مجله پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد هفدهم، شماره سوم، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

مقایسه تغییرات فصلی آنزیم پراکسیداز کلون‌های مختلف صنوبر دلتوییدس

زهره سعیدی[۱] و *داوود آزادفر[۲]

[۱]کارشناس‌ارشد جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استادیار گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۵

چکیده

زراعت گونه‌های تند رشد مانند صنوبر یکی از راه‌کارهای مهم کشورهای با مساحت کم جنگل‌های طبیعی جهت تولید چوب است. تفاوت‌های فیزیولوژیکی کلون‌های مختلف صنوبر دلتوییدس که در طول سه دهه در جنگل تحقیقاتی شصت‌کلاته گرگان کشت گردیده‌اند برای ما ناشناخته است. در این پژوهش آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی حساس به تغییرات محیطی به‌ویژه دما و دخالت مستقیم آن در فرآیند لیگنین‌سازی جهت تفکیک کلون‌ها استفاده گردید. به این منظور از نهال‌های یک‌ساله ۵ کلون این گونه نمونه‌گیری و فعالیت کمی و کیفی پراکسیداز به‌ترتیب به روش ورتینگتون[۱] و PAGE[۲] در طول ۵ ماه (شهریور تا اردیبهشت) مطالعه گردید. نتایج به‌خوبی نشان داد که میزان کمی و الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز کلون‌ها در ماه‌های مختلف با هم فرق می‌کنند که نشان‌دهنده نقش این آنزیم در مقاومت به سرما و لیگنین‌سازی است.

واژه‌های کلیدی: صنوبر دلتوییدس، پراکسیداز، کلون

* مسئول مکاتبه: azadfar.d@gmail.com

1- Worthington
2- Poly Acrylamid Gel Electrophoresis

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

جنس صنوبر در میان مجموعه درختان تند رشد موجود، جایگاه خاص و منحصر به فردی را به‌خصوص در احداث توده‌های وسیع درخت‌کاری در سراسر دنیا بر عهده دارد به‌طوری‌که امروزه سطوح بسیار وسیعی در کشورهای مختلف جهان مانند ایتالیا، ترکیه، چین، اسپانیا و... زیر کشت گونه‌های مختلف صنوبر قرار دارند. این جنس به خاطر ظرفیت بالای تکثیر غیرجنسی و سرعت رشد زیاد آن به‌عنوان یک مدل درخت جنگلی در تحقیقات بیوتکنولوژی تلقی شده و در میان درختان جنگلی وسیع‌ترین تحقیقات را در زمینه مطالعات اصلاح نژاد داشته و در مطالعات بیوتکنولوژی به‌عنوان دومین جنس بعد از جنس کاج استفاده شده است (مارچادیر و سیگاد، ۲۰۰۵).

بررسی‌ها نشان داده که آنزیم‌ها حساس‌ترین عامل تغییرات فیزیولوژیکی گیاهان تحت تنش‌های محیطی محسوب می‌شوند. در این راستا آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یکی از بهترین نشانگرهای بیوشیمیایی جهت انعکاس تنش‌های دمایی کاربرد فراوان دارد و تحقیقات متعددی در این زمینه صورت گرفته است (پرهیزکار و همکاران، ۲۰۰۲؛ علی‌احمد کروری، ۱۹۹۳، علی‌احمد کروری و صالحی، ۱۹۹٤؛ چن و همکاران، ۲۰۰۵؛ برگمن و روتز، ۱۹۹۱؛ لینگسیری و همکاران، ۱۹۹۵). گیاهان به‌منظور محدود کردن صدمات ناشی از تنش‌های خشکی، نور و دما یک سری از سیستم‌های سم‌زدایی شامل آنزیم‌ها مانند پراکسیداز، آسکوربیک پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و غیره را توسعه داده‌اند (پله، ۲۰۰۲؛ چاکرابورتی و تونگدن، ۲۰۰۵). آنزیم پراکسیداز (EC 1.11.1.X) از گروه آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز بوده که قادر است ماده سمی آب اکسیژنه را که در تمام فرآیندهای مختلف سلولی تولید می‌شود تجزیه کند (علی‌احمد کروری، ۱۹۹۹؛ کاستیلو، ۱۹۸٦؛ گاسپر و همکاران، ۲۰۰۲). حداکثر فعالیت این آنزیم در فصول سرد سال و حداقل آن در تابستان می‌باشد (مونری و گاردیولا، ۲۰۰۱؛ بوگانویک و همکاران، ۲۰۰۷). در پژوهشی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و ایندول استیک اسید اکسیداز در قبل و بعد از تنش سرما بر روی نهال‌های خیار بررسی گردید. نتایج نشان داد که با کاهش دما میزان آنزیم کاتالاز کاهش یافته و برعکس میزان پراکسیداز و ایندول استیک اسید اکسیداز افزایش یافت که این امر باعث تجزیه ایندول استیک اسید و کاهش رشد گردید (عمران، ۱۹۸۰). در مطالعه‌ای دیگر اثر اکلیماسیون سرد بر روی چند آنزیم از جمله پراکسیداز در نهال‌های گیاه *Euonymus radicans* بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار سرما (٤ درجه سانتی‌گراد) بر روی

