مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی
دوره دوم، شماره هشتم، پاییز ۱۳۹۱
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

خالص سازی نسبی آنزیم پراکسیداز در بنه های زعفران مزروعی در دو دوره فیزیولوژیکی خواب و بیداری

عباس رحمانی*[۱]، نرجس صیقلی [۲]، حسن ابراهیم زاده[۳]، حسین زارعی جلیانی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری،گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

[۲] کارشناس ارشد،گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

[۳] استاد، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۴] دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پراکسیداز یکی از مهم ترین آنزیم های فیزیولوژیکی در گیاهان می باشد. زعفران یک گیاه با ارزش از زمان های باستان محسوب می شود. اما اطلاعات کافی درمورد رشد و پیشرفت زعفران و آنزیم های مهم آن وجود ندارد. پراکسیداز یک شاخص فیزیولوژی محسوب می شود به گونه ای که در مطالعات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش ها: پیازهای ریزومی (بنه ها) زعفران مزروعی (*Crocus sativus*) در ماه های تیر و آبان به ترتیب به عنوان نمونه های خواب و بیداری جمع آوری شدند. بنه ها به عنوان منبع عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند. این عصاره برای مطالعات بیشتر استفاده شد.

یافته ها: محتوای پروتئین کل بنه های زعفران مزروعی در دو مرحله خواب و بیداری، در کلیه مراحل مختلف خالص سازی سنجش شد. نتایج بیانگر آن است که مرحله بیداری دارای مقدار پروتئین کل بیشتری نسبت مرحله خواب است.

نتیجه گیری: این اختلاف می تواند مربوط به الگوهای متفاوت گلیکوزیلاسیون آنزیم ها و بارهای الکترواستاتیکی سطحی می باشند.

کلمات کلیدی: زعفران، خالص سازی، پراکسیداز، خواب، بیداری

مقدمه

زعفران گیاهی علفی و چند ساله از تیره زنبق است که بنه ی آن قادر است یک مرحله خشکی را در خاک به حالت خواب بگذراند (۲). زعفران از گذشته های بسیار دور شناخته شده بود. اولین زعفرانی که بشر اقدام به کشت آن کرد زعفران مزروعی یا *Crocus sativus L* می باشد که مصرف عمده ای در صنایع تغذیه ای، پزشکی، نساجی و نظایر آن دارد (۱،۲). کشت زعفران در ایران از سابقه ای طولانی برخوردار است، بطوری که یکی از خاستگاه های عمده و اصیل این گیاه را کشور ایران می دانند (۱). گیاهان در معرض تنش های گوناگون زیستی و غیر زیستی هستند. از جمله این تنش ها، تنش اکسایشی می باشد. در مجموع صدماتی را که از گونه های فعال اکسیژن (ROS) به گیاهان می رسد تنش اکسایشی گویند. این تنش برای گیاهان نسبت به سایر موجودات به خاطر شیوه زندگی و عدم تحرک آن ها خطرناک تراست (۳،۱۶). میزان آنزیم های ضد اکسایشی در حالت عادی برای پاکسازی ROSکافی است، ولی در شرایط تنشی که مقادیر ROS افزایش می یابد، سازگان های دفاعی ضد اکسایشی در گیاهان فعال می شود. پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود، کاتالیز کننده احیا H_2O_2 هستند (۵،۱۷). فعالیت پراکسیداز را به آسانی می توان در تمام طول عمر گیاهان مختلف از مراحل اولیه جوانه زنی تا مرحله پیری از طریق کنترل طویل شدن یاخته ای، مکانیسم های دفاع و چندین عملکرد دیگر تشخیص داد. پراکسیدازها در بسیاری از فرآیند های سلولی از قبیل متابولیسم اکسین، تشکیل چوب،

آدرس نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری،گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
Email: rh.abbas@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۴/۱۰
تاریخ پذیرش:۹۱/۰۶/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

اتصالات عرضی در دیواره سلول گیاهی، پاسخ به تنش های محیطی و نظایر آن شرکت می کند (۱۱). مطالعات پیرامون این آنزیم به طور قابل ملاحظه ای انجام شده و در حال حاضر نیز در حال انجام است. دلایل عدم موفقیت در تعیین نقش دقیق پراکسیدازها را می توان در وجود تعداد زیاد ایزوفرم ها در گیاهان، اختصاصی نبودن گهرمایه های مختلف برای هر یک از این ایزوفرم ها دانست (۱۷). در این پژوهش سعی گردید تا پراکسیداز از بنه های زعفران مزروعی در دو مرحله فیزیولوژیکی خواب و بیداری با استفاده از روش های متداول خالص سازی از قبیل رسوب دهی پروتئین ها به کمک نمک آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی تعویض یونی خالص گردد.

