مطالعات آنزیمی در ارتباط با چوبی‌شدن در اکالیپتوس

Eucalyptus camaldulensis Dehn[1]

نوشین طغرایی[2] داود پارساپژوه[3] عبدالرحمن حسین‌زاده[4] سودابه علی احمدکروری[5]

چکیده

به منظور بررسی مقدماتی چگونگی تغییرات مقدار لیگنین و آنزیم پراکسید از درختان اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) در فصول مختلف، از چهارمنطقه در دو فصل پاییز و زمستان نمونه تهیه شده و با دو روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (PAGE) و اسپکتروفتومتری، بررسی کیفی و کمی انجام شد. مقدار لیگنین کلاسون نیز بر روی آرد چوب عاری از مواد استخراجی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد که الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز در این گونه اکالیپتوس تغییر کرده و این تغییرات در ابتدای فصل سرما، بخشی از آماده سازی فیزیولوژیک درختان در برابر سرما محسوب می‌شود. همچنین اختلافاتی بین مناطق اکولوژیک و بین پایه‌های یک منطقه از نظر ژنتیکی مشاهده شد. مقدار نسبی لیگنین در زمستان در منطقه خوزستان تقلیل یافته و فعالیت آنزیم نیز کاهش نشان می‌دهد. مقدار لیگنین با قطر شاخه‌ها و فعالیت آنزیم پراکسیداز در بیشتر اوقات همبستگی مستقیم نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *اکالیپتوس کاملدولنسیس، چوبی‌شدن پراکسیداز، لیگنین، پلی‌اکریل آمید ژل اکتروفورز.*

---

[1] - تاریخ دریافت: ۸۰/۷/۷، تاریخ پذیرش: ۸۲/۶/۲۳

۲- دانشجوی دکتری رشته علوم و صنایع چوب وکاغذ، دانشگاه تهران(E-mail:ntoghrai@motahari.ut.ac.ir)

[3] -استاد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

[4] - عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع

[5] -عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع

مقدمه

پراکسیدازهای گیاهی (EC۱،۱۱،۱،۷) عمدتا در غشاء سلول و درواکوئول‌ها جای دارند. این آنزیم مسوول گردهمایی مواد تشکیل‌دهنده مختلف غشاء سلول توسط کاتالیز کردن شکل‌گیری پیوندهای کووالانسی بین بقایای تیروزین یا فرولات پلیمرهای مختلف غشاء هستند. این آنزیم‌ها را عموما به‌عنوان مسوول پلیمریزاسیون لیگنین نیز شناخته‌اند (۷) و می‌توانند در شکل‌گیری پراکسید ئیدروژن نیز درگیر باشند. به‌دلیل طیف وسیع واکنش‌های بیوشیمیایی که این آنزیم‌ها می‌توانند کاتالیز کنند، نقش بسیار مهمی در مکانیسم‌های طویل‌شدن سلول‌ها، تمایز-یابی [۱]. سلول‌ها و دفاع علیه پاتوژن‌ها ایفا می‌نمایند.

اگر پراکسیداز واقعا در لیگنینی شدن نقش داشته باشد، آنزیم بایستی در غشاء سلول جای داشته باشد، بخصوص در غشاء ثانویه که با تراکم بیشتری لیگنینی می‌شود. همبستگی مثبت بین موقعیت مکانی پراکسیداز باغشاء لیگنینی شده توسط محققان بسیاری معلوم شده است. هپلر و همکاران (۱۹۷۲) با این نتیجه رسیدند که فعالیت پراکسیداز درعناصر آوندی زخمی در Coleus در غشاء ثانویه مشبک و غشاء اولیه جایی که ضخامت‌های ثانویه در حال شکل‌گیری‌اند وجود دارد(۴). فعالیت آنزیم در پلاسمالمای عناصر آوندی در حال تمایزیابی می‌باشد، بخصوص در جایی که روی ضخامت‌های ثانویه و نیز در دیکتیوزوم‌ها و وزیکل‌های مربوط به آنها زیاد قرار می‌گیرد. این نتایج قویا از این نظریه که پراکسیداز در پلیمریزاسیون دهیدروژنه مونولیگنول‌ها به لیگنین در گیاهان عالی نقش دارد حمایت می‌کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در دو فصل و در چهار منطقه انجام شد. نمونه‌برداری پاییز (نیمه آبان) از منطقه گربایگان فارس، باغ خوانساری هفت تپه و منطقه کارون صورت گرفت. از چهار درخت در گربایگان و از سه درخت در دو منطقه دیگر، شاخه‌هایی به‌قطر حدود ۴ سانتیمتر با درنظرگرفتن ارتفاع شاخه بر روی درخت و جهت رویش آنها با اره قطع شد. در فصل زمستان نیز (نیمه‌های بهمن) از مناطق قبلی و نیز مازندران (ساری) از هر محل سه درخت نمونه‌برداری شد و شاخه‌ها در کیسه‌های دربسته به آزمایشگاه حمل شد.