Archive of SID

www.SID.ir

نهال‌ها به‌مدت ۱ تا ۳ هفته باعث افزایش این آنزیم نسبت به نهال‌های شاهد می‌گردد (هوی‌هنگ و همکاران، ۲۰۰٤). پراکسیداز به‌دلیل داشتن ایزوآنزیم‌های متعدد، نشانگری مناسب جهت کلاسه‌بندی ژنتیکی گونه‌های گیاهی از نظر صفات مختلف محسوب می‌گردد (آزادفر و علی‌احمد کروری، ۲۰۰٤؛ لینگسیری و همکاران، ۱۹۹۵؛ برگمن و روتز، ۱۹۹۱). همچنین پژوهش‌های مختلف نشان داد که الگوی ایزوآنزیمی در فصول مختلف ثابت نبوده و بیش‌ترین تعداد باندهای ایزوآنزیمی در ناحیه استقرار مولکول‌های کاتدی (سبک) در اوایل فصل سرما مشاهده می‌شود (علی‌احمد کروری و صالحی، ۱۹۹٤؛ علی‌احمد کروری و متینی‌زاده، ۲۰۰۲؛ علی‌احمد کروری و همکاران، ۱۹۹٤؛ ناکاگاوارا و ساگی‌ساکا، ۱۹۸٤؛ کانمرس و همکاران، ۱۹۹۳؛ سعیدی، ۲۰۰۷). از سوی دیگر تحقیقات بسیار زیادی نقش این آنزیم را در پلیمریزاسیون الکل‌ها در فرآیند لیگنین‌سازی نشان داده‌اند به‌طوری‌که باندهای ایزوآنزیمی منطقه مولکول‌های سنگین در این زمینه دخیل هستند (کریستیرنین و همکاران، ۲۰۰۵؛ رزبارسلو و همکاران، ۲۰۰۲؛ ساساکی و همکاران، ۲۰۰٤). پراکسیداز از جمله نشانگرهایی است که به‌علت پلی‌مورفیسم بالای آن برای شناسایی گونه‌های مختلف گیاهی، تفکیک هیبریدها، تعیین خلوص واریته‌ها و بررسی روابط تکاملی کاربرد دارد. اما توانایی این آنزیم در تفکیک پایه‌ها بسته به نوع گونه، کلون، زمان برداشت و اندام نمونه‌برداری شده متفاوت می‌باشد. مانجوناتا و همکاران (۲۰۰۳) پلی‌مورفیسم آیزوزایم‌های پراکسیداز را در کولتیوارهای نیشکر مطالعه نمودند و الگوهای ایزوآنزیمی را برای تفکیک کلون‌ها و حتی لاین‌ها مناسب تشخیص دادند. همچنین پلی‌مورفیسم ژنتیکی ایزآنزیم‌های پراکسیداز و استراز برای گونه صنوبر دلتوییدس (*P. deltoides*) مطالعه شد (گازینا، ۱۹۷٤). کلاگری تغییرات اکولوژیکی و ژنتیکی صنوبر پده را در رویشگاه‌های طبیعی ایران به روش پلی‌اکریل آمید ژل بررسی نمود. نتایج حاصل از فعالیت کیفی آنزیم، الگوهای آیزوزایمی متفاوتی را در مناطق مختلف ایران با شرایط دمایی و بارش متفاوت نشان داد (کلاگری، ۲۰۰٤). کیم و چانگ (۱۹۷٤) با تهیه زیموگرام از برگ گونه‌های *P. alba*، *P. euramericana*، *P. deltoides*، *P. glandulosa* و *P. nigra* موفق به تعیین ٤ گروه متفاوت درون گونه‌ای شدند. هدف از این پژوهش، استفاده از نشانگر بیوشیمیایی پراکسیداز جهت تعیین تفاوت‌های ایزوآنزیمی ۵ کلون مختلف گونه صنوبر دلتوییدس (*Populus deltoides*) موجود نسبت به دما در ماه‌های مختلف سال در جنگل آموزشی و پژوهشی شصت‌کلاته است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این پژوهش ابتدا ۵ کلون موجود شامل پایه‌های نر *P. deltoides 72.51*، *P. deltoides 77.51*، *P. deltoides 67.51*، *P. deltoides 63.51* و پایه ماده *P. deltoides 69.55* وارد شده از ترکیه و ایتالیا انتخاب و در اسفندماه از هر کلون به تعداد ۱۰۰ قلمه، به ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۲ سانتی‌متر تهیه شدند. سپس قلمه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع حدود ۳۰ سانتی‌متر به‌طوری‌که حدود ۳-٤ سانتی‌متر از نوک قلمه‌ها بیرون از خاک قرار گیرد کاشته شدند. خاک گلدان‌ها شامل خاک سیاه جنگلی، خاک برگ و ماسه بادی (نسبت ۱:۱:۱) بود که کاملاً نرم شده و بعد از الک شدن در گلدان‌ها ریخته شدند. کاشت قلمه‌ها در محیطی مشابه موجب تأثیر یکسان عوامل محیطی بر تمامی کلون‌ها بوده و توانایی‌های فیزیولوژیک متفاوت کلون‌ها در چنین شرایطی ناشی از خصوصیات متفاوت فردی و عوامل ژنتیکی کلون‌ها است. کلیه عملیات نگهداری شامل وجین علف‌های هرز و آبیاری در زمان‌های مناسب انجام گردید.

در مرحله بعدی تعداد سه اصله از هر کلون به‌عنوان تکرار به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه‌برداری در پانزدهم ماه‌های شهریور (۲۹ درجه سانتی‌گراد)، آبان (۲۷ درجه سانتی‌گراد)، دی (۱۱ درجه سانتی‌گراد)، اسفند (۳ درجه سانتی‌گراد) و اردیبهشت (۲۰ درجه سانتی‌گراد) از قسمت انتهایی ساقه به قطر ۱ سانتی‌متر انجام و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها بلافاصله با نسبت ۱ به ۳ با محلول عصاره‌گیری به روش ابرمن و استیچ (۱۹۸۲) مخلوط شدند که این محلول شامل ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم اسید اسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکس، ۳/٦ گرم نمک طعام، ۲ گرم $EDTA\text{-}Na_2$ و ۵۰ گرم پلی‌اتیلن گلیکول در لیتر است. نمونه‌ها بعد از ۱۰ دقیقه سایش به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و از قسمت شفاف رویی برای مطالعات کمی و کیفی آنزیم استفاده گردید. مطالعه کمی آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۳۰ نانومتر طبق روش ورتینگتون (ورتینگتون، ۱۹۷۲) و مطالعه کیفی آنزیم با استفاده از الکتروفورز عمودی به روش پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز صورت گرفت. در این روش پراکسیداز بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد با pH=۸ شامل ۱۲۰ گرم اکریل آمید، ۲ گرم بیس و ۳ گرم تریس در حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بار شده و با قرار گرفتن در میدان الکتریکی ۳۰ میلی‌آمپر و طول حرکت ۱۰ سانتی‌متر در دستگاه الکتروفورز عمودی مدل Sigma براساس میزان بار دریافتی و وزن مولکولی با سرعت‌های متفاوت حرکت می‌کنند. سپس جهت ظهور