مواد و روش ها

تهیه نمونه

بنه های زعفران مزروعی (*Crocus sativus*) کاشته شده در مزرعه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه تهران در دو ماه تیر و آبان که نماد دوران خواب و بیداری بنه های مذکور هستند جمع آوری شدند پس از شستشوی کامل، بنه ها در مقیاس های ۱۰گرمی وزن شدند و در دمای۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا در مراحل بعدی آزمایشات مورد استفاده قرار گیرند.

عصاره گیری و استخراج پروتئین ها

جهت استخراج پروتئین از بنه های زعفران، از بافر استخراج ۵۰ میلی مولار تریس با pH ۷ حاوی گلیسرول ۱۰ درصد (w/v)، تریتون X-100 ، (Ethylenediamine tetraaacetic acid) EDTA یک میلی مولار،(PHenylmethanesulfonyl flu-oride) PMSF یک میلی مولار و (Polyvinyl polypyrroli-done) PVPP دو درصد وزن به حجم استفاده شد. عصاره گیری با نسبت ۱ به ۴ (۱ میلی لیتر بافر با ۴ گرم بنه زعفران) انجام شد. به این منظور ابتدا مقدار ۳۰ گرم از هر دو نمونه بنه ای (بنه های خواب و بنه های بیداری) به مدت ۱۵ دقیقه در هاون سرد ساییده شدند. در ادامه کار به هر نمونه بافر استخراج اضافه و نمونه‌ها به مدت۳۰ دقیقه مجدداً ساییده شدند. عمل سانتریفوژ نمونه‌ها ۳ بار و هر بار به مدت ۱ ساعت با دستگاه سانتریفوژ Beckman J_2-21M با g ۱۳۰۰۰ در دمای $4\ ^{o}C$ انجام شد.

به این صورت که بعد از پایان یافتن دور اول سانتریفوژ و پس از خارج کردن لوله ها، محلول روشناور را با ۴ لایه پارچه تنزیب صاف شد. سپس در این مرحله رسوبات کنار گذاشته شد. روشناور جهت انجام کارهای بعدی نگه داشته شد (۱۲). روش های متعددی برای سنجش میزان پروتئین موجود می‌باشد. در پژوهش حاضر از روش برادفورد استفاده شده است (۶). در این تحقیق برای ترسیم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. سنجش پروتئین کل در دو مرحله صورت گرفت. مرحله اول روی عصاره خام، پس از ۵۰ و ۸۰ درصد نمک زنی به عصاره و مرحله دوم پس از بردن عصاره آنزیمی روی ستون و جمع آوری نمونه آنزیمی می باشد. در این پژوهش، طی دو مرحله نمک زنی به عصاره انجام شد. مرحله اول به محلول روشناور نمک ۵۰ درصد آمونیوم سولفات اضافه شد. پس از اینکه نمک به خوبی حل شد، محلول به مدت ۱ ساعت در g ۱۳۰۰۰ و دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. در مرحله دوم به محلول روشناور نمک آمونیوم سولفات ۸۵ درصد اضافه شد (۹). سپس مانند مرحله قبل پس از حل شدن نمک و رسوب دهی، محلول به مدت یک ساعت در g ۱۳۰۰۰ و چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. لازم به ذکر است که پس از هر مرحله رسوب در مقدار کمی بافر تریس ۰٫۰۲M، pH ۷ حل شد. پس از هر مرحله نمک زدن و سانتریفوژ، غلظت پروتئین و فعالیت پراکسیداز بررسی شد (۷).