تهیه نمونه برای بررسی آنزیمی

عصاره‌گیری: کلیه نمونه‌ها بلافاصله بعد از برداشت در یخدان حاوی یخ خشک قرار گرفته و به مجتمع تحقیقات البرز منتقل و در همان شب نمونه‌برداری عصاره‌گیری شدند.

برای نمونه‌گیری ابتدا ۳ گرم از نمونه موردنظر را در هاون به خوبی ساییده و با ۶cc محلول عصاره‌گیری (۱) (نسبت ۱ به ۲) مخلوط کرده، داخل لوله آزمایش ریخته و با پارافیلم درب آن مسدود می‌شود و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت ذخیره می‌گردد. سپس نمونه‌ها را در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و قسمت زلال رویی برای مطالعات بعدی در شیشه‌ای جداگانه نگهداری شد. (شکل‌های ۲و۱).

روش بررسی فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز (روش اسپکتروفتومتری)

مطالعات کمی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Colmant model6/2) انجام گرفت.

ابتدا بافر استات و بنزیدین را مخلوط کرده و سپس به مجموعه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه می‌شود. در انتها آب اکسیژنه ۳درصد اضافه می‌شود و مقدار جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر در هر ۶۰ ثانیه و تا ۶ دقیقه قرائت می‌شود.

از حداقل، حدبیشتر و میانگین اعداد قرائت شده مقدار فعالیت آنزیم در واحد زمان تعیین می‌شود.

روش بررسی کیفی آنزیم پراکسیداز

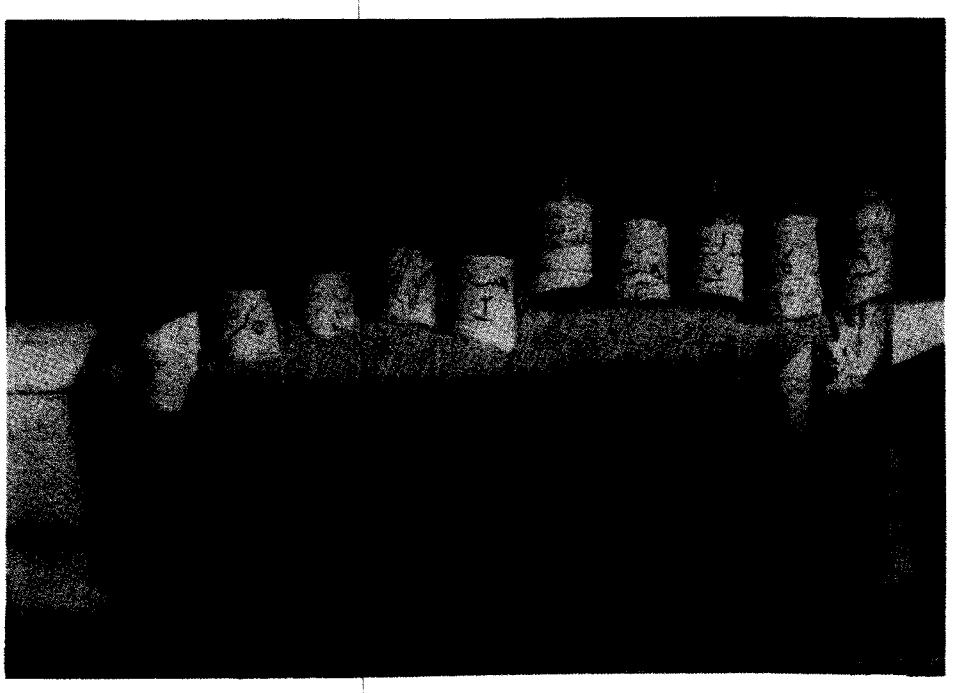
مطالعات کیفی با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی به روش PAGE (پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز) و طبق روش کروری و ابرمن [۲] (۱۹۹۱) صورت گرفت.