Archive of SID

www.SID.ir

الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز از تامپون استات ۰/۲ مولار به اضافه معرف بنزیدین و آب اکسیژنه ۳ درصد استفاده گردید (علی‌احمد کروری، ۱۹۹۹). نتایج به‌دست آمده به کمک مقایسه الگوهای ایزوآنزیمی و مقایسه داده‌های کمی به کمک آزمون F و مقایسات چندگانه دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های کمی نشان داد که به‌طورکلی در بین سطوح کلی فعالیت کمی پراکسیداز کلون‌ها در مجموع ۵ ماه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی بین ماه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد خطا وجود دارد (جدول ۱). به‌طوری‌که کلون‌ها در اسفندماه بیش‌ترین و در شهریورماه کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم را دارا هستند (شکل ۱- الف). بررسی اثر متقابل نوع کلون و ماه‌های مورد مطالعه نشان داد که اثر متقابل معنی‌داری بین این دو عامل وجود ندارد و این به آن معنی است که روند تغییرات آنزیم پراکسیداز برای کلون‌های مورد مطالعه در ۵ ماه مورد بررسی مشابه یکدیگر است (جدول ۱). همچنین جدول آنالیز واریانس بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد اطمینان بین تأثیر همزمان نوع کلون و ماه بر میزان فعالیت کمی پراکسیداز می‌باشد (جدول ۱). به‌طوری‌که کلون ۷۲/۵۱ در شهریورماه، دی‌ماه (به همراه کلون ٦٩/٥٥) و اسفندماه و کلون ٦٣/٥١ در آبان‌ماه و اردیبهشت‌ماه دارای بیش‌ترین و کلون ۷۷/۵۱ در شهریورماه و آبان‌ماه و کلون ٦٧/٥١ در دی‌ماه و اسفندماه (به همراه کلون‌های ٦٣/٥١ و ٦٩/٥٥) و کلون ۷۲/۵۱ در اردیبهشت‌ماه دارای کم‌ترین میزان پراکسیداز می‌باشد (جدول ۲ و شکل ۲).

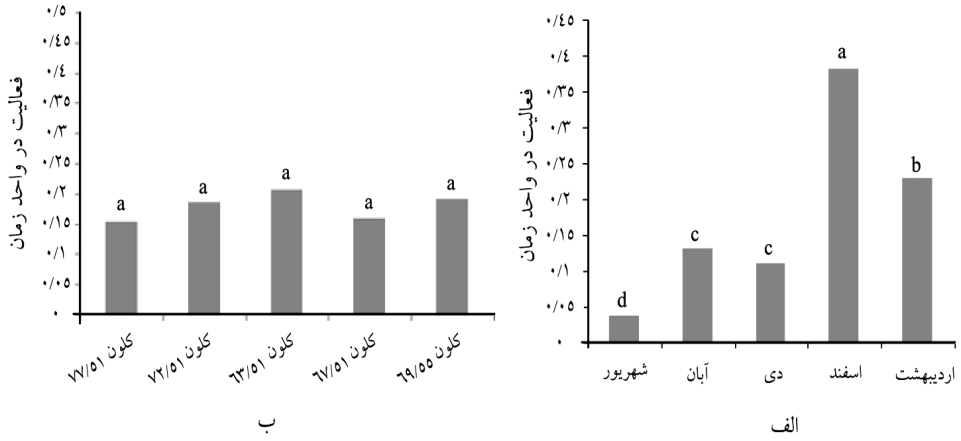
جدول ۱- تجزیه و تحلیل واریانس فعالیت کمی پراکسیداز کلون‌های *P. deltoides* در ۵ ماه مختلف.

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	میزان F	سطح معنی‌داری
تیمار مرکب	۳/٦٢٠	۲٥	۰/۱٤٥	۱٦/٥٨٠	۰/۰۰۰**
کلون	۰/۰۳۰	٤	۰/۰۰۸	۰/۸٦٤	۰/٤۹۲ns
ماه‌ها	۱/۰٥۸	٤	۰/۲٦٥	۳۰/۲۹۰	۰/۰۰۰**
کلون × ماه‌ها	۰/۱٥۹	۱٦	۰/۰۱۰	۱/۱۳۸	۰/۳٤۹ns
خطا	۰/٤۳۷	٥۰	۰/۰۰۹		
کل	٤/۰٥۷	۷٥			

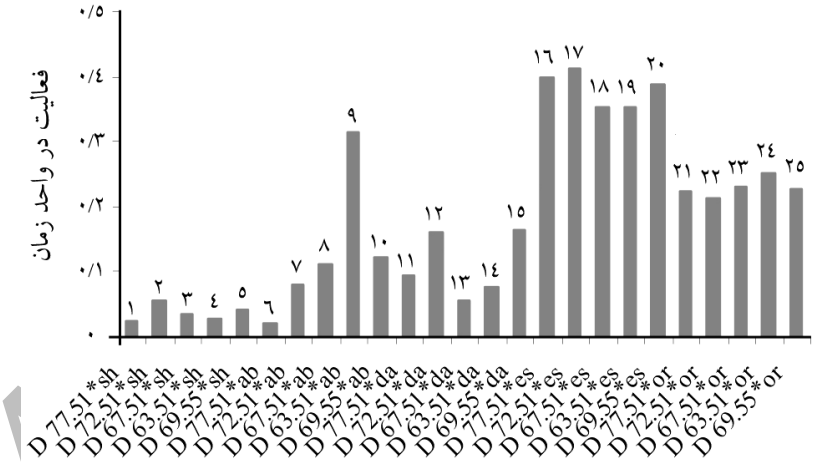
** معنی‌دار بودن در سطح ۹۹ درصد اطمینان، ns غیرمعنی‌دار.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مقایسه کمی آنزیم پراکسیداز کلون‌های *P. deltoides* (الف) بین ۵ ماه برای کلیه کلون‌ها، (ب) بین ۵ کلون در طول کل نمونه‌برداری.