مراحل آماده سازی ستون کروماتوگرافی تعویض یونی

تهیه رزین(ژل) سفادکس A25

با توجه به حجم ستون، یک گرم از این پودر در ۲۵ میلی لیتر بافر حل شد (بافر مورد استفاده در این قسمت، تریس ۵۰ میلی مولار با pH ۷ می باشد). سپس ظرف حاوی ژل را در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت (و یا در دمای آزمایشگاه به مدت دو روز) قرار داده شد. در این مدت ژل آبگیری کرده و ذرات آن به اصطلاح باد می کنند. پرکردن ستون و باردارکردن ستون، قرار دادن نمونه (عصاره دیالیز شده) روی ستون، شستشوی ستون جهت خارج شدن پروتئین های متصل نشده به رزین، شیب نمک برای رها سازی آنزیم از رزین،

www.SID.ir

Archive of SID

شستشوی ستون برای خارج کردن کلیه ترکیبات باقی مانده بروی ژل از مراحل بعدی است. آنالیز اطلاعات حاصل از این مدل با استفاده از نرم افزار fitting بنام Sigmaplot ver 11 انجام شد. برای سنجش پروتئین کل از روش برادفورد استفاده شد که به این منظور، یک منحنی استاندارد با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) در محدوده صفر تا ۲۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر رسم گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی محتوی پروتئین کل

محتوی پروتئین کل بنه های زعفران مزروعی در دو مرحله خواب و بیداری، در کلیه مراحل مختلف خالص سازی سنجش شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول (۱) نشان شده است. نتایج بیانگر آن است که مرحله بیداری دارای مقدار پروتئین کل بیشتری نسبت مرحله خواب است، هم چنین تغییرات در محتوی پروتئین در مراحل مختلف خالص سازی نیز قابل مشاهده است.

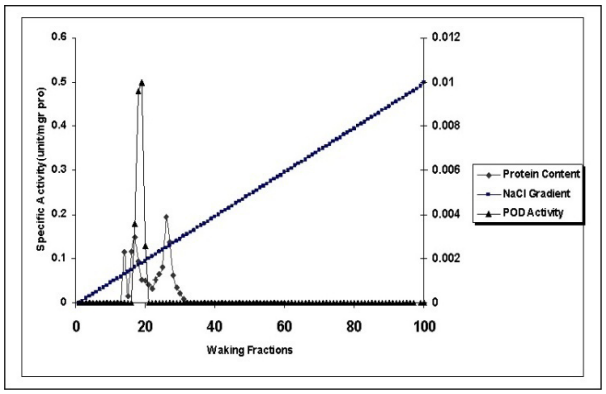
جدول ۱- نتایج حاصل از سنجش کمی محتوی پروتئین در مراحل مختلف خالص سازی.

نمونه بیداری (mg/ml)	نمونه خواب (mg/ml)	پروتئین کل
۱۲/۷۲	۶/۵۳	عصاره خام
۱۱/۶۴	۶/۰۱	نمک ۵۰ درصد
۵/۸۳	۴/۹۵	نمک ۸۵ درصد
۰/۱۸۹۶	۰/۱۱۴۷	ستون DEAE-SpHadex

نتایج حاصل از خالص سازی نسبی آنزیم پراکسیداز از بنه های زعفران مزروعی

نتایج حاصل از خالص سازی نسبی آنزیم پراکسیداز نمونه بیداری

پس از استخراج عصاره از بنه زعفران، جهت خالص سازی طی دو مرحله به آن نمک زنی شد (۵۰ و ۸۵ درصد). سپس جهت خالص سازی بیشتر، نمونه دیالیز شده بر روی ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-SepHadex قرار گرفت. پس از کروماتوگرافی، تمامی اجزاء از نظر مقدار پروتئینی و فعالیت پراکسیدازی مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی ها نشان داد که فراکشن های ۱۴ الی ۳۱ دارای پروتئین بودند. هم چنین از میان این فراکشن ها، فراکشن های ۱۷ الی ۲۰ از خود فعالیت پراکسیدازی نشان دادند. نتایج حاصله بر روی شکل۱ نشان داده شده است.



.شکل ۱- نمودار های مربوط به فراکشن های پروتئینی، آنزیمی و شیب نمک نمونه بیداری.

نتایج کلی بدست آمده از خالص سازی نسبی پراکسیداز زعفران در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصل از جدول ۲، فعالیت آنزیمی حاصل از مرحله اول نمک زنی کم شده است ولی در مرحله بعدی نمک زنی، فعالیت آنزیمی به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. هم چنین پس از عبور از ستون فعالیت آنزیمی افزایش یافت.

