

مطالعه ایزوفرم‌های زیمایه‌های پاداکساینده در قطعات گل نارس زعفران (*Crocus sativus* L.) ایران برای انتخاب نمونه برتر اندام‌زایی به روش الکتروفورز

منیر حسین‌زاده نمین^{۱،۲*}، حسن ابراهیم‌زاده^۲ و طیبه رجیبیان^۳

^۱ تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه فیزیولوژی گیاهی

^۲ تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۳ تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۷

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) از تیره Iridaceae به‌عنوان ادویه و در پزشکی نیز استفاده می‌شود. تحقیقی به‌منظور تعیین اندام مناسب برای کشت بافت و بهبود محصول زعفران انجام شد. شدت ظهور و ایزوفرم‌های زیمایه‌های پاداکساینده و تعیین‌کننده نسبت H_2O_2/O_2 که نشانگر پتانسیل اندام‌زایی است به روش الکتروفورز و با استفاده از پنج قطعه گل نارس زعفران انجام شد. تعداد ایزوفرم‌های پراکسیداز که نشانویژه بافت و مرحله نمو و مصرف‌کننده H_2O_2 هستند و سوپراکسید دیسموتاز که تولیدکننده H_2O_2 است در تخمدان بالاترین و در گلپوش و میله پائین‌ترین نسبت H_2O_2/O_2 را به نمایش گذاشتند. کاتالاز که در غلظت بالای H_2O_2 غیرفعال می‌شود و بر خلاف پراکسیداز در سطوح پائین H_2O_2 قادر به پاسخگویی است. سه زیمایه پاداکساینده پلی فنل اکسیداز نشانویژه سیستم دفاعی و رشد و نمو، ملات دهیدروژناز نشانویژه روابط بین اندامها و رشد و نیز تولید H_2O_2 و استراز نشانویژه سطح سازمان یافتگی بافتها اطلاعات مفیدی را درباره توان بالای تخمدان به‌عنوان نمونه برتر و توان پائین گلپوش و میله را در اندام‌زایی ارائه دادند تا بتوانیم مناسبترین نمونه را برای کشت بافت انتخاب کنیم.

واژه‌های کلیدی: Iridaceae، الکتروفورز، ایزوفرم، *Crocus sativus* L.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۸۸۰۴۴۰۵۱، پست الکترونیکی: monirhosseinzade@yahoo.com

مقدمه

موتاسیون DNA و واسرشتی پروتئین‌ها را در سلولها دارند (۲۵). زیمایه‌های پاداکساینده از قبیل SOD، POD و CAT می‌توانند رادیکال اکسیژن و هیدروژن پراکسید را به‌ترتیب حذف کنند. گونه‌های واکنشگر اکسیژن که در غلظت پائین اثرات خفیف دارند دخیل در علامت‌دهی سلولی بوده و در غلظت‌های قابل تحمل بوسیله زیمایه‌های پاداکساینده جاروب می‌شوند (۱۱). در متابولیسم طبیعی سلول، H_2O_2 از طریق واکنش Mehler در کلروپلاستها، از طریق زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری‌ها و در تنفس نوری از پراکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند. تنش‌های زیستی و

زعفران گیاهی تریپلوئید، عقیم، تک‌لپه‌ای و عضوی از تیره (Iridaceae) است. کلاله‌های خشک شده زعفران به‌عنوان ادویه مصرف می‌شود. رنگ کروسین (crocin) زعفران از مشتقات کاروتنوئید و محلول در آب است. امروزه زعفران علاوه بر ادویه در پزشکی به‌عنوان ضد سرطان، ضد تومور و نیز به‌عنوان پاداکساینده بکار می‌رود که جاروب‌کننده گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) است. گونه‌های واکنشگر اکسیژن به‌ترتیب شامل سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^{\cdot}) می‌باشند که اثراتی زیان‌آور از قبیل پراکسیداسیون لیپد،

این Mn-SOD در هر ژنوم گیاهی موجود می‌باشد. SOD-Fe در کلروپلاستها یافت می‌شود. به نظر می‌رسد SOD-Fe در بعضی از گونه‌های گیاهی با Cu/Zn-SOD جایگزین شده باشد (۱۶).

کاتالاز (Catalase) (CAT, EC 1.11.1.6): کاتالاز باعث دیسموتاسیون H_2O_2 به H_2O و O_2 می‌شود، بدون اینکه نیاز به منابع احیاء کننده داشته باشد. کاتالاز نسبت به پراکسیدازها توان کمتری در جاروب کردن H_2O_2 دارد، زیرا تمایل کمتری نسبت به گهرمایه در آنها وجود دارد. بیان ژن کاتالاز در ذرت بافت ویژه است. کاتالاز گلی اکسی زوم نقش اساسی را در شکستن H_2O_2 تولید شده در بتا-اکسیداسیون و در تنفس نوری بازی می‌کند و بیان آنها اندام ویژه و نیز نشانویژه مرحله نمو بافتی است (۱۰).

پراکسیداز (Peroxidase) (POD, EC 1.11.1.7): گیاهان عالی واجد دسته بزرگی از پراکسیدازها می‌باشند که در طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی از قبیل جاروب کردن و ایجاد H_2O_2 ، طویل شدن سلول، ساختار دیواره سلولی، تمایز و پاسخ گیاه به تنش شرکت می‌کنند. الگوی بیانی پراکسیدازها بافت ویژه و تنظیمشان وابسته به تمایز است. بطور کلی پراکسیدازها براساس عملکرد و جایگاه زیر سلولی‌شان به دو گروه تقسیم شدند. آنهایی که گایاکول (o-متوکسی فنل) را به‌عنوان گهرمایه احیاءکننده اکسید می‌کنند؛ در سیتوسل، واکونل، دیواره سلولی و آپوپلاست قرار دارند و در تعدادی از فرایندها که به رشد و تمایز گیاه مربوط می‌شوند، شرکت می‌کنند. نوع دیگر آن اسکورییک اسید را به‌عنوان گهرمایه احیاءکننده استفاده می‌کنند (۱۲). بعضی از پراکسیدازهای گیاهی تولید H_2O_2 می‌کنند. پراکسیدازهای ویژه پرزها در میانکنش کلاله-دانه گرده، باعث سست شدن دیواره سلول کلاله شده و اجازه نفوذ و رشد لوله گرده را می‌دهد، و نیز کمک به شناسایی دانه گرده گونه ویژه، دفاع برابر عوامل بیماری‌زا و محافظت از شهد (نکتار) در زمان قبول دانه گرده کرده و