---

[۱] -Differentiation

[۲] -Ebermann & Korori

شکل ۱- نمونه‌های خردشده و سائیده شده و آماده شده جهت عصارگیری



شکل ۲- نمونه‌های آماده شده پس از سانتریفوژ

تهیه نمونه برای بررسی مقدار لیگنین

شاخه‌های موردنظر را همراه با پوست به‌صورت خلال در آورده و سپس با آسیاب به‌صورت پودر و بعدا با الک‌کردن، ذرات با ابعاد مورد نظر (جمع‌آوری شده بر روی الک ۸۰ مش) جمع‌آوری و به‌وسیله اتانول - استن عاری از مواد استخراجی شد. سپس لیگنین آن اندازه‌گیری و ثبت گردید

(ASTM-D1106-84). در انتها بحثی درباره همبستگی قطر شاخه، منطقه رویش، فصل، فعالیت آنزیم و مقدار لیگنین خواهیم داشت.

نتایج

شکل‌های (۳ و ۴) تغییرات کمی آنزیم پراکسیداز را در درختان نمونه و در دو فصل پاییز و زمستان نشان می‌دهد. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، در نمونه‌های آبان (پاییز) ما بین یک گونه در مناطق مختلف و نیز پایه‌های موجود در یک منطقه اختلاف زیادی وجود دارد. اختلاف زیاد بین میانگین فعالیت آنزیم در فارس و خوزستان شاید به‌دلیل آن باشد که در خوزستان در زمان نمونه‌برداری (آبان) فصل آمادگی درخت برای ورود به دوره خواب تدارک دیده می‌شود درحالی‌که در فارس درختان وارد دوره سرما شده‌اند.

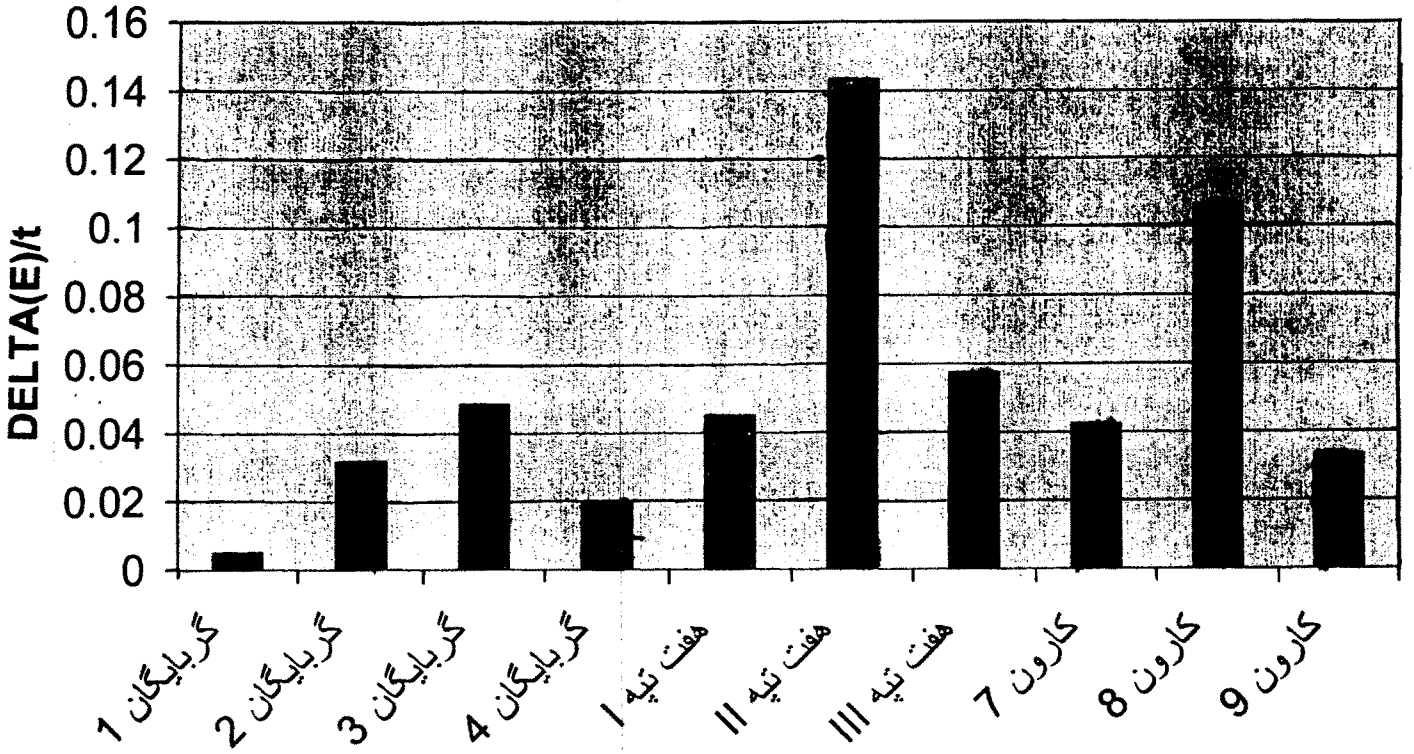
در شکل مربوط به دی و بهمن (زمستان) متاسفانه به نمونه‌های مربوط به فارس دسترسی نبود و در عوض نمونه‌های مازندران (در نیمه بهمن) بررسی شده‌اند. لیکن فعالیت آنزیم در نمونه‌های خوزستان همگی در دو فصل پاییز (آبان) و زمستان (دی) قابل مقایسه است. در این فصل به‌طور کلی تفاوت بین مناطق و نیز پایه‌های موجود در یک منطقه بسیار کمتر شده است، همچنین کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز بیش از افزایش آن چشمگیر است. جالب آن است که روند تغییرات پایه‌ها در یک منطقه در پاییز و زمستان مشابه است.