جدول۲- نتایج حاصل از مراحل مختلف خالص سازی در نمونه بیداری.

نمونه بیداری	پروتئین کل (mg/ml)	فعالیت ویژه ΔOD/min/mg) (protein[1]
عصاره خام	۱۲/۷۲	۰/۰۶۷۵
نمک ۵۰ درصد	۱۲/۶۴	۰/۰۱۵
نمک ۸۵ درصد	۵/۸۳	۰/۸۵۰۴
ستون DEAE-SpHadex	۰/۱۸۹۶	۱/۲۵۱۲

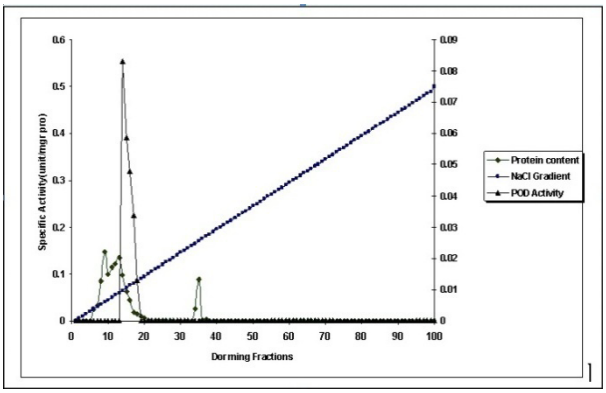
نتایج حاصل از خالص سازی نسبی آنزیم پرکسیداز از نمونه خواب

در این مرحله نیز مانند مرحله قبل، به عصاره استخراج شده از بنه مرحله خواب زعفران مزروعی طی دو مرحله نمک زنی شد. سپس جهت خالص سازی بیشتر نمونه دیالیز بر روی ستون

www.SID.ir

Archive of SID

کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-SpHadex قرار گرفت. پس از کروماتوگرافی تمامی فراکشن ها از نظر مقدار پروتئین و فعالیت پراکسیدازی سنجش شدند. نتایج این بررسی نشان داد که فراکشن های ۶ الی ۲۰ و ۳۴ الی ۳۷ دارای پروتئین بودند. هم چنین فراکشن های ۱۴ الی ۱۹ از خود فعالیت پراکسیدازی نشان دادند. نتایج حاصل از این بررسی در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- نمودار های مربوط به فراکشن های پروتئینی، آنزیمی و شیب نمک نمونه خواب.

جدول۳- نتایج حاصل از مراحل مختلف خالص سازی در نمونه خواب.

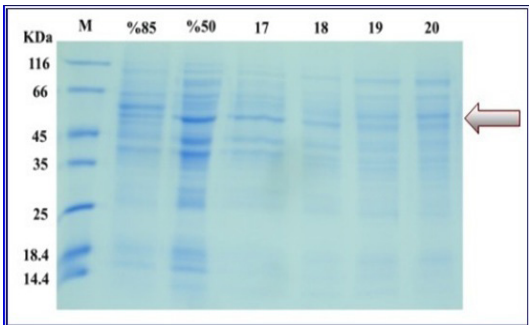
نمونه خواب	پروتئین کل (mg/ml)	فعالیت ویژه ΔOD/min/mg) (protein
عصاره خام	۶/۵۳	۰/۰۱۲۵
نمک ۵۰ درصد	۶/۰۱	۰/۰۰۷۲
نمک ۸۵ درصد	۴/۹۵	۰/۱۱۲۸
ستون DEAE-SpHa-dex	۰/۱۱۴۷	۰/۱۹۶۴

نتایج کلی بدست آمده از خالص سازی نسبی پراکسیداز زعفران در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که از جدول ۳ مشخص است همانند مرحله بیداری، فعالیت آنزیمی حاصل از مرحله اول نمک زنی کم شده است ولی در مرحله بعدی نمک زنی فعالیت آنزیمی به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. در ضمن، پس از کروماتوگرافی تعویض یونی نیز فعالیت پراکسیدازی افزایش یافت.