شکل ۲- مقایسه کمی پراکسیداز کلون‌های *P. deltoides* مورد مطالعه در ۵ ماه مورد مطالعه (sh شهریورماه، ab آبان‌ماه، da دی‌ماه، es اسفندماه، or اردیبهشت‌ماه).

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسات میانگین فعالیت کمی پراکسیداز کلون‌های *P. deltoides* در ۵ ماه بروش دانکن (حروف هم‌نام نماینده قرار گرفتن کلون‌ها در دسته مشابه از نظر مقدار میانگین است).

شماره	کلون	میانگین (فعالیت کمی در واحد زمان)	انحراف معیار	دسته‌بندی
۱	۷۷/۵۱ (شهریور)	۰/۰۲۳۸	۰/۰۰٤۹	i
۲	۷۲/۵۱ (شهریور)	۰/۰٥٦۸	۰/۰۱۰۱	fghi
۳	٦۷/۵۱ (شهریور)	۰/۰۳٥٤	۰/۰۰۸۲	hi
٤	٦۳/۵۱ (شهریور)	۰/۰۲۹۳	۰/۰۰٦۳	hi
٥	٦۹/٥٥ (شهریور)	۰/۰٤۲٤	۰/۰۰۹۷	ghi
٦	۷۷/۵۱ (آبان)	۰/۰۲۲۰	۰/۰۰٥۲	i
۷	۷۲/۵۱ (آبان)	۰/۰۸۰۸	۰/۰۱٦٥	efghi
۸	٦۷/۵۱ (آبان)	۰/۱۱۱	۰/۰۲٤٥	efghi
۹	٦۳/۵۱ (آبان)	۰/۳۱٥	۰/۰٥۸۷	abcd
۱۰	٦۹/٥٥ (آبان)	۰/۱۲۲	۰/۰۰۱۳	efghi
۱۱	۷۷/۵۱ (دی)	۰/۰۹٤	۰/۰۰۱۸	efghi
۱۲	۷۲/۵۱ (دی)	۰/۱٦۱	۰/۰۰٤۹	defghi
۱۳	٦۷/۵۱ (دی)	۰/۰٥٦	۰/۰۰۹۳	fghi
۱٤	٦۳/۵۱ (دی)	۰/۰۷٦	۰/۰۰۱۸	efghi
۱٥	٦۹/٥٥ (دی)	۰/۱٦٤	۰/۰۲۲۹	defghi
۱٦	۷۷/۵۱ (اسفند)	۰/۳۹۷	۰/۰۷۰٥	ab
۱۷	۷۲/۵۱ (اسفند)	۰/٤۱۲	۰/۰۳۳۹	a
۱۸	٦۷/۵۱ (اسفند)	۰/۳٥۳	۰/۰۳۰۷	abc
۱۹	٦۳/۵۱ (اسفند)	۰/۳٥٤	۰/۰۳٦٤	abc
۲۰	٦۹/٥٥ (اسفند)	۰/۳۸۹	۰/۰٥٥۳	abc
۲۱	۷۷/۵۱ (اردیبهشت)	۰/۲۲٤	۰/۰۱۸۹	bcdefg
۲۲	۷۲/۵۱ (اردیبهشت)	۰/۲۱۲	۰/۰۳۳۹	cdefgh
۲۳	٦۷/۵۱ (اردیبهشت)	۰/۲۳۰	۰/۰٦۷۸	bcdef
۲٤	٦۳/۵۱ (اردیبهشت)	۰/۲٥۲	۰/۰٤۳۹	abcde
۲٥	٦۹/٥٥ (اردیبهشت)	۰/۲۲۷	۰/۰۲٦۱	bcdef

همان‌طور که مشاهده شد کلون ۷۲/۵۱ دارای بیش‌ترین میزان فعالیت پراکسیداز شهریورماه در بین ۵ کلون مطالعه شده این گونه است. اما بررسی فعالیت کیفی پراکسیداز نشان داد که باندهای ایزوآنزیمی تمامی کلون‌های *P. deltoides* در شهریورماه مشابه هم هستند. باند B30 (نام باندها براساس درصد

