آنزیم

روش استخراج (۳۴)

در این پژوهش فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین کل در اندامهای برگ، شاخه، مخروط نر، مخروط ماده درخت ارس بررسی شده‌اند. به این منظور یک گرم از بافت گیاهی برگ (سرشاخه‌های سبز)، مخروط نر، مخروط ماده و شاخه وزن گردیده و با ۴ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری به خوبی سائیده شده‌اند.

برای مطالعهٔ شاخه، شاخه‌هایی به قطر ۱/۲-۰/۷ سانتیمتر را انتخاب نموده و برای همگن‌سازی با مدادتراش، تراشیده می‌شوند. زمان سائیدن برای تمام نمونه‌ها به‌طور ثابت نیم‌ساعت درنظر گرفته شده است. همگنا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری و بعد به مدت نیم‌ساعت با قدرت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. با پایان‌یافتن سانتریفوژ، محلول رویی در دمای ۴°C نگهداری شد. البته آنچه مسلم است بلادرنگ می‌بایست بررسیهای آنزیمی در مورد عصاره پروتئینی انجام شود. ولی طی بررسی مشخص شد که عصاره پروتئین حتی تا ۴ هفته پس از عصاره‌گیری نیز می‌تواند خواص کمی و کیفی خود را حفظ نماید.

روش تهیه محلول عصاره‌گیری (۴۹)

۱/۲ g	تریس (Tris)
۲ g	اسید آسکوربیک (Ascorbic acid)
۳/۸ g	بوراکس (Di. Sodium tetraborate)

۲g	$EDTA\text{-}Na_2$
۵۰g	پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ (PEG-2000)

مواد فوق را پس از توزین با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. pH محلول ۷ است. محلول عصاره‌گیری در یخچال نگهداری می‌گردد.

الکتروفورز به روش PAGE

الکتروفورز پروتئینها بر روی ژل پلی‌اکریل آمید (PAGE) به‌طور وسیعی برای مطالعه آنزیمی، ارزیابی فعالیت آنزیم‌ها در دوره‌های مختلف رشد و نمو و بررسی پروتئینهای واسرشته نشده مورد استفاده قرار می‌گیرد. جداسازی پروتئینها در این روش در اصل براساس غلظت بار پروتئینها (نسبت بار به جرم) صورت می‌گیرد.

طرز تهیه ژل تحرک مولکولها ۱۲٪ (۳۴)

۱۲۰ g	اکریل آمید (Acrylamid)
۲ g	بیس اکریل آمید (Acrylamid-bis)
۴۵/۶ g	تریس (Tris)

پس از توزین مواد فوق، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ml می‌رسد. pH ژل ۸ انتخاب شده است.

طرز تهیه ژل سفید ۵٪ (ژل هدایت ملکولها به داخل ژل تحرک ملکولها) (۳۴)

۵۰ g	اکریل آمید (Acrylamid)
۸/۳۳ g	بیس اکریل آمید (Acrylamid-bis)
۱۵ g	تریس (Tris)
۸/۴۱ g	اسید سیتریک (citric acid)

پس از توزین مواد فوق، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ml می‌رسد.

نحوه درست‌کردن محلول الکترولیت (۳۴)

۲۸/۸ g گلیسین (Glycine)

۶ g تریس (Tris)

پس از انحلال مواد فوق، حجم محلول به ۴۰۰۰ml می‌رسد.

نحوهٔ آماده کردن ژل الکتروفورز (۳۴)

بعد از آماده‌کردن دستگاه الکتروفورز، ژل را در سه مرحله در داخل دستگاه می‌ریزیم:

۱ـ ۳۵ میلی‌لیتر ژل ۱۲٪ + ۰/۹ میلی‌لیتر آمونیم پرسولفات + ۶ قطره تمد (Temed)

۲ـ ژل دوم مانند ژل اول تهیه می‌شود و بعد از بسته‌شدن ژل اول داخل دستگاه ریخته می‌شود.

۳ـ ۴۰ میلی‌لیتر ژل ۵٪ + ۱ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات + ۷ قطر تمد

بعد از ریختن ژل سوم شانه را به آرامی درون دستگاه می‌گذاریم. پس از بستن ژل، محلول الکترولیت را داخل دستگاه ریخته و شانه را خارج می‌کنیم. در این حالت دستگاه آماده تزریق عصاره گیاه است.

برای انجام مطالعات الکتروفورزی، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه استفاده شد و دستگاه با برق ۳۰۰ ولت و شدت جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر تنظیم می‌گردد. زمان جداسازی ایزوآنزیم‌ها حدود ۳ ساعت است (میزان حرکت عصاره در ژل ۱۰ سانتیمتر است).

نحوهٔ آماده کردن محلول آمونیوم پرسولفات (۳۴)

۱/۴ g آمونیوم پرسولفات را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ml می‌رسانیم.

۹-۲-۲- بررسی پلی‌فنل اکسیداز (۳)

به‌منظور بررسی مقایسه‌ای فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ارس، ۰/۱ml از عصاره پروتئین تهیه شده را به محلول زیر افزوده و پس از آنکه خوب مخلوط شد مقدار جذب را در ۴۸۰ نانومتر می‌خوانیم. در واکنش آنزیمی فوق DOPA در اثر فعالیت آنزیم به DOPA–chrome تبدیل می‌شود. مقدار آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین (Abs/min/mg pro.) و یا هر گرم وزن‌تر (Abs/min/g FW) محاسبه شد.

۲ ml	تامپون فسفات (۰/۲ M و pH=۶/۸)
۰/۱ ml	٪۰/۲۵ DL – Dopa

روش ظهور پلی‌فنل اکسیدازها روی ژل پلی‌آکریلامید (۴)

بعد از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲٪، برای ظهور نوارهای مربوط به پلی‌فنل‌اکسیداز از مخلوط ترکیبات زیر استفاده شد:

۷۰ ml	تامپون فسفات (۰/۲ M و pH=۶/۸)
۳۰ ml	٪۰/۵ DL – Dopa
۰/۶ ml	٪۷۰ $CaCl_2$ $2H_2O$

ژلها به مدت ۲-۳ ساعت تا ظهور نوارهای قهوه‌ای رنگ مربوط به پلی‌فنل‌اکسیداز در معرف فوق و در تاریکی نگهداری شدند. طی تجربیاتی ملاحظه گردید که اگر برای ازبین‌بردن رنگ زمینه ژل به مدت یک شب در محلول ۱۰ میلی‌مول اسید آسکوربیک بگذاریم رنگ باندها نیز بسیار کمرنگ می‌شود. و اگر این مرحله حذف گردد، ژلها به شدت تیره می‌شوند. بدین‌جهت ژلها پس از ۲-۳ ساعت نگهداری در معرف رنگی، به

مدت یک شب در آب مقطر مانده و بعد ۵ ساعت در محلول ۱۰ میلی‌مول اسید آسکوربیک باقی می‌مانند.

بررسی آنزیم پراکسیداز (روش تغییریافته ۱۹)

پس از آماده‌سازی عصاره‌های حاصل از ارس، فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌وسیله معرف زیر سنجیده شد:

۴ ml تامپون استات (۰/۲ M و pH=۴/۸)

۰/۴ ml آب اکسیژنه ۳٪

۰/۲ ml بنزیدین (محلول در متانل ۵۰°) ۰/۰۱ مولار

بعد از تهیه ترکیب فوق بلافاصله ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده و بعد منحنی تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر رسم گردید و فعالیت آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین (Abs/min/mg protein) و یا هر گرم وزن تر گیاه محاسبه گردید.

روش ظهور پراکسیداز بر روی ژل

با خاتمه‌الکتروفورز ژلهای پلی‌اکریل آمید ۱۲٪، برای ظهور پراکسیدازها از معرف زیر استفاده شد:

۸۰ ml تامپون استات (۰/۲ M و pH=۴/۸)

۸ ml آب اکسیژنه ۳٪

۴ ml بنزیدین (محلول در الکل متانل ۵۰°، ۰/۰۲ M)

به مدت یک شب ژل در این محلول باقی مانده و بعد تا مطالعه و رسم الگوهای

ایزوپراکسیدازی در آب مقطر و در دمای ۴°c نگهداری شد (لازم به ذکر است که برای بدست‌آوردن ترکیب فوق آزمایشهای زیادی انجام شد که برای مثال تأثیر pH بر روی ظهور باندها یکی از آن آزمونها است).

غلظت‌سنجی نوارهای پروتئینی در ژل پلی‌اکریل آمید

غلظت‌سنج دستگاهی است که می‌تواند براساس غلظت نوارهای پروتئینی جداشده در یک نیمرخ الکتروفورزی طیف رسم کرده و درصد پروتئین تشکیل‌دهنده هر نوار را نسبت به‌کل براساس سطح زیر هریک از قله‌ها تعیین نماید.مطالعات غلظت‌سنج توسط دستگاه لایه‌نگار shimadzu مدل DR (CRT) بر روی mode جذب و به کمک لامپ تنگستن و کامپیوتر DR-13 انجام گردید. بدین‌ترتیب نوارها موقعیت‌یابی و غلظت‌سنجی شدند.

جهت یافتن طول موج مناسب برای لایه‌نگاری، طیف جذب یک باند پروتئین در محدوده طول موج ۳۷۰ ـ ۷۰۰ نانومتر رسم شد و بیشینهٔ جذب آب در ۵۶۰ نانومتر بدست آمد. پس از دستیابی به طول موج مناسب و انتخاب پارامترهای مناسب برای رسم بهترین طیف‌ها، لایه‌نگاری ژلها انجام گرفت.

سنجش میزان پروتئین

به‌منظور تعیین میزان پروتئین از روش Folin-lowry استفاده شد. این روش از روش بیوره مشتق شده است. در این واکنش ترکیب (مجموعه) پروتئین ـ مس قلیایی تشکیل می‌گردد که بعدها معرف فسفر مولیبدیک ـ فسفو تنگستینیک زرد را به رنگ آبی تیره احیاء می‌کند. این واکنش بسیار حساس می‌باشد و درصورت وجود مرکاپتانها و ترکیبهای متنوع دیگر در نتایج اشتباه پدید می‌آید. واکنش بیوره با مس (II) قلیائی و یک

نمک فسفرمولیبد و تنگستیت به معرف Folin-ciocalteu نامیده می‌شود که رنگ سبز ـ آبی با مجموعه‌های بیوره تریوزین و تریپتوفان پدید می‌آورد (۱۳).

معرف فولن تنها در pH اسیدی پایدار است، ولی احیاء در pH=۱۰ می‌تواند صورت گیرد. از این رو هنگامی که معرف فولن به محلول پروتئین ـ مس قلیائی افزوده شد، مخلوط بایستی به سرعت با ورتکس بهم‌زده شود.

در ابتدای کار برای سنجش پروتئین باید منحنی استاندارد را رسم کرد، بنابراین از روش لوی تغییر یافته (۱۳) به صورت زیر استفاده شد:

الف ـ معرف A: ۱۰۰ گرم از Na_2CO_3 در مقداری NaOH ۰/۵ نرمال حل می‌شود و حجم نهایی به یک لیتر می‌رسد.

ب ـ معرف B: ۱ گرم از $CuSO_4 . 5H_2O$ در مقداری آب مقطر حل می‌شود و حجم نهایی به ml ۱۰۰ می‌رسد. ۱ قطره اسید سولفوریک غلیظ برای حل‌شدن و شفاف‌شدن محلول لازم است.

پ ـ معرف C: ۲ گرم از تارترات سدیم پتاسیم در مقداری آب مقطر حل می‌شود و حجم به ml ۱۰۰ می‌رسد.

ت ـ معرف D: ۱۵ ml از معرف A، ۰/۷۵ ml از معرف B و ۰/۷۵ ml از معرف C با هم به شدت مخلوط می‌شود.

ث ـ معرف E: ۵ ml از معرف فولن را به ml ۵۰ آب مقطر اضافه کرده و به سرعت بهم می‌زنیم.

ج ـ برای رسم منحنی استاندارد از محلول mg/ml ۰/۳ سرم آلبومن گاوی (۳۰mg از سرم آلبومن گاوی در ۱۰۰ml آب دو بار تقطیر) استفاده گردید. در ۱۱ لولهٔ آزمایش ۱۶×۱۵۰mm مقادیر ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، و ۱ ml از محلول سرم آلبومن ریخته شد و برای دقت کار ۳ تکرار برای هر غلظت بکار برده شد.

چ ـ حجم لوله‌ها را با آب مقطر به یک ml رسانده به هر یک از آنها، یک ml از معرف D افزوده و به سرعت با ورتکس بهم می‌زنیم. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شوند.

ح ـ در مدت ۱۵ دقیقهٔ فوق، معرف E را تهیه کرده و پس از اتمام این مدت، ۳ ml از معرف را به لوله‌ها افزوده و در کمترین زمان با ورتکس بهم زده و مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار می‌دهیم.

خ ـ جذب نمونه‌های آماده شده را در طول موج ۶۶۰ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر shimadzo مدل uv-160 بدست می‌آوریم.

به‌منظور سنجش پروتئین تیمارهای مختلف، از ۰/۰۵ml از عصارهٔ پروتئین را در لولهٔ آزمایش ریخته و با افزودن ۰/۹۵ ml آب مقطر، حجم را به یک ml می‌رسانیم. روش کار همانند رسم منحنی استاندارد بوده و مراحل چ به بعد انجام می‌شود (۵).

نتایج

نتایج مطالعات کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و پروتئین محلول

نحوهٔ پاسخ گیاهان به محیط زیست از جنبه‌های مختلفی قابل بررسی است. در این جا ابتدا میزان کمی و کیفی پروتئینهای محلول و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز پلی‌فنل اکسیداز در ماههای مختلف بررسی می‌گردد و بعد ارتباط آن با عوامل مختلف به بحث گذارده می‌شود.

همان‌گونه که ذکر شد ۱۲ درخت انتخابی در کلیه آزمونها ثابت است. این ۱۲ درخت از سه نوع پایه نر، نرماده و ماده، هر یک در ۴ تکرار می‌باشند. آزمون روی اندامهای مختلف سرشاخه‌های سبز، شاخه و مخروط‌های نر و ماده انجام شد.

تغییرات کمی فعالیت پراکسیداز در فصول مختلف

در شکلهای شمارهٔ ۳، ۴ و ۵ منحنی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در واحد میزان جذب در دقیقه در هر گرم وزن تر نمونه گیاهی (سرشاخه‌های سبز، شاخه، مخروط نر و مخروط ماده) در پایه‌های مختلف نر، نرماده و ماده درختان ارس با احتساب انحراف از معیار آنها رسم گردیده است. همان‌گونه که در شکل شمارهٔ ۳ مشاهده می‌شود تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در سرشاخه‌های سبز و شاخه‌ها صرف‌نظر از اختلاف در مقدار آنزیم، مشابه هم است. مقدار آنزیم پراکسیداز با شروع فصل رویش (بهار) کاهش می‌یابد و در مرداد ماه به کمترین میزان خود می‌رسد. از مردادماه به بعد افزایش فعالیت پراکسیداز شروع شده و در آبان‌ماه به بیشینه مقدار خود می‌رسد. کاهش آنزیم تا دی‌ماه و بعد افزایش آن به طرف بهار از تغییرات دیگر آن است. بنابراین، در دو فصل بهار و پاییز که دوره گذار رویشی است مقدار آنزیم پراکسیداز بیشینه بوده، درحالی که در تابستان و بهار در کمینه است.

به علاوه مقایسه تغییرات منحنی فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه‌های گیاهی در پایه‌های مختلف نر، نرماده و ماده نشان می‌دهد که صرف‌نظر از تفاوتهای فردی، تغییرات مشابهی دارند.

در شکل شمارهٔ ۴ تغییرات فصلی فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی تکوین مخروط ماده از

زمان لقاح تا رسیدن میوه که از اردیبهشت سال اول تا آبان سال دوم به طول می‌انجامد بررسی شده است (در واحد Abs/min/g FW). منحنی تغییرات نشان می‌دهد که در طول دو سال، فعالیت آنزیم پراکسیداز ۳ قله بیشینه و ۳کمینه داشته است که بیشترین فعالیت آن در خردادماه سال دوم و کمترین مقدار آن در آبان‌ماه سال دوم یعنی در میوه‌های رسیده است. تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز مخروط ماده در سال اول مشابه تغییرات آنزیم در سرشاخه‌های سبز و شاخه بوده است، و در سال دوم، فعالیت آنزیم پس از افزایش بسیار شدید تا نزدیک صفر پایین می‌آید.

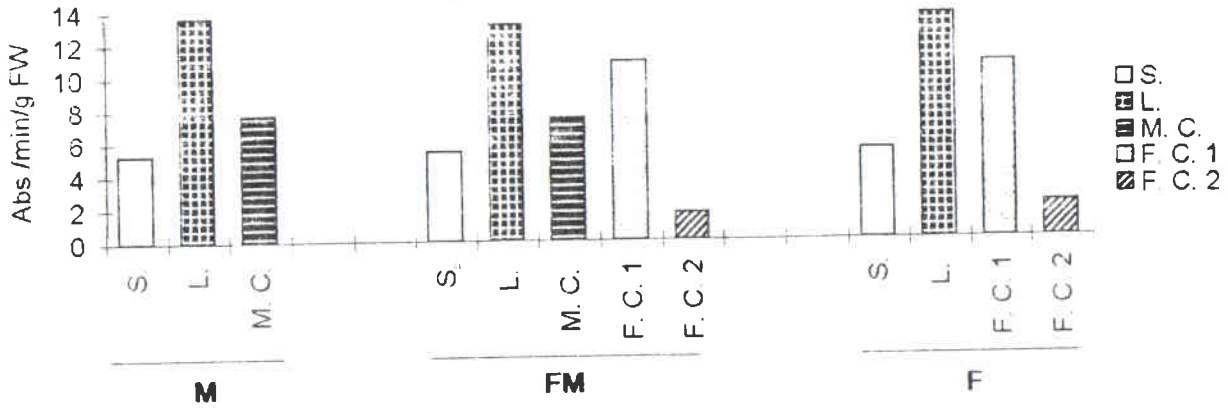
در شکل شمارهٔ ۵ تغیرات فصلی فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی تکوین مخروط نر تا قبل از گرده‌افشانی در هر دو پایه‌های نر و نرماده درختان ارس یعنی در طول پاییز و زمستان، رسم شده است. البته پیدایش مخروط نر در اواخر بهار و اوائل تابستان است که به علت کوچک‌بودن، تجزیه آن امکانپذیر نیست. بررسی نشان داد که در هر دو پایه‌های نر و نرماده، فعالیت آنزیم پراکسیداز مخروط نر از مهرماه تا آبان‌ماه کمی افزایش یافته و بعد تا دی‌ماه سیر نزولی داشته و با شروع فصل رویش مقدار آن افزایش می‌یابد.

شکل شمارهٔ ۶ میزان فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز را در اندامها و پایه‌های مختلف ارس نشان می‌دهد. در این شکل دو مطلب مشاهده می‌شود: ۱ـ مقایسه آنزیم پراکسیداز در اندامهای مختلف شاخه، سرشاخه‌های سبز، مخروط نر و مخروط ماده (سال اول و دوم). ۲ـ مقایسهٔ میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز اندامهای مختلف در پایه‌های نر، نرماده و ماده.

همان‌گونه که می‌بینیم سرشاخه‌های سبز بیشترین میزان فعالیت پراکسیدازی و مخروط ماده سال دوم کمترین میزان فعالیت را دارد. باتوجه به کاهش کلی فرایندهای متابولیسمی در مخروط ماده سال دوم، کاهش میزان پراکسیداز طبیعی است. اگر به فعالیت آنزیم پراکسیداز در سرشاخه‌های سبز نمره ۱۰۰ داده شود میزان فعالیت شاخه، مخروط نر و مخروط ماده سال اول و دوم به‌ترتیب ۴۰، ۶۰، ۷۵ و ۱۵ است.

مقایسه میزان فعالیت در پایه‌های مختلف نشان می‌دهد که هر سه پایه شباهت زیادی به هم دارند و هیچ جدایی سیستماتیکی در آنها مشاهده نمی‌شود.

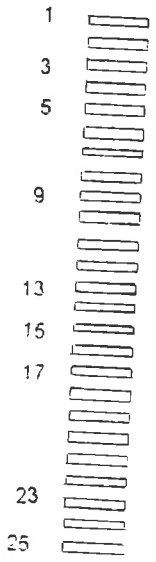
شکل ۶- مقایسه فعالیت آنزیم پراکسیداز اندامهای مختلف شاخه (S)، سرشاخه‌های سبز (L)، مخروط نر (M.C) و مخروط ماده یکساله و دوساله (F.C.2 و F.C.1) پایه‌های نر (M)، نرماده (FM) و ماده (F) درختان ارس در فصل پاییز



بررسی کیفی آنزیم پراکسیداز در ارس

آنزیم پراکسیداز در ارس تعداد زیادی ایزوآنزیم دارد که در سه گروه، با حرکت تند، کند و متوسط قرار دارند. در پژوهش حاضر آنزیم پراکسیداز در ۴ اندام، سرشاخه‌های سبز (برگ)، شاخه، مخروط نر و مخروط ماده آزمون شد و در کل ۲۵ ایزوآنزیم شناسایی گردید. باتوجه به تفاوت آنها در فصول و پایه‌های مختلف، در شاخه ۲۳ ایزوآنزیم، در سرشاخه‌های سبز ۱۹، در مخروط نر ۲۰ و در مخروط ماده ۲۱ ایزوآنزیم از هر سه گروه با حرکت تند، کند و متوسط وجود دارد.

۲۵ جایگاه ایزوآنزیمی تشخیص داده شده ۱ تا ۲۵ (از کندرونده به تندرونده) نامگذاری شدند. به این ترتیب برای هر ایزوآنزیم هویتی درنظر گرفته شد که در کل مقاله ثابت است، به‌طوری که هنگامی از نوار یا ایزوآنزیم ۲۵ در اندامهای مختلف صحبت می‌شود همان ایزوآنزیم نامگذاری شده در زیر است:



در این قسمت به مقایسه تغییرات کمی وکیفی آنزیم پراکسیداز شاخه، سرشاخه‌های سبز، مخروط‌های نر، نرماده و ماده در تک‌تک درختان می‌پردازیم.

شکل شمارهٔ ۱۷ به پایه‌های نر مختلف ارس متعلق است. تفاوتهای فردی در الگوهای ایزوآنزیمی ۴ درخت بسیار فاحش است. درخت M۱ نسبت به بقیه درختان ایزوآنزیم‌های فراوانتری دارد. کاهش فعالیت آنزیمی با ناپدیدشدن یا پدیدارشدن نوارهای خاصی ارتباط ندارد. چنانچه در درخت M۱ که تعداد ایزوآنزیم‌ها در ابتدا (دی‌ماه) و انتها (فروردین‌ماه) برابر بوده، ولی تفاوت در میزان فعالیت بسیار فاحش است، درحالی که در M۲ با اینکه تعداد ایزوآنزیم‌ها در انتهای زمستان کم شده ولی فعالیت باز هم افزایش می‌یابد.

درخت M۱ و M۲ بیشترین تفاوت را بین میزان کمینه و میزان بیشینه فعالیت آنزیم پراکسیداز داشته درحالی‌که M۳ کمترین اختلاف را دارد و در همین درخت که کمترین اختلاف را بین قلهٔ کمینه و قله بیشینه است تغییرات کیفی آنزیم بیشتر می‌باشد.

در شکلهای شمارهٔ ۱۸ و ۱۹ که نشان‌دهندهٔ تغییرات کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز در پایه‌های نرماده و ماده است نیز همان وضعیت حاکم است و نمی‌توان رابطه‌ای منطقی را بین کم‌شدن یا زیادشدن فعالیت آنزیم با حضور ایزوآنزیم خاصی پیدا کرد. درواقع نمی‌توان تغییرات کیفی خاصی را به اثر عوامل محیطی نسبت داد.

برخلاف نحوهٔ تغییرات کیفی آنزیم پراکسیداز که فاقد نظم خاصی است تغییرات کمی آنزیم بسیار منظم است به‌طوری‌که در کلیه نمونه‌ها فعالیت پراکسیداز در تابستان درحد کمینه و در بهار و پاییز در بیشینه است.

شکلهای شمارهٔ ۲۰، ۲۱ و ۲۲ تغییرات کمی و کیفی سرشاخه‌های سبز هر یک از درختان نر، نرماده و ماده را مقایسه می‌نماید نتایج نشان می‌دهند که تغییرات فردی بین درختان فوق بسیار محدود است. کاهش تعداد ایزوآنزیم‌ها با کم‌رنگ‌شدن آنها در تابستان با کاهش فعالیت پراکسیداز ارتباط دارد، درحالی‌که کاهش فعالیت پراکسیداز در

زمستان نسبت به پاییز با تعداد و نوع نوارهای ایزوآنزیمی مطابقت ندارد. و در اصل با اینکه فعالیت پراکسیداز در زمستان کم می‌شود، ولی ایزوآنزیم‌های آن به‌طور محسوسی کاهش نمی‌یابد.

مقایسه شکلهای شمارهٔ ۲۳ و ۲۴ نشان می‌دهد که در طی تکوین مخروط نر دو نوار کندرونده ثابت وجود دارد، ولی نوارهای تندرونده درختان مختلف بین ۵، ۲ و ۱ عدد متفاوت است.

به‌استثناء مخروط‌های نر درخت نرماده ۱ و ۲، سایر درختان الگو مشابهی نشان دادند. مقایسه تغییرات فصلی کمی و کیفی نشان می‌دهد که به ظاهر ظهور برخی ایزوآنزیم‌ها در ابتدای زمستان، باعث کاهش فعالیت پراکسیداز می‌شود. این ایزوآنزیم‌ها به گروه ایزوآنزیم‌ها با حرکت متوسط متعلق هستند.

درخت نر شماره یک بیشترین فعالیت را داشته و در همین درخت نیز گسترهٔ فعالیت بیشینه و کمینه نیز چشمگیر است.

شکل شمارهٔ ۲۵ الگوی الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز را در طول تکوین مخروط ماده از زمان گرده‌افشانی تا رسیدن میوه در پایه‌های مختلف معرفی می‌نماید.

نتایج نشان می‌دهند که نوارهای ۱، ۲، ۳ از ایزوآنزیم‌های کندرونده، ایزوآنزیم‌های ۱۶ و ۱۷ با حرکت متوسط و ۲۴ و ۲۵ از ایزوآنزیم‌های تندرونده در مخروط ماده تازه لقاح‌یافتهٔ تمام پایه‌ها مشترک است. با ادامه تکوین در تابستان، نوارهای ۱ و ۲ و ۲۴ به کلی محو می‌شوند. در این هنگام ملاحظه می‌شود که میزان فعالیت آنزیم نیز به‌طور چشمگیری کاهش یافته است. در پاییز ایزوآنزیم‌های جدید بسیاری در هر سه منطقه ظاهر شده‌اند و با اینکه تعداد آنها بیشتر از ایزوآنزیم‌های موجود در بهار است ولی میزان فعالیت بیشتر نیست. بنابراین، ظاهراً دو ایزوآنزیم ۱ و ۲ دارای فعالیت بسیار زیادی دارند. در ابتدای زمستان با اینکه بر میزان رنگ‌پذیری بعضی نوارها افزوده شده ولی فعالیت کلی آنزیم پراکسیداز کاهش یافته است. در انتهای زمستان افزایش رنگ

بعضی ایزوآنزیم‌ها همسو با افزایش خفیف فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز است. در بهار که فعالیت کمی آنزیم تا ۲۰۰٪ افزایش می‌یابد نه تنها ایزوآنزیم جدیدی ظاهر نشده، بلکه بعضی ایزوآنزیم‌ها از بین رفته و میزان رنگ برخی دیگر نیز کاهش یافته است. در تابستان نیز کاهش فعالیت آنزیم به همراه تشکیل ایزوآنزیم‌های جدید است و در پاییز که زمان رسیدن مخروط ماده در سال دوم است و در این هنگام میوه به‌طور کامل بنفش شده و بافت میوه نرم شده و کم‌کم تجزیه می‌شود در کل فعالیت آنزیم کم شده و ایزوآنزیم‌ها نیز درحال ازبین‌رفتن می‌باشند. البته این موضوع فقط شامل پراکسیداز نمی‌شود و در اصل کل فرایندهای میوه درحال ازبین‌رفتن است. آخرین ایزوآنزیم‌های پراکسیدازی که از بین می‌روند نوارهای ۳ و ۵ هستند.

تغییرات کمی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در فصول مختلف

در شکلهای شمارهٔ ۷، ۸ و ۹ منحنی تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در واحد میزان جذب در دقیقه در هر گرم وزن تر نمونه گیاهی (سرشاخه‌های سبز، شاخه، مخروط نر و مخروط ماده) در پایه‌های مختلف نر، نرماده و ماده درختان ارس با احتساب انحراف از معیار آنها رسم گردیده است. همان‌گونه که در شکل شمارهٔ ۷ مشاهده می‌شود، تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در سرشاخه‌های سبز و شاخه‌ها تفاوت قابل‌توجهی با یکدیگر دارند. مقدار آنزیم پلی‌فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز با شروع فصل رویش (بهار) افزایش می‌یابد. میزان افزایش تا اواخر پاییز ادامه دارد و اوج فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز آذرماه است. با شروع زمستان از فعالیت آنزیم کاسته می‌شود، به‌طوری‌که در اوائل بهار مقدار آن به کمترین میزان خود در طول سال رویشی می‌رسد. پس کمینه فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز، بهار و بیشینه آن اواخر پاییز است.

منحنی تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در شاخه‌هاطرح دیگری را دنبال

می‌کند. به‌طوری‌که در ابتدای بهار همانند سرشاخه‌های سبز فعالیت آن افزایش می‌یابد. افزایش پلی‌فنل اکسیداز تا مردادماه ادامه می‌یابد. از آن پس مقدار آنزیم شاخه‌ها برخلاف سرشاخه‌های سبزکاهش می‌یابد و در آبان‌ماه به کمترین مقدار خود می‌رسد. سپس تااوائل زمستان یک افزایش سریع داشته، به‌طوریکه اوج فعالیت آن در اوائل زمستان است و در طی زمستان مقدار آن به‌طور خفیفی کاهش می‌یابد و با شروع فصل رویش به کمترین مقدار خود می‌رسد. پس در دو فصل یا دوگذار آب و هوائی یعنی بهار و پاییز میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز کمینه بوده، درحالی که در تابستان و زمستان درحد بیشینه است.

در شکل شمارهٔ ۸ تغییرات فصلی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در طی تکوین مخروط ماده از زمان لقاح تا رسیدن میوه که از اردیبهشت سال اول تا آبان سال دوم به طول می‌انجامد بررسی شده است (در واحد Abs/min/g Fw) منحنی تغییرات نشان می‌دهد که در طول دو سال فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ۲ قلهٔ بیشینه و ۳کمینه دارد که بیشترین فعالیت آن در پاییز سال اول است. ولی مقدار کمینهٔ آنزیم در سه حالت مخروط ماده تازه لقاح‌یافته (در بهار سال اول) مخروط ماده سال اول (در بهار سال دوم) و مخروط ماده رسیده (پاییز سال دوم) مشاهده می‌شود. مخروط ماده در طی سال دوم در اصل فعالیت آنزیمی (پلی فنل‌اکسیداز) کمی دارد، درحالی که اصل فعالیت آن در طی سال اول است.

در شکل شمارهٔ ۹ تغییرات فصلی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در طی تکوین مخروط نر تا قبل ازگرده‌افشانی در هر دو پایه نر و نرماده درختان ارس یعنی در طول پاییز و زمستان، رسم شده است. البته پیدایش مخروط نر در اواخر بهار و اوائل تابستان است که به علت کوچک بودن، تجزیه جداگانه آن امکانپذیر نشد. بررسی نشان دادکه در هر دو پایه نر و نرماده فعالیت آنزیم پراکسیداز مخروط نر در طول پاییز یعنی از مهر تا آذرکاهش خفیفی داشته و بعد با شروع زمستان به شدت نزول می‌کند و دوباره در طول زمستان تا شروع فصل رویش مقدار آن افزایش یافته و به میزان قبلی می‌رسد.

به علاوه مقایسه منحنی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نمونه‌های گیاهی در پایه‌های مختلف نر، نرماده و ماده نشان می‌دهد که صرف‌نظر از تفاوتهای فردی، تغییرات مشابهی دارند.

شکل شمارهٔ ۱۰ میزان فعالیت کمی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در اندامها و پایه‌های مختلف را نشان می‌دهد. در این شکل دو مطلب مشاهده می‌شود: ۱ـ مقایسه آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در اندامهای مختلف شاخه، سرشاخه‌های سبز، مخروط نر و مخروط ماده (سال اول و دوم) ۲ـ مقایسه میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌پراکسیداز اندامهای مختلف در پایه‌های نر، نرماده و ماده.

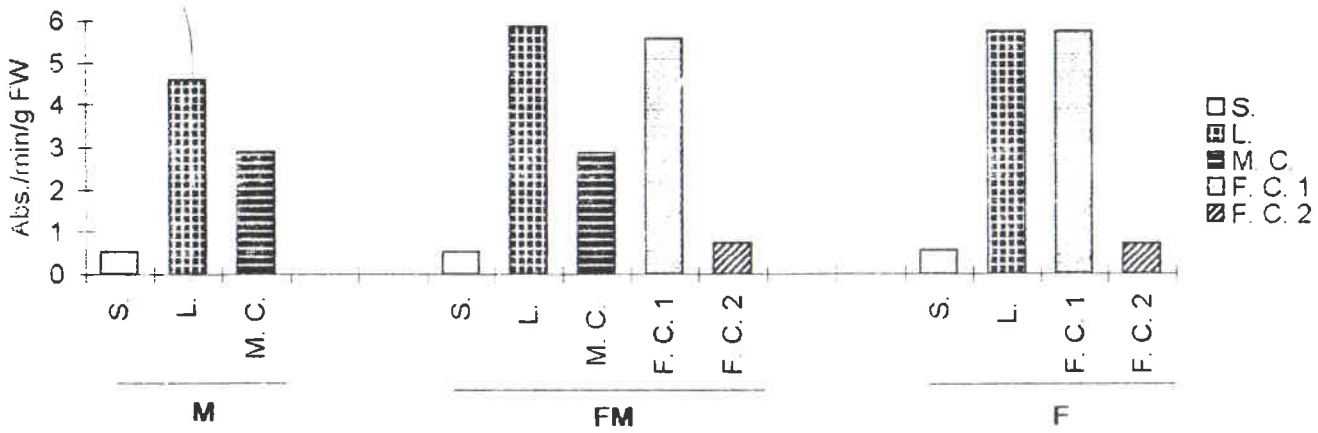
همان‌گونه که می‌بینیم سرشاخه‌های سبز و مخروط سال اول بیشترین میزان و شاخه و مخروط سال دوم کمترین میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیدازی را نشان می‌دهند. علت کم‌بودن فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازی این دو اندام کاهش کلی فرایندهای متابولیسمی در مخروط سال دوم (رسیده) و چوبی بودن یا تعداد کم سلولهای زنده در شاخه است.

مقایسه میزان فعالیت در پایه‌های مختلف نشان می‌دهد که هر سه پایه شباهت زیادی به هم دارند و هیچ جدایی سیستماتیکی در آنها مشاهده نمی‌شود.

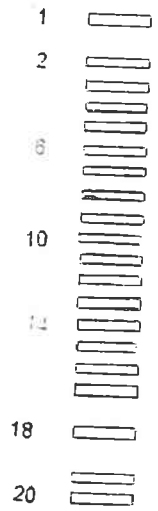
بررسی کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ارس

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ارس تعداد زیادی ایزوآنزیم دارد که در ۳ گروه، با حرکت تند، کند و متوسط قرار دارند. در پژوهش حاضر آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در ۴ اندام، سرشاخه‌های سبز، شاخه، مخروط نر و مخروط ماده آزمون شد که در کل ۲۰ ایزوآنزیم شناسایی گردید. باتوجه به تفاوت آنها در فصول و پایه‌های مختلف، در شاخه ۱۲، در سرشاخه‌های سبز ۱۸، در مخروط نر ۱۷ و در مخروط ماده ۱۸ ایزوآنزیم وجود دارد که به استثنای مخروط نر که فاقد ایزوآنزیم‌های تندرونده است. ایزوآنزیم‌ها در بقیه اندامها در سه گروه با حرکت تند، کند و متوسط قرار می‌گیرند.

شکل شمارهٔ ۱۰ مقایسه فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز اندامهای مختلف شاخه (S)، سرشاخه‌های سبز (L)، مخروط نر (M.C) و مخروط ماده یکساله و دوساله (F.C.2 و F.C.1) پایه‌های نر (M)، نرماده (FM) و ماده (F) درختان ارس در فصل پاییز



۲۰ جایگاه ایزوآنزیمی تشخیص داده شده از ۱ تا ۲۰ (از کندرونده به تندرونده) نامگذاری شدند. به‌این ترتیب برای هر ایزوآنزیم هویتی قائل شدیم که در کل مقاله ثابت است، به‌طوری‌که هنگامی از نوار یا ایزوآنزیم ۲۰ در اندامهای مختلف صحبت می‌شود همان ایزوآنزیم نامگذاری شده در زیر است:



در این قسمت به مقایسه تغییرات کمی وکیفی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز شاخه، سرشاخه‌های سبز مخروط‌های نر، نرماده و ماده تک‌تک درختان می‌پردازیم.

شکل شمارهٔ ۲۶ به پایه‌های نر ارس مختلف متعلق است. چنانچه مشاهده می‌شود تفاوتهای فردی فقط در الگوهای ایزوآنزیمی یکی از درختان (M_1) مشاهده می‌شود. درخت M_1 نسبت به بقیه درختان ایزوآنزیم‌های فراوان‌تری دارد. مشاهدات نشان می‌دهند که کمترین میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در بهار و پاییز با کاهش تعداد

ایزوآنزیم‌ها منطبق است. درخت M_1 که برخلاف بقیه پایه‌ها تعداد بیشتری ایزوآنزیم دارد از نظر میزان فعالیت کمی تفاوتی با بقیه درختها ندارد. بنابراین نمی‌توان همیشه انتظار داشت که با افزایش تعداد ایزوآنزیم تغییر ویژه‌ای در فعالیت کمی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بروز نماید.

شکلهای شمارهٔ ۲۷ و ۲۸ نیز همانند زیموگرام ۱۰ نظم خاصی دارند. البته همیشه پایه‌های خاصی وجود دارند که به نحو متفاوتی نسبت به محیط پاسخ می‌دهند. ایزوآنزیم‌های ۲ و ۹ و ۲۰ در کلیه فصول وجود دارند، درحالی که در تابستان و انتهای فصل زمستان که نمونه‌ها دارای فعالیت بالایی از پلی‌فنل اکسیداز دارند ایزوآنزیم‌های ۲، ۶، ۹، ۱۹ و ۲۰ نقش پلی‌فنل اکسیدازی را به عهده دارند.

تغییرات کمی فعالیت پلی‌فنل اکسیدازی همانند تغییرات کیفی آن منظم است. از میان ۱۲ درختی که مورد آزمون قرار گرفته‌اند. تفاوت بین کمینه و بیشینه فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز M_4 و FM_3 نسبت به بقیه بیشتر، در M_2 و F_3 کمتر است و درواقع گسترهٔ تغییرات M_4 و FM_3 وسیعتر است.

مقایسهٔ تغییرات کمی و کیفی سرشاخه‌های سبز تک‌تک پایه‌ها وجود نظم خاصی را در آنها نشان می‌دهد، به‌طوری‌که بسیاری از ایزوآنزیم‌ها در تمام فصول وجود دارند و تغییرات تعداد ایزوآنزیم‌ها بسیار محدود است آنچه که در کلیه پایه‌ها تغییر می‌کند میزان رنگ نوارها است.

نوارهای قسمت کندرونده کمتر دچار تغییر می‌شوند. بیشترین تغییرات مربوط به قسمت میانی و نوارهای تندرونده است. همانگونه که در شکلهای ۲۹، ۳۰ و ۳۱ مشاهده می‌شود در سرشاخه‌های سبز تمام پایه‌های نر، نرماده و ماده تغییرات مشابه هم هستند. بنابراین، از فصل بهار خصوصاً تابستان به بعد رنگ ایزوآنزیم‌های ۱۲ و ۱۳ و ۱۴ از قسمت میانی و ۱۹ و ۲۰ از نوارهای تندرونده، تیره‌تر می‌گردد و با شروع فصل رویش در انتهای فصل زمستان از میزان رنگ بعضی نوارها

کاسته می‌شود.

هم‌آهنگی بین میزان فعالیت کمی و کیفی آنزیم بسیار منظم می‌باشد و بیشترین تفاوت بین کمینه و بیشینه فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در درخت F_3 و کمترین تفاوت در درختان FM_4 و F_1 مشاهده می‌شود.

در شکلهای ۳۲ و ۳۳ تغییرات کمی و کیفی مخروط نر تک‌تک پایه‌ها برای مقایسه رسم شده است. همچنانکه مشاهده می‌شود ایزوآنزیم‌های ۱۲، ۱۳، ۱۹ و ۲۰ در کلیه فصول وجود دارند ولی تغییرات بعدی آنها در درختان نر منظم‌تر از درختان نرماده است.

در درخت M_1 می‌بینیم که کاهش فعالیت آنزیم در ابتدای فصل زمستان با کم‌شدن رنگ نوارهای ۱۲ و ۱۳ همراه است. هنگامی که این موضوع در درختان دیگر دنبال می‌شود، مشاهده می‌گردد که در اغلب پایه‌ها وضع به همین شکل است. البته ایزوآنزیم‌های ۱۶ و ۱۷ درختان نر شماره ۲، ۳ و ۴ نیز در ابتدای زمستان محو می‌شوند. پدیدار شدن ایزوآنزیم ۹ در الگو زمستانی درختان نرماده نیز ممکن است دلیل کم‌شدن فعالیت مخروط نر باشد. پررنگ‌شدن نوارهای ۱۲ و ۱۳، و ظهور نوارهای ۶ و ۱۰ و ۱۱ در اغلب پایه‌ها منطبق با افزایش فعالیت پلی فنل‌اکسیدازی مخروط نر است.

درخت FM_1 از جمله درختانی است که نسبت به بقیه تعداد بیشتری ایزوآنزیم دارد و از میان درختان فوق همین درخت از نظر فعالیت کمی، گسترهٔ تغییرات وسیع‌تری دارد درحالی‌که مقاومت بین کمینه و بیشینه فعالیت آنزیمی در درخت FM_4 محدودتر از بقیه است ولی این محدودیت ناشی از کمتر یا بیشتربودن تعداد ایزوآنزیم‌ها نیست.

شکل ۳۴ مقایسه تغییرات کمی و کیفی آنزیم را در طول تکوین مخروط ماده، از زمان گرده‌افشانی تا رسیدن میوه تک‌تک درختان ماده معرفی می‌نماید.

نتایج نشان می‌دهند که از ایزوآنزیم‌های کندروندهٔ ثابت یعنی نوار ۱، ۲، ۵ و ۶ (که در تمام پایه‌ها مشترک است)، ایزوآنزیم ۲ و ۵ از زیموگرام مخروط سال اول در تابستان حذف می‌شود. باتوجه به اینکه این مرحله از تکوین مرحلهٔ مشخصی است (یعنی مراحل اولیه تشکیل دانه)، حذف این دو نوار احتمالاً با مراحل رشد و نمو ارتباط دارد.

در پاییز ایزوآنزیم‌های جدیدی در منطقهٔ میانی و نوارهای کندرونده ظاهر می‌شوند که به افزایش فعالیت بسیار چشمگیری منجر می‌گردند. در ابتدای زمستان بر تعداد ایزوآنزیم‌ها در مرحله میانی افزوده می‌شود و رنگ بسیاری از ایزوآنزیم‌های زیموگرام پاییز کم‌رنگ می‌گردد. احتمالاً کم‌شدن فعالیت بعضی نوارها و پیدایش تعدادی دیگر، عامل کاهش چشمگیر فعالیت پلی‌فنل اکسیداز است. در طول زمستان هم از نظر کمی و هم از نظر کیفی کاهش چشمگیری در فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود، ولی با شروع فصل رویش مقدار آنزیم به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد. محوشدن بسیاری از نوارها احتمالاً دلیل این کاهش است.

میوه‌های سال دوم، در پاییز که فصل رسیدن میوه‌های آن است، ایزوآنزیم‌های مشخصی نشان نمی‌دهند به‌طوری‌که میزان کاهش فعالیت پلی فنل‌اکسیداز در طول تکوین مخروط ماده (در این زمان) بی‌سابقه است و نشان‌دهندهٔ کاهش فعالیت کلی متابولیسم و رسیدن میوه است.

تغییرات پروتئینهای محلول در فصول مختلف

در شکلهای شمارهٔ ۱۲ و ۱۳ منحنی تغییرات مقدار پروتئینهای محلول نمونه‌های گیاهی (سرشاخه‌های سبز، شاخه، مخروط نر و مخروط ماده) در پایه‌های مختلف نر، نر ماده و ماده درختان ارس با احتساب انحراف از معیار آنها رسم گردیده است.

همانگونه که در شکل شمارهٔ ۱۱ مشاهده می‌شودتغییرات پروتئینهای محلول در سرشاخه‌های سبز و شاخه صرف‌نظر از تفاوت در مقدار پروتئین، مشابه هم است. مقدار پروتئین با شروع فصل رویش افزایش می‌یابد و در تابستان به اوج می‌رسد، بعد مقدار آن در طی پاییز و زمستان کاهش می‌یابد. در پایه‌های نر و پایه‌های ماده یک قله دیگر در پاییز مشاهده می‌شود که در پایه‌های نر ملاحظه نمی‌گردد. این قله حاکی از واکنش در برابر تغییرات فصل است.

در انتهای زمستان افزایش خفیف پروتئینها از شروع فصل رویش حکایت می‌کند. توجه به مقدار پرونئین در انتهای فصل زمستان و بهار نشان می‌دهد که شیب افزایش مقدار پروتئین در ابتدای بهار بسیار شدیدتر از ماه‌های دیگر است و نیز شیب کاهش مقدار پروتئین در طول شهریور تا مهر ماه نیز تند است.

شکل شمارهٔ ۱۲-A که مقدار پروتئین را در طی تکوین مخروط نر نشان می‌دهد حاکی از افزایش پروتئین در مراحل ابتدایی تکوین مخروط نر و سپس کاهش پروتئین در فاصله پاییز تا زمستان است. افزایش سریع پروتئین قبل از گرده‌افشانی حاکی از دگرگونی متابولیسم و آماده‌سازی سلول برای گرده‌افشانی حکایت می‌کند.

شکل ۱۲-B کاهش مقدارپروتئین مخروط ماده سال اول را در طی پاییز و زمستان (فصل خواب) نشان می‌دهد. در هر دو مخروط سال اول و دوم مقدار پروتئین در طی فصل رویش افزایش شدیدی دارد.

مقایسهٔ تغیرات فصلی پروتئینهای محلول، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز

شکلهای شمارهٔ ۱۳ تا ۱۶ به مقایسهٔ تغییرات فصلی پروتئینهای محلول، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز به ترتیب در شاخه، سرشاخه‌های سبز، مخروط نر و مخروط ماده ارس اختصاص دارد.

همانگونه که در شکل شمارهٔ ۱۳ مشاهده می‌شود تغییرات فصلی آنزیم

پراکسسیداز(E) و پلی‌فنل‌اکسیداز(D) شاخه که در واحد Abs/min/g FW محاسبه شده‌اند به‌طور کامل عکس هم است، به‌طوری که فعالیت پراکسیداز با شروع بهار کاهش می‌یابد، ولی در پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش می‌یابد.درحالی که با شروع فصل خواب مقدار پراکسیداز افزایش می‌یابد، ولی پلی‌فنل‌اکسیداز کاهش می‌یابد. بیشترین میزان پراکسیداز در بهار و پاییز ودر پلی‌فنل‌اکسیداز تابستان و زمستان است.

شکل شمارهٔ ۱۳ B, C تغییرات فصلی پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در واحد Abs/min/g FW را نشان می‌دهد. نحوه تغییرات آنزیمی بر حسب واحد فوق، با شکل شمارهٔ ۱۳ E, D تفاوت دارد، به‌طوری‌که برخلاف B, C فعالیت آنزیم فوق در طول فصل رویش در حد کمینه و در طی فصل خواب، بیشینه است. این مشاهدات نشان می‌دهد که به رغم فعالیت زیاد پلی‌فنل‌اکسیداز در تابستان، بخش کمی از پروتئینهای محلول را تشکیل می‌دهد و بیشترین میزان پروتئینهای محلول در فصل زمستان به آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز است.

شکل شمارهٔ ۱۴ مقایسهٔ آنزیمی و پروتئینی سرشاخه‌های سبز را نشان می‌دهد. در این شکل نیز مشاهده می‌شود که به رغم کاهش مقدار پروتئین در فصل زمستان، قسمت بیشتر پروتئین موجود به فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز تعلق دارد، در حالی‌که بخش ناچیزی از پروتئین در فصل رویش به پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز متعلق است.

شکل شمارهٔ ۱۵ نشان می‌دهد که تغییرات پروتئین (A)، پراکسیداز (B) و پلی‌فنل‌اکسیداز (D) در طول تکوین مخروط نر (در واحد Abs/min/g FW) به طور کامل همسو بوده، به طوری که مقدار هر سه در زمستان به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد و درست قبل از گرده افشانی فعالیت پیشین خود را باز می‌یابند.

نکته قابل توجه در مورد تغییرات پراکسیداز (C) و پلی‌فنل‌اکسیداز (E) در واحد

Abs/min/mg protein است. افزایش این دو منحنی در فصل خواب نشان می‌دهد که بخش عمده‌ای از پروتئین در فصل زمستان به این دو آنزیم متعلق است، در حالی‌که بیشترین بخش پروتئین در آذر ماه به پلی‌فنل‌اکسیداز و در دی ماه متعلق به پراکسیداز تعلق دارد.

شکل شمارهٔ ۱۶ تغییرات پروتئین و آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز را در طی تکوین مخروط ماده نشان می‌دهد. مقایسه تغییرات پروتئین کاملا عکس تغییرات پراکسیداز (D) و پلی‌فنل‌اکسیداز (C) در واحد Abs/min/mg protein است.

شکل ۱۶ نشان می‌دهد که منحنی‌های تغییرات پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در واحد Abs/min/g FW در دو نقطه، اشتراک ناچیزی باهم دارند و آن افزایش مقدار هر دو آنزیم در مخروط ماده سال اول (در پاییز) و کاهش مقدار هر دو آنزیم در مخروط ماده رسیده سال دوم (در پاییز) است، ولی در سایر مراحل تکوین متفاوت از هم عمل می‌کنند، به‌طوریکه بیشترین فعالیت پراکسیداز در شروع فصل رویش است، در حالی که بیشترین فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در پاییز (در مخروط ماده سال اول) مشاهده شده است.

بحث

فعالیت پراکسیدازی در شاخه و سرشاخه‌های سبز

پراکسیداز آنزیمی است که در تمام گونه‌های گیاهی یافت می‌شود و نقشهای بسیاری در فیزیولوژی گیاهان دارد (۱۵). نقش آن در رشد، نمو و تمایز گیاهی بسیار حائز اهمیت است. بخشی از پژوهش حاضر به بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز اندامهای مختلف گیاه ارس اختصاص یافته است.

همانگونه که در شکل شمارهٔ ۳ مشاهده می‌شود تغییرات فصلی فعالیت آنزیم پراکسیداز شاخه و سرشاخه‌های سبز همسو بوده و با شروع فصل رویش فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش می‌یابد. منحنی تغییرات آنزیم پراکسیداز به‌طور کامل عکس منحنی دمای سالانه منطقهٔ مورد بررسی (شکل شمارهٔ ۲) است به‌طوری‌که با گرم‌شدن محیط و شروع رشد و نمو از میزان فعالیت پراکسیداز کاسته می‌شود.

گزارشهای بسیاری در مورد نقش پراکسیدازها در ممانعت از رشد وجود دارند (۲۶). تحلیلهای اولیه در مورد نقش پراکسیدازها حاکی است که این آنزیم در ساخته‌شدن مواد تشکیل‌دهندهٔ دیواره سلولی دخالت داشته و در مرحله بعدی با ایجاد اتصال عرضی بین پلیمرهای فنلی دیوارهٔ سلولی، انعطاف‌پذیری دیوارهٔ سلولی را کاهش می‌دهد. این فرایند باعث سخت‌شدن غیرقابل برگشت دیوارهٔ سلولی می‌شود. به علاوه این آنزیم اثر اکسینها را بر اتساع‌پذیری غشاهای اسکلتی و در مرحله کاتابولیسم آنها، با ایفای نقش اکسین اکسیدازی کنترل می‌نماید (۱۶، ۴۴). از این رو، با افزایش دمای محیط و شروع فعالیتهای زیستی گیاه از جمله فتوسنتز، تنفس، رشد و نمو فعالیت پراکسیدازها کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت پراکسیدازی احتمالاً در اثر کاهش فعالیت ایزوآنزیم‌های اسیدی است که مسئول لیگنین‌سازی و ایزوآنزیم‌های بازی است که نقش اکسین اکسیدازی را دارند (۴۱).

علاوه بر دما که از عوامل زیستی مهم در شروع فصل رویش است می‌توان از نور نیز

نام برد. یکی از اثرات نور بر رشد، کنترل سطح پراکسیدازهای خارج سلولی است. براساس بررسیهای موجود رنگیزه تنظیم‌کنندهٔ فیتوکروم، تغییرات رشدی سریع و متفاوتی را در نواحی مختلف گیاه القا می‌نماید. درواقع فیتوکروم باعث کاهش پراکسیدازهای آنیونی دیوارهٔ سلولی می‌شود (۴۴).

این گزارشها به‌طور کامل با نحوهٔ فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاخه و سرشاخه‌های سبز ارس مطابقت دارند. البته فعالیت آنزیم فوق بکلی کم نشده و از بین نمی‌رود، بلکه کاهش می‌یابد، زیرا وجود آن نه فقط برای سنتز دیواره‌ها، بلکه برای تمایز ضروری است. مطالعات انجام شده در مورد تمایز مزوفیل Zinnia به عناصر تراکئیدی در شیشه (in vitro) نشان می‌دهد که فعالیت پراکسیدازهای دیواره‌ای و محلول هر دو در طی القای سلولهای مزوفیل به عناصر تراکئیدی افزایش می‌یابد و ممانعت‌کننده‌هایی که تمایز تراکئیدها را مسدود نموده یا به تأخیر می‌اندازند مقدار این آنزیم را نیز کاهش می‌دهند. این نتایج بر ارتباط بین تعدیل سطح ایزوپراکسیدازهای ویژه تمایز با تشکیل عناصر تراکئیدی صحه می‌گذارند (۱۶).

مسأله دیگر در مورد تولید H_2O_2 در طی دورهٔ فعالیت رشدی گیاه است. زیرا در موجودات فتوسنتزی نه تنها در شرایطی که انرژی فتون موجود، برای فتوسنتز بیش از توانایی پذیرفتن آن است بلکه حتی وقتی شرایط محیطی برای فتوسنتز مناسب است، آنیونهای سوپراکسید تولید می‌شوند (۱۱). این آنیونها در تیلاکوئید بواسطه سوپراکسیددسیموتاز به سرعت به پراکسید ئیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌شوند. میزان تولید پراکسید- ئیدروژن در کلروپلاستها حدود $۲۴۰\mu ms^{-1}$ است که اگر به سرعت حذف نشود در چند ثانیه می‌تواند از فتوسنتز به‌طور کامل ممانعت کند. بنابراین برای اینکه فتوسنتز به خوبی انجام شود حذف سریع پراکسید ئیدروژن در کلروپلاست ضروری است (۱۳). علاوه بر این به علت اینکه بین رشد و سطوح درونزای H_2O_2 گونه‌های مختلف رابطه‌ای منفی وجود دارد می‌بایست در بافتهای گیاهی که فعالانه رشد

می‌کنند ماشین سمیت‌زدای کارآمدی مانند آسکوربات پراکسیداز موجود می‌باشد که در طی رشد فعالیت می‌نماید(۲۴ و ۴۲).

شکلهای ۱۷، ۱۸ و ۱۹ (بخش بهار و تابستان الگوی ایزوپراکسیدازی شاخه) و ۲۰، ۲۱ و ۲۲ (بخش بهار و تابستان الگوی ایزوپراکسیدازی سرشاخه‌های سبز) نیز نتایج فوق را تائید می‌کنند. به‌طوری‌که در طی فصل رویش مشاهده می‌گردد فعالیت برخی از ایزوآنزیم‌ها کم (نوارهای کندرونده) و برخی دیگر زیاد (نوارهای متوسط رونده) می‌شود.

کمترین مقدار پراکسیداز در مرداد ماه بوجود می‌آید، به‌طوری‌که انتظار می‌رود که بیشترین رشد در این زمان حاصل شود، ولی کاهش نسبی رشد در اواسط تابستان، عامل دیگری دارد و نشاندهندهٔ آغاز لیگنین‌سازی در گیاه است. در اینجا این سئوال پیش می‌آید که آیا پراکسیداز در شروع سخت‌شدن دیواره نقشی ندارد؟ پروهشها نشان می‌دهند که کاهش چشمگیر پراکسیداز بویژه اکسین اکسیداز باعث فعال‌شدن اکسین می‌شود و غلظت‌های بالای اکسین، چوبی‌شدن و تشکیل گزیلم را بویژه در گونه‌های چوبی تحریک می‌کند.

از مردادماه به بعد فعالیت پراکسیداز افزایش می‌یابد که نه فقط پراکسیدازهای بازی واکوئلی که مسئول کنترل هموستاتیک IAA (مخزن IAA سیتوسولی) در سلولهای در حال رشد و درنتیجه توقف رشد هستند، بلکه پراکسیدازهای مستتر در دیواره را نیز شامل می‌شود که با کاتوبولیسم IAA باعث توقف رشد می‌گردند یعنی می‌توانند با استفاده مجدد از IAAکه در قبل در رشد و تمایز به‌کار رفته عمل نمایند (۴۴).

براساس گزارش فرر[1] و همکاران اکسیداسیون کونیفریل‌الکل، P-کوماریک اسید و فرولیک اسید با هزینه IAA و O_2 انجام می‌شود. بدین‌ترتیب که H_2O_2 (یا یک

1- Ferrer

هیدروپراکسید آلی) مورد نیاز برای شروع چرخه پراکسیدازی آنزیم، در یک چرخه اکسیدازی وابسته به IAA و O_2 تولید می‌شود (۳۵).

با کاهش دمای هوا و رطوبت محیط (ودرنتیجه کاهش جذب آب)، فعالیتهای حیاتی گیاه کم می‌شود و به عبارتی گیاه برای رشد مانند سابق مواد غذایی کافی در دسترس ندارد. از طرفی با بالغ‌شدن سلولها، تجمع مواد ممانعت‌کننده رشد، سنتز اتیلن و... روی می‌دهد که سنتز اتیلن فعالیت پراکسیدازها را تحریک می‌کند (۱۵). جالب توجه اینکه سنتز اتیلن از پیشساز آن یعنی ۱ـ آمینو ـ سیکلوپروپان ۱ـکربوکسیکیک اسید (ACC) به‌وسیله آنزیمی[1] (EFE) که نقش پراکسیدازی دارد، انجام می‌شود(۵۲). بنابراین، کاهش رشد از چند جهت: ۱ـاکسیداسیون IAA ۲ـافزایش سنتز پراکسیداز ۳ـکمبود مواد غذایی قابل پیگیری است.

همانگونه که در شکل شمارهٔ ۳ مشاهده می‌شود منحنی تغییرات پراکسیداز ۲ قله یکی در بهار و دیگری در پاییز دارد. در پاییز و بهار که دوره‌های گذاری[2] آب و هوای سرد است، وضعیت متابولیسمی گیاهان عالی به صورت متفاوتی عمل می‌کند. گزارشهای زیادی در مورد افزایش فعالیت پراکسیدازها وجود دارند که نقش آنها حذف آنیونهای سوپراکسید و پراکسیدهای ناشی از تنش (تنش پراکسیداتیو) است. کورودا[3] و همکاران ارتباط بین سیستمهای حذف پراکسید و آب و هوای سرد را در کالوس بررسی نمودند. آنها مشاهده کردند که با انتقال نمونه‌ها به سرما، سرعت فعالیت آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز افزایش یافته تغییرات سیتولوژیکی مشخصی به وقوع می‌پیوندد که حادترین آنها تقسیم واکوئل و ضخیم‌شدن دیواره است (۱۲). کروری و همکاران نشان دادند که بین فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز و سازگاری در برابر سرما در گیاهان مختلف ارتباط مثبتی وجود دارد (۶، ۷، ۳۴، ۳۵، ۳۶). از این رو

1- Ethylene - Forming enzyme
2- Transitional Periods
3- Kuroda

افزایش پراکسیداز را می‌توان عامل: الف) حذف آنیونهای سوپراکسید و پراکسید ب) افزایش لینگنین‌سازی و تشکیل دیواره ثانوی (چنانچه تفاوت بین چوب بهاری و چوب پاییزی آنرا شناسایی کرد) پ) افزایش فعالیت اکسین اکسیدازی، دانست که در نهایت باعث مقاومت و سازگاری در برابر شرایط سخت (دمای سرد) می‌شود.

در شکلهای شمارهٔ ۱۷، ۱۸ و ۱۹ (بخش پاییزی الگوی ایزوپراکسیدازی شاخه) و ۲۰، ۲۱ و ۲۲ (بخش پاییزی الگوی ایزوپراکسیدازی سرشاخه‌های سبز) افزایش فعالیت ایزوآنزیم‌ها و نوارهای کندرونده و متوسطرونده) و پیدایش ایزوآنزیم‌های جدید (تندرونده) که براساس تحقیقات کروری و دیگران به عنوان ایزوآنزیم‌های نشانگر تنش معرفی شده‌اند (۶) بخوبی قابل مشاهده است.

در شکل شمارهٔ ۳ ملاحظه می‌شود که با فرارسیدن زمستان فعالیت پراکسیداز به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت پراکسیداز به‌طور کامل با کاهش دما مطابقت دارد. دوره خواب واقعی ارس را می‌توان آبان ماه تا دی‌ماه دانست. در این دوره، کلیه واکنشهای متابولیسمی گیاه کاهش می‌یابند و احتمالاً کاهش متابولیسم گیاه شامل کاهش واژگری پراکسیداز نیز می‌شود. با این وجود، تعداد نوارهای ایزوآنزیمی در دی‌ماه بیشتر از ماههای دیگر است (شکل ۲۰) و این امر احتمالاً از تفکیک اجزای تشکیل‌دهندهٔ ملکولهای درشت‌تر پراکسیداز ناشی می‌شود. از دی‌ماه به بعد که شدت سرما رو به کاهش می‌گذارد و امکان انجام پدیده‌های زیستی فراهم می‌شود دوباره ضرورت سنتز پراکسیدازها پیدا می‌شود. از طرفی پراکسیدازها در مراحل نهایی چوبی‌شدن و تشکیل شبکه‌های بسیار سخت دخالت می‌کنند و چون ضرورت تشکیل چنین شبکه‌های سختی در سرشاخه‌های سبز وجود ندارد فعالیت پراکسیدازی در آنها زیاد نیست. مطالعات ایزوآنزیمی نیز این مطلب را تأئید می‌کنند (شکلهای شمارهٔ ۲۰، ۲۱ و ۲۲).

بااینکه هم در بهار و هم در پاییز گیاه تحت تنش پراکسیداتیو قرار می‌گیرد و در هر دو فصل فعالیت پراکسیدازی افزایش می‌یابد نمی‌توان انتظار داشت که الگوی ایزوآنزیمی

این دو فصل یکسان باشد، زیرا ایزوپراکسیدازهای مختلف سلولهای گیاهی به صورت متفاوتی به‌وسیله تنش پراکسیداتیو متأثر می‌شوند و اثر القایی یا فعال‌کنندگی آنزیم‌ها با حالت رشدی سلول ارتباط دارد (۲۵). درواقع تغییرات بیان پراکسیداز به تغییر نیاز متابولیسم گیاه در طول رشد و نمو مربوط است (۲۹).

فعالیت پلی‌فنل اکسیدازی در شاخه و سرشاخه‌های سبز

پلی‌فنل‌اکسیدازها جزء اکسیدازهایی هستند که از دیرباز در موجودات زنده به ویژه گیاهان عالی شناخته شده‌اند. نقش این آنزیم گسترده است و گهرمایه (سوبسترا)های بسیاری را اکسیده می‌کنند(۳).

شکل شمارهٔ ۷ منحنی تغییرات فصلی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز را در سرشاخه‌های سبز و شاخه‌ها نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، فعالیت پلی‌فنل اکسیداز با شروع فصل رویش افزایش می‌یابد و درحالی که در شاخه با سردشدن هوا کاهش می‌یابد در سرشاخه‌های سبز بر فعالیت آن افزوده می‌شود. در اصل محل درون سلولی آنزیم در گیاهان، علاوه بر دیوارهٔ سلول و سیتوپلاسم، پلاستها است. حضور این آنزیم در کلروپلاستها با استفاده از روشهای میکروسکوپی و بیوشیمیایی و جداسازی به کمک سانتریفوژ در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (۴۵). براساس یافته‌های مایر[۱] و بیل[۲] در اسفناج آنزیم به تیلاکوئیدها متصل است و به هنگام پیری برگها، فعالیت آن به دلیل جداشدن آنزیم از تیلاکوئید افزایش می‌یابد. در سرشاخه‌های سبز نیز در طول سال به جهت اینکه قدرت تشکیل کلروپلاستها نسبت به انهدام آنها کاهش می‌یابد فعالیت آنزیم بیشتر می‌شود. به‌طوری‌که در زمستان رنگ درختان نیز تغییر محسوسی می‌کند و کمی مایل به قهوه‌ای می‌شود. بروز چنین حالتی احتمالاً ناشی از پیری و تخریب

1- Mayer 2- Biehl

کلروپلاستها و درنتیجه آزادسازی آنزیم در بافت گیاهان است. اورتوکوئینونهای تشکیل شده در طی عمل آنزیم بسیار فعال و واکنش‌کننده هستند و به‌طور خودبخودی پلیمریزه شده و ترکیباتی با وزن ملکولی بالا بوجود می‌آورند که دسته‌ای از آنها رنگدانه‌های قهوه‌ای هستند (۲۹ و ۴۷). البته فعال‌شدن پلی‌فنل اکسیداز همیشه درنتیجه جداشدن آن از تیلاکوئید صورت نمی‌گیرد بلکه ممکن است از آزادشدن فعال کننده‌های آنزیمی ناشی شده باشد. چنانچه در *Vicia faba* که واجد آنزیم کاتکول اکسیداز نهفته است، اسیدهای چرب آزاد مسئول فعال‌سازی آن هستند و در طی پیری که اسیدهای چرب با تخریب غشای سلولی رها می‌شوند فعالیت آنزیم نیز افزایش می‌یابد (۱۶ و ۲۱).

از طرفی پلی‌فنل اکسیدازها و پراکسیدازها هر دو در پدیده چوبی‌شدن دخالت می‌کنند با این تفاوت که آنها در مراحل مختلفی عمل می‌نمایند به عبارت دیگر پلی‌فنل اکسیدازها در مراحل نخستین چوبی‌شدن و در اصل در تشکیل شبکه‌های ساده و پلیمرهای کوچک چوب دخالت می‌کنند درحالی که پراکسیدازها در تشکیل شبکه‌های بسیار پیچیده و سخت چوب دخالت می‌نمایند (۱۴) افزایش فعالیت پلی فنل‌اکسیداز و کاهش فعالیت پراکسیداز سرشاخه‌های سبز در زمستان نیازگیاه را به تشکیل شبکه‌های ساده چوبی بیان می‌کند.

شکلهای شمارهٔ ۲۹ تا ۳۱ که الگوی ایزوآنزیمی پلی‌فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز را نشان می‌دهد حاکی از پدیدارشدن و یا ناپدیدشدن ایزوآنزیم‌های خاصی در فصل پاییز و بهار (گذار آب و هوایی) است.

کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شاخه در زمستان چند علت می‌تواند داشته باشد: ۱ـ همسویی با کاهش متابولیسم کلی گیاه در فصل سرما ۲ـ عدم نیاز سلولهای شاخه به تشکیل شبکه‌های ساده چوبی.

افزایش فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز شاخه با شروع فصل رویش، نقش این آنزیم‌ها را در تعدیل فعالیتهای گیاه در طول فصل نامناسب نشان می‌دهد و از سوی دیگر

ممکن است از نقش این آنزیم‌ها در تمایز ناشی شده باشد.

شکلهای شمارهٔ ۲۶ تا ۲۸ الگوی ایزوآنزیمی پلی‌فنل‌اکسیداز شاخه را در فصل تابستان و در ابتدا و انتهای زمستان نشان می‌دهند. به علت عدم ظهور ایزوآنزیم واضحی در بهار و پاییز، شاخه، زیموگرامی در این دو فصل ندارد. صرف‌نظر از تفاوتهای فردی، الگوی فوق با منحنی تغییرات فعالیت کم و بیش مطابقت دارد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در مخروط نر

نتایج موجود در شکل شمارهٔ ۱۵ نشان می‌دهند که منحنی‌های تغییرات آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و پروتئین محلول همسو با کاهش شدید دمای محیط در زمستان کاهش می‌یابند. این مسأله با کاهش کلی متابولیسم گیاه و عدم نیاز به ساخت لیگنین و به عبارت صحیح‌تر عدم توان گیاه در سنتز ماده جدید (لیگنین) توجیه می‌شود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در مخروط ماده

پراکسیداز (EC 1.11.1.7) مدتها به عنوان تنها آنزیم اکسیداتیو متصل به دیواره، که در مرحله پلیمریزاسیون بیوسنتز لیگنین شرکت می‌کند بررسی می‌شد، درحالی‌که اکسیدازهای غیرهمی دیوارهٔ سلولی مانند لاکاز یا پلی‌فنل اکسیداز (EC.1.10.3.2) نیز در این فرایند شرکت می‌کنند و نقش انحصاری پراکسیداز، به‌غیراز نقشهایی که لاکاز نیز بعهده دارند، تشکیل لیگنین در طول ضخیم‌شدن ثانوی آوندهای چوبی است.

آلبا[1] و دیگران در ۱۹۹۶ با بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در طی تشکیل میوه هلو نشان دادند که تشکیل میوه دو مرحله دارد. در مرحله اول که مرحله سنتز شبکه‌های کوچک لیگنین است لاکاز فعالیت زیادی داشته در طول مرحله

1- Alba

دوم فعالیت آن کاهش می‌یابد، درحالی‌که در پایان مرحله دوم که مرحلهٔ سنتز شبکه‌های پیچیده و سخت‌چوبی است پراکسیداز بیشترین فعالیت را دارد (۱۰). در ارس (شکل D و E ۱۶) مشاهده می‌شود پراکسیداز به‌طور وسیعی در میوه توزیع شده، ولی بیشترین فعالیت آن در اواسط مرحله دوم تشکیل میوه است. این آزمایش نشان می‌دهد که پلی‌فنل‌اکسیداز در مرحلهٔ اول چوبی‌شدن و پراکسیداز در مرحلهٔ پایانی این فرایند شرکت می‌کنند. کروری نیز با بررسی فعالیت کمی کیفی مخروط ماده لاریکس نتیجه مشابهی بدست آورد (۳۴).

تغییرات فصلی پروتئینهای محلول

نتایج حاصل از پژوهش حاضر (شکل شمارهٔ ۱۱ و ۱۲) نشان می‌دهد که مقدار پروتئین در فصل خواب به‌شدت پائین می‌آید که در اصل از کاهش متابولیسم کلی گیاه در فصل سرما ناشی شده است. به رغم کاهش مقدار پروتئین، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در فصل خواب، نتایج حاصل از بررسی در شکلهای B و C ۱۳ (منحنی تغییرات فصلی پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز شاخه)، C و B ۱۴ (منحنی تغییرات فصلی آنزیمی سرشاخه‌های سبز)، و C و E ۱۵ (منحنی تغییرات فصلی آنزیمی مخروط نر) و شکل B و C ۱۶ (منحنی تغییرات فصلی آنزیمی مخروط ماده) نشان می‌دهند که بخش زیادی از پروتئین در فصل خواب به آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز اختصاص دارد، درحالی که فقط مقدار اندکی از پروتئین را در فصل رویش این دو آنزیم تشکیل می‌دهند.

ویژگی سیستماتیکی گیاه مورد مطالعه

درختان ارس موجود در ایستگاه تحقیقات سیراچال بومی ایران بوده و از گونه *Jumiperus excelsa* یا *Juniperus polycarpos* تشکیل شده‌اند. منشاء چنین طرز تفکری که باعث شد عده‌ای از پژوهشگران آن را در دو گونه و عده‌ای تحت عنوان یک

گونه یا حتی یکی را زیرگونه دیگری بدانند تنوع حالت جنسی و تعداد دانه‌ها در مخروط است. به‌طوری که در برخی منابع درختان ارس دو پایه را که تعداد دانه‌ها در مخروط ماده آن ۲ـ۴ است به عنوان *J. polycarpos* و درختان تک‌پایه را با دارابون ۴ـ۸ دانه در مخروط ماده، *J.exselsa* معرفی نمودند و در فلورهای معتبری مثل ایرانیکا دو نام مترادف ذکر شده است.

آدامز[۱] و همکاران زیستگاههای ارس را به دقت بررسی کرده (۹) و گسترش پراکنش گونهٔ *J. excelsa* را از مرکز اروپا به غرب آسیا و *J. excelsa ssp. polycarpos* را از مرکز آسیا به غرب آسیا معرفی کرده‌اند که هر دو به ایران ختم می‌شوند. به عبارتی در ایران شرایط محیطی به‌گونه‌ای است که *J. excelsa* و *J. excelsa ssp. polycarpos* هر دو ظاهر می‌شوند. پژوهش حاضر نشان داد که تعداد دانه‌ها در مخروط از شرایط محیطی پیروی می‌کند، به‌طوری‌که در سال کم‌باران (۱۳۷۳) تعداد دانه در مخروط کم (۴ـ۳ عدد) و در سال پرباران ۱۳۷۴ تعداد دانه افزایش یافت و حتی در مواردی ۷ دانه در مخروط ماده نیز مشاهده گردید. به علاوه ظهور تعداد معدودی مخروط ماده روی درختانی که دو سال تنها به عنوان پایه‌های نر مطالعه شده بودند این تردید را بوجود می‌آورد که آیا می‌توان رده‌بندی را براساس چنین صفات انعطاف‌پذیری (جنسیت یا تعداد دانه‌ها در مخروط ماده) بنا نمود.

باکاردیوا[۲] و همکاران (۱۹۹۶) با بررسی فعالیت پراکسیدازی در گیاهان مختلف به این نتیجه رسیدند که در طول تکامل، فعالیت پراکسیداز افزایش می‌یابد. به علاوه آنها نشان دادند که وجود ایزوآنزیم‌های متفاوت در گیاهان کاربردهای تکاملی دارد. به‌نظر آنها ایزوآنزیها در دو دسته قرار می‌گیرند، تعدادی از ایزوآنزیم‌ها در همهٔ گونه‌ها مشترک هستند و نقش پراکسیداز را در طول تکامل تضمین می‌نمایند. دسته دیگری به صورت

1- Adams

2- Bakardjieva

اختصاصی در گونه‌هایی ظاهر می‌شوند که وجود آنها از عمل سازشی پراکسیداز با ویژگیهای متابولیسمی گیاه ناشی شده است. تحقیقات آنها ثابت می‌کنند که بیشترین فعالیت پراکسیداز در گیاهان پست به ایزوآنزیم‌های تندرونده و متوسط رونده مربوط بوده، درحالی‌که در گیاهان عالی به ایزوآنزیم‌های کندرونده مربوط است (۱۴).

در این مورد پژوهشی که از پراکسیداز برای جداسازی تاکسونهای کوچکتر از گونه استفاده شود موجود نیست. پژوهش حاضر (شکلهای شمارهٔ ۳ تا ۱۶) هیچ تفاوتی از نظر ویژگی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز در پایه‌های مختلف نر، ماده و نرماده ارس نشان نمی‌دهد و کلیه پایه‌ها الگوی یکسانی را به نمایش می‌گذارند.

باتوجه به شباهت ریختاری، تشریحی و بیوشیمیایی در هر سه پایهٔ ارس (نر، ماده و نرماده)، جداسازی آنها براساس صفات متأثر از محیط (تک‌پایه یا دوپایه بودن و تعداد دانه در میوه) مورد تردید است. به همین جهت ترجیحاً می‌توان ارسهای موجود در ایران را براساس نامگذاری قدیمی در گونه *Juniperus excelsa* قرار داد.

منابع مورد استفاده

۱ـ اکبرزاده، مرتضی. ۱۳۷۳. تهیه نقشه پوشش گیاهی منطقه سیراچال به روش فلورستیک و فیزیونومیک. نشریه مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، شماره ۹۲.

۲ـ بابایی، آزیتا ۱۳۷۵. بررسی اثر تنش آبی در مراحل رشد و نمو کمیت و کیفیت اسانس و مقدار روغن سیاه‌دانه *Nigela sativa*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد شمال تهران ـ دانشکده علوم.

۳ ـ سنجری، سیروس. ۱۳۷۲. بررسی فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازی و پراکسیدازی در گیاه چای Camellia sinensi. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران ـ دانشکده علوم.

۴ـ صبورا، عذرا ۱۳۷۴. بررسی مقدماتی اونتوژنی و فیلوژنی برخی گونه‌های زعفران ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران ـ دانشکده علوم.

۵ـ کیایی، محمد ۱۳۷۴. بررسی اثر غلظت‌های مختلف فسفر بر سازش گیاه در شرایط شور. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم.

۶ـ کروری علی احمد، سودابه و صالحی شانجانی، پروین ۱۳۷۳. اثر تغییرات درجه حرارت و فصل بر روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آمیلاز در گونه سوزنی برگ *Picea abies*. پژوهش و سازندگی شماره ۲۴، صفحه ۵۶ ـ ۵۹.

۷ـ کروری علی‌احمد، سودابه ۱۳۷۲. تغییرات فصلی آنزیم و ایزوآنزیم‌های پراکسیداز دوگونه از Larix و نقش این آنزیم در مقاومت درختان نسبت به سرمازدگی و رسیدن بذر. پژوهش و سازندگی، شماره ۲۰، صفحه ۶۸ ـ ۷۲.

۸ـ قهرمان، احمد ۱۳۷۳. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). جلد اول، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی

9- Adams, R. P., Thappa, R. K, Agarwal S. G., Kapahi B. K., Sarin K. Y. 1992. The wolatile leaf oils of Juniperus semiglobos a-Regel from India compared with J. excelsa M. Bieb. from Greece. J.

Essent. Oil Res., 4:214-219.

10- Alba C.M., Forchetti M.D. & Pigier A. 1996. Peroxidase and phenoloxidase activities in Peach endocarp. Plant Peroxidase IV international symposium, Austria.

11- Asada K., Miyake C., Sano S., Amako K. 1993. Scavenging of hydrogen peroxide in phytosynthetic organisms from catalase to ascerbate peroxidase. Plant Peroxidase III international symposium, Denmark.

12- Asada K., Miyake C., Amako K. 1993. Scavenging of hydrogen peroxide in photosynthetic organisma from catalase to ascorbate peroxidase. Plant peroxidase III international symposium, Denmark.

13- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Physiol plant, 85:235-241.

14- Bakardjieva N.T., Christova N.V., Christov K. 1996. Evolution of peroxidase fanction and Comparative stady of the isoperoxidases from plants at different evolutionary states. Plant Peroxidases IV international symposium, Austria.

15- Bardat PH. and Yazdani R. 1988. Genetic experssion for monoterpenes in clones of Pinus silvestris growon on different sites. Scan. J. For. Res., 3:25-36.

16- Cassab G.I., Varner J.E. 1987. Imunocytolocalization of extansin in developing soybean seed coats by immunogold - silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. J. Cell Biol. 105:2581-2588.

17- Castilo F.J. 1992. Peroxidas and stress. Plant Peroxidas 1980-1990.

18- Cuenca J., Garcla-Florenclano E., Ros Barceló A., Munoz R. 1989. Sequential release of both basic and acidic isoperoxidases to the media of suspension cultured cells of Caspisicum annuum. Plant Cell Rep., 8:471-4.

19- Ebrahimzadeh H. 1969. Metabolisme glucidique associe aI organogenese florale in vitro chez Nicotina tobacum L.. These de doctorat d et al es sciences naturelles, Faculte des sciences de paris.

20- Elvy L. & Otwell J. 1990. Inhibition of enzymatic browning in foods & beverages. Critic. Rev. Food Sci. Nutrition. Vol. 32(3), pp. 253.

21- Edreva A., Salcheva G., Georgieva D. 1993. Stress damage in related to peroxidase induction in wheat Plants. Plant Peroxidase III International symposium, Denmark.

22- Flurkey W.H. 1986. Polyphenoloxidase in higher plants. Plant Physiol., Vol. 81, pp. 614.

23- Flurkey W.H. 1991. Polyphenoloxidase composition and aminoterminl sequences of broad bean polyphenoloxidas. Plant Physiol., Vol. 91, pp. 481-483.

24- Gazaryan I.G. 1994. Heterologous expression of hemecontaing peroxidase. Plant Poroxidas Newsletter, No.4:17-19.

25- Gonzalez A., Tames R.S. and Rodriguez R. 1991. Ethylene in relation to protein, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rooting in hazelnut cotyledons. Physiologia Plantarum. Vol. 83, pp. 611-620.

26- Gordon J., Mcdougall C. 1993. Covolently bound peroxidase and lignification. Plant Peroxidases III international symposium, denmark.

27- Gyamfua A.O., Simpson B.K. and Squires E.J. 1992. Comparative studies on the polyphenoloxidase fraction from lobster on tyrosinase. J. Agri. Food Chem., Vol. 40: 772.

28- Ilahi J. 1986. Biotechnology in agriculture an forestry.

29- Jackson P., Paulo S., Pinto ricardo C. 1996. B2, The major soluble peroxidase of Lupins, in vegetative development and the plant response to pathogenic agents. Plant Peroxidase III international

symposium, Denmark.

30- Janovitz A. H. 1990. Inhibition study on apple polyphenoloxidase. J. Agri. Food Chem., Vol. 38:926-931.

31- Jolley R.L., Robb D.A. and Mason H.S. 1992. The multiple forms of mushroom tyrosinase. The Journal of biological Chemistry. Vol. 244, No. 6, PP.1593.

32- Kammerer S., Praznik W., Jessner G., Ebermann R., Korori S.A.A. 1993. Seasonal changes of peroxidase isoenzymes and activity of fructan containing plants. Plant Peroxidase III international symposium, Denmark.

33- Klapp A.J. Richard F. and Nicolas J. 1992. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. Phytochemistry, Vol. 28, No. 11, PP. 2903.

34- Korori S.A.A. 1989. Gelelektrophoretische und spektral photometrische unteruchungen zum einfluss der temperature avf struktur and oktivitat der amylase und peroxidase isoenzyme verschicdener bsvmarten. Ph.D. Thesis, University fur Boden Kultur Wien.

35- Korori S.A.A., Hinterstoisser B., Long M. and Ebermann R. 1992. Seasonal alteration of plant peroxidase isoenzymes pattern in larix decidua. Phyton, vol. 32: 307-313.

36-Korori S.A.A., Pichorer H., Ebermann R. 1993. Seasonal alteration of peroxidase and catalase isoenzyme in branches and seads of three different species of Larix. Plant Peroxidase III international symposium, denmark.

37- Kowalski S.P., Eannetta N.T. Hirzel A.T and Steffens J.C. 1992. Purification and characterization of polyphenoloxidase from glandular trichomes of Solanum berthaulotii. Plant Physiol., Vol. 100:677-687.

38- Lax A.R. and Vaughn K.C. 1991. Colocalization of polyphenoloxidase and photosystedm 11 proteins. Plant Physiol., Vol. 96:26.

39- Mayer A. M. 1987. Polyphenoloxidases in plants. Phytochem., Vol. 26, No. 1, PP. 11-20.

40- Mayer A.M. and Harel E. 1979. Polyphenoloxidase in plants. Phytochemistry, Vol. 18:193-215.

41- Mcdogall G.J. 1992. Plant peroxidases and cell differentiation. Plant Peroxidas, 180-190.

42- Mittler R., Pitcher L.H., Ziliuskas B.A. 1993. Molecular biology of pea cytosolic ascorbate peroxidase and its response to oxidative stress. Plant Peroxidase III international symposium, denmark.

43- Murao S., Oyama H., Furusawa S.H. 1992. Isolation and identification of pyrogalloloxidase producing microorganism and the enzyme production. Biosi. Biotech. Biochem., Vol. 56:3/525-526.

44- Ros Barcelo A., Munoz R. 1992. Peroxidases: Their role in the control of plant cell growth. Plant Peroxidase 1980-1990 pp. 71-89.

45- Sadri H.A., Assadi M. 1994. Preliminary stadies on momoterpene composition of Juniperus polycarpos. Iran J. Bot., 6(2).

46- Sandberg G., Gardestrõn P., Sltbon F., Olsson O. (1990). Presence of indole -3-acetic acid in chloroplasts of Nicotiana tobacum and Pinus sylrestris. Planta, 18:562-568.

47- Sezik E., Erosoz T. 1986. Monoterpene hydrocarbones of essential oil of Juniperus foetidissima. Fitoterapia, 57(6), 442-444.

48- Shahar T., Henndy N., Gutfinger T., Hareven D. and Lifschits E. 1992. The tomato 66.3-KD polyphenoloxidase gene: Molecular identification and developmental expression. the plant cell, Vol. 4:135-147.

49- Stich K. and Ebermann R. 1988. Investigation of the substrate

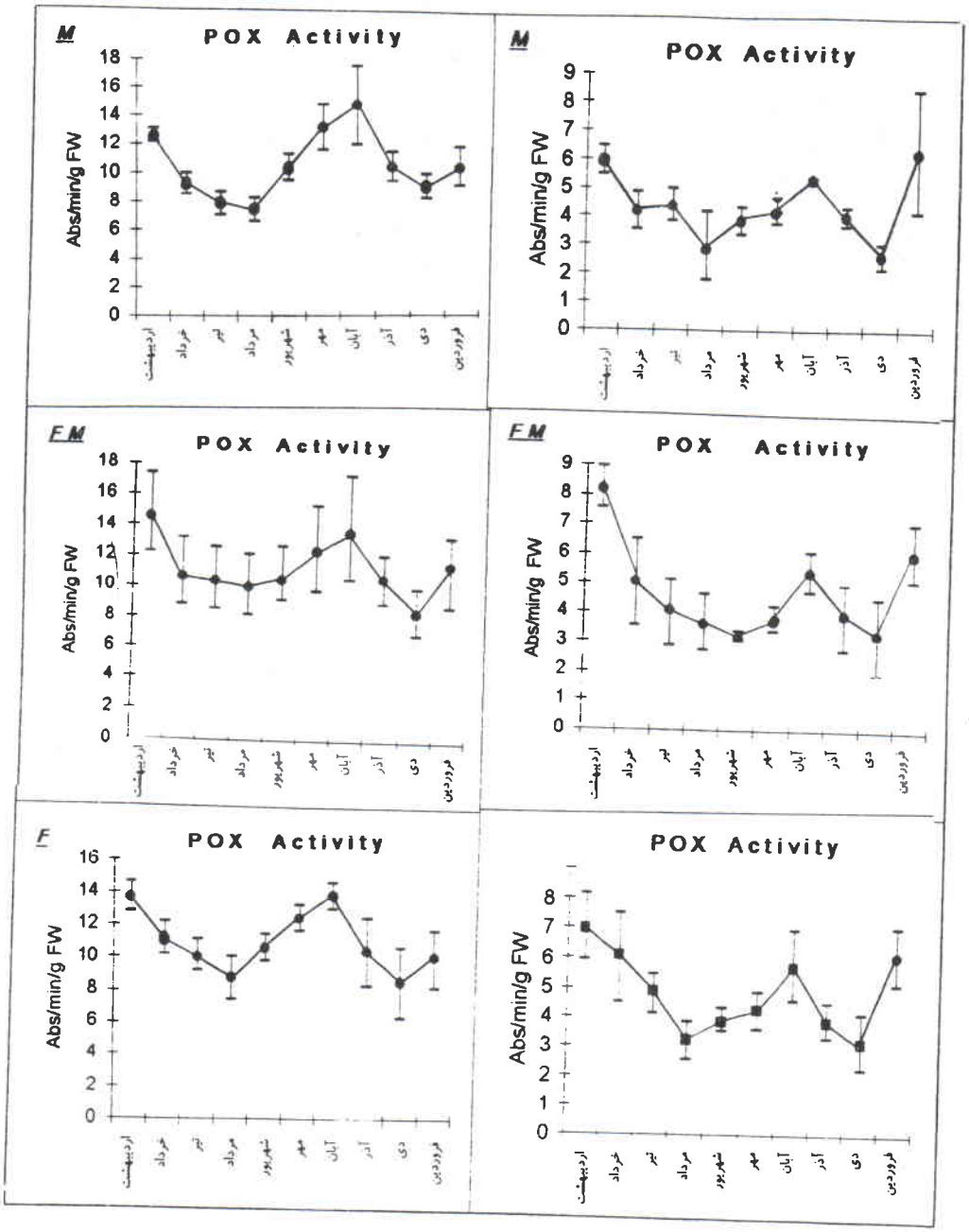
specially of peroxidase isoenzymes occuring in wood of different species. Hozgorschung,42:221-224.

50- Takeuchi W., Takahashi H., Kojima M. 1992. Purification and characterization of the main isozyme of polyphenoloxidase in mung bean (Vigna mungo) seedlings. Biosci. Biotech. Biochem., 56:7, 1137-1135.

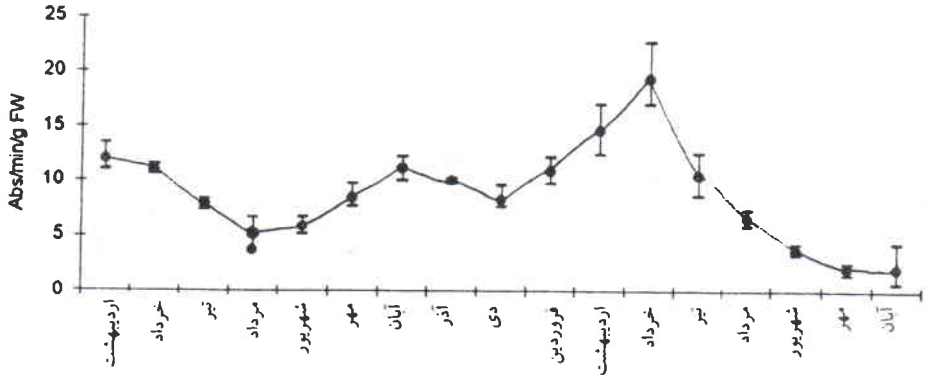
51- Van huystec R.B., Esnault R. 1992. Stracture and biosynthesis of peroxidase from peanut cells. Plant Peroxidase, 1980-1990.

52-Welinder K. G. 1994. Plant peroxidase: Structure-fruction relationships. Plant Peroxidase, 1980-1990.

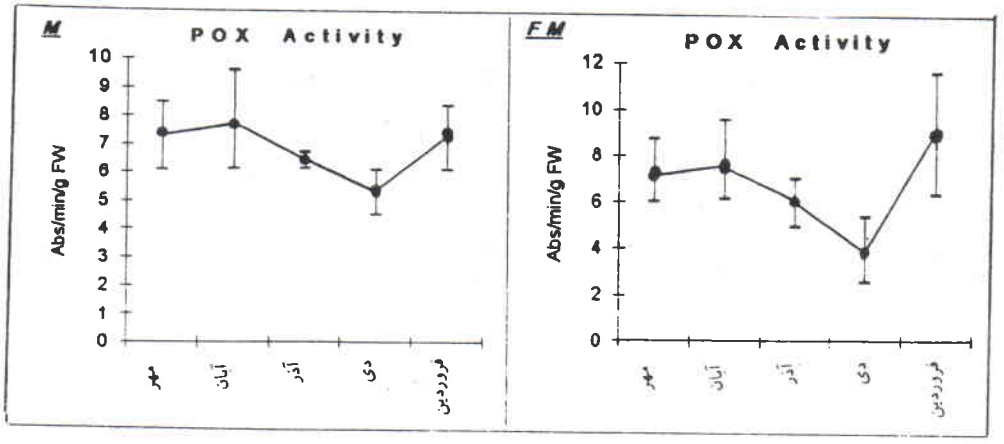
شکل شمارهٔ ۳- مقایسهٔ تغییرات فصلی فعالیت آنزیم پراکسیداز در سرشاخه‌های سبز (شکلهای سمت چپ) و شاخه‌ها (شکلهای سمت راست) در واحد Abs/min/g FW پایه‌های نر (M)، نر ماده (FM) و ماده (F) درختان ارس



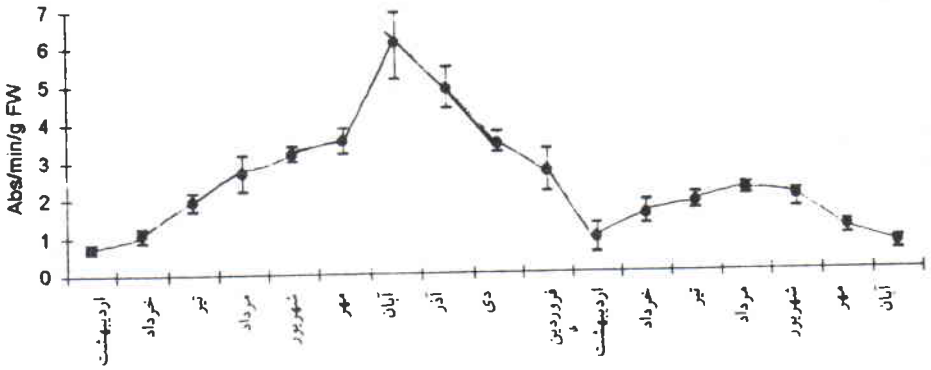
شکل شمارهٔ ۴- بررسی تغییرات فصلی فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی تکوین مخروط ماده از زمان لقاح تا رسیدن میوه در واحد Abs/min/g FW پایه‌های ماده درختان ارس



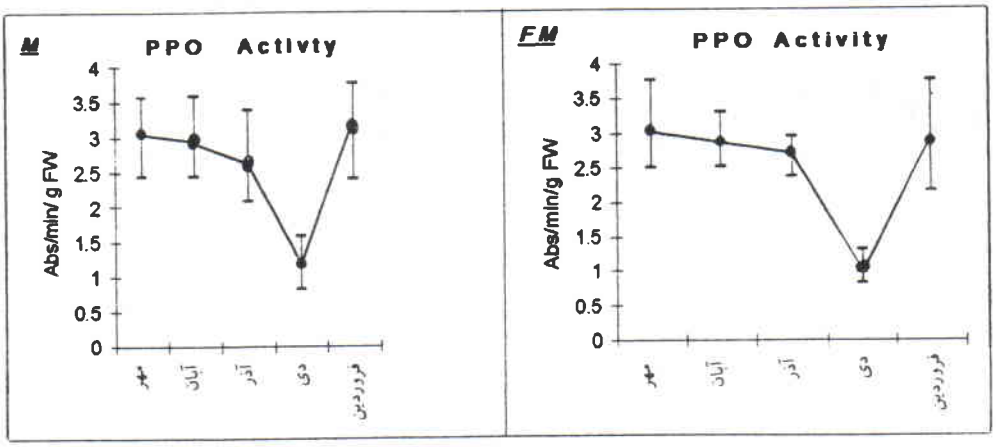
شکل شمارهٔ ۵- بررسی تغییرات فصلی فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی تکوین مخروط نر تا قبل از گرده‌افشانی در واحد Abs/min/g FW پایه‌های نر (M) و نر ماده (FM) درختان ارس



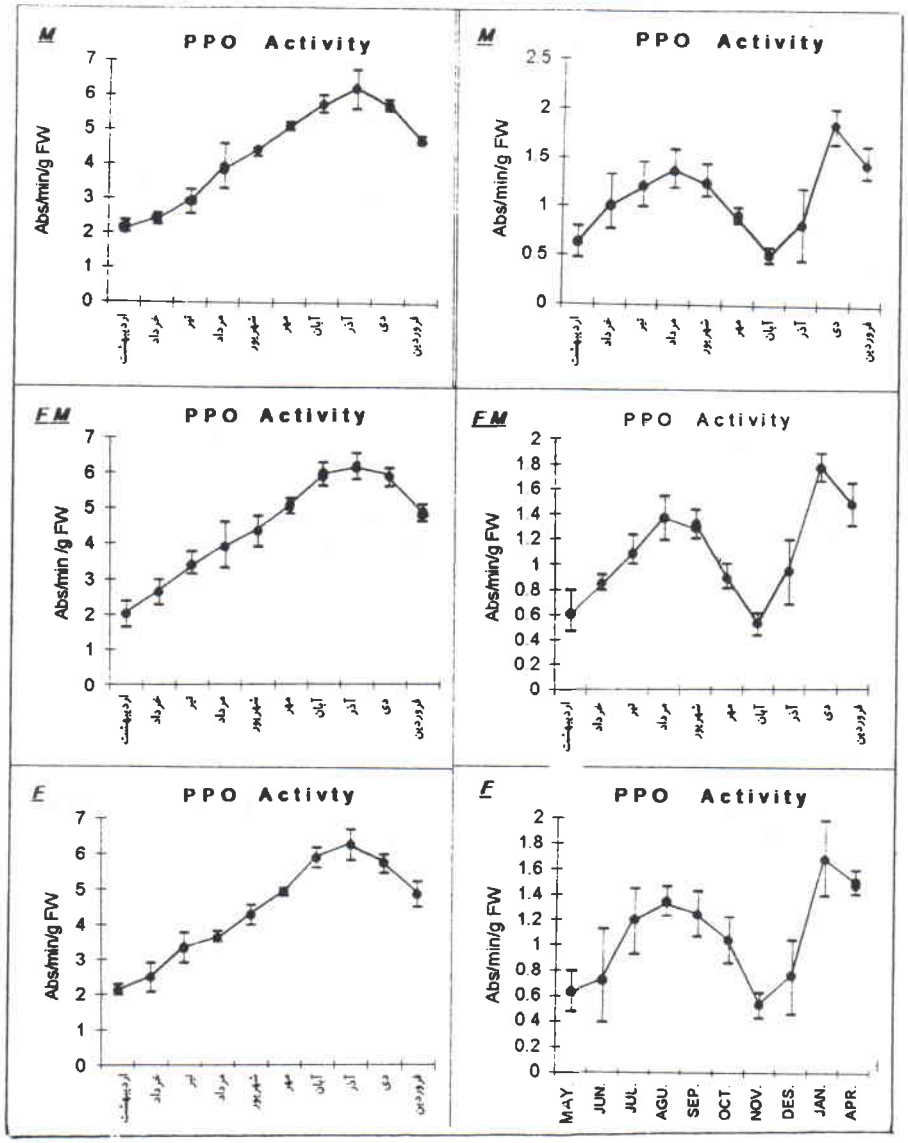
شکل شمارهٔ ۸- بررسی تغییرات فصلی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در طی تکوین مخروط ماده از زمان لقاح تا رسیدن میوه در واحد Abs/min/g FW پایه‌های ماده درختان ارس



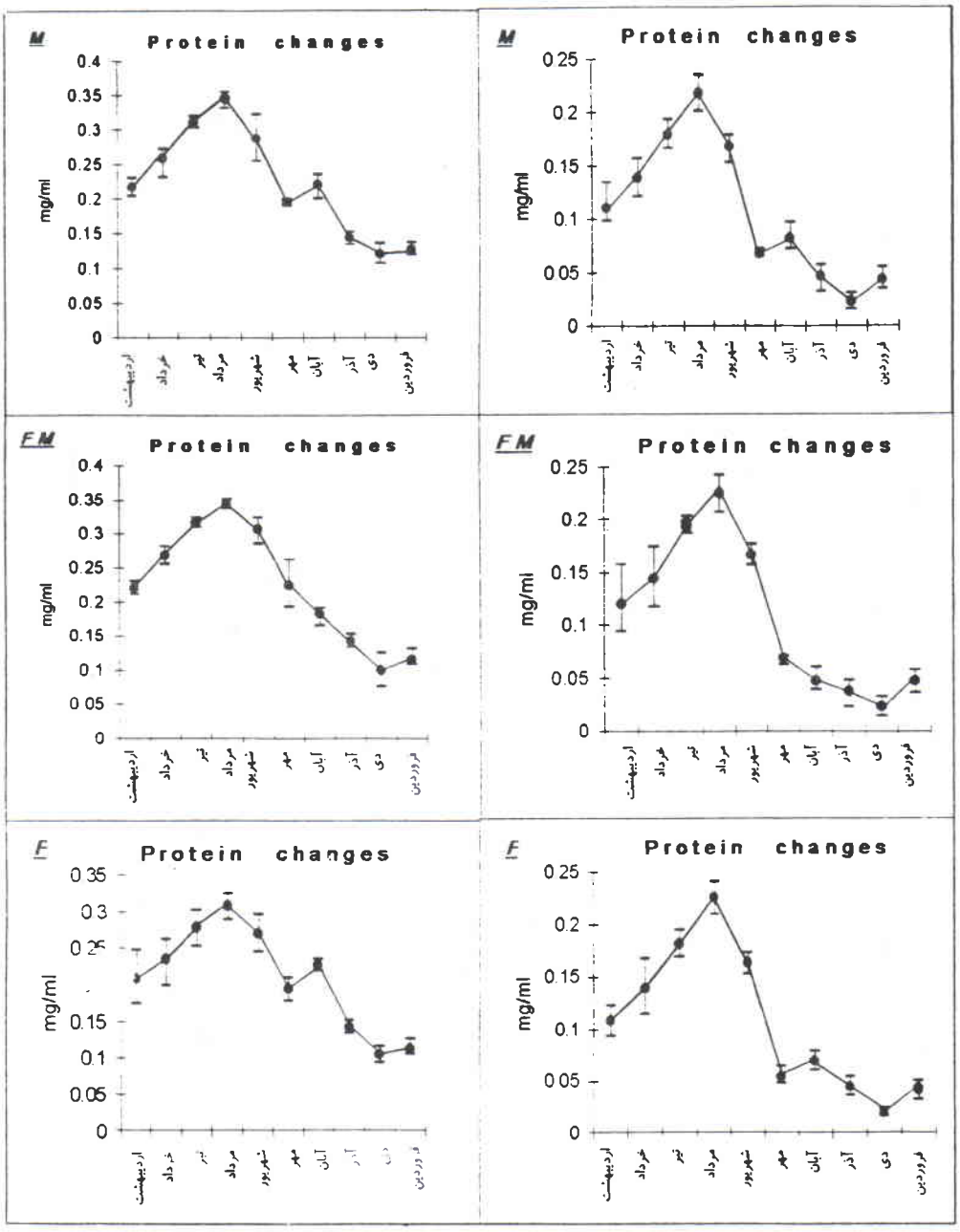
شکل شمارهٔ ۹- بررسی تغییرات فصلی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در طی تکوین مخروط نر تا قبل از گرده‌افشانی در واحد Abs/min/m FW پایه‌های نر (M) و نر ماده (FM) درختان ارس.



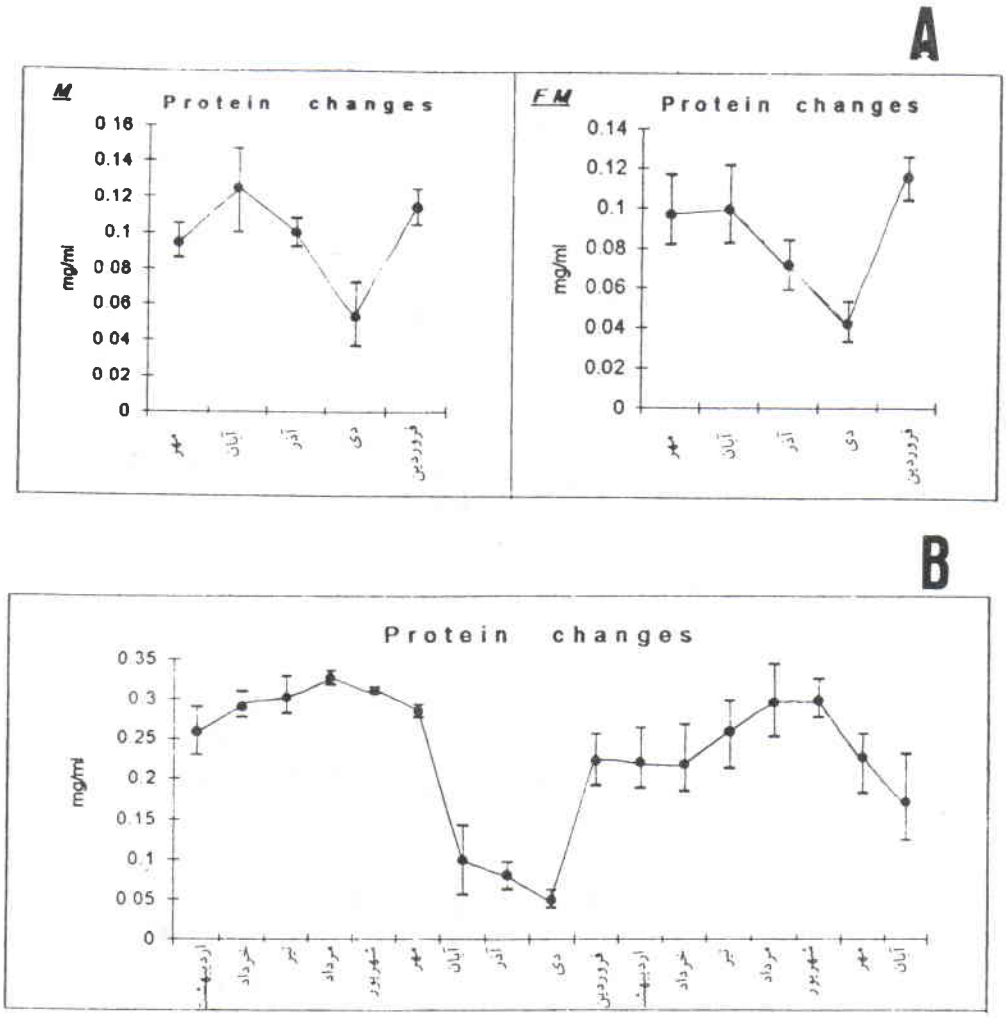
شکل شمارهٔ ۱۰ - مقایسهٔ تغییرات فصلی آنزیم پلی فنل اکسیداز در سرشاخه‌های سبز (شکلهای سمت چپ) و شاخه‌های (شکلهای سمت راست) در واحد Abs/min/g FW پایه‌های نر (M)، نر ماده (چپ) و شاخه‌های (شکلهای سمت راست) در واحد Abs/min/g FW پایه‌های نر (M)، نر ماده (FM) و ماده (F) درختان ارس



شکل شمارهٔ ۱۱- مقایسهٔ تغییرات پروتئینهای محلول در سرشاخه‌های سبز (شکلهای سمت چپ) و شاخه (شکلهای سمت راست) در واحد mg/ml پایه‌های نر (M)، نر ماده (FM) و ماده (F)



شکل شمارهٔ ۱۲- بررسی تغییرات فصلی پروتئینهای محلول در واحد mg/ml
A: در طی تکوین مخروط نر تا قبل از گرده‌افشانی در پایه‌های نر (M) و نر ماده (FM) درختان ارس
B: در طی تکوین مخروط ماده از زمان لقاح تا رسیدن میوه پایه‌های ماده درختان ارس

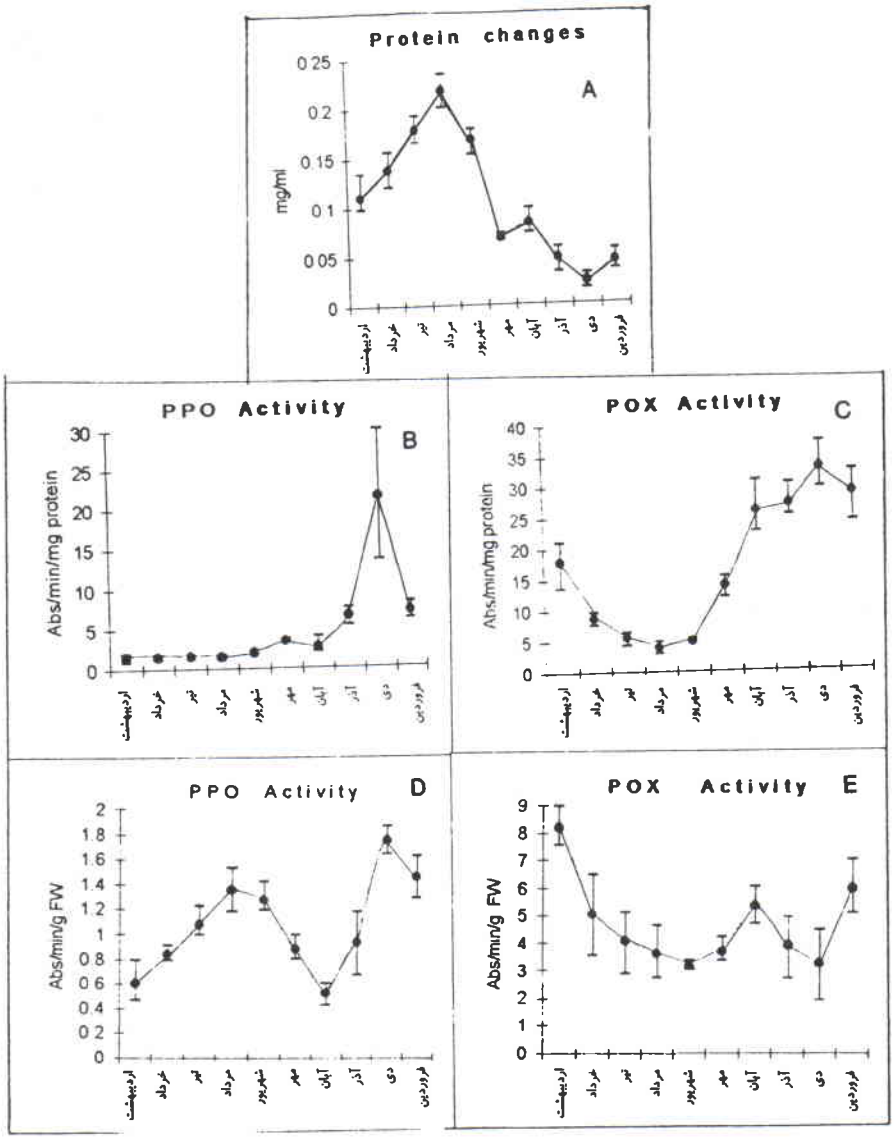


شکل شمارهٔ ۱۳- مقایسهٔ تغییرات فصلی پروتئینهای محلول، فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در شاخه

A: تغییرات پروتئینهای محلول در واحد mg/Ml

C و B: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/mg Protein

E و D: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/g FW

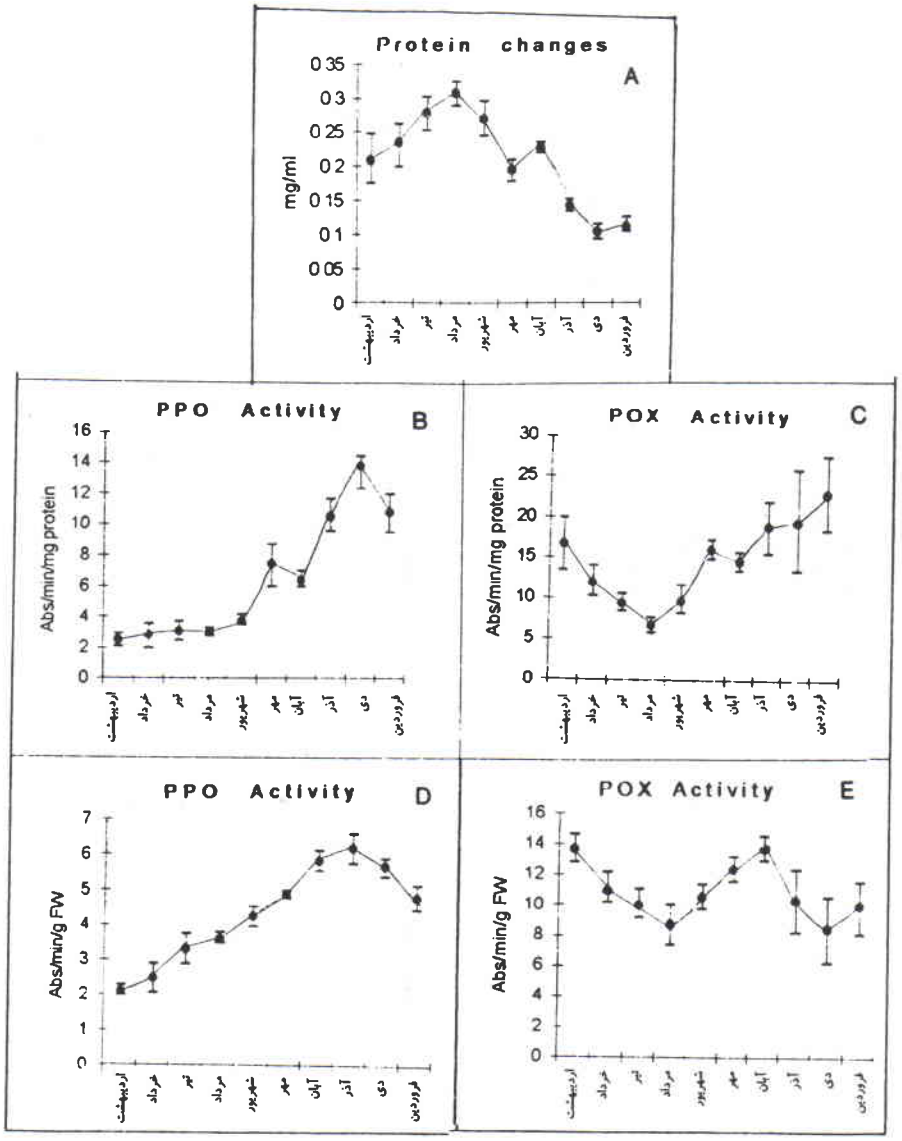


شکل شمارهٔ ۱۴ - مقایسهٔ تغییرات فصلی پروتئینهای محلول، فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در سرشاخه‌های سبز

A: تغییرات پروتئینهای محلول در واحد mg/Ml

C و B: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/mg Protein

E و D: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/g FW

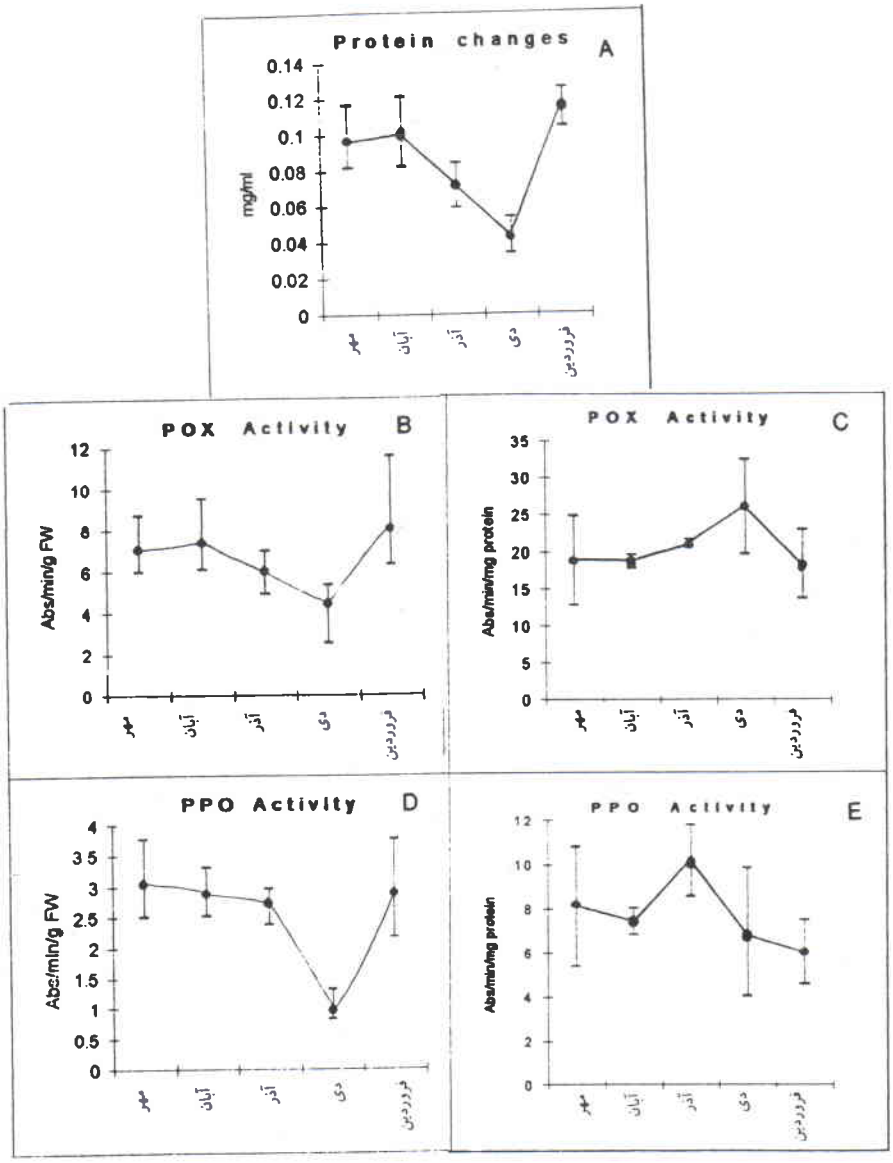


شکل شمارهٔ ۱۵- مقایسهٔ تغییرات فصلی پروتئینهای محلول، فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در طول تکوین مخلوط نر قبل از گرده‌افشانی

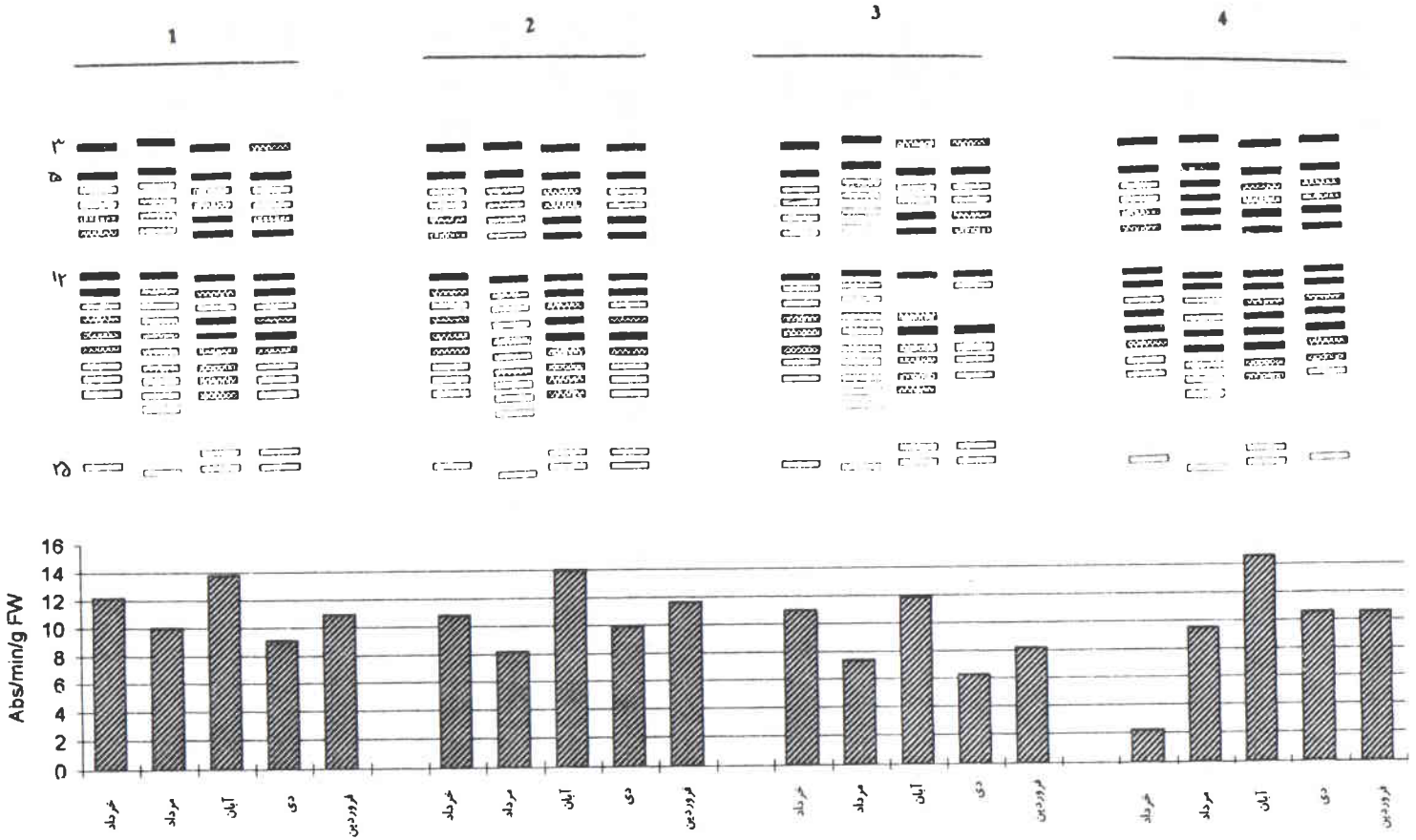
A: تغییرات پروتئینهای محلول در واحد mg/Ml

C و B: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/mg Protein

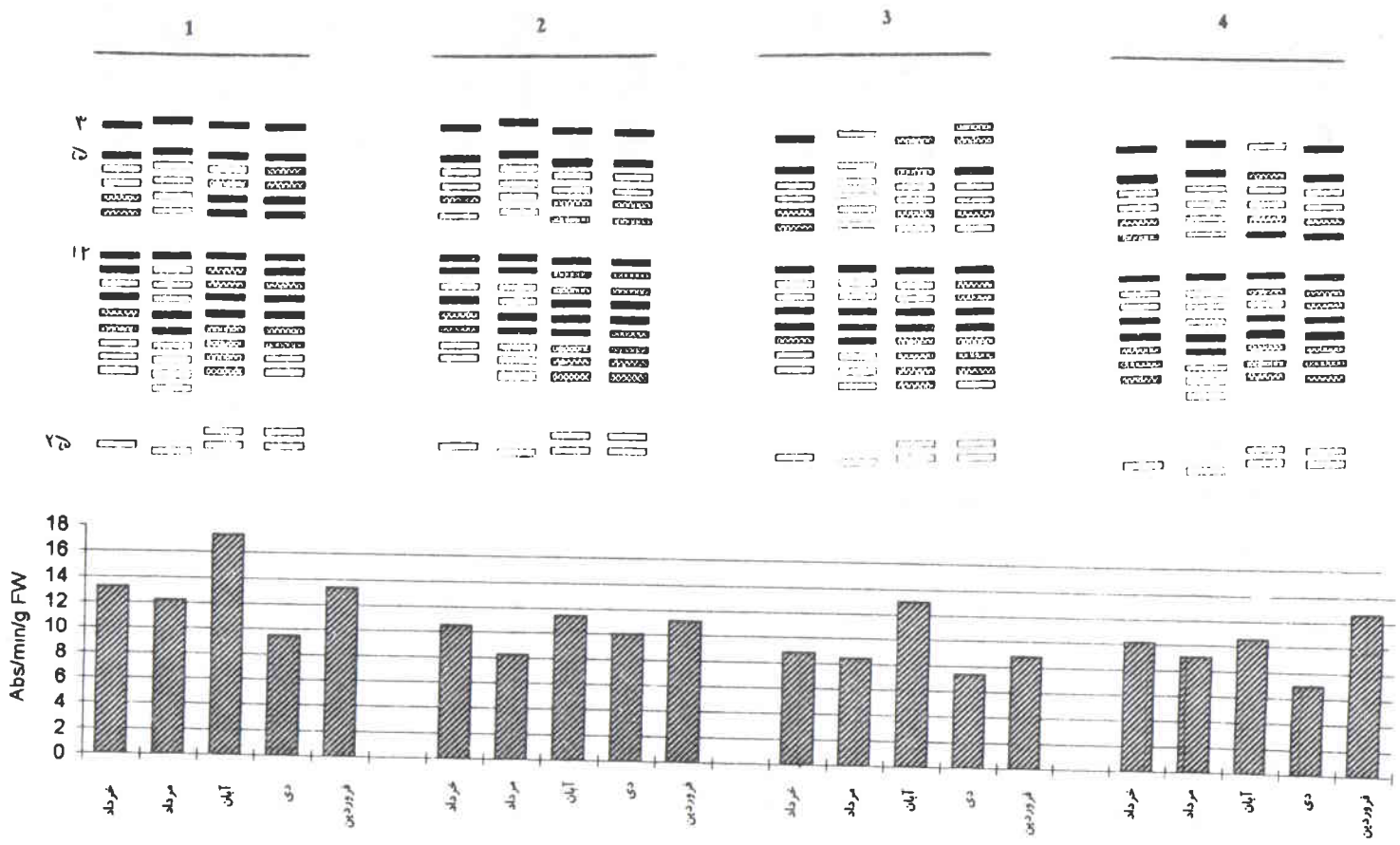
E و D: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/g FW



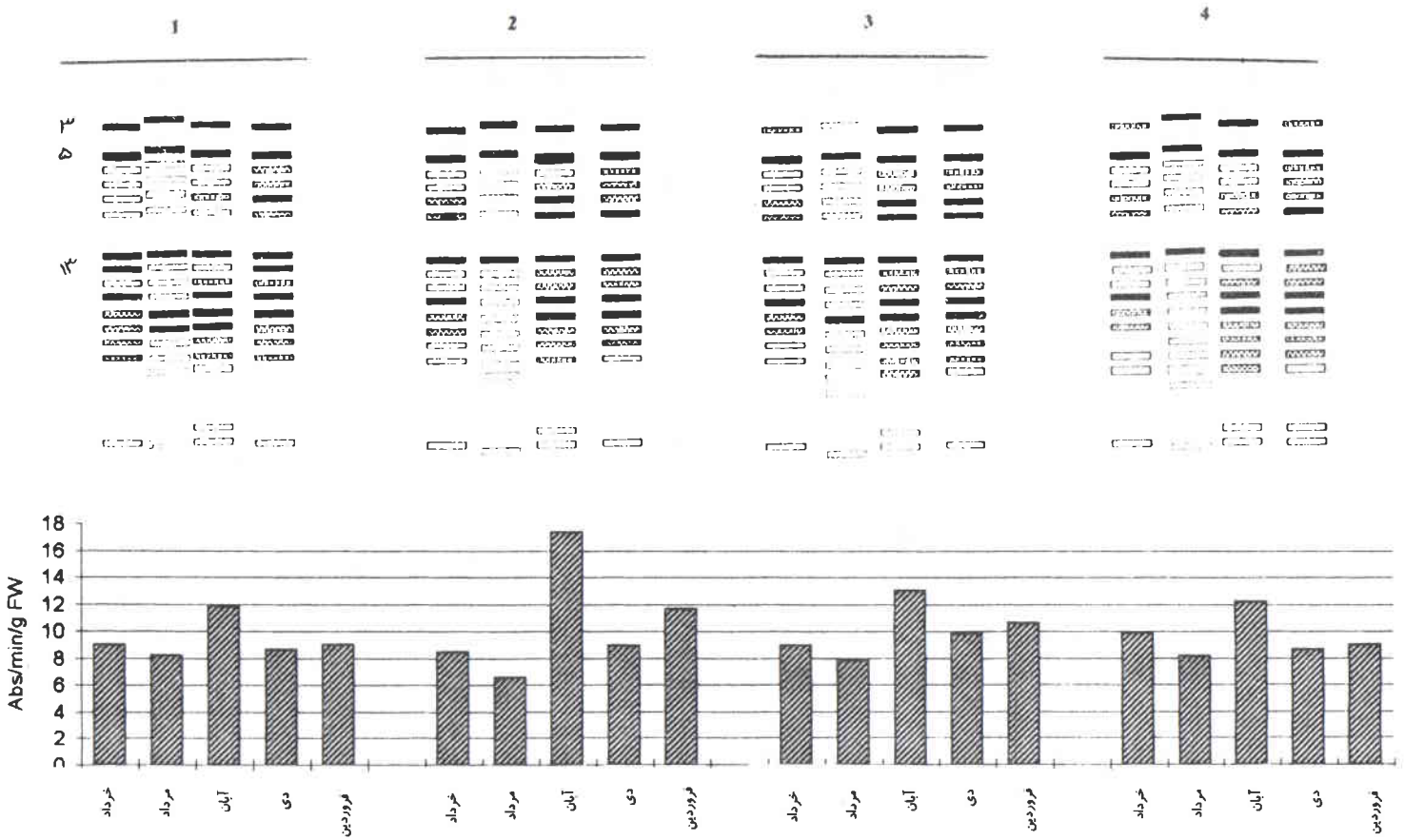
شکل شمارهٔ ۲۲- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز سرشاخه‌های سبز ۴ پایه ماده ارس



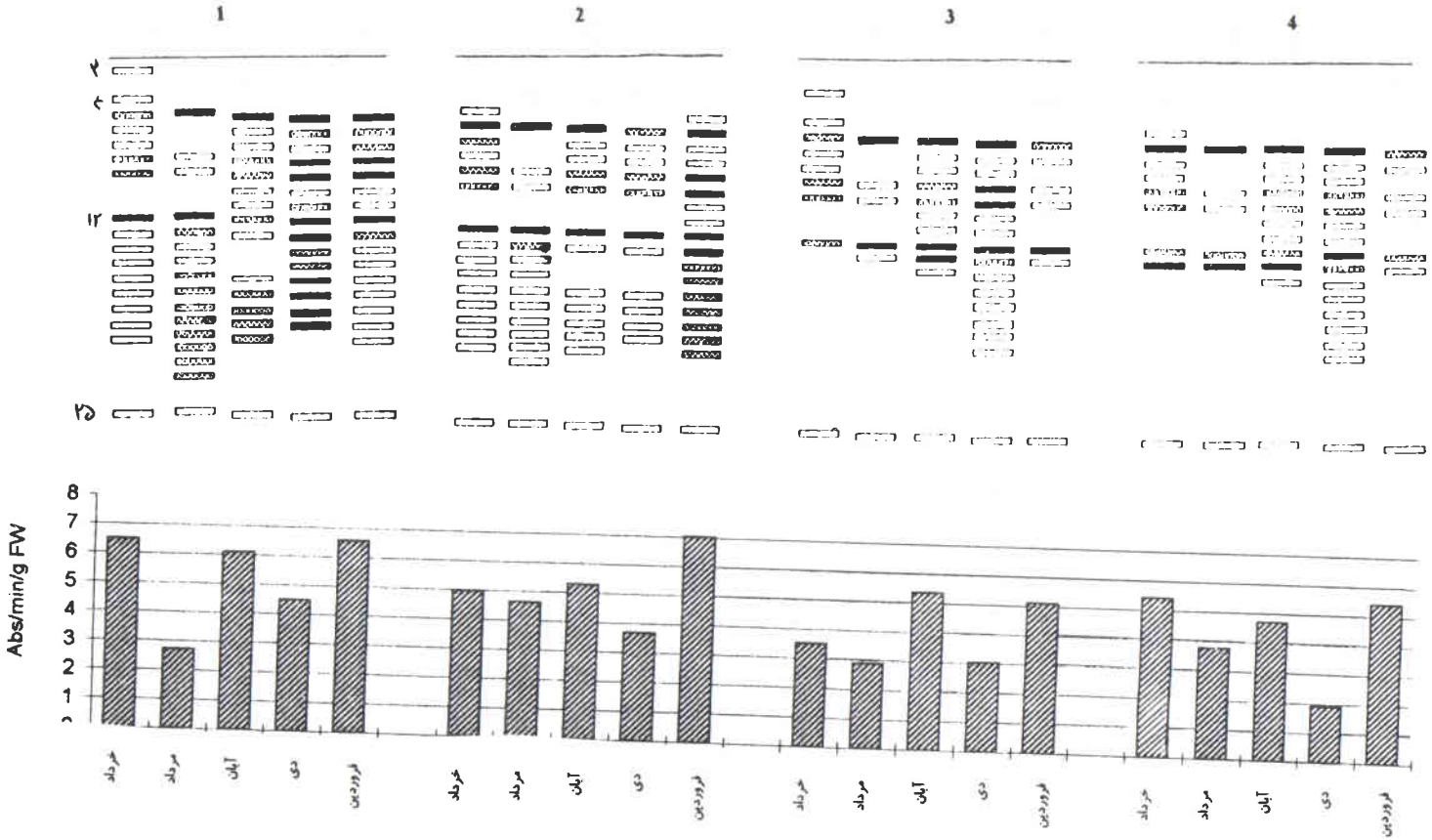
شکل شمارهٔ ۲۱- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز سرشاخه‌های سبز ۴ پایه نر ماده ارس



شکل شمارهٔ ۲۰- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز سرشاخه سبز ۴ پایه نر ارس



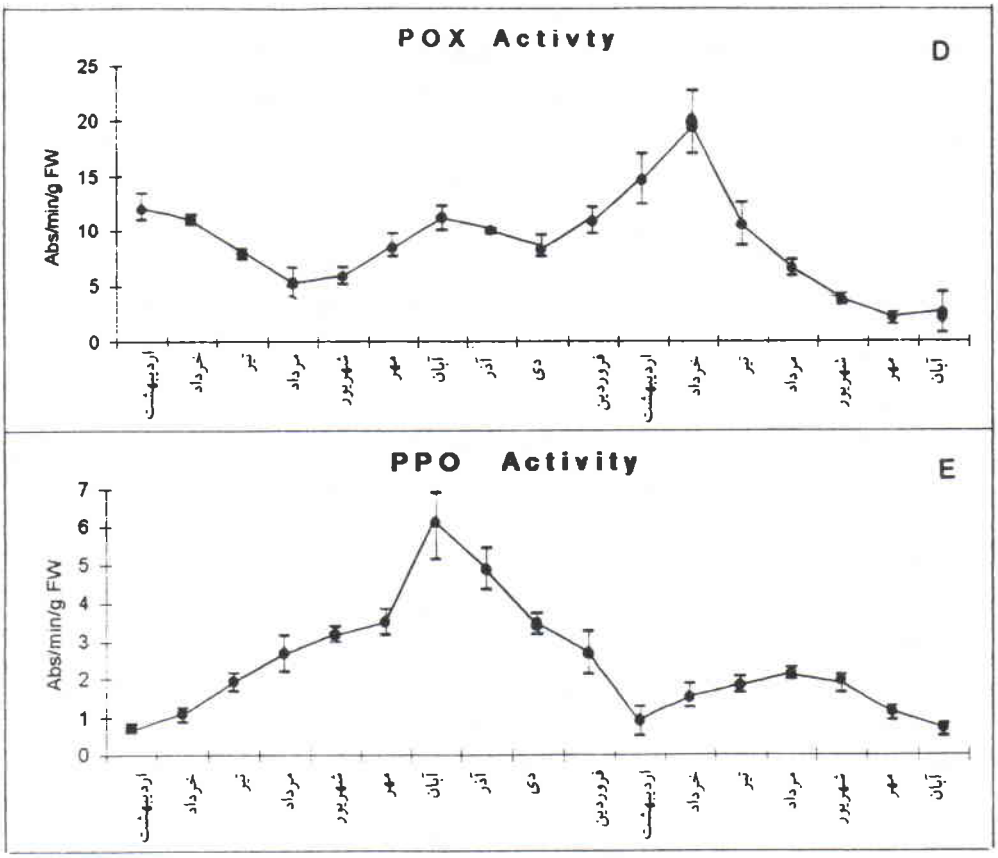
شکل شمارهٔ ۱۹- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز شاخه ۴ پایه ماده ارس



شکل شمارهٔ ۱۸ – مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز شاخه ۴ پایه نر ماده ارس

شکل شمارهٔ ۱۷ – مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز شاخه ۴ پایه نر ارس

ادامه شکل شمارهٔ ۱۶-

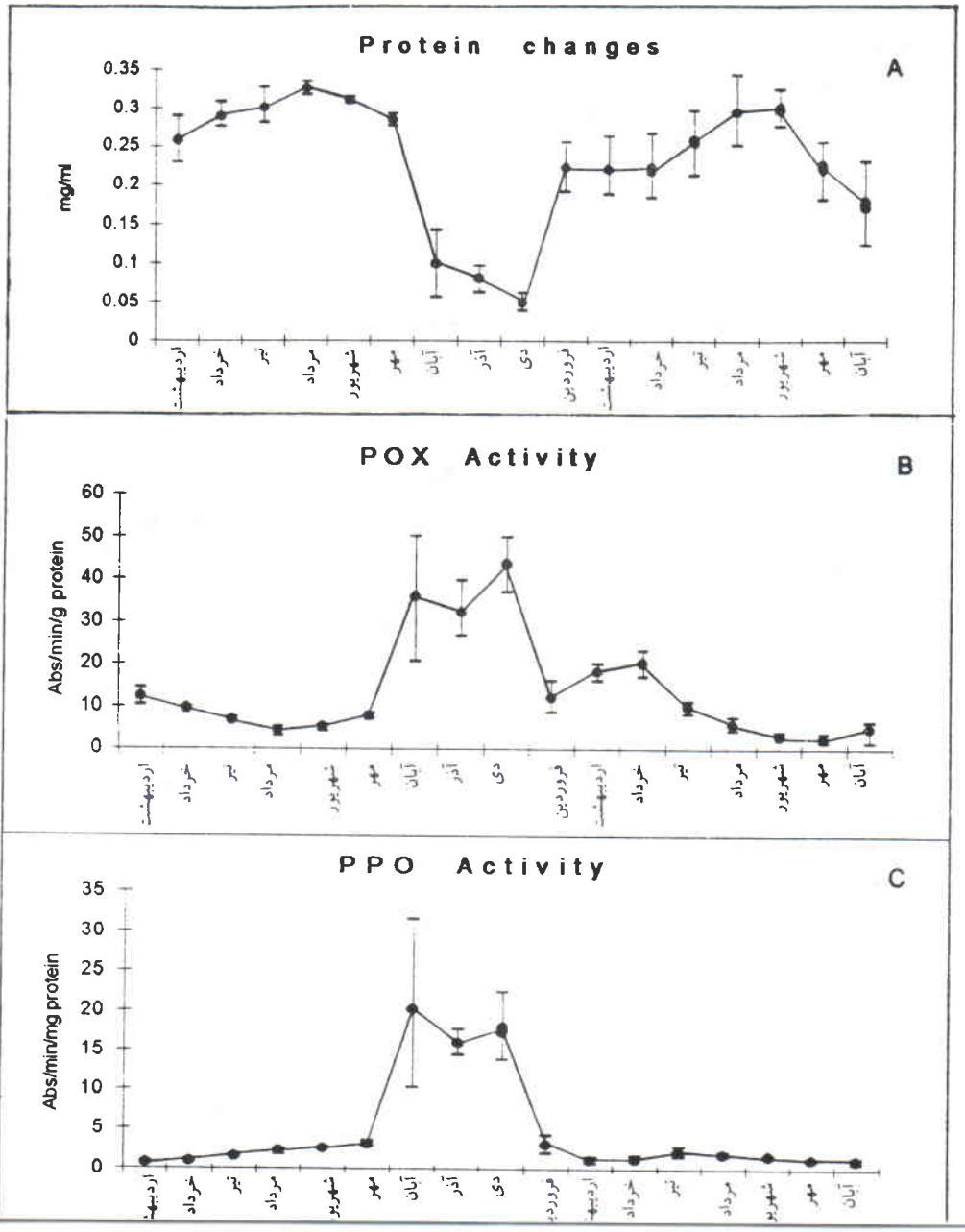


شکل شمارهٔ ۱۶- مقایسهٔ تغییرات فصلی پروتئینهای محلول، فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در طول تکوین مخروط ماده بعد از گرده‌افشانی

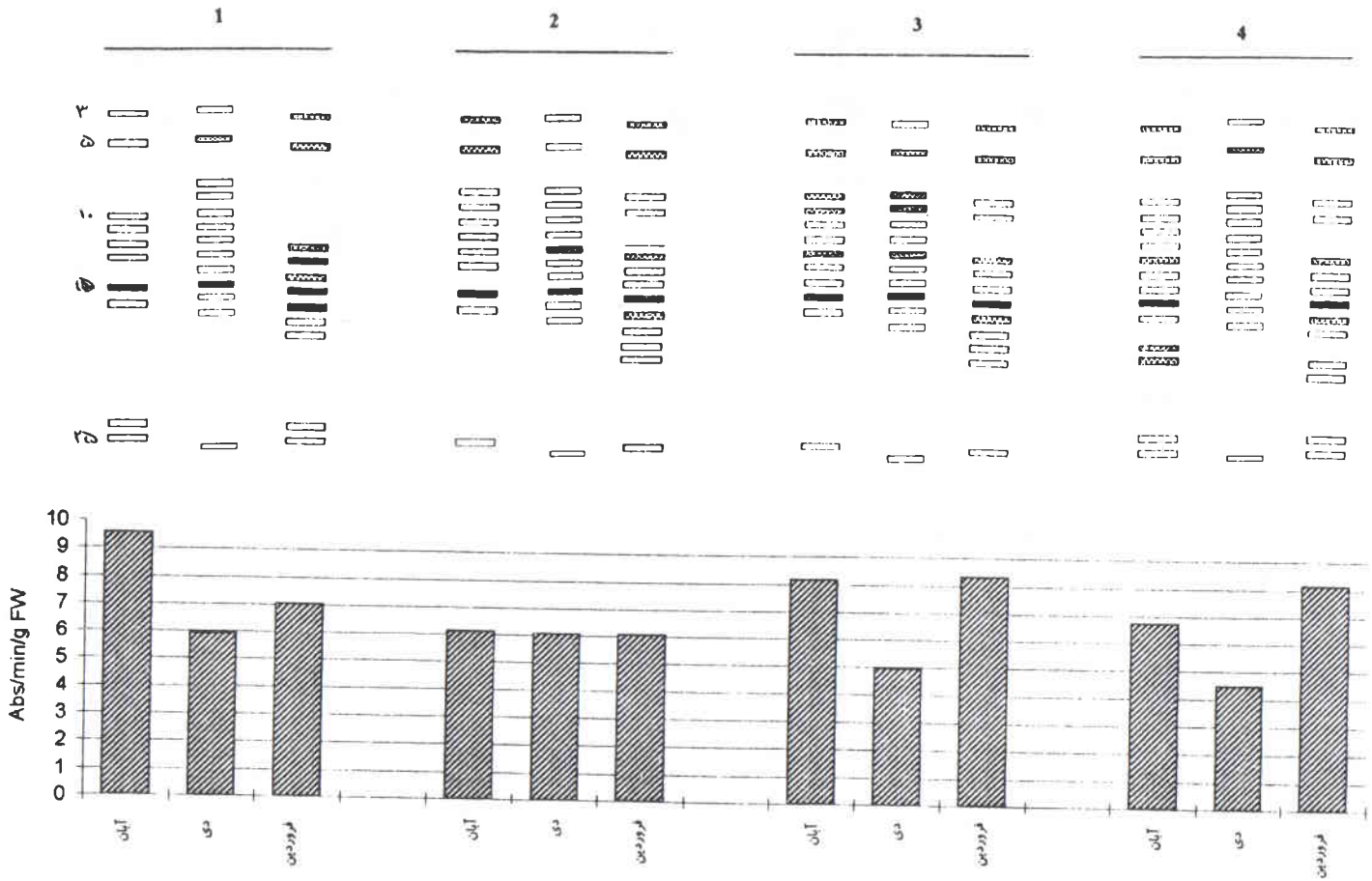
A: تغییرات پروتئینهای محلول در واحد mg/Ml

C و B: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/mg Protein

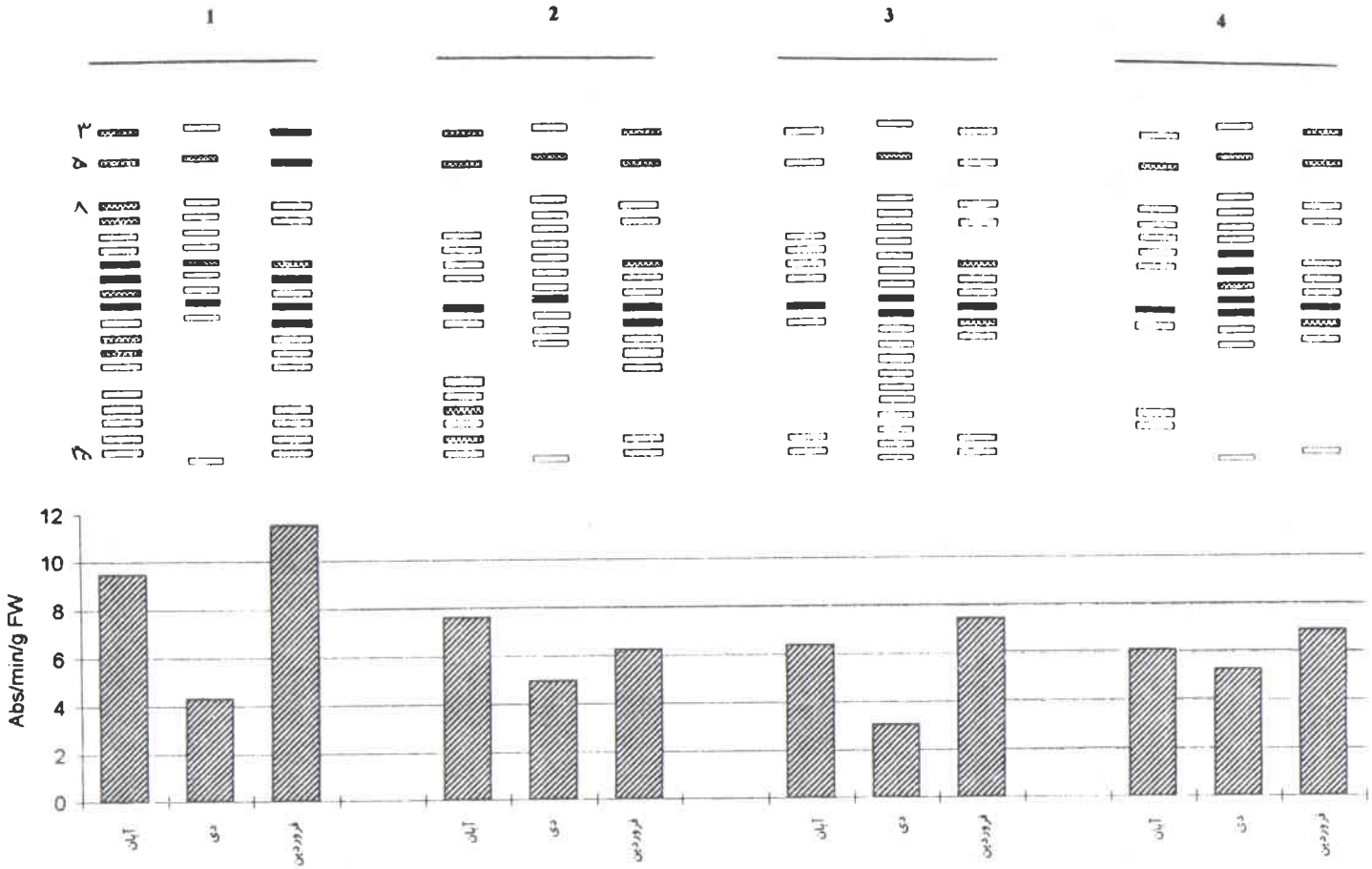
D و B: تغییرات پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز (POX) در واحد Abs/min/g FW



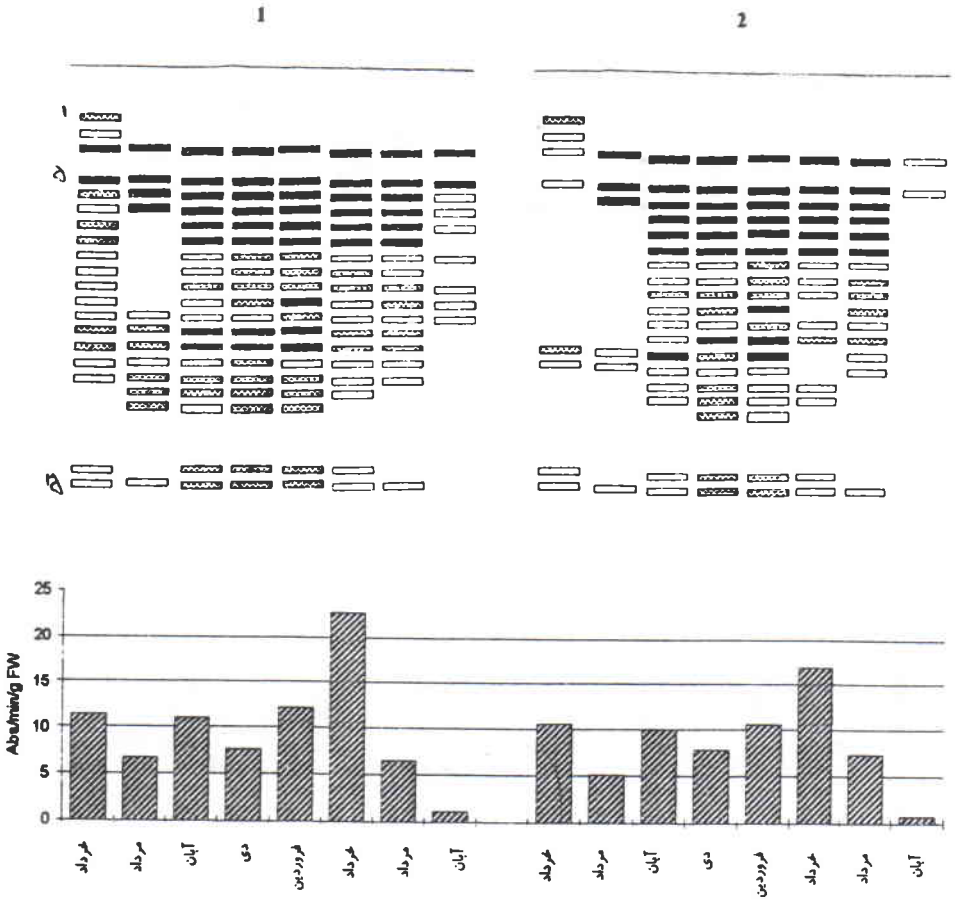
شکل شمارهٔ ۲۳- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز مخلوط نر ۴ پایه نر ارس



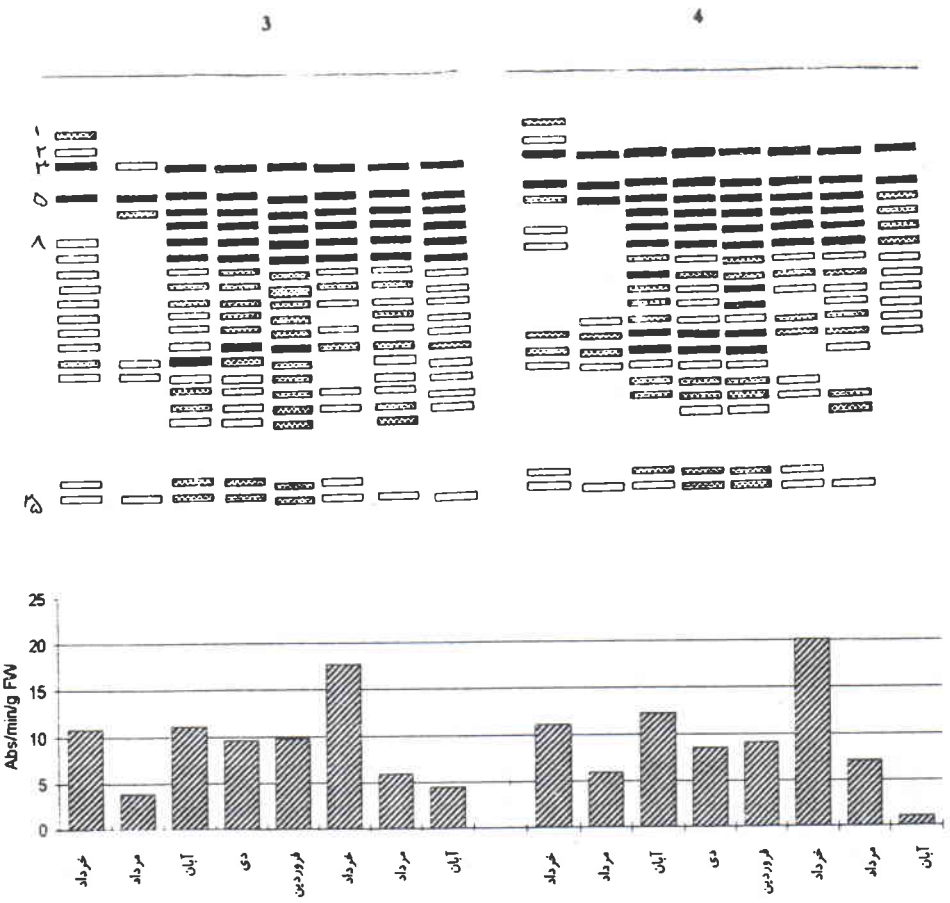
شکل شمارهٔ ۲۴- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز مخروط نر ۴ پایه نر ارس



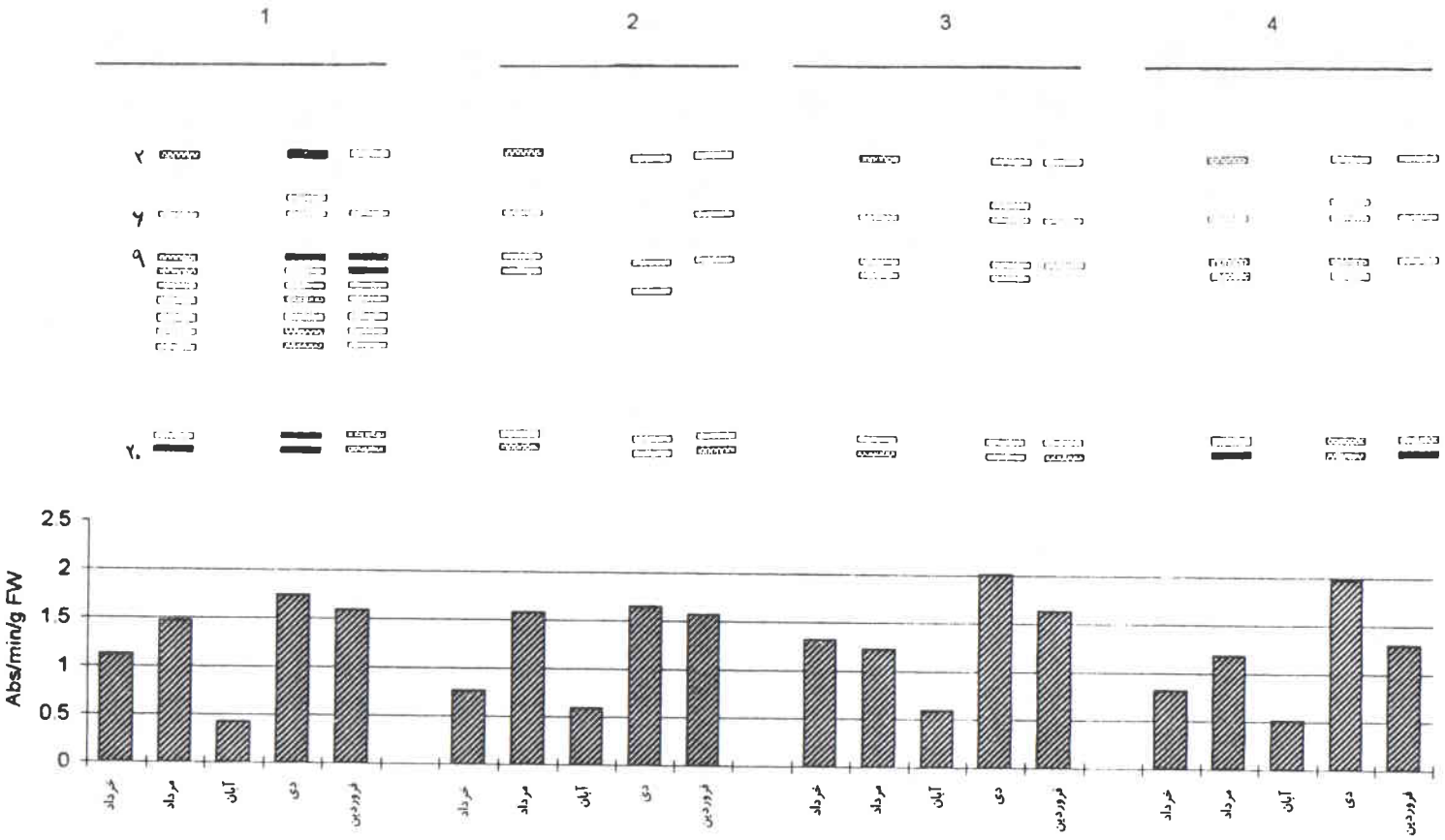
شکل شمارهٔ ۲۵- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز مخروط ماده ۴ پایه ارس



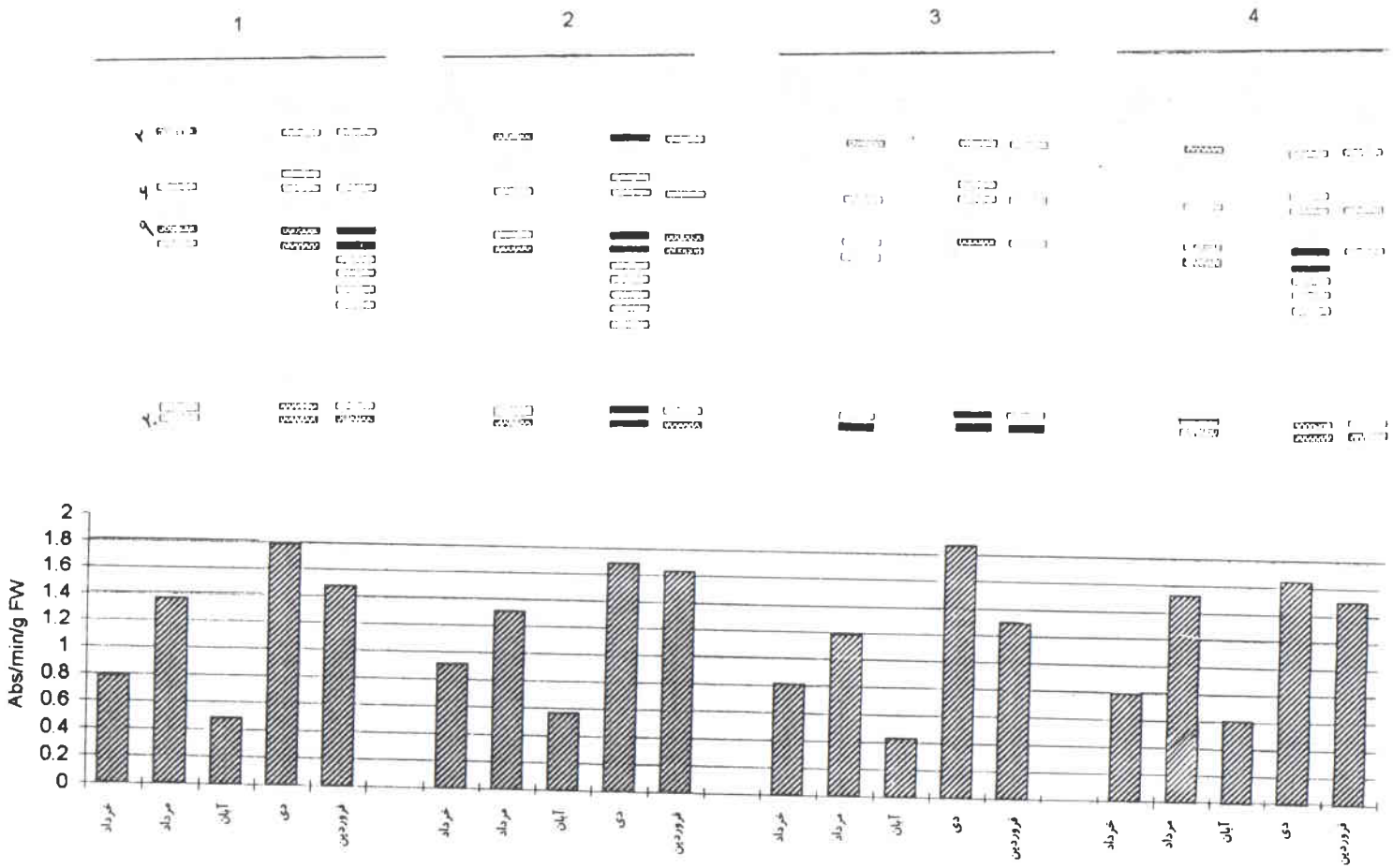
ادامه شکل شمارهٔ ۲۵-



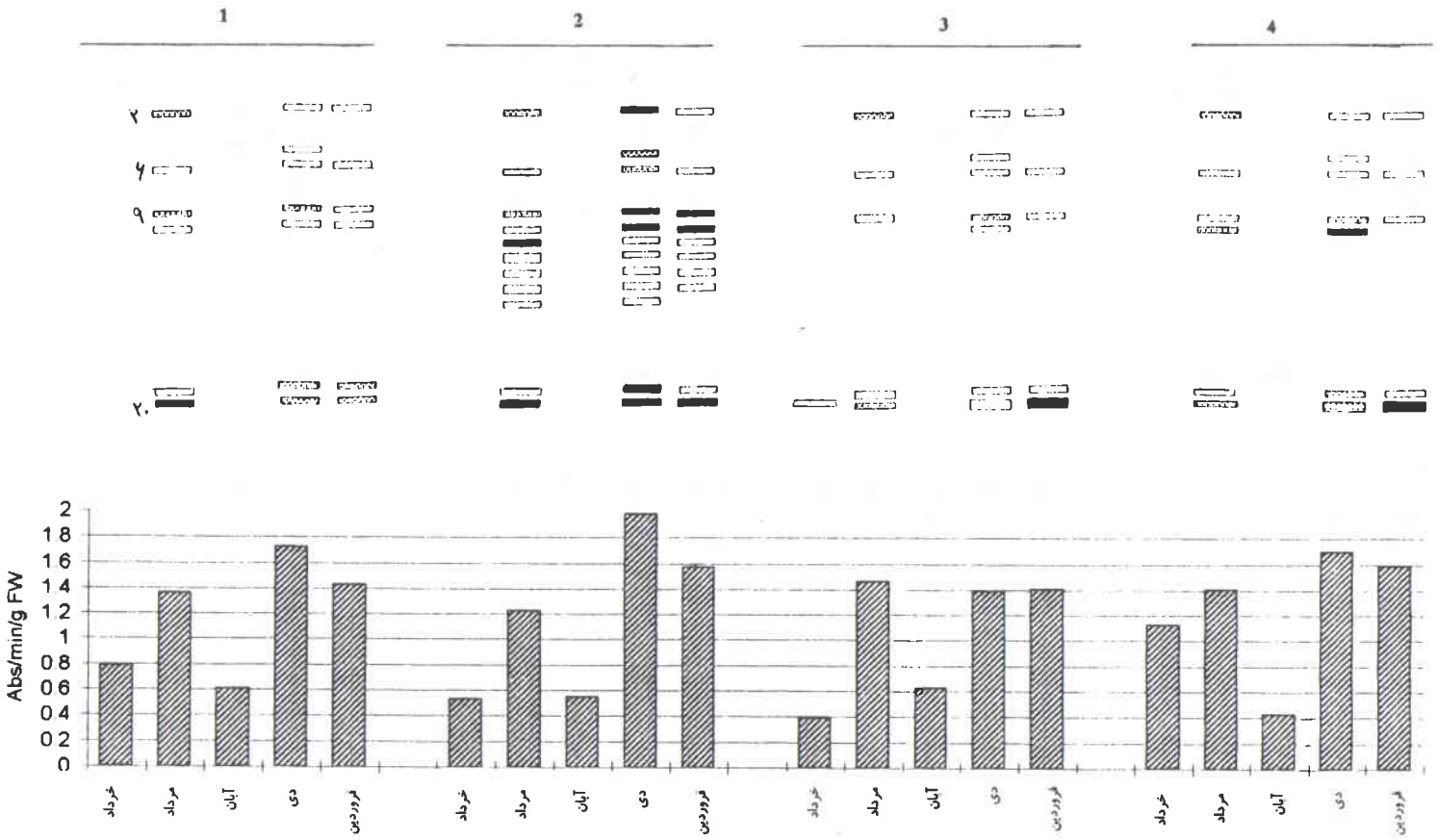
شکل شمارهٔ ۲۶- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ۴ پایه نر ارس