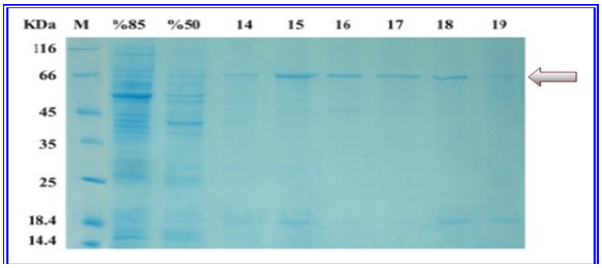
نتایج حاصل از مطالعات الکتروفورزی

نتایج حاصل از مطالعات الکتروفورزی به روش SDS-PAGE

در نمونه بیداری فراکشن های ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰ و در نمونه های خواب فراکشن های ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ از بین فراکشن های دارای پروتئین، بیشترین فعالیت آنزیم پرکسیداز را از خود نشان دادند. ژل های حاصله نمونه بیداری در شکل ۳ و نمونه خواب در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که از شکل ها مشاهده می شود تعداد باندها در مراحل مختلف خالص سازی تا حد زیادی کاهش یافته است. این کاهش در نمونه های خواب مشهود تر است. نشانگر استفاده شده از شرکت فرمنتاز خریداری شد.



شکل ۳- الکتروفورگرام SDS-PAGE نمونه بیداری. M مارکر شامل پروتئین های بتا گالاکتوزیداز (۱۱۶ KDa) ، آلبومین سرم گاوی (KDa ۶۶)،آلبومین سرم جوجه (۴۵ KDa)، لاکتات دهیدروژناز (۳۵ KDa)، (KDa R Ease ۲۵)(بتا لاکتوگلوبولین (۱۸/۴ KDa)، لیزوزیم (KDa ۱۴/۴). ۸۵ ٪ و ۵۰ ٪ دو مرحله نمک زنی.۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰ فراکشن های دارای بیشترین فعالیت آنزیمی



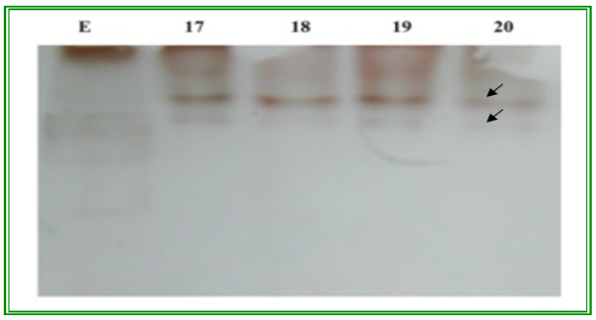
شکل ۴- الکتروفورگرام SDS-PAGE نمونه خواب. M مارکرشامل پروتئین های بتا گالاکتوزیداز (۱۱۶ KDa)، آلبومین سرم گاوی (KDa ۶۶)، آلبومین سرم جوجه (۴۵ KDa)، لاکتات دهیدروژناز (۳۵ KDa)، بتا لاکتوگلوبولین (۱۸/۴ KDa)، لیزوزیم (۱۴/۴ KDa). ۸۵ ٪ و ۵۰ ٪ دو مرحله نمک زنی. ۱۴، ۱۵، ۱۶،۱۷، ۱۸،۱۹ فراکشن های دارای بیشترین فعالیت آنزیمی.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج مطالعات الکتروفورزی به روش PAGE

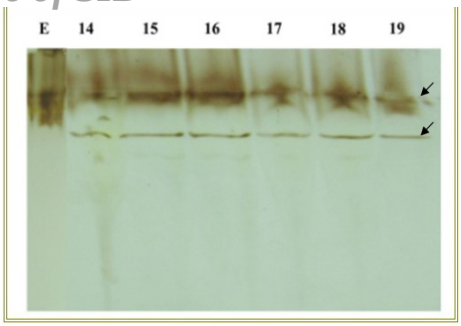
پس از جمع آوری فراکشن ها از ستون کروماتوگرافی و بررسی آن ها از لحاظ مقدار پروتئین کل و فعالیت آنزیمی، فراکشن های که از خود فعالیت پراکسیدازی نشان دادند برای بررسی بیشتر از ژل الکتروفورز PAGE استفاده شد. در نمونه بیداری فراکشن های ۱۷ ،۱۸، ۱۹، ۲۰ و در نمونه های خواب فراکشن های ۱۴ ،۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ از بین فراکشن های دارای پروتئین، که بیشترین فعالیت آنزیم پرکسیداز را از خود نشان دادند، جهت گذاشتن ژل PAGE استفاده شد و ژل با استفاده از سوبستراهای اختصاصی POD (بنزیدین و پراکسید هیدروژن) رنگ آمیزی شد. نتایج ژل های حاصله نمونه بیداری در شکل ۵ و نمونه خواب در شکل ۶ نشان داده شده است. همانطور که از شکل ها پیداست، در هر دو مرحله خواب و بیداری دو باند آنزیمی قابل مشاهده است که بیانگر این است که دو ایزوفرم آنزیمی در هر دو مرحله فعال هستند ولی شدت باندها در مرحله خواب کمتر از مرحله بیداری است.