Archive of SID

www.SID.ir

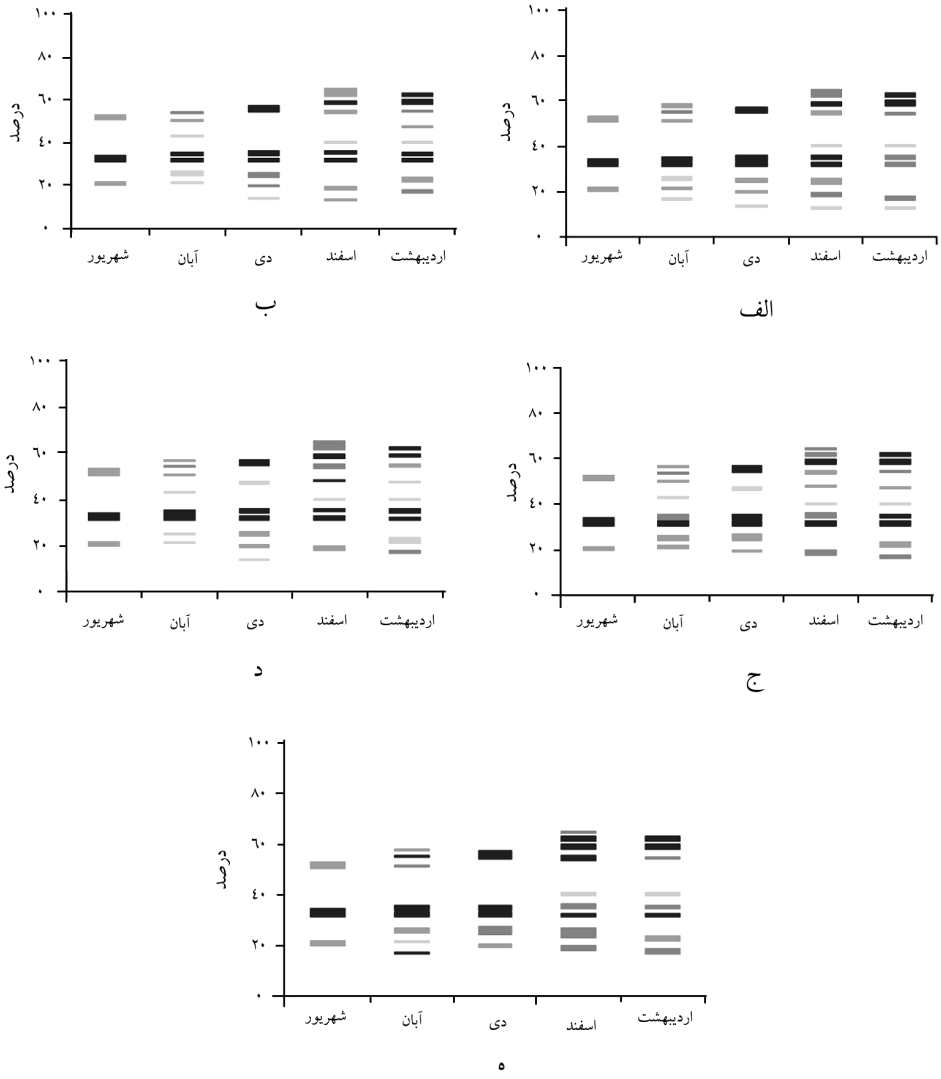
حرکت آن‌ها نسبت به کل طول حرکت تعیین شده است) به‌عنوان باند پایه فیزیولوژیک در تمامی فصول سال و در تمامی کلون‌ها مشاهده می‌شود که در ماه‌های بعد از شهریور تبدیل به دو باند مجزا از هم شده است. باندهای ایزوآنزیمی سبک‌تر در طی خزان و زمستان رفته رفته شروع به ظهور کرده و به تعداد آن‌ها افزوده می‌شود که وظیفه مقابله با تنش‌های دمایی این فصول را به عهده دارند و این در حالی است که تعداد این باندها در شهریورماه فقط یک باند ایزوآنزیمی می‌باشد (شکل ۳). همچنین الگوی ایزوآنزیمی کلون ۷۲/۵۱ در اسفندماه دارای حداکثر تعداد باندهای ایزوآنزیمی (۱۰ باند) در کل مناطق حرکتی و بیش‌ترین میزان کمی پراکسیداز در بین کلون‌ها است (شکل‌های ۲ و ۳). همچنین الگوی ایزوآنزیمی آن در دی‌ماه تفاوت‌هایی را به لحاظ تعداد باند در هر دو منطقه سنگین و متوسط نشان می‌دهد (شکل ۳).

کلون ٦۳/۵۱ در آبان‌ماه دارای بیش‌ترین میزان فعالیت پراکسیداز در بین تمامی کلون‌های پنج‌گانه مورد مطالعه است. بررسی فعالیت کیفی آن در این ماه نشان داد که از نظر تعداد باندهای ایزوآنزیمی این کلون مشابه با سایر کلون‌ها بوده ولی از نظر ضخامت و شدت رنگ باندها متفاوت بوده که نشان‌دهنده فعالیت بیش‌تر آنزیم می‌باشد (شکل ۳). همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بالاترین میزان فعالیت آنزیم این کلون در اسفندماه و پایین‌ترین میزان آن در شهریورماه است و از سوی دیگر میزان فعالیت کمی این آنزیم در آبان‌ماه که به‌عنوان بیش‌ترین میزان در بین تمام کلون‌های این گونه است در حد اسفندماه این کلون می‌باشد. اختلاف بالای میزان فعالیت کمی این آنزیم در آبان‌ماه نسبت به شهریور و دی‌ماه در بین تمامی کلون‌های این گونه شاخص است. از طرف دیگر این کلون در اردیبهشت‌ماه نیز دارای بالاترین میزان فعالیت کمی آنزیم در بین تمامی کلون‌های این گونه می‌باشد. بررسی و مقایسه فعالیت کیفی باندهای ایزوآنزیمی این کلون نیز بیانگر مشابه بودن تعداد باندها در کلون‌های مختلف ولی متفاوت بودن ضخامت و رنگ باندها در این کلون نسبت به سایر کلون‌ها است (شکل ۳).

همچنین بررسی فعالیت کیفی پراکسیداز کلون ٦۷/۵۱ (دارای کم‌ترین میزان پراکسیداز ماه‌های دی و اسفند در بین ۵ کلون) بیانگر این مطلب است که الگوی ایزوآنزیمی این کلون در آبان‌ماه با ۷ باند دارای کم‌ترین تعداد باند و در دی‌ماه با ٦ باند متفاوت از سایر کلون‌ها است (شکل ۳). مقایسه باندهای ایزوآنزیمی کلون ۷۷/۵۱ (دارای کم‌ترین میزان پراکسیداز ماه‌های شهریور و آبان در بین ۵ کلون) در ماه‌های مورد مطالعه نیز نشان داد که این کلون در دی‌ماه با ۷ باند ایزوآنزیمی دارای بیش‌ترین تعداد باند در بین تمامی کلون‌ها است (شکل ۳). مطالعه باندهای ایزوآنزیمی کلون ٦۹/۵۵ در ماه‌های مورد مطالعه نشان داد که این کلون در دی‌ماه با ٤ باند دارای کم‌ترین تعداد باند در بین ۵ کلون مورد مطالعه می‌باشد (شکل ۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز ۵ کلون صنوبر دلتوییدس در ماه‌های مورد مطالعه (محور عمودی درصد حرکت باندها از کل طول حرکت ژل را نشان می‌دهد). الف) کلون ۷۲/۵۱ ب) کلون ٦٧/٥١ ج) کلون ٦٣/٥١ د) کلون ٧٧/٥١ ه) کلون ٦٩/٥٥.