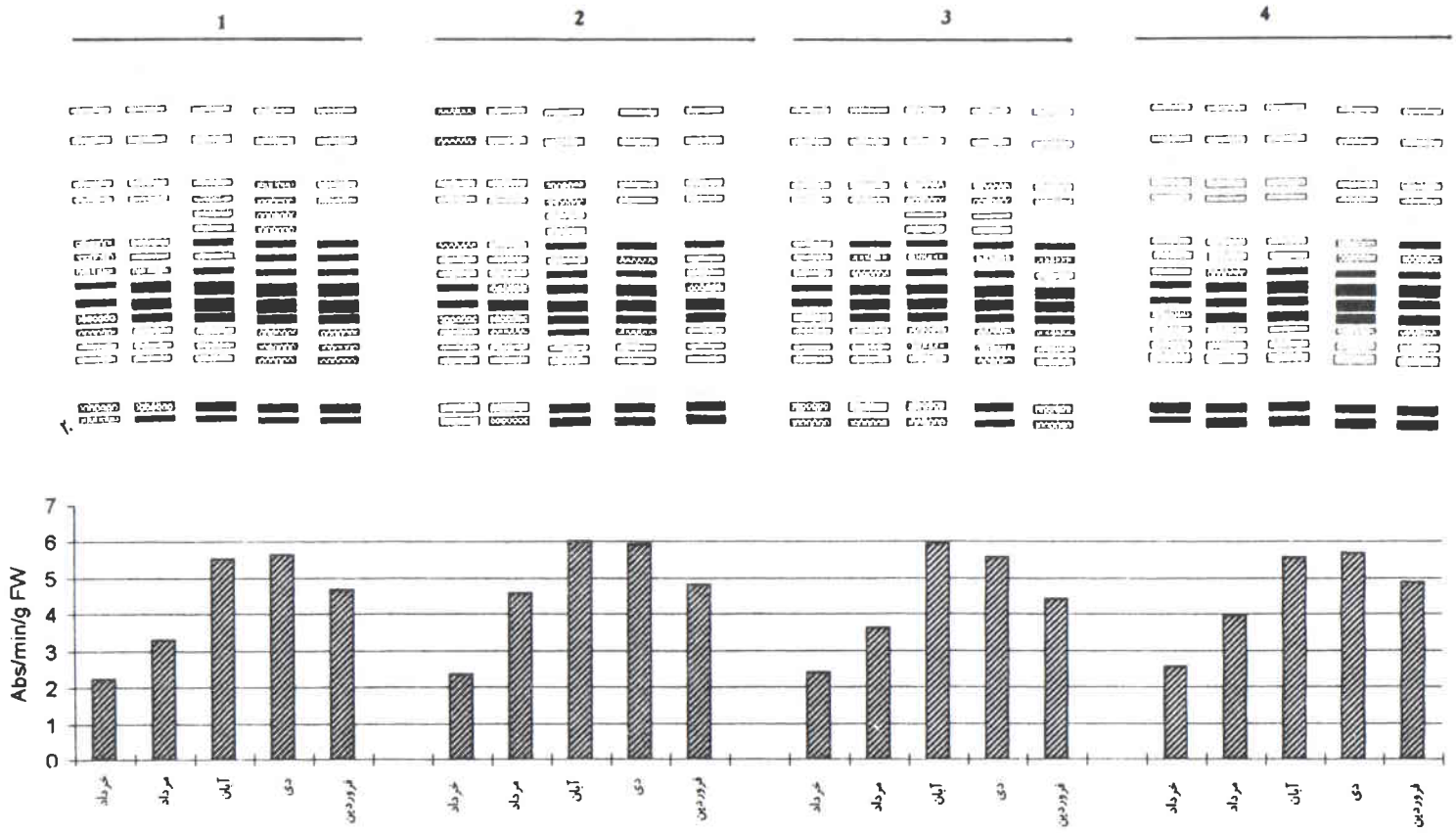
شکل شمارهٔ ۲۷- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ۴ پایه نر ماده ارس



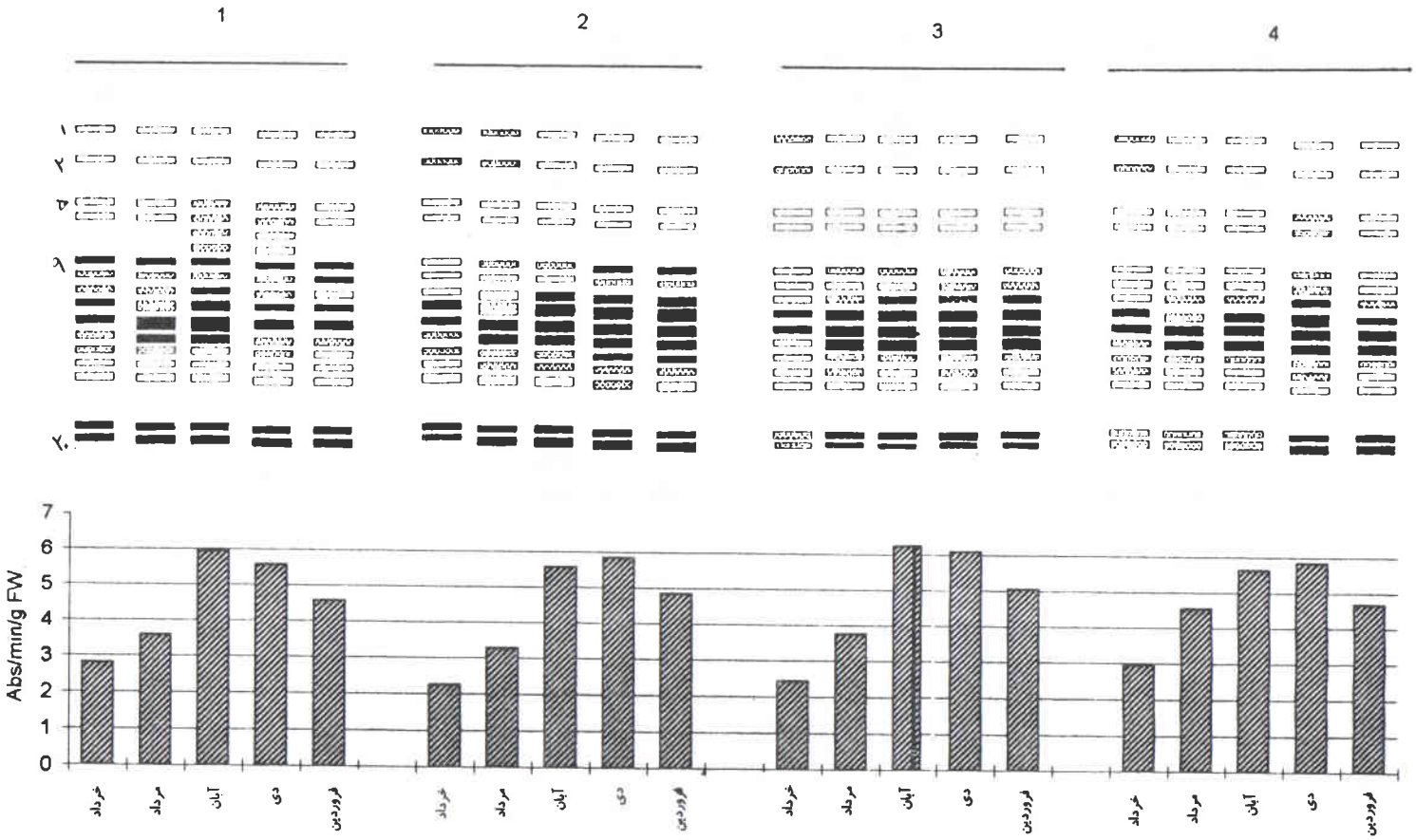
شکل شمارهٔ ۲۸- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شاخه ۴ پایه ماده ارس



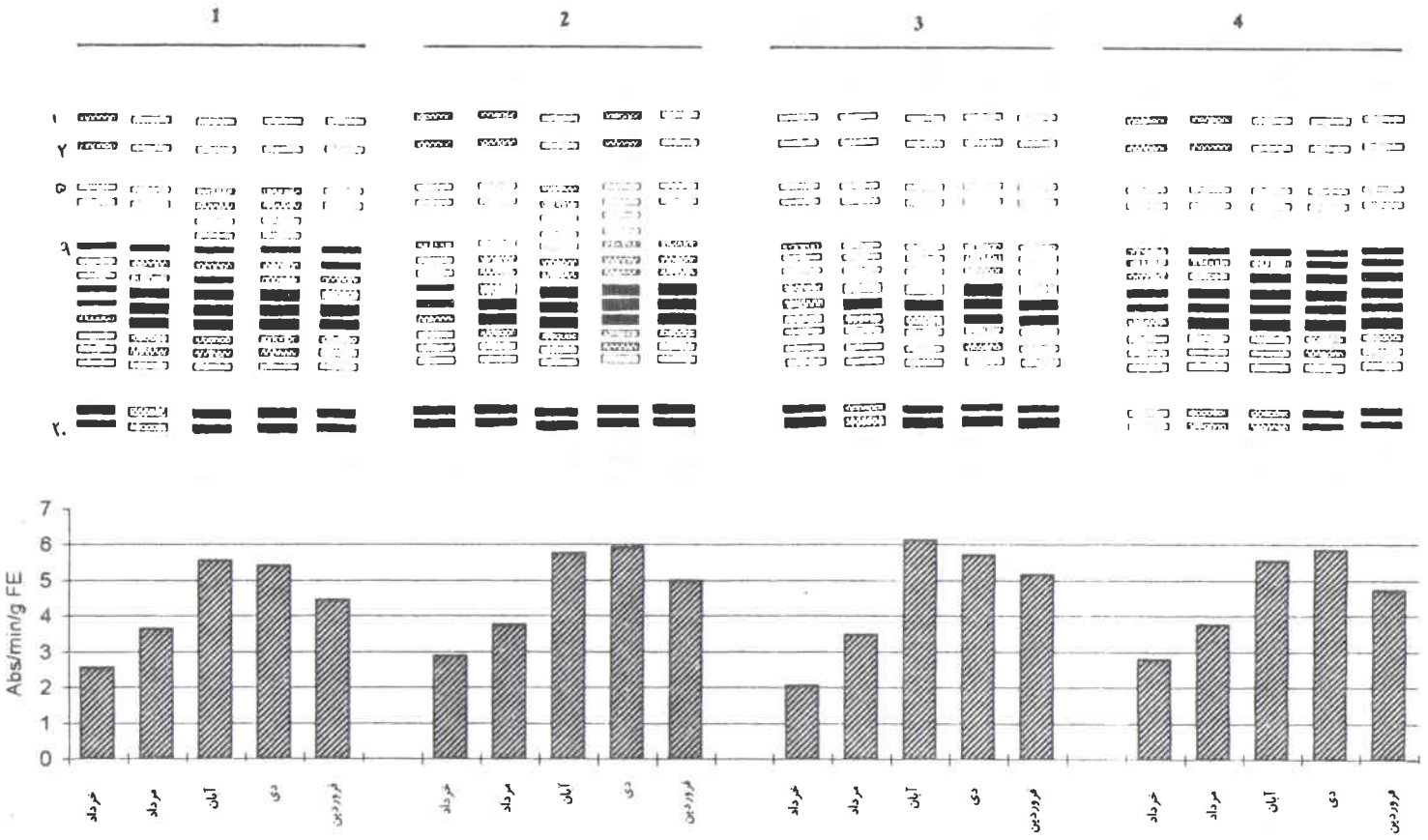
شکل شمارهٔ ۲۹- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز ۴ پایه نر ارس



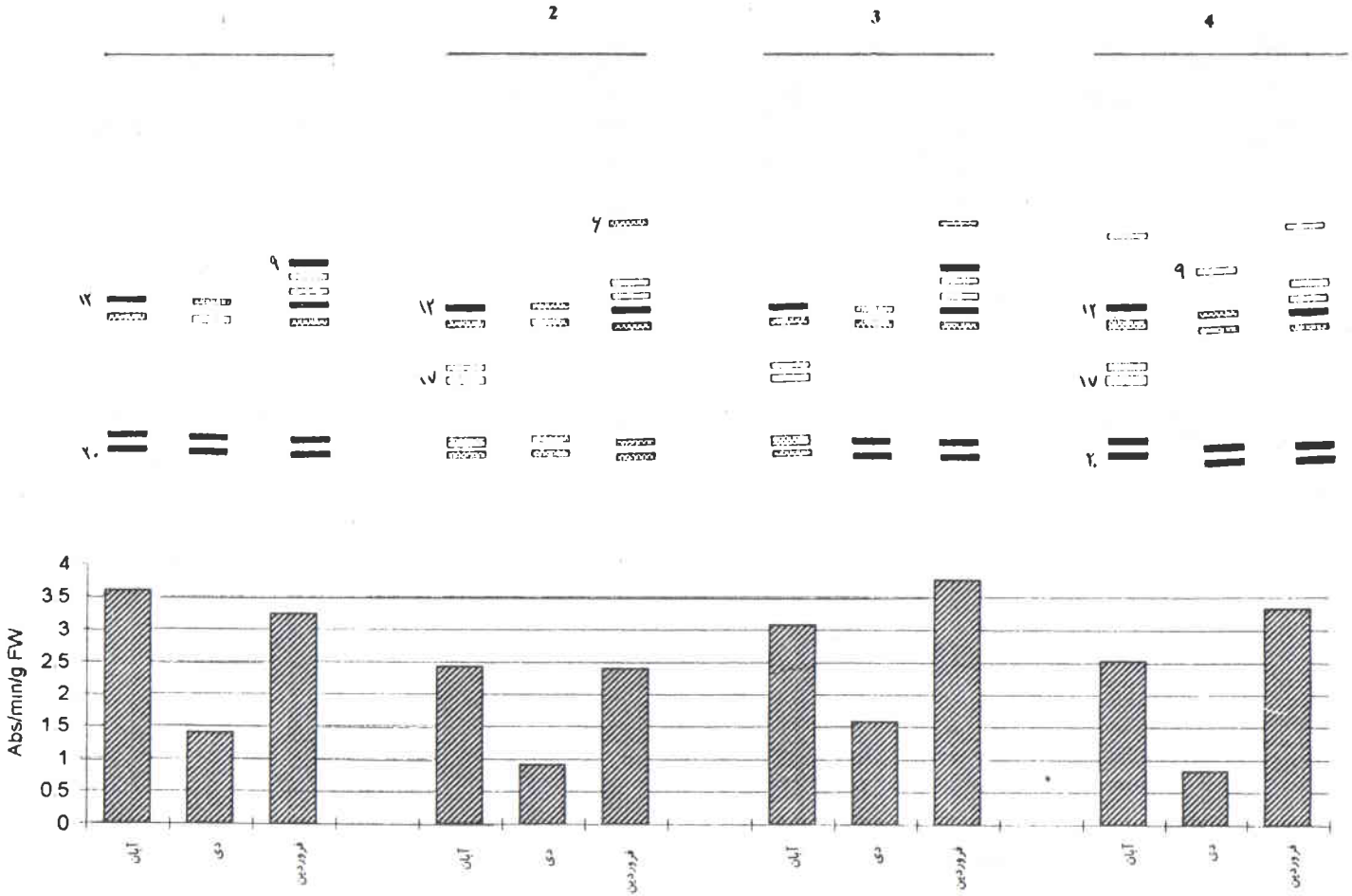
شکل شمارهٔ ۳۰- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز ۴ پایه نر ماده ارس



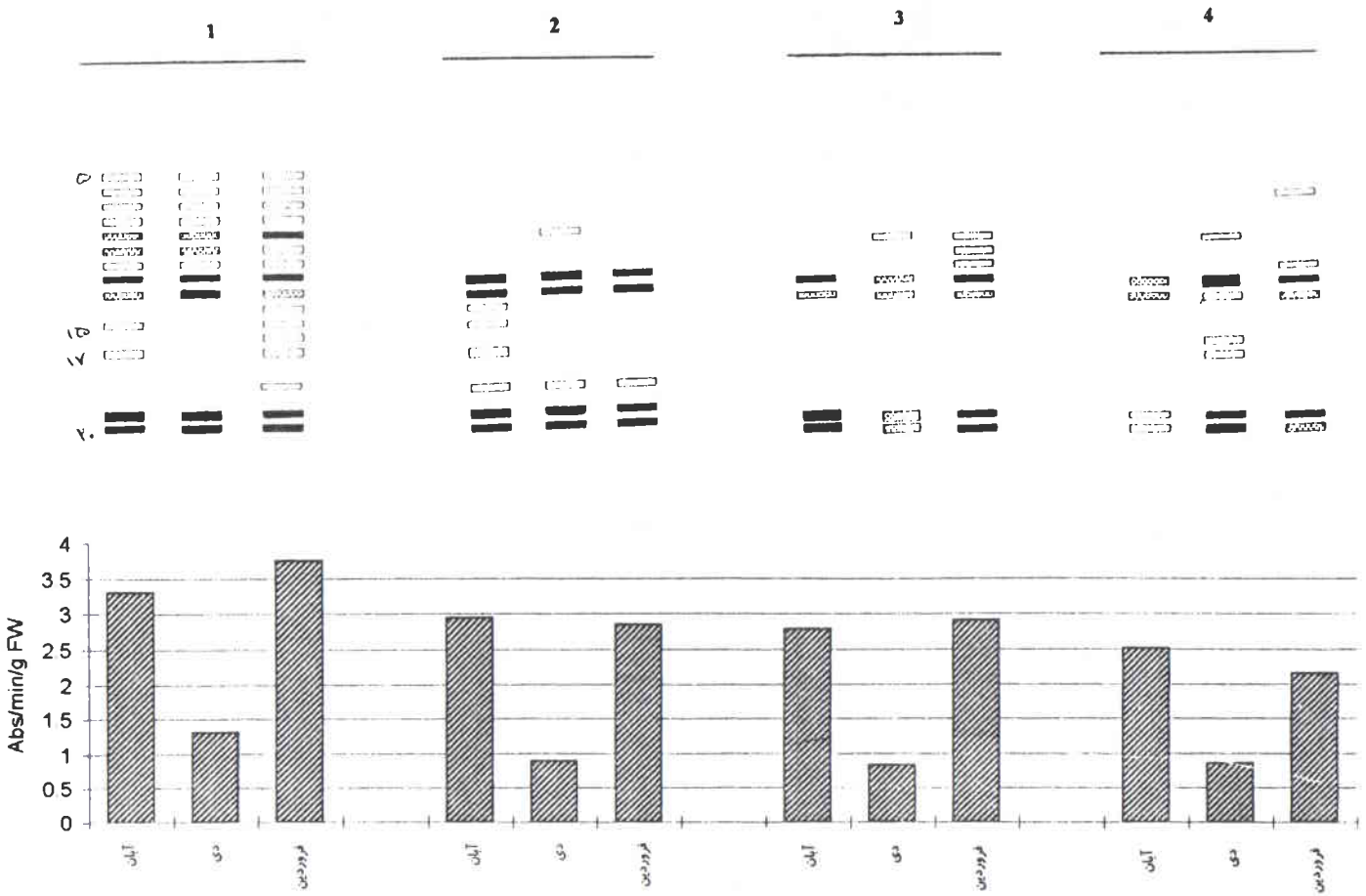
شکل شمارهٔ ۳۱- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز ۴ پایه ماده ارس



شکل شمارهٔ ۳۲- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مخروط نر ۴ پایه نر ارس

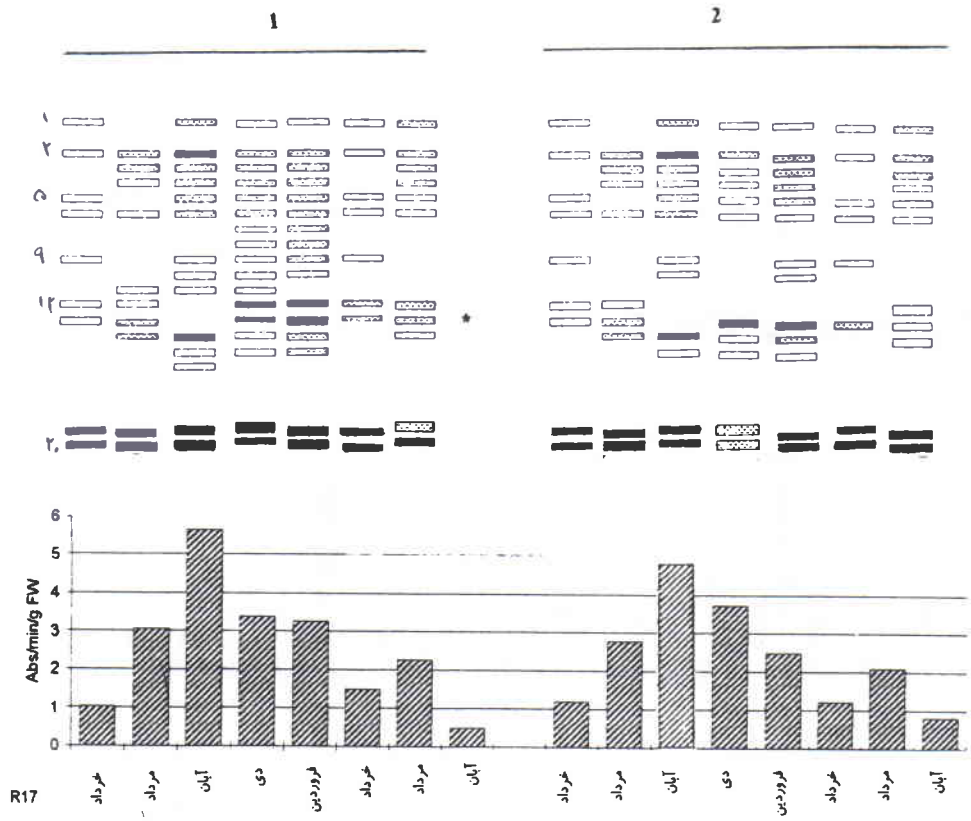


شکل شمارهٔ ۳۳- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مخروط نر ۴ پایه نر ماده ارس



شکل شمارهٔ ۳۴- مقایسهٔ تغییرات فصلی کمی و کیفی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مخروط ماده ۴ پایه ماده ارس

* میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز مخروط رسیده بسیار پایین است. به‌طوری که نوار مشخصی روی ژل ملاحظه نمی‌شود) (بقیه صفحه بعد)



ادامه شکل شمارهٔ ۳۴-