شکل۵- الکتروفورگرام PAGE پراکسیداز بطور نسبی خالص شده زعفران مزروعی در مرحله فیزیولوژیکی بیداری. E عصاره خام، ۱۷ ،۱۸ ،۱۹ ،۲۰ فراکشن های دارای فعالیت پراکسیدازی..فلش ها نشان دهنده دو ایزوفرم آنزیمی پراکسیداز می باشند.

بحث

در این پژوهش سعی گردید تا پراکسیداز از بنه های زعفران مزروعی در دو مرحله فیزیولوژیکی خواب و بیداری با استفاده از روش های متداول خالص سازی از قبیل رسوب دهی پروتئین ها به کمک نمک آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی تعویض یونی خالص گردد. به طور کلی فرایند خالص سازی آنزیم ها از بافت های گیاهی یک فرایند بسیار مشکل است زیرا تعداد زیادی از ترکیبات ثانوی در بافت های گیاهی وجود دارند که



شکل۶- الکتروفورگرام PAGE پراکسیداز بطور نسبی خالص شده زعفران مزروعی در مرحله فیزیولوژیکی خواب E عصاره خام،۱۴، ۱۵ ،۱۶، ۱۷،۱۸ ،۱۹، فراکشن های دارای فعالیت پراکسیدازی. فلش ها نشان دهنده دو ایزوفرم آنزیمی پراکسیداز می باشند.

قادرند با اتصالات محکم به آنزیم ها متصل شده و نشان ویژگی آنزیم را تغییر دهند (۶،۱۴). از جمله راه کارهائی که برای غلبه بر این مشکل پیشنهاد شده است استفاده از پودرهای استون، آمونیوم سولفات، نمک ها، پلیمرهای غیر محلول و شوینده‌ها می باشد. در این پژوهش از تریتون X-100 استفاده شد (۴،۸). کروماتوگرام های حاصل از خالص سازی که در شکل های (۵،۴،۳،۲) ارائه شده است، نشان دهنده تفاوت در خروج آنزیم از ستون در دو مرحله خواب و بیداری می باشد. در مرحله بیداری از ۱۸ فراکشن پروتئینی، چهار فراکشن از خود، فعالیت پراکسیدازی نشان دادند بطوری که دو پیک پروتئینی و یک پیک آنزیمی مشاهده شد. در حالی که در مرحله خواب از ۹ فراکشن پروتئینی، شش فراکشن از خود فعالیت پراکسیدازی نشان دادند. این تفاوت در خروج پروتئین و آنزیم می تواند ناشی از عوامل مختلفی از جمله تفاوت در میزان گلیکوزیلی شدن آنزیم و یا میزان بار الکتریکی سطح آنزیم (۱۱،۱۰) و میزان میانکنش آن با سطح ژل طی این دو مرحله دانست. پژوهش های مختلفی جهت تعیین فعالیت پراکسیداز در گیاهان مختلف صورت گرفته است بطور مثال بهینه فعالیت پراکسیداز در سویا، میوه هندوانه در حضور سوبسترای گایاکول، در گونه ای نخل به نام *Roystonena rega* ، صورت گرفته است. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج بدست آمده از پژوهش های بالا مطابقت دارد (۱،۱۱، ۱۵،۱۸). مقایسه ژل های SDS-PAGE در دو مرحله خواب و بیداری

www.SID.ir

Archive of SID

نشان دهنده افزایش میزان بیان پروتئین ها و پیرو آن آنزیم ها در مرحله بیداری نسبت به مرحله خواب است زیرا همان طور که در اشکال بخوبی مشهود است تعداد باندها در مرحله بیداری علی رغم خالص سازی و حذف بسیاری از پروتئین ها نسبت به مرحله خواب بیشتر می باشد. با بررسی ژل های آنزیمی PAGE می توان به حضور دو ایزوفرم پراکسیداز در هر دو مرحله خواب و بیداری پی برد. مشاهده دو نوار الکتروفورزی مشخص با استفاده از گهرمایه های تخصصی آنزیم (بنزیدین و پراکسید هیدروژن) موید آن است هر دو دارای فعالیت پراکسیدازی هستند (۱۲،۱۳).

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه تهران نهایت سپاسگزاری را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(۱) اویسی س. بررسی کینتکی پراکسیدازها در ریشه زعفران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران IBB. ۱۳۸۶.

(۲) صبورا ع. بررسی تنوع ایزوزیمی. پروتئین و فلاونوئیدهای زعفران های ایران. رساله دکتری. دانشکده علوم. دانشگاه تهران ۱۳۸۱.

(۳) معتمد ن. بررسی کمی و کیفی پروتئینها و آنزیمها در طی رشدونمو میوه و انتقال ژن مقاومت به شوری (P5C5) در گیاه زیتون، رساله دکتری. دانشگاه تهران. دانشکده علوم. ۱۳۸۰.

(4) Arora A, Sairam R K, Srivastava, G C .Oxidative Stress & Antioxidative System in Plants. Current Sience. 2002; 10: 1227-1238.

(5) Ashraf M, Harris P J C . Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. Plant Sience . 2004; 166: 3-16.

(6) Bradford MM. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

(7) Chance B, Maehly AC. Assays of Catalases and Peroxidases. In: *Methods in Enzymology*. (Colowick, S.P. and Kaplan, N O, eds.) Academic Press, New York, 1955; II. pp. 764- 775.

(8) Cosio C ,Dunand C .Specific Functions of Individual Class III Peroxidase Genes .Journal of Experimental Botany. 408–391 :60 ;2009

(9) Elstner EF .Mechanisms of Oxygen Activation in Different Compartments of Plant cells .In :Pell EJ ,Steffen KL ,eds. Active oxygen species ,oxidative stress and plant .Rockvill ,Maryland :The American Society of Plant pHysiologists. .13-25 ;1991

(10) James M Conroy ,David C ,Borzelleca Leslie A. Mcdonell Homology of Plant Peroxidase .Plant PHysiol; 1982 . 69:28-31

(11) Kjalke M ,Anderson MB ,Schneider P ,Christensen B ,Schulein M ,Welinder KG .Comparison of Strure and Activities of Peroxidase from Coprinus cinereus , Coprinus macrorhizus and Arthromyces ramosus. Biochim. BiopHys. Acta 248-256 : 1120 ;1992.

(12) Minibayeva F, Lu¨ thje S, Kolesnikov O, Chasov A, Beckett RP,Vylegzhanina N, Buck F, Bo ttger M. Wound-induced Apoplastic Peroxidase Activities: Their Roles in the Production and Detoxification of Reactive Oxygen Species. Plant, Cell Environment.2009;32:497–508.

(13) Morita Y, Yamashita H, Mikami B, Lwamoto H, Aibara S, Terada M ,Minami J. Purification, Crystallization and Characterization of Peroxidase from Coprinus cinereus. J Biochem 103.693-699 ;1988 .

(14) Oh WG, Jang IC, Jeon GI, Park EJ, Park HR, Lee SC. Antioxidative Activity of Extracts from Wisteria floribunda flowers. The Korean Society of Food Science and Nutrition. 2008; 37:677-683.

(15) Passardi F ,Cosio C ,Penel C ,Dunand C .Peroxidases Have More Functions Than a Swiss Army Knife .Plant Cell Eports.265–24,255 ;2005 .

(16) Rajgura N S ,Banks S W ,Gossett D R ,Lucas M C .Antioxidant Response to Stress During Fiber Development in Cotton Ovales .The Journal of Cotton Sience.11-18 :3 ;1999 .

(17) Yildirim O, Aras S, Ergul A. Response of Antioxidant System to Short-term NaCl stress in Grapevine Root stock-1616c & vitis vinifera L. cv. Razaki. Acta Biological Cracoviensia. 2004; 46: 151-158.

(18) Zheng Y Q J X ,Liu J N ,Wang L Xu .Effects of Crocin on Reperfusion-Induced Oxidative/Nitrative Injury to Cerebral Microvessels after Global Cerebral Ischemia :Brain Res86-94 :1138 ;2007 .

www.SID.ir