www.SID.ir

بحث

همان‌طور که در قبل اشاره شد آنزیم پراکسیداز به‌دلیل داشتن ایزوآنزیم‌های متعدد، نشانگری مناسب جهت کلاسه‌بندی ژنتیکی گونه‌های گیاهی از نظر صفات مختلف محسوب می‌گردد (آزادفر و علی‌احمد کروری، ۲۰۰٤؛ پرهیزکار و همکاران، ۲۰۰۲؛ علی‌احمد کروری، ۱۹۹۳؛ لینگسیری و همکاران، ۱۹۹۵؛ برگمن و روتز، ۱۹۹۱؛ علی‌احمد کروری و همکاران، ۱۹۹٤؛ کلاگری، ۲۰۰٤). تنش‌های محیطی مانند دمای خیلی بالا، روشنایی زیاد، خشکی و ازن و... باعث ایجاد ماده سمی ROS در گیاهان می‌شوند (چاکرابورتی و تونگدن، ۲۰۰۵). پراکسیدازهای گیاهی نسبت به این ماده سمی از طریق کاهش رادیکال آزاد اکسیژن و تجزیه آب اکسیژنه (H_2O_2) که کم و بیش در تمام عکس‌العمل‌های متابولیک و فیزیولوژیک گیاهان به‌وجود می‌آیند، واکنش نشان می‌دهند (کاستیلو، ۱۹۸٦؛ گاسپر و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یک نشانگر زیستی در مطالعه تنش‌های محیطی و عکس‌العمل‌های پایه‌های مختلف کاربرد فراوانی دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان پراکسیداز کلون‌های پنج‌گانه گونه ***P. deltiodes*** در ماه‌های مورد مطالعه با هم تفاوت معنی‌داری ندارند و این به آن معنا است که توانایی‌های کلی فیزیولوژیک مرتبط با این آنزیم مانند مقابله با سرما و لیگنین‌سازی این کلون‌ها مشابه می‌باشد. نتایج تغییرات کمی و کیفی پراکسیداز کلون‌های مورد مطالعه در ماه‌های مختلف بیانگر بالاترین توانایی مقابله به سرمای آن‌ها در اسفندماه (عمران، ۱۹۸۰؛ هوی‌هنگ و همکاران، ۲۰۰٤) و سپس اردیبهشت‌ماه نسبت به سایر ماه‌ها است ولی مطالعه روند تغییرات پراکسیداز در طول این ماه‌ها نشان داد که کلون‌ها دارای روندهای متفاوتی از شهریورماه تا دی‌ماه بوده و بعد از آن مشابه هم می‌باشند بنابراین سطوح مقاومتی آن‌ها به تنش‌های محیطی در ماه‌های مختلف با هم فرق می‌کنند که می‌تواند یکی از جنبه‌های جالب توجه تفاوت بین کلون‌های مورد مطالعه باشد.

کلون‌های هر گونه به‌علت داشتن ساختار ژنتیکی یکسان از لحاظ ساختار کلی مانند مورفولوژی دارای شباهت‌های زیادی با هم هستند و تفکیک آن‌ها از نظر خصوصیات مختلف، مشکل می‌باشد. از این‌رو وجود باند B30 در شهریورماه که بعد از آن به دو باند مجزا تفکیک شده و به‌طور یکسان در تمامی کلون‌ها قابل مشاهده است به‌عنوان باند پایه فیزیولوژیک گونه صنوبر دلتوییدس معرفی می‌شود. اما در این پژوهش تفکیک کلون‌ها به کمک نشانگر زیستی پراکسیداز نشان داد که فعالیت این آنزیم در کلون ۷۲/۵۱ در شهریورماه دارای بیش‌ترین میزان به لحاظ فعالیت کمی است که به‌علت وجود رابطه منفی بین فعالیت کمی پراکسیداز با هورمون رشدی اکسین (آزادفر و علی‌احمد کروری، ۲۰۰٤؛