در شکل (۵) الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز در فصل پاییز نمایش داده شده است. ملاحظه می‌شود در گربایگان این الگو در دو پایه مشابهت زیادی دارد و فعالیت آنزیم با الگوی ایزو آنزیم‌ها توافق دارد. در این منطقه سه باند مشخص در ناحیه مولکول‌های متوسط مشاهده می‌شود که به نظر می‌رسد یک باند از آنها ثابت باشد.

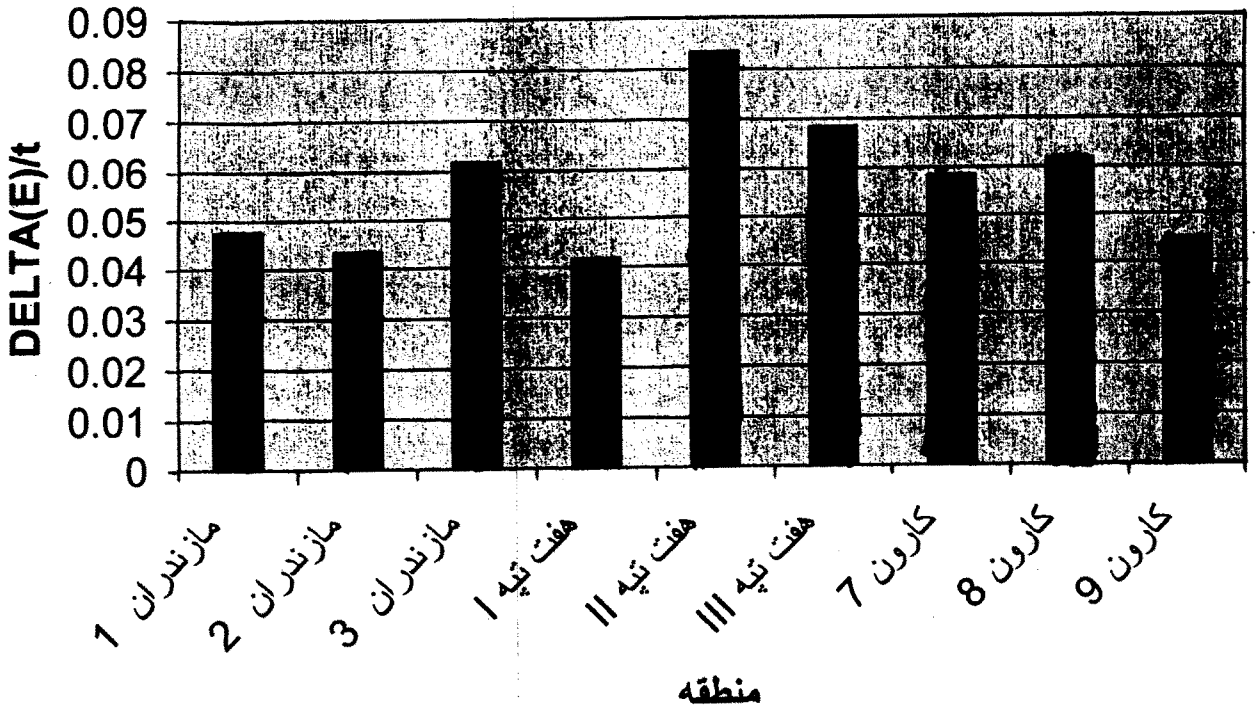
در منطقه هفت تپه تطابق فعالیت آنزیم و الگوی ایزوآنزیم‌ها دیده نمی‌شود (حداقل در مورد هفت تپه II) لیکن سه باند ثابت در هر سه پایه وجود دارد و نیز باندها به سمت محل استقرار مولکول‌های سنگین و سبک بیشتر گرایش می‌یابند، بیشترین تعداد ایزوآنزیم‌ها را هفت تپه III از خود نشان می‌دهد که هشت بانداست و در منطقه آنیون‌ها بیشتر گسترش دارند. آخرین الگو متعلق به منطقه کارون است که مولکول‌های تند رونده و کندرونده در اینجا ظاهر شده‌اند و توافق نسبی بین فعالیت آنزیم و این الگو وجود دارد.

در شکل (۶) الگوی ایزوآنزیم‌های پراکسیداز را در فصل زمستان داریم. دراین فصل باندهای ظاهر شده به تعداد بسیار کم و کمرنگ می‌باشند، در منطقه هفت تپه، پایه‌ها از شباهت نسبی برخوردارند و تعدادباندها معادل هم است و با فعالیت کمی آنزیم نیز تقریبا مطابقت دارد ولیکن نسبت به پاییز، تعداد باندها تقلیل یافته و نیز دو ایزوآنزیم کاتیونی آن در منطقه مولکول‌های متوسط باندهای جدید ظاهر شده‌اند و بقیه مولکول‌های تندرونده‌تر حذف شده‌اند. در مورد منطقه کارون نیز تعداد باندها تقلیل پیدا نموده است. در مورد کارون ۹ در دو فصل مورد بررسی به‌نظر می‌رسد که همان باند منحصر بفرد در منطقه مولکول‌های آنیونی نیز جای خود را به مولکول‌های متوسط داده است و هم‌سویی بین فعالیت و الگوی ایزوآنزیم‌ها تقریبا مشهود است. در مورد نمونه‌های مازندران که فقط همین یک فصل نمونه‌برداری شده‌اند نیز شباهت بین پایه‌ها مشهود است و در ضمن یک باند ثابت در تمامی نمونه‌های هر سه منطقه مشاهده می‌شود که به‌نظر می‌رسد همان ایزوآنزیم تندرونده پاییز باشد.

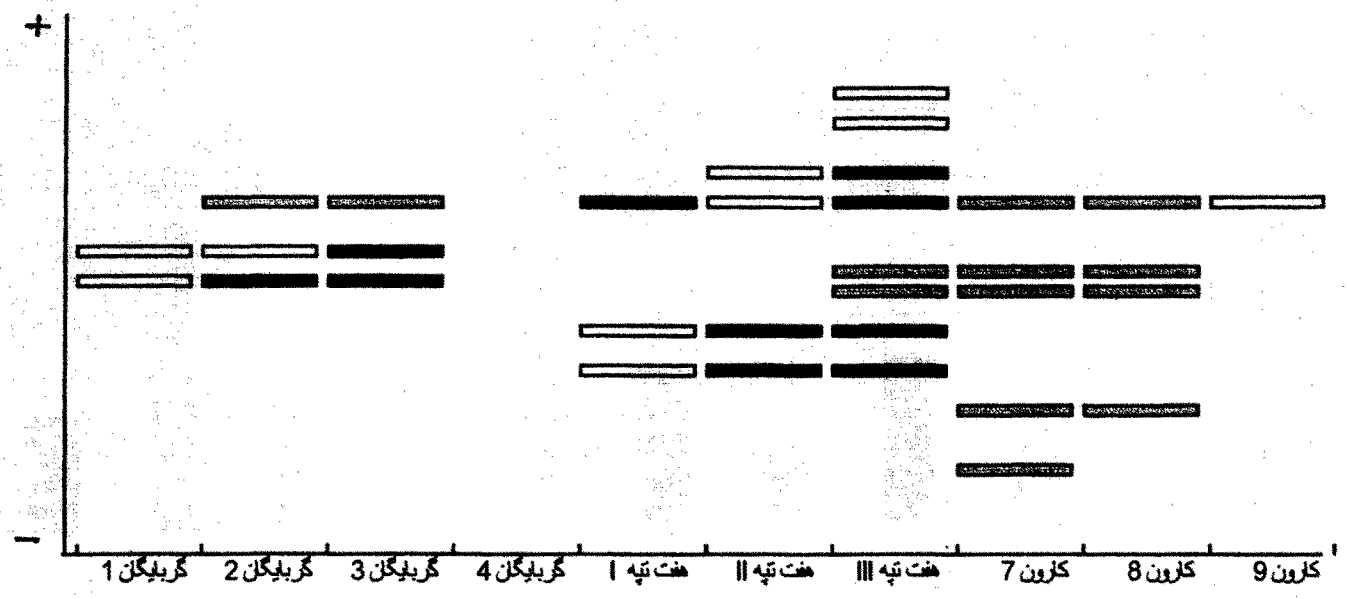
در جدول (۱) ویژگی‌های مربوط به قطر شاخه‌ها، فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار لیگنین در دو فصل نمونه‌برداری آورده شده است.



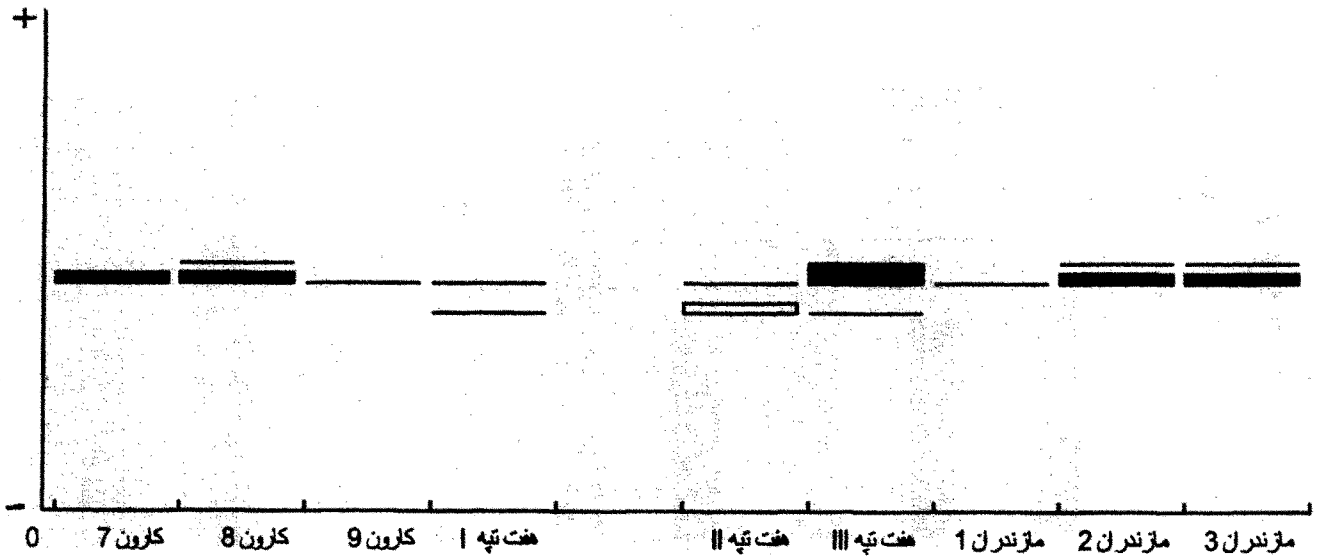
شکل ۳- تغییرات کمی فعالیت‌های آنزیم پراکسیداز در قطع پاییزه



شکل٤- تغییرات کمی فعالیت‌های آنزیم پراکسیداز در قطع زمستانه



شکل ٥- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز در نمونه‌های پاییز



شکل ٦- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز در نمونه‌های زمستان

جدول ۱-ویژگی‌های مربوط به قطر شاخه‌ها، فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار لیگنین در دو فصل نمونه‌برداری

منطقه	قطرشاخه(سانتیمتر)		مقدار لیگنین ٪		فعالیت آنزیم $\times 10^{-3}$	
	زمستان	پاییز	زمستان	پاییز	زمستان	پاییز
گربایگان ۱	-	۳/۱	-	۲۷/۴۹	-	۶/۶۷
گربایگان ۲	-	۳/۷	-	۲۵/۸۳	-	۳۵/-
گربایگان ۳	-	۳/۳	-	۲۵/۴۶	-	۴۸/۳
گربایگان ۴	-	۳/۲	-	۲۳/۹۸	-	۲۳/۳
هفت تپه I	۲/۵	۳/۰	۲۲/۴۹	۲۵/۶۳	۴۱/۷	۴۹/۱
هفت تپه II	۲/۴	۳/۲	۲۲/۵۹	۲۳/۸۰	۸۳/۳	۱۴۵/۰
هفت تپه III	۳/۱	۴/۶	۲۳/۸۳	۲۵/۲۶	۶۸/۳	۶۰/۰
کارون ۷	۲/۰	۳/۵	۲۲/۹۰	۲۲/۳۴	۵۸/۳	۴۲/۵
کارون ۸	۳/۰	۳/۳	۲۴/۸	۲۷/۲۰	۶۱/۷	۱۰۶/۷
کارون ۹	۲/۵	۲/۸	۲۳/۱۰	۲۳/۳۰	۴۵/۰	۳۶/۷
مازندران ۱	۳/۴	-	۱۷/۲۷	-	۴۷/۵	-
مازندران ۲	۳/۵	-		-	۴۳/۳	-
مازندران ۳	۳/۰	-		-	۶۱/۷	-

در نمونه‌های هفت تپه حداقل مقدار لیگنین با حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز همراه است و بالعکس (در پاییز) نیمی از این روند در نمونه‌های گربایگان مشاهده می‌شود به این صورت که حداکثر مقدار لیگنین باحداقل فعالیت آنزیم همراه است. به‌علاوه حداقل قطر شاخه‌ها در فارس و هفت تپه باحداقل فعالیت آنزیمی و حدبیشتر مقدار لیگنین ارتباط دارد. بطور کلی در نمونه‌های فارس و خوزستان حداقل قطر شاخه باحداقل فعالیت آنزیم همراه است.

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش اخیر در زمان محدود و روی پایه‌های درختی معدودی انجام گرفته است. ولی هرچند با تردید حاوی نتایج بسیار با ارزشی است.

آنزیم پراکسیداز، از آنزیم‌های شناخته شده در پروسه نهایی سنتز لیگنین می‌باشد. پژوهش در دو فصل مختلف سال (پاییز و زمستان)، همزمان، فعالیت پراکسیدازی و مقدار لیگنینی شدن را مطالعه نموده است. نواحی نمونه‌برداری در این تحقیق شامل مناطق گربایگان (فارس)، هفت تپه، کارون (خوزستان) و مازندران بوده است. این پژوهش تنها روی ۶ پایه درختی نواحی هفت تپه و کارون از استان خوزستان به‌طور کامل انجام گرفته است.

مقدار لیگنین‌سازی و همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان مبتنی بر نوع گونه، محل نمونه‌برداری، فصل نمونه‌برداری و طبیعتا زیربنای ژنتیکی پایه‌هاست. باتوجه به ثبوت نوع گونه و فصل نمونه‌برداری، عوامل متغییر دراین پژوهش شامل محل نمونه‌برداری و زیربنای ژنتیکی درختان است. دو منطقه هفت تپه و کارون هر دو متعلق به استان خوزستان و از نظر شرایط اقلیمی و بستر کاشت تقریبا مشابه می‌باشند. ضمنا در دو منطقه هفت تپه و کارون هر یک ۳ تکرار درختی داشته‌ایم. در این تکرار با تغییرات مقدار لیگنین‌سازی محدود، ولی تغییرات کمی آنزیم پراکسیداز، دامنه بسیار وسیعی داشته است.

