

رویانزایی بدنی و آنزیمهای پاداکساینده در بنگ سیاه (*H. niger* L.)

مهدیس ابراهیم زاده^{۱*} و حسن ابراهیم زاده^۲

^۱ کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه میکروبیولوژی

^۲ تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۸

چکیده

اثرات درمانی سرده بنگ (*Hyoscyamus*) به خاطر وجود تروپان آلکالوئیدهای مختلف همواره مورد توجه بوده است. کاربرد روشهای مهندسی ژنتیک برای تولید گیاهانی از این سرده با خواص دارویی ارزشمندتر و ازدیاد آنها در زمان کوتاه تر و با صرف هزینه کمتر یکی از جنبه های مورد توجه می باشد. رویانزایی بدنی و شناخت آن ممکن است کمک شایانی در دستیابی به اهداف فوق بنماید. در این پژوهش تلاش شده است سازوکار رویانزایی از طریق بررسی آنزیمها در مراحل مختلف تشکیل رویان تا حدی روشن شود. کشت قطعات جداکشت برگی بنگ سیاه (*H. niger*) در محیط کشت MS واجد BAP (1 mgL^{-1}) و IAA (0.2 mgL^{-1}) منجر به رویانزایی موفقیت آمیزی شد. بررسی تغییرات فعالیت آنزیمها نشان داد سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز بیشترین فعالیت را در کالوس واجد رویان اولیه، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بیشترین فعالیت را در کالوس رویانزا، و پلی فنل اکسیداز بیشترین فعالیت را در کالوس داشتند. همچنین الگوی الکتروفورزی ایزوفرمهای سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، اکسین اکسیداز و استراز در مراحل مختلف تشکیل رویان بررسی شد و وجود ایزوفرمهای مختلف (به ترتیب ۷، ۶، ۵، ۶، ۷ و ۲ ایزوفرم) در این مراحل مشخص گردید. جرم مولکولی ایزوفرمها تعیین شد و پس از بررسی فراتنظیمی، فروتنظیمی و یا تعدیل نوارهای ایزوفرمی، ایزوفرمهای اصلی و نهادهی دخیل در رویانزایی نیز معرفی گردید.

واژه های کلیدی: *Hyoscyamus niger*، آنزیمهای پاداکساینده، رویانزایی بدنی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۳۶۳۷، پست الکترونیکی: m_ebr1974@yahoo.com

مقدمه

به عنوان یک پیش ساز با خاصیت یاخته کشی بیشتر یا یکی از مشتقات اکسیژن با واکنشگری شدیدتر نظیر پراکسی نیتريت یا HO^{\bullet} عمل می کند (۱۷). بنابراین SOD اغلب به عنوان خط اول دفاع علیه تنش اکسایشی مورد توجه است (۸). یافته های عملکردی با استفاده از گیاهان تراژن نشان داده است که گیاهان بیش بیان کننده SOD مقاومت بیشتری به شرایط تنشی مختلف دارند (۳۶).

SOD امکان تشکیل HO^{\bullet} (یک اکساینده بسیار قوی با میل ترکیبی بسیار بالا برای مولکولهای حیاتی) را از طریق

بررسی فعالیت آنزیمهای پاداکساینده در مراحل مختلف رویانزایی بدنی نشان داده است. که تمایز ونمو یاخته های رویانزا به وسیله آنزیمهای مختلفی تنظیم می شود (۲۴).

ایزوفرمهای سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نقش کلیدی را در جارو کردن سیستمهای اکسیژن فعال (AOS) به وسیله تنظیم ترازهای $\text{O}_2^{\bullet-}$ تولید شده در کلروپلاستها، میتوکندریها و سیتوسل دارا می باشند (۱۰). کنترل حالت پایدار ترازهای $\text{O}_2^{\bullet-}$ به وسیله SOD یک سازوکار محافظتی مهم بر علیه آسیب اکسایشی یاخته ای می باشد، زیرا $\text{O}_2^{\bullet-}$

تحت چنین شرایطی تنفس نوری به عنوان یک مخزن انرژی مانع احیای بیش از حد زنجیره انتقال الکترون نور آمایشی و بازدارندگی نوری می‌شود (۳۷). بنابراین غلظت‌های بالای CO_2 مشاهده شده در اتاق زیر روزنه در گیاهان تحت تنش خشکی می‌تواند نتیجه افزایش فرآیندهای تنفس نوری همراه با کند شدن فعالیت آنزیمهای چرخه کالوین باشد (۷).

بررسی فعالیت کاتالاز در طی رویانزایی نشان داده است که فعالیت این آنزیم در کالوس بالا بوده، در اولین روزهای تمایز کاهش می‌یابد (۲۴) و کاربرد آمینو تریازول (AT) به عنوان بازدارنده کاتالاز بسامد رویانزایی بدنی را افزایش می‌دهد (۲۴).

پراکسیدازها (POD) واجد گروهی از ایزوفرمها هستند که هم در فرآیندهای درون یاخته ای و هم بین یاخته ای شرکت می‌کنند و فعالیت آنها اغلب تحت تنش تغییر می‌یابد و محرومیت از غذا یک علامت برای راه اندازی بسیاری از آلکالین ایزوپراکسیدازها می‌باشد. همچنین رویانزایی گرده را القاء می‌نمایند که این اشاره به ارتباط بین محرومیت از غذا، و تغییر فعالیت پراکسیدازها طی رویانزایی دارد (۲۹). فعالیت این آنزیم دفاعی در گیاهان در مقابله با عوامل بیماریزا افزایش می‌یابد (۱۱ و ۱۳).

مشخص شده است که فعالیت پراکسیدازهای محلول در یاخته‌های غیر رویانزا سه بار بیشتر از یاخته‌های رویانزا است. بررسی این فعالیت در طی رویانزایی نشان داده که در کالوس فعالیت آن بالا و در اولین روزهای تمایز کاهش می‌یابد (۲۴). فعالیت پراکسیداز در دیواره یاخته ای نیز دیده شده است (۲۹). دیواره یاخته ای یک مکان زیر یاخته ای ممکن برای این پراکسیدازها می‌باشد. بنابراین، فعالیت سه برابر در یاخته‌های غیر رویانزا ممکن است منعکس کننده فعالیت‌هایی باشد که برای تثبیت شکل یاخته طولی شده مورد نیاز است (۲۹).

واکنش هابر - ویس (Haber-Weiss) و یا واکنش فنتون (Fenton) کاتالیز شده با فلز، کاهش می‌دهد (۳۴). سوپراکسید دیسموتاز می‌تواند به عنوان یکی از متالوپروتئینهای کاتالیزکننده واکنش $2\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{O}_2^{2-} + \text{O}_2$ به کار رود (۲۴)، یعنی SOD یک آنزیم تولید کننده H_2O_2 است (۱۴).

به علاوه می‌توان حدس زد که ترازهای بالاتر H_2O_2 برون یاخته ای عامل تشکیل یاخته‌های رویانی است. H_2O_2 ممکن است به عنوان پیک یاخته ای جدید در رویانزایی بدنی موجب بیان ژن مؤثر و تحریک تشکیل یاخته‌های رویانزا شود (۲۴).

فعالیت SOD به طور تدریجی در روزهای ابتدایی تمایز بافت کشت شده افزایش و سپس در طول تقسیمات بعدی و تشکیل رویان چند یاخته ای کاهش می‌یابد. اوج فعالیت SOD همزمان با تشکیل رویانهای چند یاخته ای در اثر تقسیم یاخته‌های رویانزا می‌باشد (۲۴). دی اتیل دی تیو کرينات (DDC) به عنوان بازدارنده SOD بسامد رویانزایی بدنی را کاهش می‌دهد (۲۴). اختلاف در فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز به مقدار پروتئین ارتباط دارد (۳۲).

کاتالاز (CAT) یکی از آنزیمهای جاروکننده H_2O_2 می‌باشد که می‌تواند به عنوان یکی از متالوپروتئینهای کاتالیز کننده واکنش $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ به کار رود (۱۴)، ۱۷ و ۲۴). کاتالازها در طی بیماریزایی فروتنظیمی شده و تراز اشکال مختلف اکسیژن فعال را در حدی نگه می‌دارند که باعث محدودیت رشد عوامل بیماریزا شود (۲۵). فعالیت CAT، پس از یک افزایش ملایم و متناسب با کمبود آب در برگها و ریشه‌ها در برگها تقریباً پایدار باقی مانده و در طی کمبود شدید آب در ریشه‌ها تنزل می‌یابد که این شاید به علت غیر فعال شدن و تنزل فعالیت کاتالاز باشد (۱۵). بقای فعالیت کاتالاز در برگهای گیاهان تحت تنش به خوبی امکان حذف H_2O_2 تولید شده در طی تنش خشکی را از طریق تنفس نوری فراهم می‌نماید (۳۳). در واقع

کندوان جمع‌آوری شدند. پس از برطرف کردن خفتگی با خیساندن آنها به مدت ۱۲ ساعت در ژیرلیک اسید (35 mgL^{-1}) (۲) و سترون نمودن آنها، بذرها در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد کشت داده شدند. دانه رسته‌های سترون ۱۰-۱۲ روزه حاصل جهت کشت بافت مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات برگ‌گی به دست آمده از دانه رسته‌های سترون در محیط کشت MS (۱) واجد 1 mgL^{-1} بنزیل آمینو پورین (BAP) و 0.2 mgL^{-1} اندول استیک اسید (IAA) کشت شدند.

نمونه برداری در طی رویانزایی انجام گردید. به این صورت که در مورد قطعات جداکشت برگ‌گی، برگ (زمان صفر)، برگ حامل کالوس، کالوس، کالوس رویانزا و بالاخره کالوس واجد رویان جمع‌آوری شدند. بافر فسفات 0.2 M با $\text{pH} = 6.8$ برای استخراج پروتئین و آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. برای جلوگیری از اکسیداسیون ترکیبات فنلی و اثر سوء آنها در سنجش پروتئین از ۱ درصد PVPP استفاده شد.

نسبت استخراج $1:1/5 \text{ w/v}$ مناسب تشخیص داده شد. کلیه مراحل استخراج در دمای $4-0^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌ها با کمک بافر استخراج در داخل هاون کاملاً ساییده شدند. سپس همگنای حاصل ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد با قدرت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (با دستگاه HERAEUS 400R) سانتریفیوژ شد. رو شاور بار دیگر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد و با همان دور سانتریفیوژ شدند و جهت مطالعه فعالیت آنزیمها و انجام الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت. به خاطر نقش بازدارنده پلی فنلها روی اکسیداسیون آنزیمی اکسین (۲۷) هنگام استخراج آنزیم اکسین اکسیداز از بافر فاقد PVPP استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیمها برای هر نمونه حداقل سه بار تکرار شد. آزمون آماری Kruskal-Wallis جهت بررسی نتایج انجام گرفت. روشهای به کار رفته برای سنجش فعالیت آنزیمها

PODs می‌توانند اکسیدکننده باشند و به این ترتیب H_2O_2 را ترجیحاً با استفاده از برخی ترکیبات فنلی نظیر گایاکول به عنوان عناصر احیایی اولیه، جارو نمایند (۳۱). پراکسیداز می‌تواند به عنوان یکی از متالوپروتئینهای کاتالیزکننده واکنش $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{2-} + 2\text{H}^+$ به کار رود (۲۴).

آسکوربات پراکسیداز (APX) یکی از توسعه یافته ترین آنزیمهای پاداکساینده در یاخته گیاهی است و H_2O_2 را که یک بازدارنده قوی نورآمایشی است، با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون به آب احیاء می‌نماید (۳۱). سپس آسکوربات می‌تواند به وسیله چرخه آسکوربات - گلوکاتیون دوباره تولید شود (۱۶ و ۳۵). APX در کلروپلاستها و سیتوسل قرار دارد، و به عنوان یک آنزیم کلیدی مسیر گلوکاتیون - آسکوربات، پراکسیدها را به وسیله تبدیل آسکوربات به دهیدروآسکوربات حذف می‌نماید (۲۲).

پلی فنل اکسیداز (PPO)، مونواکسیژناز حاوی مس کاتالیزکننده هیدروکسیلاسیون وابسته به اکسیژن مونوفنلها به دی فنلهای مربوطه و اکسایش دی فنلها به دی کوئینونهای می‌باشد، بنابراین در جاروکردن H_2O_2 به وسیله پراکسیدازها همکاری می‌نمایند (۱۹، ۲۶، ۲۸، ۲۹ و ۳۰). pH بهینه آن ۶ بوده، و به وسیله تروپولون که یک بازدارنده شناخته شده آنزیمهای حاوی فلز است بازداشته می‌شود (۱۲). مطالعات تاگ سازی (cloning) اخیر نشان داده است که PPO اغلب به وسیله ک خانواده ژنی چندگانه که اعضای آن به طور متفاوتی در بخشهای مختلف گیاه بیان می‌شوند، رمز سازی می‌گردد (۲۰).

هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات فعالیت آنزیمهای پاداکساینده و شناسایی ایزوفرمهای آنها در طی مراحل مختلف رویانزایی می‌باشد.

مواد و روشها

بذرهای بنگ سیاه (*H. niger*) از جاده چالوس بالای تونل

به صورت زیر است:

فعالیت SOD (۲۳) با قابلیت هر عصاره در بازدارندگی واکنش احیایی فوتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم (NBT) تعیین شد. کار با دستگاه طیف سنج در مد نور سنجی (Photometric) و طول موج ۵۶۰nm انجام گرفت. از آنجا که یک واحد آنزیم مذکور عبارت است از میزانی از آنزیم که ۵۰ درصد بازدارندگی ایجاد کند فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیمی در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت CAT (۲۳) در مد Kinetic و در طول موج ۲۴۰nm انجام گرفت و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰nm خوانده شد. فعالیت بر حسب واحد آنزیمی در میلی گرم پروتئین ($U \cdot mg^{-1} \text{ protein}$) محاسبه شد.

سنجش فعالیت APX (۹) در مد Kinetic در طول موج ۲۶۵ نانومتر انجام گرفت و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین ($U \cdot mg^{-1} \text{ protein}$) محاسبه شد.

فعالیت POD (۲۱) با دستگاه طیف سنج در مد Kinetic در طول موج ۵۳۰ نانومتر، انجام گردید.

سنجش فعالیت PPO (۴) در مد Kinetic و در طول موج ۴۳۰ نانومتر انجام شد. فعالیت آنزیم بر حسب میزان جذب در دقیقه به ازای یک میلی گرم پروتئین ($U \cdot mg^{-1} \text{ protein}$) محاسبه شد.

الکتروفورز پروتئینها در سیستم ناپیوسته بر روی ژل پلی آکریل آمید غیراحیاء کننده (PAGE) به طور وسیعی برای مطالعه چند شکلی (polymorphism) آنزیمها و ارزیابی فعالیت آنزیمی در دوره های مختلف رشد و نمو مورد استفاده قرار گرفت (۳، ۱۹). پس از آماده سازی عصاره پروتئینی که با افزودن ۱۰ میکرولیتر محلول بوموفنل بلو (W/V، ۰/۲۵ درصد) به هر نمونه انجام می گیرد، و پس از تزریق نمونه ها به داخل چاهکها، ژلها بر روی

تانک الکتروفورز با سیستم عمودی سوار گردید. برای تأمین جریان الکتریسته از یک منبع تغذیه Electrophoresis power supply consort EV 243 که انجام الکتروفورز را در ولتاژ، شدت جریان و یا توان ثابت امکان پذیر می‌سازد، استفاده شد. رسیدن رنگ بوموفنل بلو به فاصله یک سانتیمتری انتهای ژل زیرین به عنوان زمان ختم عمل الکتروفورز در نظر گرفته شده است.

در مورد آنزیمهای APX و CAT در طی انجام الکتروفورز ولتاژ روی ۱۸۰ ولت به طور ثابت تنظیم گردید. برای بقیه آنزیمها ولتاژ برای ژل رویی روی ۱۳۰ ولت و برای ژل زیرین ۱۴۰ ولت تنظیم شد.

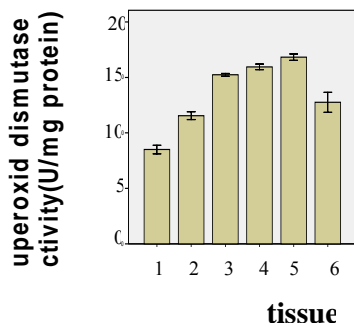
آشکارسازی فعالیتهای آنزیمها روی ژلهای پلی آکریل آمید با روشهای متفاوتی انجام گرفت.

برای ظهور نوارهای مربوط به SOD (۵) ژل را داخل محلول حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر تریس - کلرید (۰/۰۵ مولار با pH = ۸)، ۴ میلی گرم ریوفلاوین، ۲ میلی گرم EDTA (Triplex III) و ۲ میلی گرم NBT قرار داده بر روی جعبه نورانی در مجاورت نور فلئوئورسان در حالی که ظرف حاوی ژل و محلول ظهور، تکان داده شد مناطق فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به صورت نوارهای بیرنگ در یک زمینه بنفش ظاهر گردید. پس از ظهور نوارها ژل با آب مقطر شسته شد و در آب مقطر نگهداری گردید.

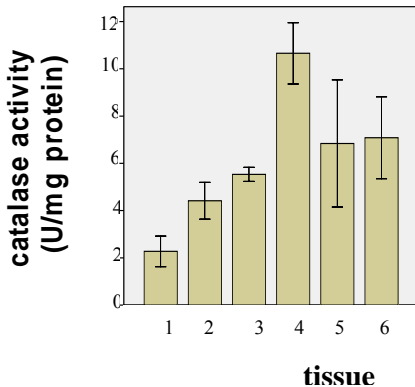
ظهور نوارهای مربوط به CAT (۱۲) با قرار دادن ژلها به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در ۰/۰۱ H_2O_2 درصد، شستشو با آب مقطر، قرار دادن ژلها به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در محلول $FeCl_3$ ۱ درصد و $K_3(Fe(CN)_6)$ ۱ درصد و در نهایت شستشو با آب مقطر صورت پذیرفت.

روش ظهور نوارهای APX (۱۲) نیز طی چند مرحله انجام شد: ۱. ژلها با بافر سدیم فسفات (۵۰ mM با pH = ۷) حاوی آسکوربات (۲ mM) به مدت ۳۰ دقیقه به تعادل

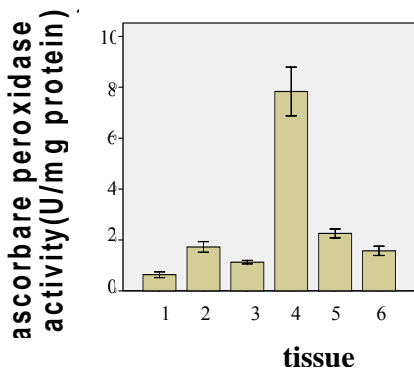
رسیدند. ۲. سپس در محلولی شامل بافر سدیم فسفات (۵۰ mM با pH = ۷) حاوی آسکوربات (۴ mM) و H₂O₂ (۲ mM) به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. ۳. ژل در بافر به مدت ۱ دقیقه شسته شد. ۴. غوطه ور شدن ژل همراه با تکانهای ملایم در محلول حاوی بافر سدیم فسفات (۵۰ mM با pH = ۷/۸)، TEMED (۲۸ mM) و NBT (۲/۴۵ mM) به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه انجام شد. ۵. ژلها پس از ظهور نوارهای بیرنگ در زمینه بنفش رنگ با آب مقطر شستشو داده شدند.



نمودار ۱ - مقایسه فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. (۰/۰۰۹) ۱۵/۶۳۴: Chi-square ۱:برگ؛ ۲:برگ کالوس؛ ۳:کالوس؛ ۴:کالوس رویانزا؛ ۵:کالوس واجد رویان اولیه؛ ۶: کالوس واجد رویان پیشرفته.



نمودار ۲ - مقایسه فعالیت کاتالاز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. (۰/۰۵۴) ۱۰/۸۸۲: Chi-square ۱:برگ؛ ۲:برگ کالوس؛ ۳:کالوس؛ ۴:کالوس رویانزا؛ ۵:کالوس واجد رویان اولیه؛ ۶: کالوس واجد رویان پیشرفته.



برای ظهور نوارهای آنزیمی با فعالیت POD (۴) بر روی ژل پلی آکریل آمید، محلولهای بافر استات ۰/۲ مولار با pH = ۸ (۸۰ میلی لیتر)، آب اکسیژنه ۳ درصد (۸ میلی لیتر) و بنزیدین ۰/۰۴ مولار در متانل ۵۰ درصد (۴ میلی لیتر) با یکدیگر مخلوط شدند. ژلها حداقل به مدت ۲ تا ۳ ساعت و در صورت لزوم بیشتر تا زمان ظهور نوارهای آنزیمی در دمای ۴ درجه سانتی گراد در محلول فوق نگهداری شدند و پس از این مرحله شسته شده و در آب مقطر ذخیره شدند.

مخلوط بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH = ۶/۸ (۵۰ میلی لیتر)، ۳-۴ دی هیدروکسی فیل آلانین (L-DOPA) (۲۰ میلی لیتر) و کلسیم کلرید (۲H₂O) و CaCl₂ (۷۳/۵ درصد (۰/۷ میلی لیتر) برای آشکارسازی نوارهای آنزیمی مربوط به PPO (۴) بر روی ژل مورد استفاده قرار گرفت. ژل تا زمان آشکار شدن نوارهای آنزیمی در مخلوط فوق و در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت. پس از آن در صورت تیره شدن زمینه، ژل به مدت یک شب در محلول آسکوربیک اسید ۱۰^{-۴} میلی مولار قرار گرفت تا رنگ زمینه زائل شود و در نهایت پس از شستشو با بافر فسفات در آب مقطر نگهداری شد.

برای رنگ آمیزی نوارهای پروتئین دارای فعالیت اکسین اکسیدازی (OOX) (۶) ابتدا نمک فست بلو (BBSalt) ۲ mg/ml⁻¹ H₂O₂ ۰/۰۰۵ درصد، اندول-۳ - استیک اسید

گیاه با رویانزایی بدنی منتهی به ایجاد گیاهانی با ویژگیهای ریختی مشابه با یکدیگر و مشابه مادر و از نظر ژنتیکی تقریباً تغییر ناپذیر می‌گردد (۱۸).

در بررسی حاضر نیز کشت برگ در محیط کشت MS واجد BAP ($1/5 \text{ mgL}^{-1}$) و IAA ($0/2 \text{ mgL}^{-1}$) منجر به رویانزایی موفقیت آمیزی شد و شرایط لازم برای بررسی نقش آنزیمهای پاداکسایشی در تمایز رویان فراهم گردید.

بررسی تغییرات فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در مراحل مختلف تشکیل رویان (جدول ۱ و نمودار ۱) نشان داد که در برگ فعالیت این آنزیم کمترین مقدار را دارا می‌باشد. فعالیت آنزیم در طی تشکیل رویان به تدریج افزایش یافته تا مرحله کالوس واجد رویان اولیه به تدریج افزایش می‌یابد (۱/۸ برابر برگ) و دوباره کاهش حاصل می‌کند. بررسی آماری نشان داد که فعالیت این آنزیم در مراحل مختلف رویانزایی اختلاف معنی دار دارد (جدول ۶). این نتایج با بررسی Kakkar و Sawhney (۲۰۰۲) که ابتدا افزایش و سپس کاهش فعالیت این آنزیم را در طی نمو رویان گزارش کرده بودند (۲۴) همخوانی دارد.

بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرمهای سوپراکسید دیسموتازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۱) وجود ۷ ایزوفرم را نشان داد. در برگ ۴، برگ کالوس زا ۷، کالوس ۷ و کالوس واجد رویان ۵ ایزوفرم قابل شناسایی می‌باشد. Rm و جرم مولکولی ایزوفرمهای فوق در جدول ۷ بیان شده است. بررسی مقایسه ای ایزوفرمهای در مراحل مختلف تشکیل رویان نشان داد که ایزوفرمهای ۱ ($45/1 \text{ KD}$)، ۵ ($22/1 \text{ KD}$) و ۷ ($13/4 \text{ KD}$) که تنها در برخی از مراحل رویانزایی مشاهده شده اند جزء ایزوفرمهای اصلی دخیل در تمایز رویان محسوب می‌شوند و ایزوفرمهای ۲ (33 KD)، ۳ ($26/5 \text{ KD}$)، ۴ ($24/2 \text{ KD}$) و ۶ ($18/9 \text{ KD}$) که در تمام مراحل تشکیل رویان قابل مشاهده بودند جزء ایزوفرمهای نهادی دخیل در فرآیندهای عمومی تمایز محسوب می‌شوند. از سوی دیگر

نمودار ۳ - مقایسه فعالیت آسکوربات پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger* (۰/۰۰۹) : $15/327$ Chi-square ۱: برگ؛ ۲: برگ کالوس زا؛ ۳: کالوس؛ ۴: کالوس رویانزا؛ ۵: کالوس واجد رویان اولیه؛ ۶: کالوس واجد رویان پیشرفته.

جدول ۱ مقایسه فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger*.

U : $\mu\text{mol/ min}$

tissue	Activity (U/mg protein)
leaf	8.5 ± 0.29
callogenic leaf	11.55 ± 0.27
callus	15.23 ± 0.09
embryogenic callus	15.95 ± 0.19
early embryo holding callus	16.83 ± 0.16
late embryo holding callus	12.75 ± 0.68

جدول ۲ - مقایسه فعالیت کاتالاز در مراحل مختلف تشکیل رویان از

جداکشت برگی در *H.niger* : U $\mu\text{mol/ min}$

tissue	Activity (U/mg protein)
leaf	2.27 ± 0.35
callogenic leaf	4.41 ± 0.59
callus	5.52 ± 0.22
embryogenic callus	10.65 ± 0.98
early embryo holding callus	6.8 ± 2.05
late embryo holding callus	7.11 ± 1.32

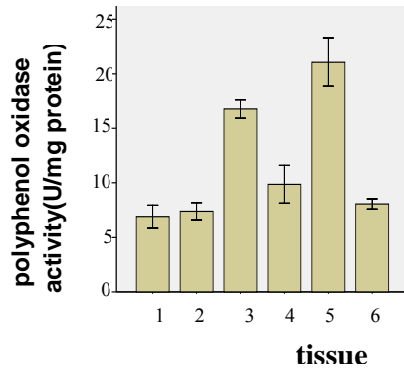
جدول ۳ - مقایسه فعالیت آسکوربات پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger* : U $\mu\text{mol min}$

tissue	Activity (U/mg protein)
leaf	0.634 ± 0.08
callogenic leaf	1.72 ± 0.11
callus	1.126 ± 0.05
embryogenic callus	7.82 ± 0.72
early embryo holding callus	2.258 ± 0.13
late embryo holding callus	1.568 ± 0.13

نتیجه گیری و بحث

رویانزایی بدنی عبارت است از فرآیندی که طی آن یک ساختار دو قطبی مشابه رویان تخمی از یک یاخته غیر تخمی بدون اتصال آوندی با بافت اصلی تشکیل می‌شود. رویانهای بدنی به منظور مطالعه سازوکار تنظیم نمو رویان مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما در عین حال ابزاری را در جهت ازدیاد غیر جنسی در مقیاس بزرگ نیز هستند. تکثیر

callus embryogenic	9.86 ± 1.32
embryo holding callus early	21.3 ± 1.68
embryo holding callus late	8.04 ± 0.35

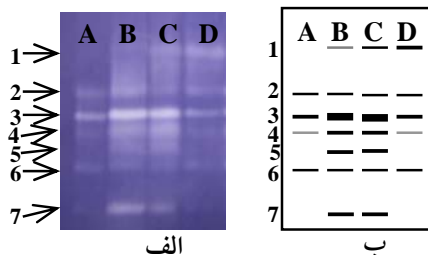


نمودار ۵ - مقایسه فعالیت پلی فنل اکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger* (۰/۰۳۵). Chi- : ۱۱/۹۷۱ square . ۱:برگ؛ ۲:برگ کالوس زا؛ ۳:کالوس؛ ۴:کالوس رویانزا؛ ۵:کالوس واجد رویان اولیه؛ ۶: کالوس واجد رویان پیشرفته. جدول ۵ - مقایسه فعالیت پلی فنل اکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger* : U . μmol/ min

tissue	Activity (U/mg protein)
leaf	6.88 ± 0.79
callogenic leaf	7.36 ± 0.6
callus	16.78 ± 0.63
embryogenic callus	9.86 ± 1.32
early embryo holding callus	21.3 ± 1.68
late embryo holding callus	8.04 ± 0.35

جدول ۶ - بررسی آماری با آزمون Kruskal-wallis. مقایسه میانگینهای فعالیتهای آنزیمها در مراحل مختلف رشد رویان و معنی دار بودن اختلاف بین این مراحل.

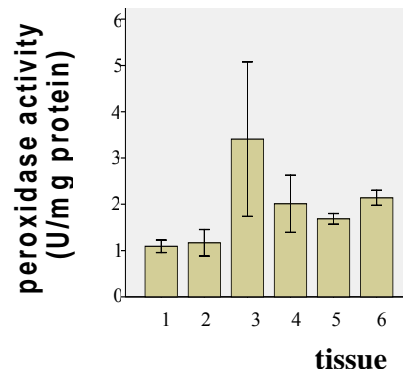
Enzyme	Chi-square(p)
Superoxid dismutase	15.436 (0.009)
Catalase	10.882 (0.054)
Ascorbate pepoxidase	15.327 (0.009)
Peroxidase	14.848 (0.011)
Polyphenol oxidase	11.971 (0.035)



شکل ۱ - الکتروفورز سوپر اکسید دیسموتاز در مراحل مختلف

ایزوفرمهای ۱ (۴۵/۱ KD) ، ۳ (۲۶/۵ KD) ، ۴ (KD) ، ۵ (۲۲/۱ KD) و ۷ (۱۳/۴ KD) در طی تشکیل رویان دچار بیش بیانی یا فراتنظیمی گشته اند و ایزوفرمهای ۲ (۳۳ KD) و ۶ (۱۸/۹ KD) در طی تشکیل رویان تقریباً به طور یکسان بیان شده اند.

بررسی تغییرات فعالیت پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان (جدول ۴ و نمودار ۴) نشان داد که در برگ این آنزیم کمترین فعالیت را دارا می باشد. فعالیت این آنزیم در طی تشکیل رویان تا کالوس واجد رویان اولیه که به حداکثر خود می رسد (۳ برابر برگ)، افزایش و دوباره کاهش می یابد. بررسی آماری نشان داد که فعالیت این آنزیم در مراحل مختلف رویانزایی اختلاف معنی دار دارد (جدول ۶). این بررسی با نظر Martensson و همکاران (۱۹۹۸) که به نقش این آنزیم در به راه انداختن رویانزایی اشاره دارند مطابقت داشته، ولی با بررسی دیگر همین گروه مبنی بر کاهش فعالیت این آنزیم در کالوس رویانزا نسبت به کالوس غیر رویانزا، همخوانی ندارد (۲۹).



نمودار ۴ - مقایسه فعالیت پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger* (۰/۰۱۱). Chi-square : ۱۴/۸۴۸ square . ۱:برگ؛ ۲:برگ کالوس زا؛ ۳:کالوس؛ ۴:کالوس رویانزا؛ ۵:کالوس واجد رویان اولیه؛ ۶: کالوس واجد رویان پیشرفته.

جدول ۴ - مقایسه فعالیت پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداکشت برگی در *H.niger* : U . μmol/ min

tissue	Activity (protein U/mg)
leaf	6.88 ± 0.79
leaf callogenic	7.36 ± 0.6
callus	16.78 ± 0.63

تتشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. A: برگ، B: برگ کالوس زا، C: کالوس و D: کالوس واجد رویان. ۱→۷: شماره های نوارهای ایزوفرماها. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح واره ای نوارها.

بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرماهای پراکسیدازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۴) ۶ ایزوفرما را نشان داد که در برگ ۵، برگ کالوس زا ۵، کالوس ۶، کالوس رویانزا ۵ و کالوس واجد رویان ۶ ایزوفرما قابل شناسایی می‌باشد. Rm و جرم مولکولی ایزوفرماهای فوق در (جدول ۱۰) بیان شده است. بررسی مقایسه ای ایزوفرماها در مراحل مختلف تشکیل رویان و نشان داد که

تتشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. A: برگ، B: برگ کالوس زا، C: کالوس و D: کالوس واجد رویان. ۱→۷: شماره های نوارهای ایزوفرماها. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح واره ای نوارها.

بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرماهای پراکسیدازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۴) ۶ ایزوفرما را نشان داد که در برگ ۵، برگ کالوس زا ۵، کالوس ۶، کالوس رویانزا ۵ و کالوس واجد رویان ۶ ایزوفرما قابل شناسایی می‌باشد. Rm و جرم مولکولی ایزوفرماهای فوق در (جدول ۱۰) بیان شده است. بررسی مقایسه ای ایزوفرماها در مراحل مختلف تشکیل رویان و نشان داد که



شکل ۲ - الکتروفورز کاتالاز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. A: برگ، B: برگ حامل کالوس، C: کالوس، D: کالوس رویانزا و E: کالوس واجد رویان. 1: شماره نوار ایزوفرما. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح واره ای نوارها.

جدول ۷ - الکتروفورز آنزیم SOD در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. ۱→۷: شماره های نوارهای ایزوفرماها. + ← +++++ مقادیر نسبی نوارهای ایزوفرما.

number	R _m	molecular weight	Leaf	callogenic leaf	callus	embryo holding callus
1	0.368	45.1		++	+++	++++
2	0.473	33	++++	++++	++++	++++
3	0.541	26.5	+++	++++	++++	+++
4	0.578	24.2	++	++++	++++	++
5	0.61	22.1		++++	++++	
6	0.663	18.9	++++	++++	++++	++++
7	0.778	13.4		++++	++++	

جدول ۸ - الکتروفورز آنزیم CAT در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. 1: شماره نوار ایزوفرما. + ← +++++ مقادیر نسبی نوار ایزوفرما.

number	R _m	molecular weight	Leaf	callogenic leaf	callus	embryogenic callus	embryo holding callus
1	0.294	106.7				+++	++++

جدول ۹ - الکتروفورز آنزیم APX در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. ۵ → ۱: شماره های نوارهای ایزوفرمها. + ←
+++++ مقادیر نسبی نوارهای ایزوفرمی.

number	R _m	molecular weight	leaf	callogenic leaf	embryogenic callus	embryo holding callus
1	0.533	45.1		+	+++	+++
2	0.728	28.2			++	++
3	0.796	23.8	++++	++++	+++++	+++++
4	0.844	21.1		++	++++	++++
5	0.893	18.7			+++	+++

جدول ۱۰ - الکتروفورز آنزیم POD در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. ۶ → ۱: شماره های نوارهای ایزوفرمها.
+ ← +++++ مقادیر نسبی نوارهای ایزوفرمی.

number	R _m	molecular weight	Leaf	callogenic leaf	callus	embryogenic callus	embryo holding callus
1	0.178	76.8	++	++	++++	++++	++++
2	0.264	60	++	++++	+++++	+++++	++++
3	0.303	53.6	++	+++	++++	+++	++
4	0.431	37	++	+++	++++	+++	+++
5	0.46	34.1	+	++	+++	++	+++
6	0.5	30.4			++		++

جدول ۱۱ - الکتروفورز آنزیم PPO در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. ۶ → ۱: شماره های نوارهای ایزوفرمها. + ← +++++ مقادیر نسبی نوارهای ایزوفرمی.

number	R _m	molecular weight	leaf	callogenic leaf	embryogenic callus	embryo holding callus
1	0.215	141.6	+			+++
2	0.421	67.79	++++	++++	+++++	+++
3	0.568	40.1		+++	++++	+
4	0.637	31.6	++++	+++++	+++++	+++++
5	0.686	26.3	+++	++++	++++	+++
6	0.735	22		+++	+++	

جدول ۱۲ - الکتروفورز آنزیم OOX در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H.niger*. ۷ → ۱: شماره های نوارهای ایزوفرمها. + ← +++++ مقادیر نسبی نوارهای ایزوفرمی.

number	R _m	molecular weight	leaf	callogenic leaf	callus	embryogenic callus	embryo holding callus
1	0.161	79.1		+	+++	++++	+++
2	0.252	62.1				++++	++++
3	0.273	58.3	++	++++	++++	++++	++++
4	0.315	51.7	+	++++	++++	++++	++++
5	0.421	38.1	++++	++++	++++	++++	++++
6	0.442	35.9		++++	++++	++++	++++
7	0.484	31.8			++	++	+++

شناسایی می‌باشد. Rm و جرم مولکولی ایزوفرمهای فوق در (جدول ۹) بیان شده است. با بررسی مقایسه ای ایزوفرمها در مراحل مختلف تشکیل رویان و با توجه به توضیحات داده شده می‌توان گفت ایزوفرمهای ۱ (KD) ۴۵/۱، ۲ (KD) ۲۸/۲، ۴ (KD) ۲۱/۱ و ۵ (KD) ۱۸/۷ که تنها در برخی از مراحل رویانزایی مشاهده شده اند جزء ایزوفرمهای اصلی دخیل در تمایز رویان محسوب می‌شوند و ایزوفرم ۲ (KD) ۲۸/۲ که در تمام مراحل تشکیل رویان قابل مشاهده بود جزء ایزوفرمهای نهادی دخیل در فرآیندهای عمومی تمایز محسوب می‌شود. کلیه ایزوفرمها در طی تشکیل رویان دچار بیش بیانی یا فراتنظیمی شده بودند.

بررسی تغییرات فعالیت پلی فنل اکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان (جدول ۵ و نمودار ۵) نشان داد که در برگ این آنزیم کمترین فعالیت را دارا می‌باشد. فعالیت این آنزیم در طی تشکیل رویان تا مرحله کالوس واجد رویان اولیه که به حداکثر خود می‌رسد (۳/۳ برابر برگ)، به تدریج افزایش یافته و دوباره کاهش می‌یابد. بررسی آماری نشان داد که بین فعالیتهای این آنزیم در مراحل مختلف رویانزایی اختلاف معنی دار می‌باشد (جدول ۶).

با بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرمهای پلی فنل اکسیدازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۵) وجود ۶ ایزوفرم نشان داده شد. همچنین معلوم شد که در برگ ۴، برگ کالوس زا ۵، کالوس رویانزا ۵ و کالوس واجد رویان ۵ ایزوفرم قابل شناسایی می‌باشد. Rm و جرم مولکولی ایزوفرمهای فوق در (جدول ۱۱) بیان شده است. با بررسی مقایسه ای ایزوفرمها در مراحل مختلف تشکیل رویان می‌توان گفت ایزوفرمهای ۱ (KD) ۱۴۱/۶، ۳ (KD) ۴۰/۱ و ۶ (KD) ۲۲ که تنها در برخی از مراحل رویانزایی مشاهده شده اند جزء ایزوفرمهای اصلی دخیل در تمایز رویان محسوب می‌شوند و ایزوفرمهای ۲ (KD)

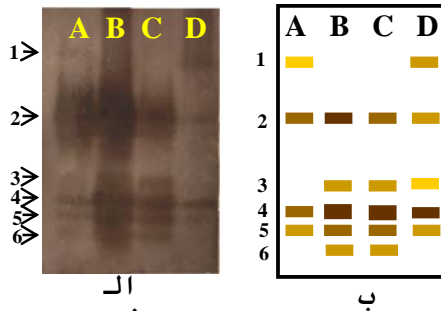
بررسی تغییرات فعالیت کاتالاز در مراحل مختلف تشکیل رویان (جدول ۲ و نمودار ۲) نشان داد که در برگ این آنزیم کمترین فعالیت را دارا می‌باشد. فعالیت این آنزیم در طی تشکیل رویان تا مرحله کالوس رویانزا که به حداکثر خود می‌رسد (۴/۶۹ برابر برگ) به تدریج افزایش یافته و دوباره کاهش می‌یابد. بررسی آماری نشان داد که بین فعالیتهای این آنزیم در مراحل مختلف رویانزایی اختلاف معنی دار نمی‌باشد (جدول ۶). این نتایج با بررسی Kakkar و Sawhney (۲۰۰۲) که بالا بودن فعالیت CAT در کالوس و کاهش آن را در اولین روزهای تمایز رویان گزارش کرده اند تطابق کاملی ندارد (۲۴).

بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرمهای کاتالازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۲) وجود تنها یک نوار ایزوفرمی با جرم مولکولی ۱۰۶/۷ کیلوالتون را نشان داد (جدول ۸). با بررسی مقایسه ای این ایزوفرم در مراحل مختلف تشکیل رویان می‌توان گفت این ایزوفرم که تنها در برخی از مراحل رویانزایی قابل مشاهده است یک ایزوفرم اصلی دخیل در تمایز رویان محسوب می‌شود. همچنین بیش بیانی یا فراتنظیمی این ایزوفرم در طی تشکیل رویان قابل توجه می‌باشد.

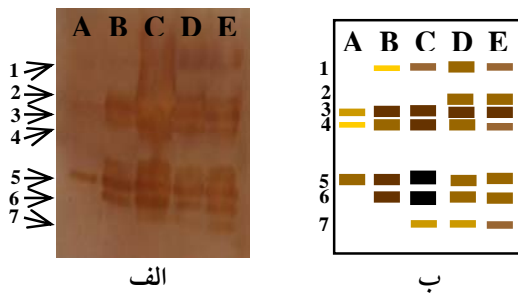
بررسی تغییرات فعالیت آسکوربات پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان (جدول ۳ و نمودار ۳) نشان داد که در برگ این آنزیم کمترین فعالیت را دارا می‌باشد. فعالیت این آنزیم در طی تشکیل رویان به تدریج افزایش یافته تا کالوس رویانزا که به حداکثر خود می‌رسد (۱۲/۳ برابر برگ) و دوباره کاهش می‌یابد. بررسی آماری نشان داد که بین فعالیتهای این آنزیم در مراحل مختلف رویانزایی اختلاف معنی دار می‌باشد (جدول ۶).

بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرمهای آسکوربات پراکسیدازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۳) ۵ ایزوفرم را نشان داد و در برگ ۱، برگ کالوس زا ۳، کالوس رویانزا ۵ و کالوس واجد رویان ۵ ایزوفرم قابل

واره ای نوارها.



شکل ۵ - الکتروفورز پلی فنل اکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H. niger*: A: برگ، B: برگ حامل کالوس، C: کالوس رویانزا و D: کالوس واجد رویان. ۱ → ۶: شماره های نوارهای ایزوفرمها. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح واره ای نوارها.

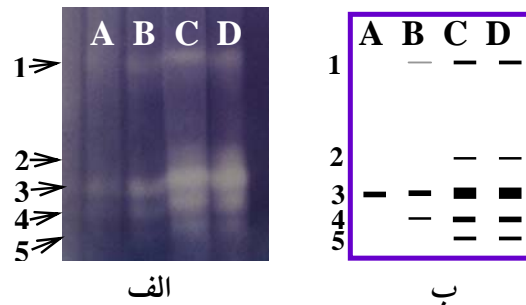


شکل ۶ - الکتروفورز اکسین اکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H. niger*: A: برگ، B: برگ حامل کالوس، C: کالوس، D: کالوس رویانزا و E: کالوس واجد رویان. ۱ → ۷: شماره های نوارهای ایزوفرمها. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح واره ای نوارها.

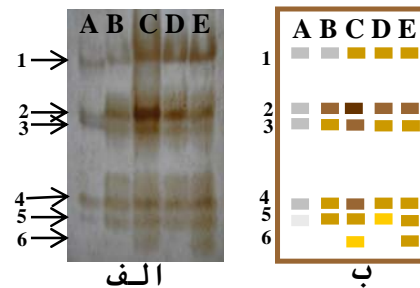
بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرمهای اکسین اکسیدازی در مراحل مختلف تشکیل رویان (شکل ۶) وجود ۷ ایزوفرم را نشان می‌دهد. با توجه به شکل در برگ ۳، برگ کالوس ۴، کالوس ۶، کالوس رویانزا ۷ و کالوس واجد رویان ۷ ایزوفرم قابل شناسایی می‌باشد. Rm و جرم مولکولی ایزوفرمهای فوق در (جدول ۱۲) بیان شده است. با بررسی مقایسه ای ایزوفرمها در مراحل مختلف تشکیل رویان و با توجه به توضیحات داده شده می‌توان

۴ (۶۷/۷۹)، ۵ (۳۱/۶ KD) و ۶ (۲۶/۳ KD) که در تمام مراحل تشکیل رویان قابل مشاهده بودند جزء ایزوفرمهای نهادی دخیل در فرایندهای عمومی تمایز محسوب می‌شوند. به علاوه ایزوفرمهای ۱ (۱۴۱/۶ KD)، ۲ (۶۷/۷۹)، ۳ (۴۰/۱ KD) و ۶ (۲۲ KD) در طی تشکیل رویان دچار بیش بیانی یا فراتنظیمی گشته اند و ایزوفرم ۵ (۲۶/۳ KD) در طی تشکیل رویان تقریباً به طور یکسان بیان شده است.

در پژوهش حاضر OOXs که جزء PODs می‌باشند با روش الکتروفورز بررسی گردیدند. مقایسه الگوهای الکتروفورزی شباهت فراوانی را بین نوارهای ایزوفرمی این دو گروه از آنزیمها نشان می‌دهد.



شکل ۳ - الکتروفورز آسکوربات پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H. niger*: A: برگ، B: برگ حامل کالوس، C: کالوس رویانزا و D: کالوس واجد رویان. ۱ → ۵: شماره های نوارهای ایزوفرمها. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح واره ای نوارها.



شکل ۴ - الکتروفورز پراکسیداز در مراحل مختلف تشکیل رویان از جداگشت برگی در *H. niger*: A: برگ، B: برگ حامل کالوس، C: کالوس و D: کالوس رویانزا و E: کالوس واجد رویان. ۱ → ۶: شماره های نوارهای ایزوفرمها. الف) شکل اصلی ژل. ب) نمایش طرح

می‌شوند. کلیه ایزوفرم‌ها در طی تشکیل رویان دچار بیش‌بینایی یا فراتنظیمی شده‌اند.

ما حاصل اینکه، مرحله تشکیل کالوس رویانرا از شاخص‌ترین مراحل رویانزایی است. این مرحله با شدید بودن فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و با ضعیف بودن فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز همراه بوده، تغییر تعداد نوارهای آنزیمی این ویژگی را همراهی نمی‌نماید.

منابع

۴- رهنما - حسن (۱۳۸۲): استفاده از روشهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوتکنولوژیکی جهت بررسی و ایجاد ارقام مقاوم به شوری در سیب زمینی. رساله دکتری - دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

۵- شریفی - گل اندام (۱۳۸۰): مطالعه تبار زایشی برخی از گونه‌های بنگ دانه (*Hyoscyamus L.*) در ایران. پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد علوم گیاهی، گرایش فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تهران، دانشکده علوم، دانشکده زیست‌شناسی.

۶- ندیم - هایده (۱۳۵۶): تغییرات کمی و کیفی پروتئینهای محلول و سه گروه آنزیمی و رابطه با افزایش سن و پیری. پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

گفت ایزوفرم‌های ۱ (۷۹/۱ KD)، ۲ (۶۵/۹ KD)، ۳ (۳۵/۹) و ۷ (۳۱/۸ KD) که تنها در برخی از مراحل رویانزایی مشاهده شده‌اند جزء ایزوفرم‌های اصلی دخیل در تمایز رویان محسوب می‌شوند و ایزوفرم‌های ۳ (۵۸/۳)، ۴ (۵۱/۷ KD) و ۵ (۳۸/۱ KD) که در تمام مراحل تشکیل رویان قابل مشاهده بودند جزء ایزوفرم‌های نهادی دخیل در فرآیندهای عمومی تمایز محسوب

۱- ابراهیم زاده - مهدیس و ابراهیم زاده - حسن (۱۳۸۷): بررسی تغییرات پروتئینها در مراحل مختلف رویانزایی بدنی از قطعات برگ *H. arachnoideus* Pojark و *H. niger* L. مجله زیست‌شناسی ایران - جلد ۲۱، شماره ۳، صفحات ۳۸۱-۳۶۹.

۲- ابراهیم زاده - مهدیس، مجد - احمد و ابراهیم زاده - حسن (۱۳۸۱): رویانزایی بدنی در قطعات جداگشت چند گونه بنگدانه (*Hyoscyamus*) : *H. pusilus* L. ، *H. arachnoideus* و *H. niger* L. Pojark مجله زیست‌شناسی ایران - جلد ۱۳، شماره ۳ و ۴، صفحات ۴۸-۳۹.

۳- ابریشم چی - پروانه (۱۳۷۹): بررسی متابولیسم گل در گیاه زعفران مزروعی. رساله برای دریافت درجه دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

7- Angelopoulos K., Dichio B. and Xiloyannis C. (1996). Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering Journal of Experimental Botany. 47: 1093-1100.

8- Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. and Filonova L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis, Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 233-249.

9- Arrigoni O., Gara L., Tommasi F., and Liso R. (1992). Change in ascorbate system during seed development of *Vicia faba*. Plant Physiol. 99: 235-238.

10- Bowler C., van Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43: 83-116.

11- Chen C., Belanger R. R., Benhamou N. and Paulitz T.C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 56: 13-23.

12- Dewir Y. H., Chakrabarty D., Al, M. B., Hahn E. J. and Paek K. Y. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Eupia millii* hyperhydric shoots. Environmental and Experimental Botany. 58 (1-3): 93-99.

13- Diamantidis G., Effose A., Potier P. and Bally R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. Soil Biology and Biochemistry. 32: 919-927.

14- Elkahoui S., Hernandez J. A., Abdelly C., Ghir R. and Limam F. (2005). Effects of salt on lipid

- peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*. 168: 607-613.
- 15- Feierabend J., Schaan C., Hertwig B. (1992). Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology*. 100: 1554-1561.
 - 16- Foyer C.H., Mullineaux P.M. (1998). The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Letters*. 425: 528-529.
 - 17- Garnczarska M. (2005). Response of the ascorbate-glutathione cycle to reoxygenation following hypoxia in lupine roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43(6): 583-590.
 - 18- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford university press, New York.
 - 19- Hames B.D. and Richwood D. (1999) *Gel Electrophoresis of Proteins: A practical Approach*, second edition, Oxford University Press, New York.
 - 20- Ho K.K. (1999). Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* 'Christine 130'. *Plant Physiol. Biochem.* 37(11): 841-848.
 - 21- Hoyle M. C. (1992). Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiol*. 50: 15-18.
 - 22- Izzo F., Meneguzzo S., Loggini B., Vazzana C. and Sgherri C. L. M. (1997). The role of the glutathione system during dehydration of *Boea hygrosopica*. *Physiol. Plant.*(99): 23-30.
 - 23- Jebara S., Jebara M., Limam F. and Aouani M.E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 162: 929-936.
 - 24- Kakkar R. K. and Sawhney V. K. (2002). Polyamine research in plants-a changing perspective. *Physio. Planta*. 116: 281-292.
 - 25- Keissar H.T., Bashan B., Levy Y. and Kenigsbuch D. (2002). Stage specificity of catalase isoform activity in *Exserohilum turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 163-168.
 - 26- Kuwabara T., Katoh Y. (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant and Cell Physiology*. 40: 1029-1035.
 - 27- Li S.H., Kuoh C.S., Chen Y.H., Chen H.H. and Chen W.H. (2005) Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81: 183-192.
 - 28- Marri C., Frazzoli A., Hochkoeppler A. and Poggi V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. 63: 745-752.
 - 29- Martensson B., Sommarin M. and Widell S. (1998). Peroxidase activity and ATP-dependent Ca²⁺ transport in subcellular fraction of embryogenic and non-embryogenic *Daucus carota* cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.* 7: 515-524.
 - 30- Mazzafera P. and Robinson S.P. (2000). Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry*. 55: 258-296.
 - 31- Mehlhorn H., Lelandais M., Korth H.G., Foyer C.H. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters*. 425: 528-529.
 - 32- Miszalski Z., Libik M., Surowka E. and Niewiadomska Ewa. (2005). Cu/Zn superoxide dismutase and catalase activities in *Pinus mugo* needles growing at elevated stands in the mountains, and their photochemical efficiency of PS II. *Jurnal of plant Physiology*, 162 (8): 895-902.
 - 33- Noctor N., Veljovic-Jovanovic S., Foyer C.H. (2000). Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 355: 1465-1475.
 - 34- Smirnov N. (1993). The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. *New Phytologist*. 125: 27-58.
 - 35- Smirnov N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:229-235.
 - 36- Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J. M., Moens T., Botherman J., Van Montagu M. and Inze O. (1999). Overproduction of *Arabidopsis thaliana* Fe SOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiol* 40: 515-523.
 - 37- Wingler A., Lea P.J., Quick W.P. and Leegood R.C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society*

Somatic embryogenesis and antioxidant enzymes in *Hyoscyamus niger*

Ebrahimzadeh M.¹ and Ebrahimzadeh H.²

¹ Biology Dept., Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, I.R. of Iran

² School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The *Hyoscyamus* genus has always been regarded as an important medical plant and its therapeutic effects are attributed to its contained different tropan alkaloids. Utilizing genetic engineering for production of plants belonging to this genus with more valuable pharmaceutical properties without consuming much time and cost is one of the most regarded points in this issue. Somatic embryogenesis and gathering knowledge about it is a great help. For this purpose we attempted to perform successful somatic embryogenesis, and to get more knowledge about its mechanism via assessing enzymes in different stages of embryo formation. In this study, leaves were cultured on MS medium containing BAP (1.5 mgL^{-1}) and IAA (0.2 mgL^{-1}) lead to a successful embryogenesis. The results show that highest activity of superoxide dismutase and peroxidase had the highest activity in primary embryo-holding callus, catalase and ascorbate peroxidase had the highest activity in embryogenic callus but polyphenol oxidase had the highest activity in callus. In different stages of embryo formation from leaf explants of *H. niger* showed that changes of activities of these enzymes in various stages of embryo formation. The electrophoresis patterns of iso-enzymes of superoxide dismutase, peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase and auxin oxidase showed the presence of 7, 6, 1, 5, 6, 7, and 2 isozymes in these enzymes respectively. The molecular mass of the isozymes were determined and up-regulation, down-regulation, and modulation of the isosymal bands were assessed. The main as well as conservative isozymes involved in embryogenesis were also identified.

Keywords: *Hyoscyamus niger*, antioxidant enzymes, somatic embryogenesis.