Archive of SID

www.SID.ir

علی‌احمد کروری و صالحی، ۱۹۹٤؛ عمران، ۱۹۸۰؛ چن و همکاران، ۲۰۰۵؛ مونری و گاردیولا، ۲۰۰۱) به آن معناست که این کلون فعالیت‌های رویشی خود را سریع‌تر از سایر کلون‌ها متوقف کرده و فرآیندهای مقاومت به سرما را شروع می‌کند. اما باندهای منطقه سبک‌تر (محدوده بالای باند پایه) این کلون که در این امر دخیل می‌باشند با سایر کلون‌ها تفاوتی را نشان نمی‌دهند. تحقیقات انجام شده بر روی گونه‌های پهن‌برگ و سوزنی‌برگ نیز بیانگر این مطلب است که باندهای ایزوآنزیمی منطقه مولکول‌های سبک‌تر در امر مقاومت به سرما دخالت داشته و ظهور زودتر یا فعالیت کمی بالاتر آنزیم در پایه‌ها نشان‌دهنده مقاومت بیش‌تر آن‌ها می‌باشد (علی‌احمد کروری، ۱۹۹۹؛ علی‌احمد کروری، ۱۹۹۳؛ علی‌احمد کروری و همکاران، ۱۹۹٤؛ هوی‌هنگ و همکاران، ۲۰۰٤؛ بوگانویک و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین بررسی و مقایسه باندهای ایزوآنزیمی منطقه مولکول‌های سنگین کلون‌ها (محدوده زیر باند پایه) در ماه‌های مورد مطالعه نشان داد که کلون ۷۲/۵۱ به‌طورکلی دارای بیش‌ترین مجموعه باندی است که طبق پژوهش‌های انجام شده در فرآیند لیگنین‌سازی دخالت دارند بنابر این سطوح لیگنین‌سازی این گونه نیز متفاوت از سایر کلون‌ها است. تحقیقات نشان داده‌اند که باندهای ایزوآنزیمی منطقه مولکول‌های سنگین در امر لیگنین‌سازی دخالت داشته و میزان لیگنین‌سازی با میزان فعالیت کمی این آنزیم همبستگی مثبت دارد (علی‌احمد کروری، ۱۹۹۹؛ رز- بارسلو و همکاران، ۲۰۰۲). تفاوت دیگر این کلون با سایر کلون‌ها در فعالیت‌های کمی و کیفی این نشانگر در زمستان به‌ویژه در اسفندماه است به‌طوری‌که دارای بالاترین میزان کمی و کامل‌ترین مجموعه باندهای ایزوآنزیمی در کلیه مناطق حرکتی بوده و بیش‌ترین اختلاف را نسبت به ٤ ماه دیگر از خود نشان می‌دهد که بیانگر توانایی متفاوت آن در مقابله با سرما و سطوح لیگنین‌سازی نسبت به سایر کلون‌ها می‌باشد. مطالعات ناکاگاوارا و ساگی‌ساکا (۱۹۸٤) بر روی صنوبر، کانمرس و همکاران (۱۹۹۳) و گاسپر و همکاران (۲۰۰۲) بر روی سایر گونه‌ها نیز بیش‌تر بودن میزان این آنزیم را در فصل زمستان نسبت به سایر فصول در مقابله با سرما نشان داده است. اما نتایج بیش‌ترین تفاوت کلون ٦۳/۵۱ با سایر کلون‌ها را از دو نظر نشان داد. اول آن‌که این کلون در آبان‌ماه دارای بیش‌ترین فعالیت کمی پراکسیداز بوده به‌طوری‌که در حد اسفندماه آن بوده و چنین فعالیتی از نظر ضخامت و شدت رنگ باندهای ایزوآنزیمی نیز مشهود می‌باشد در حالی‌که چنین موردی در هیچ‌یک از کلون‌های دیگر دیده نشد. شایان ذکر است که بیش‌ترین فعالیت کمی و کیفی پراکسیداز تمامی کلون‌ها در اسفندماه مشاهده شده است. بنابراین مشاهده می‌شود که این کلون توقف فعالیت‌های رویشی و شروع فرآیندهای مقاومت به سرما و لیگنین‌سازی خود را دیرتر از کلون ۷۲/۵۱ ولی با شدت بالاتر آغاز می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج سایر محققان این مطلب را تأیید می‌نماید (علی‌احمد کروری، ۱۹۹۹؛ علی‌احمد کروری، ۱۹۹۳؛ سعیدی، ۲۰۰۷؛ علی‌احمد کروری و همکاران، ۱۹۹٤؛ هوی‌هنگ و همکاران، ۲۰۰٤). مطالعات دیگر نیز نقش پراکسیداز را در لیگنین‌سازی نشان داده‌اند (رز- بارسلو و همکاران، ۲۰۰۲؛ ساساکی و همکاران، ۲۰۰٤). دوم آن‌که فعالیت کمی پراکسیداز این کلون در اردیبهشت‌ماه دارای بیش‌ترین میزان بوده و دارای کم‌ترین کاهش میزان پراکسیداز نسبت به اسفندماه و همچنین ثبات اکثر باندهای ایزوآنزیمی منطقه مولکول‌های سبک‌تر نسبت به سایر کلون‌ها (به‌جز کلون‌های ۷۲/۵۱ و ٦۷/۵۱) می‌باشد. این نتیجه به آن معنا است این کلون پس از زمستان، مقاومت به سرمای خود را دیرتر از سایر کلون‌ها از دست می‌دهد. تحقیقات سایر محققان در این خصوص نیز نشان داده است که میزان پراکسیداز با میزان ایندول استیک اسید از فراوان‌ترین اکسین‌ها رابطه عکس دارد، بالا بودن میزان این آنزیم باعث شروع نشدن رویش و شکستن خواب زمستانی و مقاومت به سرما در پایه‌ها می‌شود (آزادفر و علی‌احمد کروری، ۲۰۰٤؛ علی‌احمد کروری و صالحی، ۱۹۹٤؛ عمران، ۱۹۸۰؛ چن و همکاران، ۲۰۰۵؛ مونری و گاردیولا، ۲۰۰۱). مطالعه تفاوت‌های سه کلون دیگر به کمک نشانگر پراکسیداز نیز بیانگر اختلاف سطح کمی آنزیم شهریورماه و آبان‌ماه کلون ۷۷/۵۱ و دی‌ماه و اسفندماه کلون ٦۷/۵۱ با سایر کلون‌ها است و همان‌طور که در قبل شرح داده شد نمایانگر سطوح مقاومت به سرما و لیگنین‌سازی متفاوت کلون‌ها با یکدیگر می‌باشد. همچنین بیش‌ترین اختلاف الگوهای ایزوآنزیمی سه کلون اخیر در دی‌ماه مشاهده شد. به‌طورکلی نتیجه‌گیری می‌شود که نشانگر بیوشیمیایی پراکسیداز به‌عنوان یک نشانگر زیستی توانایی خوبی در نشان دادن تفاوت‌های فردی پایه‌ها در سطح کلون‌های صنوبر دلتوییدس را داشته و به کمک آن می‌توان کلون‌های مورد نیاز صنایع مختلف و کاشت در محیط‌های متفاوت اکولوژیک به‌ویژه از نظر رژیم‌های حرارتی را توصیه نمود.

منابع

1.Ali Ahmad Korori, S. 1993. Seasonal alteration of peroxidase enzyme and isoenzyme in *Larix decidue* and its role in trees resistance to chilling and ripening. Pajouhesh and Sazandegi, 20: 14-16.

2.Ali Ahmad Korori, S. and Salehi, P. 1994. Seasonal and temperature alteration of peroxidase and amylase enzymes in *Picea abies*. Pajouhesh and Sazandegi, 24: 56-59.

3.Ali Ahmad Korori, S., Pichorner, H. and Ebermann, R. 1994. Seasonal alteration of Peroxidase and Catalase isoenzyme in branchs and seeds of three different species of *larix*. Plant Peroxidase Newsletter, No. 3.