مطالعات الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز نیز معرف تنوع ژنتیکی زیاد پایه‌های تحت بررسی است. آنزیم پراکسیداز چهارپایه درختی منطقه گربایگان، سه پایه هفت تپه و سه پایه کارون در فصل پاییز بسیار متغیر بوده، بنحوی که حدبیشتر فعالیت پراکسیدازی ۱۴۵×۱۰^{-۳} و حداقل آن رقم $۶/۶۷\times۱۰^{-۳}$ بوده است. تکرار پراکسیداز از ۶ پایه برداشت شده در فصل زمستان ۵۰درصد کاهش فعالیت و ۵۰درصد

افزایش فعالیت پراکسیداز زمستان را نسبت به پاییز معرفی نموده است.

پژوهش‌های انجام شده ثابت کرده است که ایزوآنزیم‌های آندی پراکسیداز معرف محل لیگنین‌سازی می‌باشند و این ایزوآنزیم‌ها در ۸ مورد از ۹ مورد مطالعاتی، در فصل پاییز ظاهر و در زمستان ناپدید شده‌اند.

و بالاخره مجموعا در ۶ پایه مطالعاتی در مناطق هفت تپه و کارون در دو فصل پاییز و زمستان متوسط مقدار لیگنین ۲۴/۵درصد در برابر متوسط فعالیت پراکسیداز ۷۳×۱۰^{-۳} در فصل پاییز و زمستان متوسط مقدار لیگنین ۲۳/۵درصد در برابر ۲۳/۵درصد دربرابر متوسط فعالیت پراکسیداز ۵۹×۱۰^{-۳} در فصل زمستان قرار گرفته است.

نتایج این تحقیقات به‌خوبی رابطه لیگنین سازی را با تغییرات آنزیم پراکسیداز از نظر کمی و کیفی هرچند در تکرارهای معدود و زمان نمونه‌برداری محدود در گونه اکالیپتوس کاملدولنسیس به‌خوبی معلوم کرده است.

منابع

1-Ebermann, R., Korori, S.A.A. and Lickl, E. 1991. Temperature Dependent Alteration of Peroxidase and Amylase Isoenzymes in Quercus Robur. Phyton 31:121-128.

2-Gaspar, Th., Penel, C.C., Castukki F.J. and Greppin, H. 1985. A Two Step Control of Basic and Acidic Peroxidase and Its Sighificance for Growth and Development. Physiol. Plant. 64:418-423.

3-Gaspar, Th., Penel C., Thorpe A, and Grepping h.1982. A Survey of Their Biochemical and Physiological Rolesf Higher Plants Peroxidase 1970-1980.Univ. Geneva, Centre do Botanique. Geneva 324pp.

4-Hepler P.K., Fosket. D.E. and Newcomb, E.M. 1970. Lignification During Secondary Wall Formation in Coleus: An Electron Microscope Study A.m. J.Bot. 57, 85-96.

5-Higuchi. T. 1982. Biosynthesis of Lignin in Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (ed. T. Higuch), Academic press.

6-Saka, S. and Goring D.A., I, 1985. Localization of Lignins in Wood Cell Walls in Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (ed. T. Higuch), Academic Press. Orlando. PP.51-62.

Enzymatic Studies as Related to Wood Production in *Eucalyptus Camaldulensis* Dehn.

N. Toghraie[1] D. Parsapajouh[2] A.Hosseinzadeh[3] S.A.A Kororí[4]

Abstract

To make a primary investigation of lignin content variation as related to content of peroxidase enzyme in different seasons and in different sites, samples were taken in four regions, and during two seasons, of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) trees.

Qualitative and quantitative survey was done by employing PAGE and spectrophotometry methods. The Content of Klason lignin was determined using extractive free wood sawdust.

The results show that peroxidase isoenzyme patterns change depending upon region and season. This can be speculated as a part of tree physiological change, preparing to resist against cold. It was also observed that there are differences among ecological regions as well as among trees in the same region. Based upon the genetics of the trees, lignin content in Khuzistan region decreases in winter and so does enzyme activity. Lignin content was directly related to branch diameter as well as enzyme activity.

Keywords: Lignin, Peroxidase, PAGE, Lignification, Eucalyptus Camaldulensis

[1] -*Ph.D Student, Wood and Paper Science and Industries University of Tehran(E-mail: ntoghrai@motahari.ut.ac.ir)*

[2] -*Professor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran.*

[3] -*Staff Member, Forests and Rangelands Research Institute*

[4] - *Staff Member, Forests and Rangelands Research Institute*