غیرزیستی تولید H_2O_2 را از این مسیرها و نیز از منابع زیماهی از قبیل NADPH اکسیدازها و یا پراکسیدازهای دیواره سلولی افزایش می‌دهند. سطوح H_2O_2 سلولی، با میزان فرآورده‌های H_2O_2 و متابولیسم از طریق کاتالاز و چرخه گلوکاتیون-اسکوربات که شامل اسکوربات پراکسیداز (APX)، دهیدرواسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوکاتیون ردوکتاز (GR) است، تعیین می‌شود. همچنین H_2O_2 به گلوکاتیون واکنش نشان داده و آنرا از حالت احیاء (GSH) به حالت اکسید (GSSG) تبدیل می‌کند. هورمونهای گیاهان عالی نه تنها در پائین‌دست علامت‌دهی ROS قرار گرفته‌اند، بلکه ROS به نوبه خود پیکهای ثانوی در اغلب مسیرهای علامت‌دهی هورمونی هستند (۸). آنها اثرات زیان‌آوری را از طریق اکسایش چربیها، شکستن پلی‌ساکاریدها، جهش در DNA و واسرشتی پروتئین‌ها در سلولها می‌گذارند (۳ و ۲۵). گیاهان واجد دو سازوکار دفاعی پاداکساینده‌های غیر زیماهی و زیماهی برای کاهش اثرات کشنده هستند (۱).

پاداکساینده‌های زیماهی بکار رفته در این پژوهش بشرح زیر است.

سوپر اکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1): (Superoxide dismutase) سوپر اکسید دیسموتاز می‌تواند سوپر اکسید آنیونی ($O_2^{\cdot-}$) را جاروب کرده و غلظت $O_2^{\cdot-}$ و H_2O_2 یاخته‌ای را با کاتالیز کردن سوپر اکسید و تبدیل آنها به O_2 و H_2O_2 تنظیم نماید. H_2O_2 به نوبه خود توسط کاتالاز و پراکسیداز حذف می‌شود. سوپر اکسید علاوه بر واکنشگری، به دلیل عدم انتشار از عرض دیواره و ماندگاری در محل تولید، مخرب است. در گیاهان برحسب نوع کوفاکتور فلزی که زیماهی از آن استفاده می‌کند و نیز جایگاه زیر یاخته‌ای، سه نوع SOD شناخته شده است. Mn-SOD در میتوکندری و پراکسی‌زوم، Cu/Zn-SOD در سیتوسل، کلروپلاست و پراکسی‌زوم و Fe-SOD در کلروپلاست قرار گرفتند. حداقل یک نسخه از

دهیدروژناز وابسته به $NADP^+$ کلروپلاستی بطور غیرمستقیم بوسیله نور تنظیم می‌شود. ملات دهیدروژناز وابسته به NAD^+ در گیاهان عالی در سه فرم در سیتوپلاسم، میتوکندری و اندامکها و فرم وابسته به $NADP^+$ در کلروپلاستها حضور دارند و بوسیله ژنهای مختلف هسته‌ای رمز سازی و در سیتوپلاسم سنتز می‌شوند و به اندام‌های مورد نظر انتقال می‌یابند (۱۳). تغییر یک آمینواسید در لاکتات دهیدروژناز (LDH) ویژگی زیمايه را به MDH تغییر می‌دهد، به طوری که آرژینین در MDH و گلوتامین در LDH و گهرمایه ترجیحی برای MDH اگزالوا ستات و برای LDH پیرووات است. LDH و MDH هر دو در دسته اکسیدوردواکتازها قرار دارند. سیستم MDH اطلاعات مفیدی درباره روابط بین اندامها و بافتها در خصوص رشد، متابولیسم و توارث می‌دهد. این زیمايه‌ها در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانولها، ترپنوئیدها، استروئیدها و الکلونیدهای حاصل از مسیر شیکیمیک اسید و بیوسنتز هورمونهای گیاهی و مسیرهای متابولسمی از قبیل چرخه کربس و تنفس نوری شرکت می‌کنند (www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:1.1.1.37).

استیل استراز: استرازها نشانگرهای مناسبتری نسبت به پراکسیدازها در فرایندهای نموی هستند. از طرفی نشانگرهای خوبی برای ریخت‌زایی گیاهی می‌باشند. الگوهای ایزوفرمی آنها در بین بافت‌های سازمان یافته و غیر سازمان یافته متفاوت است. Coppins و Dewitte در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که طرحهای ایزوزیمی استراز در کالوس جو دوسر می‌توانند به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی رویان‌زایی و اندام‌زایی استفاده شوند و نیز سیستم استراز برای بررسی رویان‌زایی، قبل از اینکه رویانهای بدنی شکل بگیرند، حساس‌تر هستند. طرح ایزوفرم پیچیده بوده و به مرحله ریختی خاص ارتباط دارد. هدف از پژوهش حاضر مطالعه و مقایسه ایزوفرم‌های شش زیمايه پاداکساینده در پنج قطعه مختلف گل نارس زعفران (تخم‌دان، خامه،

نقش کلیدی دارند. از طرفی نشان داده شده که کلاله‌های تر و تازه از حمله بیماری‌زها محافظت می‌شوند، زیرا خامه پروتئینهای مربوط به بیماری‌زایی (PR) را که بعضی از آنها پراکسیدازها می‌باشند، بیان می‌کند (۲۲).

پلی فنل اکسیداز (Polyphenol oxidase) (PPO, EC 1.1.1.1): پلی فنل اکسیدازها باعث تبدیل مونو فنلها به O-دی فنلها و سپس O-دی هیدروکسی فنلها به O-quinone می‌شوند که بعداً تولیدات O-quinone حاصل می‌تواند پلیمریزه شده با گروه‌های آمینی پروتئینهای سلولی واکنش نشان دهد و منجر به رنگیزه‌های سیاه و یا قهوه‌ای شود. فنلها و اغلب ترکیبات فنلی، ترکیبات حد واسط مسیرهای شیکیمیک اسید و فنیل پروپانوئید می‌باشند که در بیوسنتز چوب دیواره سلولی دخیل هستند. ژنهای این زیمايه در بعضی گونه‌ها بصورت خانواده چند ژن و در برخی بصورت تک ژنی شناسائی شدند. زیمايه‌های آنها در بافتهای فتوسنتزکننده و غیر فتوسنتزکننده هر دو حضور دارند. دو دسته پلی فنل اکسیداز وجود دارد: لاکازها (Laccases) و کاتکول اکسیدازها (catechol oxidases). کاتکول اکسیداز به گرانومهای کلروپلاست و میتوکندری اتصال دارد. کاتکول اکسیداز و لاکاز هر دو با استفاده از اکسیژن مولکولی گهرمایه‌های فنلی را اکسید می‌کنند. مقدار زیمايه در شرایط رشد و نمو گیاه تغییر می‌کند (۲۱). تفاوت‌های مشاهده شده در الگوی ایزوفرمی در ارتباط با اندامکهای زیر سلولی، مرحله نمو بافتی، تیمار با هورمونهای گیاهی و حمله عوامل بیماری‌زا از نظر فیزیولوژیکی دارای اهمیت است. فعالیت پلی فنل اکسیداز در ابتدای تکوین گل بیشتر از سایر دوره‌هاست. این امر احتمالاً ناشی از نیاز بیشتر به سازوکارهای دفاعی دوره گلدهی می‌باشد (۲۳).

ملات دهیدروژناز (MDH- EC.1.1.1.37): ملات دهیدروژناز در گلی اکسی زومها، میتوکندریها، پراکسی زومها، کلروپلاستها و سیتوسل حضور دارد. ملات

سوپر اکسید دیسموتاز و ملات دهیدروژناز: آشکار سازی فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و ملات دهیدروژناز در ژلهای ۱۰٪ پلی آکریلامید در مجاورت محلول گهرمایه اختصاصی انجام شد (۳۰). برای شناسایی ایزوفرم های انواع مختلف SOD، یعنی Fe-SOD, Mn-SOD و

Cu/Zn-SOD پیش تیماری از بازدارنده های اختصاصی H_2O_2 (5mM) و KCN (3mM) انجام شد. از میان انواع مختلف ایزوفرم های Cu/Zn-SOD حساس به سیانید، ایزوفرم های Fe-SOD و Cu/Zn-SOD حساس به H_2O_2 و ایزوفرم های Mn-SOD مقاوم به هر دو بازدارنده بودند (۲۰).

کاتالاز: آشکار سازی ایزوفرم های کاتالاز در ژل ۷/۵ درصد پلی آکریلامید در مجاورت محلول گهرمایه اختصاصی انجام شد (۹).

پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز: آشکار سازی ایزوفرم های پراکسیدازها و پلی فنل اکسیدازها به ترتیب در ژلهای ۷/۵ و ۱۰ درصد پلی آکریلامید در مجاورت محلول گهرمایه اختصاصی انجام شد (۲۸).

استیل استراز: ایزوفرم های استراز در ژلهای ۱۰ درصد پلی آکریلامید در مجاورت محلول گهرمایه اختصاصی آن آشکار سازی شد (۴).

نتایج

آشکار سازی فعالیت زیمایه های پاداکساینده: نتایج حاصل از آشکار سازی و مقایسه شدت ظهور ایزوفرم های زیمایه های پراکسیداز، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، ملات دهیدروژناز و استیل استراز در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی در ژل پلی آکریلامید بشرح زیر می باشد.

سوپر اکسید دیسموتاز: نتایج مطالعه ایزوفرمهای سوپراکسید دیسموتاز در نمونه ها نشان‌دهنده دو دسته ایزوفرم (نوار) بود. پنج ایزوفرم در دسته اول با Rm های

گلوپوش، میله و کلاله) با استفاده از روش الکتروفورز با ژل پلی آکریلامید به منظور تعیین اندام مناسب برای کشت بافت و برای بهبود محصول زعفران است زیرا اغلب این زیمایه ها بافت ویژه بوده و اطلاعات مفیدی در مورد رشد و نمو و سازمان یافتگی نمونه ها می‌دهند.

مواد و روشها

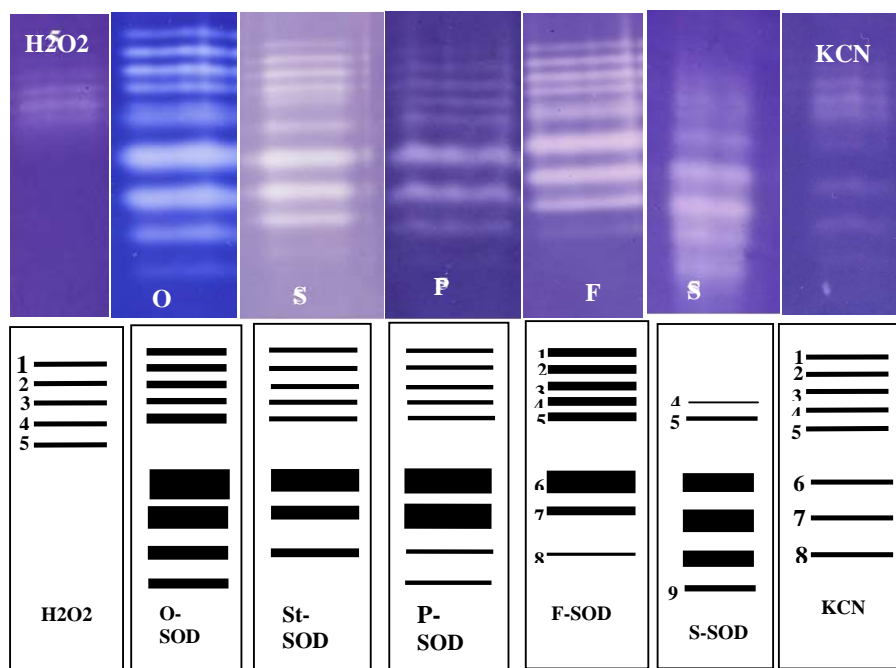
نمونه های گیاهی: برای برقراری آزمایش ها، بنه‌ها با گل‌های نارس از مزرعه مردآباد کرج وابسته به پردیس علوم دانشگاه تهران در فصل پاییز در فاصله ماه‌های آذر و دی جمع‌آوری شدند و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافتند. سپس بر روی یخ قسمتهای مختلف گل که شامل تخمدان، خامه، میله، کلاله و گلوپوش بودند از هم تفکیک شده و پس از توزین و بسته‌بندی ابتدا به ازت مایع انتقال و بعد در فریزر $80^{\circ}C$ - تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

برای استخراج پروتئین از بافر سدیم فسفات (۰/۲ مولار) pH ۶/۸ و برای سنجش پروتئین از روش برادفورد (۶) با استفاده از دستگاه طیف‌سنج Shimadzu Model UV-160 Japan و در طول موج ۵۹۵ nm استفاده شد و برای نمایش ایزوفرم ها از الکتروفورز با ژل پلی آکریلامید به روش PAGE (۱۴) استفاده شد. ژلها بعد از اتمام الکتروفورز در تماس با گهرمایه‌های اختصاصی زیمایه ها قرار گرفتند.

آشکار سازی زیمایه ها بر روی ژلهای پلی آکریلامید و محاسبه Rm: برای آشکار سازی زیمایه ها بر روی ژل پلی آکریلامید، بعد از خاتمه الکتروفورز ژل حاوی زیمایه در مجاورت گهرمایه اختصاصی قرار گرفت تا ایزوفرم های (نوار های اختصاصی) آن زیمایه ظاهر شوند. سپس Rm (relative mobility) ایزوفرم ها طبق فرمول مسافت پیموده شده توسط نوار پروتئینی در ژل زیرین از شروع ژل زیرین تا نوار پروتئینی تقسیم بر مسافت پیموده شده توسط رنگ در ژل زیرین از شروع ژل زیرین تا خط پیشروی رنگ محاسبه شد.

دسته دوم با شدت کمتری آشکار کرد. به غیر از کلاله که فاقد دو نوار با Rm های ۰/۵ و ۰/۴۸ در دسته اول بود، بقیه نمونه‌ها تمام نوارها را با شدت‌های متفاوت به نمایش گذاشتند. دو نوار با Rm های ۰/۴۲ و ۰/۳۶ بشدت در همه نمونه‌ها ظاهر شدند (شکل ۱).

۰/۵۸، ۰/۵۵، ۰/۵۲، ۰/۵، ۰/۴۸ و چهار ایزوفرم در دسته دوم با Rm های ۰/۴۲، ۰/۳۶، ۰/۳ و ۰/۲۶ بر روی ژل آشکار شدند. نوارهای هر دو دسته در قطعات تخمدان، خامه و گلپوش بر حسب نمونه و با شدت‌های مختلف آشکار شدند. قطعه میله، نوارهای دسته اول را نسبت به



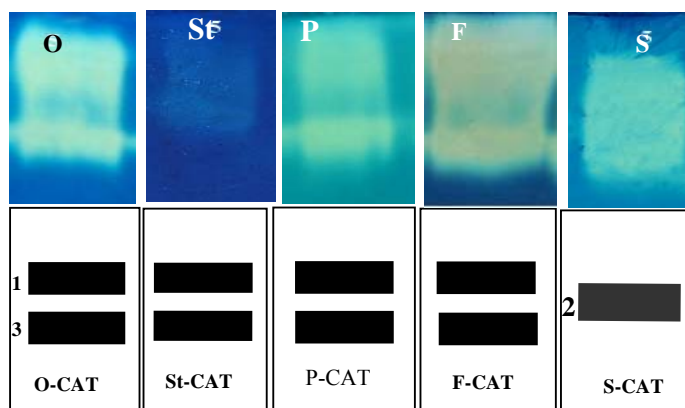
شکل ۱- نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های SOD در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی: تخمدان (O)، خامه (St)، گلپوش (P)، میله (F) و کلاله (S) در دو سمت نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های SOD در نمونه میله با پیش‌تیمارهای H₂O و KCN

شدت نوار در Rm ۰/۸۱ نسبت به بقیه بیشتر بود. گلپوش واجد نوارهایی ضعیف با Rm ۰/۵۳، ۰/۵۱، ۰/۴۸ و علاوه بر ۰/۸۱ بود. خامه واجد سه نوار با Rm ۰/۸۱ - ۰/۷۱ - ۰/۶۳ بود که بطور کمرنگ ظاهر شدند (شکل ۳).

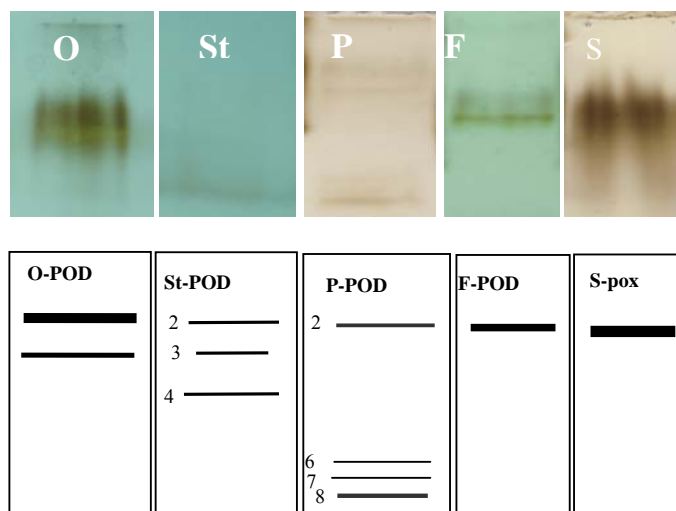
پلی فنل اکسیداز: ظهور و شدت نوارهای پلی فنل اکسیداز نشان داد که تخمدان، خامه، گلپوش و میله دو نوار با Rm های ۰/۹۲ و ۰/۸۲ را با شدت‌های مختلف ظاهر کردند ولی جداگشت کلاله فقط یک نوار با Rm ۰/۷۲ را ظاهر کرد (شکل ۴).

کاتالاز: بررسی ظهور و شدت نوارهای کاتالاز در نمونه‌های مختلف نشان داد به غیر از کلاله که واجد تک نوار با Rm ۰/۷۸ بود بقیه از الگوی ایزوفرمی مشابهی پیروی کردند و دارای دو نوار با Rm های ۰/۹ و ۰/۷۷ بودند (شکل ۲).

پراکسیداز: بررسی ظهور و شدت نوارهای پراکسیدازی در نمونه‌ها نشان داد که میله و کلاله با داشتن یک نوار با Rm ۰/۸۱ مشابه هم بودند ولی شدت ظهور در آنها متفاوت بود. تخمدان واجد دو نوار با Rm ۰/۸۱ و ۰/۷۱ بود ولی



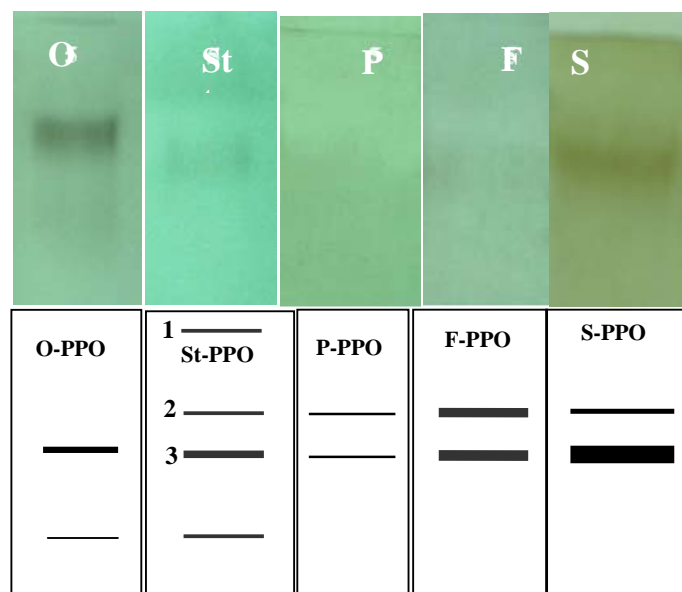
شکل ۲- نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های (CAT) در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی: تخمدان (O)، خامه (St)، گلپوش (P)، میله (F) و کلاله (S)



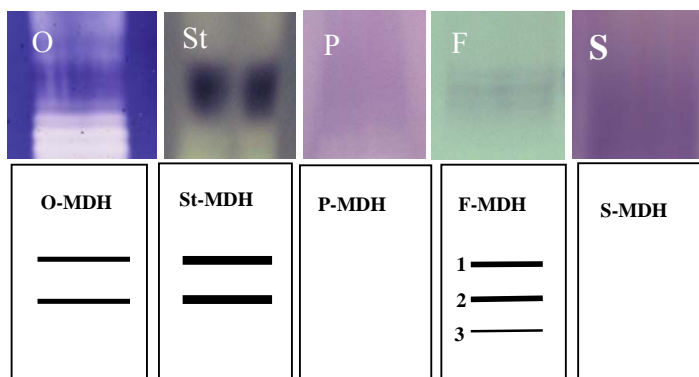
شکل ۳- نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های پراکسیداز (POD) در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی: تخمدان (O)، خامه (St)، گلپوش (P)، میله (F) و کلاله (S)

استیل استراز: ایزوفرم‌ها در سه دسته روی ژل ظاهر شدند. ایزوفرم‌های دسته اول با Rm های (۰/۸۹، ۰/۹۵) و (۰/۸۴) و یا (۰/۹۲، ۰/۸۶ و ۰/۸۱) علاوه بر ایزوفرم ۰/۷۱ که مشترک در هر دو دسته بودند. در هر نمونه فقط یکی از دو دسته را واجد بود. دسته دوم ۵ نوار با Rm های ۰/۴۷، ۰/۴۴، ۰/۴، ۰/۳۵ و ۰/۳۲ و دسته سوم ۴ نوار با Rm های ۰/۳۱، ۰/۲۸، ۰/۲۶ و ۰/۲۳ بر روی ژل ظاهر شدند. از میان نمونه‌ها کلاله و خامه واجد ایزوفرم Rm ۰/۷۱ بودند.

مالات دهیدروژناز: بررسی ظهور و شدت نوارهای مالات دهیدروژناز نشان داد که تخمدان و خامه واجد دو نوار با Rm ۰/۶۷ و ۰/۶۹ بودند که شدت ظهور در خامه چهار برابر تخمدان بود. نمونه‌های گلپوش و کلاله فاقد نوار بودند. نمونه میله علاوه بر دو نوار واجد نوار سوم با Rm ۰/۶۵ بود که تظاهرات هر سه نوار متوسط و مساوی بودند (شکل ۵).



شکل ۴- نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های پلی فنل اکسیداز (PPO) در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی: تخمدان (O)، خامه (St)، گلپوش (P)، میله (F) و کلاله (S)



شکل ۵- نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های مالات دهیدروژناز (MDH) در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی: تخمدان (O)، خامه (St)، گلپوش (P)، میله (F) و کلاله (S)

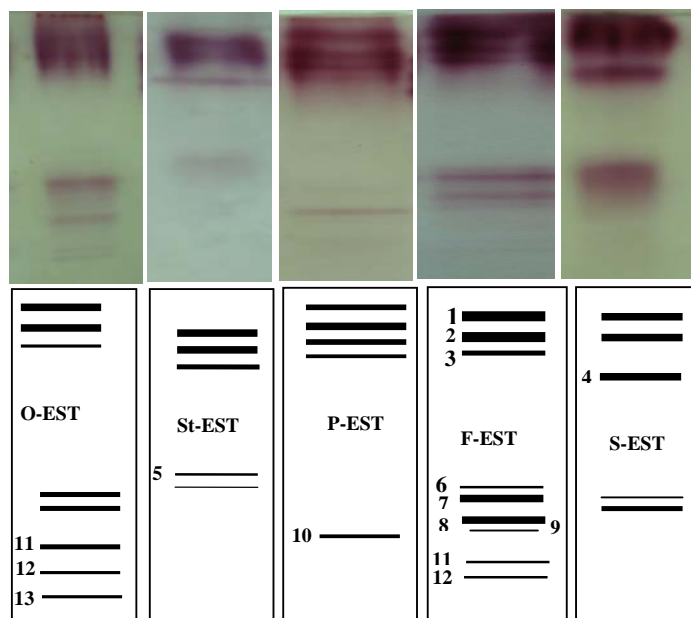
سوپر اکسید دیسموتاز: این زیمايه می‌تواند O_2^- را که مولکول علامت دهنده است و از کاهش یک الکترون O_2 حاصل از چرخه انتقال الکترون در میتوکندری یا کلروپلاست و یا از چرخه بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب در گلی اکسی زوم بدست می‌آید به H_2O_2 تبدیل نماید. H_2O_2 هر دو می‌توانند ژنهای مختلفی را بطور انفرادی یا با هم القاء کنند. کاتالاز و پراکسیداز H_2O_2 تولید شده را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کنند. در کشت

قطعات گلپوش و میله فقط در دسته دوم با سه نوار با R_m های ۰/۴۷، ۰/۴۴ و ۰/۳۵ تفاوت داشتند. کلاله و خامه با داشتن دو نوار همراه با نوار ۰/۷۱ در دسته اول و تشابه در نوارهای دسته دوم و سوم شبیه هم بودند. از طرفی تخمدان و میله در داشتن تعداد نوارها در هر سه دسته مشابه هم بودند (شکل ۶).

بحث

مسئول کاهش توان نو پدیدگی و افزایش تشکیل مریستم مانند می‌باشد (۲۷).

بافت توت فرنگی سطوح بالای $O_2^{•-}$ پتانسیل پائین اندام‌زایی را نشان داد. سطوح بالاتر $O_2^{•-}$ و پائین‌تر H_2O_2



شکل ۶ - نیمرخ ژل با ایزوفرم‌های استراز در پنج قطعه گل نارس زعفران مزروعی:

تخمندان (O)، خامه (St)، گلپوش (P)، میله (F) کلاله (S)

مشاهده شد که با بکارگیری KCN قابل رؤیت شدند. از آنجایی‌که فعالیت PSII در نمونه‌ها کم است، بنابراین نوع SOD کلروپلاستی سهم بسیار کمی را نشان داد. از این رو بنظر می‌رسد نوع Cu/Zn-SOD بیشتر از دو نوع دیگر در زیوه فعالتر باشد.

کاتالاز: کاتالاز نقش مهمی در دفاع از تنش‌های فیزیولوژیکی ایفا می‌کند. در یاخته‌ها H_2O_2 بطور طبیعی تولید شده و نسبتاً پایدار و قابل نفوذ از دیواره‌های سلولی هستند. کاتالاز در غلظت‌های بالای H_2O_2 به سرعت غیرفعال می‌شود. بررسی الگوی الکتروفورزی نمونه‌ها نشان داد که تمام نمونه‌ها واجد دو ایزوفرم بودند، بجز کلاله که فقط یک ایزوفرم را به نمایش گذاشت. نتایج بررسی اثر اکسین بر سه ژن کاتالاز ذرت (*cat1,2,3*) نشان می‌دهد هر کدام از ژنها پاسخ‌های متفاوتی به اکسین در مراحل مختلف نموی می‌دهند. در ذرت سه ایزوفرم کاتالاز

مقایسه نتایج فعالیت زیمايه SOD در این پژوهش نتایج Tian و همکاران (۲۰۰۳) را تأیید نمود (۲۷). نوع Mn-SOD در میتوکندری و پراکسی زوم وجود دارد. نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود دو دسته ایزوفرم بود. دسته اول واجد ۵ ایزوفرم در بالای ژل و دسته دوم واجد ۴ ایزوفرم در موقیت پائین ژل بودند. با بکارگیری بازدارنده H_2O_2 فقط نوع Mn-SOD با ۵ ایزوفرم در بالای ژل مشاهده شد و همه قطعات بغیر از کلاله که فقط سه ایزوفرم داشتند بطور کامل نشان داده شدند. تیمار با بازدارنده دیگر KCN که در آن Cu/Zn-SOD حذف شد برای نشان دادن موقعیت دو دسته دیگر از جمله نوع Fe-SOD در روی ژل پلی آکرلامید بکار رفت. نوع Fe-SOD در کلروپلاست است و در همه گیاهان یافت نمی‌شود و به فعالیت PSII بستگی دارد (۲). در این آزمایش سه ایزوفرم متعلق به Fe-SOD درست در موقعیت Cu/Zn-SOD در نمونه میله

یافتگی و رشد آنها بستگی داشت. Lamport (۱۹۸۶) گزارش کرد که پراکسیدازهای کاتالیز کننده اتصالات عرضی، تمایلی به کاتالیز کردن مناطق با رشد بالا را ندارند (۱۹). بنابراین توسعه یاخته‌ای متأثر از اسیدی بودن بالای محیط است، زیرا اکسین با آزاد سازی پروتون و با ایجاد شرایط اسیدی این اتصالات را مهار می‌کند و از طرفی فقط پراکسیدازهای بازی در تخریب اکسین مؤثرند و نه نوع اسیدی. بنابراین تا زمانیکه یاخته رشد می‌کند امکان ایجاد اتصالات بین تکپاره‌های اکستانسین وجود ندارد.

پلی فنل اکسیداز: محل زیمایه PPO در پلاستید و گهرمایه فنلی آن اکثراً در واکوئل قرار دارد. از عملکردهای این زیمایه، تشکیل رنگیزه و استفاده از اکسیژن است و واکنش قهوه‌ای شدگی توسط PPO فقط بعد از سست شدن این کده مثل زخمی شدن رخ می‌دهد (۱۸). تفکیک قطعات غنچه گلی بناچار در همه نمونه‌های زخم بوجود آمد. از این‌رو همه نمونه‌ها افزایشی را در فعالیت این زیمایه نشان دادند. ترکیبات فنلی گیاهان بر اکسایش IAA اثر داشته و تعدیل توسط PPO بیشتر از POD بوده که می‌تواند نشانه نیاز بالا به سیستم دفاعی باشد. فنل‌های ساده و بیشتر ترکیبات فنلی، حدواسط‌های مشتقات مسیرهای شیکیمیک اسید و فنیل پروپانویید هستند و کاهش در فعالیت پلی فنل اکسیداز در ابتدای نمو ممکن است دخیل در این فرایند باشد. بررسی الگوی الکتروفورزی این زیمایه ۴ ایزوفرم را نشان داد که تعداد آن در نمونه‌ها بر حسب نمونه و مراحل تکوینی از ۲ تا ۴ ایزوفرم تغییر می‌کند. در حالیکه در بنه زعفران مزروعی وجود سه ایزوزیم PPO بر روی ژل پلی آکریلامید نشان داده شد (۲۴).

مالات دهیدروژناز: سیستم MDH اطلاعات مفیدی درباره روابط بین اندامها و بافتها درخصوص رشد، متابولیسم و توارث ارائه می‌دهد. نتایج حاصل از آشکار سازی این زیمایه نشان‌دهنده سه ایزوفرم بود که بجز میله که دارای ایزوفرم ۳ با Rm ۰/۶۵ بود، بقیه دارای دو ایزوفرم با

توسط سه ژن رمز سازی می‌شوند (۱۰). مطالعات نشان داد که H_2O_2 ممکن است به‌عنوان یک مولکول علامتی در اعمال یاخته دخیل باشد. Keyhani و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که بنه زعفران مزروعی در حالت خواب دارای سه ایزوفرم می‌باشد (۱۷). ایزوفرم منفرد کاتالاز در قطعه کلالة تصور می‌شود به میزان بالای H_2O_2 حساس باشد. گیاه ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*) دو ایزوفرم در کالوسهای ریشه‌زا، رویان‌زا و کالوسهای فاقد اندام‌زایی حاصل از این گیاه را نشان داد (۱۵).

پراکسیداز: تعدادی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از قبیل چوبی شدن، پاسخهای تنشی، دفاع در برابر بیماری‌زها و پیری به پراکسیدازهای گیاهی نسبت داده می‌شود. همچنین اتصالات عرضی پروتئین‌های دیواره یاخته‌ای مثل پروتئین extensin توسط پراکسیدازها، می‌توانند بر رشد دیواره‌های اسکلتی اثر گذاشته و ساختار آنرا تغییر دهند. از این‌رو پراکسیدازها در چندین فرایند فیزیولوژیکی از قبیل طویل شدن و تشکیل ساختار دیواره یاخته‌ای دخیل می‌باشند. تعداد زیادی از پراکسیدازها در گیاهان حاصل بیان ژنهایی هستند که در طی تکوین گیاه و تشکیل اندام‌های نوپدید وارد عمل می‌شوند (۴). از طرفی پراکسیدازهای گایاکولی که جایگاهشان در سیتوسل، واکوئل، آپوپلاست و خارج یاخته گیاهیست می‌توانند در رشد و نمو دخیل باشند (۲۶). بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوفرم‌ها و شدت نوارهای پراکسیدازی در قطعات نشان داد که گلپوش واجد سه ایزوفرم اختصاصی با Rm ۰/۵۳، ۰/۵۱ و ۰/۴۸ علاوه بر ۰/۸۱ بود که در سایر قطعات مشاهده نشد ولی شدت ظهور آنها پائین بود. خامه واجد سه ایزوفرم با Rm ۰/۸۱-۰/۷۱ بود که بطور ضعیف ظاهر شدند. تخمدان واجد دو نوار با Rm ۰/۸۱ و ۰/۷۱ بود ولی شدت نوار در ۰/۸۱ نسبت به بقیه بیشتر بود. میله و کلالة با داشتن یک نوار با Rm ۰/۸۱ مشابه هم بودند ولی شدت ظهور در آنها متفاوت بود. پاسخ نمونه‌ها احتمالاً به ساختار و میزان تمایز

آشکارسازی رویان‌زایی، قبل از اینکه رویانهای بدنی شکل بگیرد، خیلی حساس است و سه دسته ایزوفرم روی ژل پلی‌آکریلامید را به نمایش می‌گذارد (۷). در مطالعه حاضر ۱۳ ایزوفرم نیز در سه دسته ظاهر شدند که دسته اول دارای چهار ایزوفرم بود که اغلب نمونه‌ها واجد سه ایزوفرم از آن مجموعه بودند. کلاله در دسته اول دو ایزوفرم به اضافه یک ایزوفرم با Rm ۰/۷۱ را داشت. جداکشتهای گلپوش و میله چهار ایزوفرم در دسته اول داشتند ولی Rm‌های دو ایزوفرم متفاوت از بقیه بود که به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۸۹ بودند. در دسته دوم پنج ایزوفرم بود، بقیه از میله و تخمدان که هر پنج ایزوفرم را نشان دادند بقیه بین یک تا سه ایزوفرم متغیر بودند ولی همگی ایزوفرم ۲ با Rm ۰/۴۴ را بشدت نمایش دادند، بقیه از کلاله که در این دسته نیز متفاوت از بقیه بود. کشت بافت گیاه *Mammillaria gracillis* Pfeiff در پنج نمونه مختلف ۱۳ ایزوفرم استراز را در سه دسته به نمایش گذاشتند (۵). دسته اول ۴ ایزوفرم، دسته دوم ۴ ایزوفرم و دسته سوم ۵ ایزوفرم را واجد بودند. این نتایج قابل مقایسه با نتایج حاضر در قطعات گل نارس در زعفران مزروعی است که ۱۳ ایزوفرم را نشان دادند ولی در دسته دوم بجای ۴ از ۵ ایزوفرم و در دسته سوم به جای ۵ از ۴ ایزوفرم برخوردار بود. نتایج بدست‌آمده از پژوهش حاضر نشان داد که قطعه تخمدان < خامه < کلاله < گلپوش و میله به ترتیب از توان اندام‌زایی بیشتری برخوردار می‌باشند.

Rm‌های ۰/۶۹ و ۰/۶۷ بودند که با شدتهای مختلف در نمونه‌ها ظاهر شدند. گلپوش و کلاله هیچگونه ایزوفرمی را نشان نداد. از آنجایی که برای آشکار سازی از گهرمایه NAD^+ استفاده شد، انتظار می‌رود ملات دهیدروژناز وابسته به NAD^+ وارد عمل شود. در گیاهان عالی ملات دهیدروژناز وابسته به NAD^+ در سیتوپلاسم، میتوکندری و اندامکها حضور دارند.

ملات دهیدروژناز جزء اکسیدوردوکتاز بوده که باعث ایجاد الکترون و پروتون می‌گردد و بدنبال آن H_2O_2 تولید می‌شود که یا توسط پاد اکسایندها استفاده شده و یا برای علامت‌دهی بکار گرفته می‌شود (۲۹). در مواردی بین ظهور نوارهای این زیمايه و فعالیت CAT در نمونه‌ها انطباقی مشاهده شد که نشان‌دهنده تولید H_2O_2 در حد تحریک CAT می‌باشد.

استیل استراز: استرازها نشانگرهای بیوشیمیایی مناسبی برای فرایندهای نموی هستند. فعالیت آنها با کاهش سطح سازمان یافتگی بافت افزایش می‌یابد (۴). این زیمايه نشانگرهای زیست شیمیایی خیلی مناسبتر از پراکسیدازها برای فرایندهای نموی هستند و تعداد زیادی ایزوفرم‌های بیان شده دارند. Coppens و Dewitie (۱۹۹۰) از ایزوفرم‌های استراز کالوس (*Hordeum vulgare* barley) به‌عنوان نشانگر زیست شیمیایی رویان‌زایی و اندام‌زایی استفاده کردند و نتیجه گرفتند که سیستم استراز برای

منابع

- Allen, R. D., 1995. Dissection of oxidant stress tolerance using transgenic plants. *Plant physiology*, 107:1049-1054.
- Alsher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants : Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*. 100:224-233.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*. 55:373-399.
- Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Simeon-Rudolf, V. 2003. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Journal of Plant Physiology*. 160:1401-1406.
- Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Zadro, I, Simeon-Rudolf, V. 2004. Esterase activity and Isoenzymes in relation to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Acta Botanica Croatica*. 63(2), 83-91.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytica Biochemistry*. 72:248-254.
7. Coppens, L., and Dewitte, D., 1990. Esterase and peroxidase Zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. *Plant Science*. 67:97-105.
 8. Coupe, S. A., Palmer, B. G., Lake, J. A. 2006. Systemic signaling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany*. 57(2):329-341.
 9. Dewir Y. H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Hall, E. J., Paek, K. Y. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany*. 58(1-3):93-21.
 10. Du, Y.Y., Wang, P.C., Chen, J., Song, C.P. 2008. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50:1318-1326.
 11. Gechev, T. S., and Hille, J. 2005. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Journal of Cell Biology*. 168:17-20.
 12. Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo2, S. 2007. Kinetics Properties of Guaiacol Peroxidase Activity in *Crocus sativus* L. Corm during Rooting. *Iranian Biomedical Journal*. 11 (3):137-146.
 13. Gietl. C. 1992. Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1100:217-234.
 14. Hames, B. D., and Rickwood, D. 1990. *Gel Electrophoresis of Proteins. A practical Approach*. Second Edition. Oxford University press.
 15. Kanazawa S., Sano, S. Koshihara, T., and Ushimaru, T. 2000. Changes in antioxidative in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiologia. Plantarum*. 109:211-216.
 16. Katyshev A.I., Rogozin I.B., Konstantinov Yu.M. 2006. Identification of new superoxide Dismutase transcripts in plants by EST analysis: alternative polyadenylation and splicing events. *BGRS-Computational structural and functional genomics and transcriptomics*
 17. Keyhani, J., Keyhani, E., Kamali, J. 2002. Thermal stability of catalases active in dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corms. *Molecular Biology. Reports*. 29:125-128.
 18. Kim, J. Y. Seo, Y. S., Kim. J. E., Sung, S. K., Song, K. J., An, G., Kim, W.T. 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the *Fuji* apple, *Plant Sciences*. 161:1145-1152.
 19. Lampert, D. T. A. 1986. Roles for peroxidases in cell wall genesis. *Plant Physiology*. 83:39-43.
 20. Martinez, C. A., Loureiro, M. E., Oliva, M. A., Maesri, M. 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilubum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sciences*. 160:505-515.
 21. Mayer, A. M., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18:193-215.
 22. McInnis, S. M., Emery, D. C., Porter, R. Desikan, R., Hancock, J. T., Hiscock, S. J. 2006. The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (ssp) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). 57(8):1835-1846.
 23. Mustafa. N. R. Verpoorte. R. 2007. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews*. 6:243-258.
 24. Saeidian, S., and Keyhani, E. 2007. Polyphenol Oxidase Activity during Development of Saffron (*Crocus sativus* L.) Corm. *Acta Horticulture*. 739:435-442
 25. Scandalios J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant physiology*. 101:7-12.
 26. Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53:1305-1319.
 27. Tian, L., Gu, Q., Zhu, M. 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sciences*. 165:701-707.
 28. Van Loon, L. C. 1971. Tobacco polyphenol oxidase, a specific staining method indicating non-identity with peroxidase. *Phytochemistry*. 10:503-5072.
 29. Wang P, Ma G, Liao L, Gao F. 2005. Construction of multi-enzyme bioactive systems

using a multiscale design approach.
China Particuology 3(36):304

isozymes. Isozymes in plant biology. (Eds De Solits and PS Solits) 5-45.

30. Wendel, J. F., and Weeden, N. F. 1990.
Visualization and interpretation of plant

Study of antioxidant enzymes isoforms in immature flora segments of saffron (*Crocus sativus* L.) from Iran to select best segment for organogenesis by electrophoresis

Hosseinzadeh Namin M.^{1,2*}, Ebrahimzadeh H.¹ and Radjabian T.³

¹ College of Sciences, Tehran University, Tehran, I.R. of Iran

² Biology Dept., Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

³ Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.), a member of Iridaceae, which is used as spice and also in medicine. An investigation was performed to select suitable explant for tissue culture to improve saffron production. The activities and isoforms of antioxidant enzymes which affect the H_2O_2/O_2 ratio, this ratio was represented the potential of organogenesis. were determined using electrophoresis in five different segments of saffron immature flora. The Peroxidase isoforms, which were specific-tissue and developmental stages and consumer H_2O_2 , Superoxide dismutase which produce H_2O_2 from superoxide. Ovary showed high H_2O_2/O_2 ratio, both perianth and filament segments showed low H_2O_2/O_2 ratio. Catalase was repressed by higher concentration of H_2O_2 but responses by lower level of H_2O_2 , acts versus peroxidase. Three additional enzymes including Polyphenoloxidase which is specific-growth and represent defense system, Malate dehydrogenase, showed relationship between organs and their growth and also produce H_2O_2 and Estrase was specific-tissue organization, gave us useful information about best segment. The best of our knowledge, ovary with higher potential for organogenesis and perianth and filament with lower potential of organogenesis among segments were selected for tissue culture.

Key words: Iridaceae, antioxidant enzymes, isoform, *Crocus sativus* L.