Archive of SID

www.SID.ir

4.Ali Ahmad Korori, S. 1999. Investigation on responses of Forest trees enzymes to alteration of environmental factors. Research Institute of Forests and Rangelands Press, 333p.
5.Ali Ahmad Korori, S. and Matinizade, M. 2002. Investigation of enzyme response in different organs to different temperature treatments. Pajouhesh and Sazandegi, 55: 10-13.
6.Azadfar, D. and Ali Ahmad Korori, S. 2004. Study of peroxidase and alpha-amylase activities in different growth stage of beech (Fagus orientalis Lipsky). Pajouhesh and Sazandegi, 61: 25-36.
7.Bergmann, F. and Ruetz, W. 1991. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. Forest Ecology and Management, 46: 1-2. 39-47.
8.Bogdanovic, J., Milosavic, N., Prodanovic, R., Ducic, T. and Radotic, K. 2007. Variability of antioxidant enzyme activity and isoenzyme profile in needles of Serbian spruce (*Picea omrika*). Bioche. Mical. Systematics and Ecology, 35: 263-273.
9.Castilo, F. 1986. Extracellular peroxidase as markers of stress? In: Grepin, H., Penel, C., Gaspar, T., Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase. University of Geneva. Geneva, Pp: 419-426.
10.Chakraborty, U. and Tongden, C. 2005. Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. Current Science, 89: 2, 25. 384-389.
11.Chen, Y., Zhang, M. and An, L. 2005. The relation between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina. South African Journal of Botany, 72: 272-279.
12.Christiernin, M., Ohlsson, A., Berglund, T. and Henriksson, G. 2005. Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant difference in lignin structure between primary and secondary cell wall. Plant Physiology and Biochemistry, 43: 777-785.
13.Ebermann, R. and Stich, K. 1982. Peroxidase and Amylase isoenzymes in the sapwood and heartwood of trees. Phytochem. 21: 2401-2402.
14.Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. and Dommes, J. 2002. Concepts in plant stress physiology, Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regul, 37: 263-285.
15.Guzina, V. 1974. Genetic polymorphism of isoenzymes of Peroxidase and Esteraze in Populus deltoids. Topola. 18/19: 170-176.
16.Huihong, G., Shumin, G., Fengiun, Z. and Fenglan, L. 2004. Effects of cold acclimation on several enzyme activities in *Euonymus racicans* Emorald and Gold and its realation to semi-lethal temperature. Forestyre Studies in China, 6: 1. 10-17.

Archive of SID

www.SID.ir

17.Kalagari, M. 2004. Study of ecological and genetic alteration of *Populus euphratica* among Iran natural stands. Ph.D. Thesis in Forest science, Tarbiat Modaress University, 145p.
18.Kanmeres, M., Ebermann, R. and Ali Ahmad Korori, S. 1993. Seasonal changes of Peroxidase isoenzymes and activity of fraction containing plant. Plant Peroxidase. Unive. Gene II International symposium.
19.Kim, C.S. and Chung, S.B. 1974. Variation in the pattern of Peroxidase in the genus *Populus*. Research report of the institute of forest genetics, 11: 53-59.
20.Liengsiri, Ch., Yeh, F. and Boyle, T. 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, Pterocarpus macrocarpus Kurz. In Thailand. Forest Ecology and Management, 74: 1-3. 13-22.
21.Manjunatha, B.R., Virupakshi, S. and Naik, G.R. 2003. Peroxidase isozyme polymorphism in popular sugarcane cultivars. Current Science, 85: 9. 1347-1349.
22.Marchadier, H. and Sigaud, P. 2005. Poplars in biotechnology research Unasylva. 221: 56. 38-39.
23.Monerri, C. and Guardiola, J. 2001. Peroxidase activity and isoenzyme profile in buds and leaves in relation to flowering in Atsuma mandarin *(Cirtus unshiu)*. Scientia. Horticul. Turae. 90: 1-2. 34-56.
24.Nakagawara, S. and Sagisaka, S. 1984. Increase in Enzyme Activity Related to Ascorbate Metabolism during Cold Acclimation in *Poplar* Twigs. Plant and Physiology, 25: 6. 899.
25.Omran, G. 1980. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase and IAA oxidase during and after chilling cucumber seedlings. Plant Physiology, 65: 407-408.
26.Parhizkar, P., Ali Ahmad Korori, S. and Moraghebi, F. 2002. Peroxidase and enzyme in order to lookoing for resistan individuals. Pajouhesh and Sazandegi, Pp: 44-47.
27.Polle, A. 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 2. 141-150.
28.Rose-Barcelo, A., Pomar, F., Serrano, M. and Martinez, P. 2002. Developmental regulation of the H_2O_2-producing system and a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignification xylem. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 325-335.
29.Saeedi, Z. 2007. Genotypic and ecotypic screening of poplar species related to cold tolerance and ligninification. M.Sc. Thesis in forestry. Gorgan University of Agricultural Siences and Natural Resources, 112p. (In Persian)
30.Sasaki, S., Nishida, T., Tsutsumi, Y. and Kondo, R. 2004. Lignin dehydrogenative polymerization mechanism: a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in B-O-4 linkage. FEBS Letters, 562: 197-201.
31.Worthington, K. 2010. Enzymes related Biochemicals Manual. Worthington Biochemical Corporation, Pp: 360-364.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 17(3), 2010
www.gau.ac.ir/journals

Comparison of Peroxidase Seasonal Alteration Among *Populus deltoides* Clones

Z. Saeedi[1] and *D. Azadfar[2]

[1]M.Sc. of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
[2]Assistant Prof., Dept. of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: March, 10, 2009; Accepted: April, 14, 2010

Abstract

Plantation of fast-growing species such as Poplar is one of the important methods for wood production in the countries with low natural forest areas. Physiological differences of *Populus deltoides* clones planted through three decades in Shast Kalate research forest are unknown. Peroxidase enzyme in this research was used for clone separation as a biochemical marker that is sensitive to environmental alteration especially temperature and its direct participation in lignification process. Sampling was done from one year old seedlings of five clones and quantitative and qualitative activities of peroxidase during five months (September through May) were measured using Worthington and PAGE methods, respectively. The results showed that peroxidase quantitative activity and isoenzyme pattern of clones were different among the months which indicated the role of this enzyme in cold hardiness and lignification of the clones.

Keywords: *Populus deltoids*, Peroxidase, Clone

* Corresponding Author; Email: azadfar.d@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir