

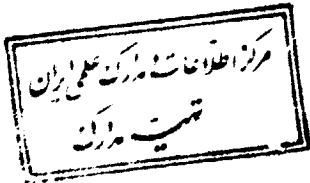
بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

۱۲۲۸۵

۱۶ / ۷ / ۱۳۷۶

دانشگاه تهران

دانشکده علوم



پایان نامه:

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته
زیست شناسی (علوم گیاهی)

عنوان:

کشت بافت و بررسی اثر عوامل محیطی بر متابولیسم فرآورده‌های ثانوی و
تغییرات کمی و کیفی پروتئینی، ایزوآنزیمی پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز
در ارس *Juniperus spp.*

استاد راهنما:

دکتر حسن ابراهیم‌زاده معبود

اساتید مشاور:

دکتر سودابه علی احمد کروری دکتر مهدی میرزا

نگارش:

پروین صالحی شانجانی

سال ۱۳۷۵

02284

۱۳۲۸۵

تقديم به پدر و مادر عزيزم

این پایان نامه با مساعدت های دفتر طرح و
برنامه ریزی جهاد سازندگی انجام گرفته است

سپاس خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است

و بشکراندرش مزید نعمت

در آغاز از استاد گرامی آقای دکتر حسن ابراهیم زاده که در کلیه مراحل شکل گیری پایان نامه مرا راهنمایی نمودند تشکر می نمایم. صمیمانه ترین سپاسگزاری ها را به خانم دکتر سودابه علی احمد کروری که پذیرای زحمات بیشماری در راهنمایی و اجرای این پایان نامه بوده اند ابراز داشته و از آقای دکتر مهدی میرزا که مرا در طی انجام این پایان نامه یاری نمودند تشکر می نمایم.

علاوه بر این:

از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که امکانات لازم جهت ارائه این پایان نامه را فراهم کرده اند

از آقای مهندس مصطفی خوشنویس که در تهیه تصاویر پایان نامه قبول زحمت نمودند

از خانم لطیفه احمدی، نوشین طفرایی، کامیار صالحی، خسرو ثاقب طالبی، افسانه تیموری و پروانه صالحی شانجانی

از همکاران گروه اکوفیزیولوژی خانم مریم تیموری، فاطمه معقولی، مریم جبلی، محمد متینی زاده

و از تمام کسانی که به نحوی در به پایان رساندن این پایان نامه مرا یاری نموده اند تشکر و قدردانی می نمایم.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	۱- پیشگفتار و هدف
۳	۲- چکیده
	فصل اول: مقدمه
۶	۱-۱) بوم شناختی ارس
۶	۱-۱-۱) ویژگی گیاه شناسی
۱۲	۱-۱-۲) ویژگی خاص در رده بندی ارس
۱۳	۱-۱-۳) موقعیت منطقه مورد بررسی
۱۳	۱-۱-۳-۱) وضعیت جغرافیایی
۱۵	۱-۱-۳-۱) وضعیت آب و هوایی
۱۶	۱-۱-۳-۳) وضعیت زمین شناسی
۱۶	۱-۱-۳-۴) وضعیت خاک
۱۸	۱-۲) فراورده های ثانوی
۱۸	۱-۲-۱) اسانسها
۲۴	۱-۲-۲) بیوسنتز اسانسها
۲۴	۱-۲-۲-۱) ترپنوئیدها
۲۶	۱-۲-۲-۲) فنیل پروپانوئیدها
۲۸	۱-۲-۳) طبقه بندی اسانسها بر اساس عوامل شیمیائی
۳۱	۱-۲-۴) اهمیت اسانسها در کموتاکسونومی
۳۳	۱-۲-۵) اثر عوامل مختلف روی اسانس در گیاهان
۳۸	۱-۲-۶) نقش حفاظتی و دفاعی اسانسها

صفحه	عنوان
۳۹	۱-۲-۷ رزین ها
۴۰	۱-۲-۸ روشهای فیزیکی و شیمیائی تجزیه اسانسها
۴۲	۱-۳ پراکسیدازها
۴۲	۱-۳-۱ نشانونیژگیهای عمومی
۴۸	۱-۳-۲ آسکوربات پراکسیدازها در گیاهان
۵۱	۱-۳-۳ جایگاه پراکسیدازها در دیواره سلولی
۵۴	۱-۳-۴ نقش پراکسیدازها در کنترل رشد سلول گیاهی
۵۵	۱-۳-۵ پراکسیدازهای گیاهی و تمایز سلولی
۵۶	۱-۳-۶ پراکسیدازهای و تنش
۵۷	۱-۳-۶-۱ دمای سرد
۵۹	۱-۳-۶-۲ ایجاد زخم
۶۰	۱-۳-۶-۳ فلزات سنگین
۶۱	۱-۳-۶-۴ تنش نمک
۶۱	۱-۳-۶-۵ آلابنده های هوا
۶۲	۱-۳-۶-۶ پاتوزنها
۶۴	۱-۴ پلی فنل اکسیدازها
۶۴	۱-۴-۱ نشانونیژگی های عمومی
۶۶	۱-۴-۲ فرا ساختمان آنزیم پلی فنل اکسیداز
۷۰	۱-۴-۳ ویژگیهای تسریع کنندگی آنزیم
۷۵	۱-۴-۴ نقش فیزیولوژیکی آنزیم در گیاهان
۷۵	۱-۴-۴-۱ عوامل بیماری زا و آنزیم (های) پلی فنل اکسیداز در گیاهان
۷۷	۱-۴-۴-۲ اثر کاتکول اکسیداز بر رشد و نمو

صفحه	عنوان
۷۸	۱-۴-۴-۳ سایر اعمال آنزیم
۷۸	۱-۴-۴-۳-۱ اعمال آنزیم در موجود زنده
۸۰	۱-۴-۴-۳-۲ اعمال آنزیم در خارج موجود زنده
۸۱	۱-۴-۵ روشهای جلوگیری از عمل قهوه‌ای شدن، آنزیمی یا غیر آنزیمی

فصل دوم: مواد و روشها

۸۳	۱-۲ منابع گیاهی مورد استفاده
۸۴	۲-۲ روش بررسی فرآورده‌های ثانوی
۸۴	۲-۲-۱ استخراج اسانس
۸۵	۲-۲-۲ شناسائی اسانسها به کمک GC/MS
۸۷	۲-۲-۳ جمع آوری اولئورزین
۸۷	۲-۲-۴ روش بررسی مقطع عرضی چوب
۸۷	۲-۲-۴-۱ مراحل مقطع‌گیری
۸۹	۲-۲-۴-۲ مراحل رنگ آمیزی
۸۹	۲-۲-۴-۳ مراحل تثبیت روی لام و لامل
۹۰	۲-۳ روش مطالعه پروتئینی و آنزیمی
۹۰	۲-۳-۱ روش استخراج آنزیم و پروتئین
۹۰	۲-۳-۲ روش تهیه محلول عصاره‌گیری
۹۱	۲-۳-۳ الکتروفورز به روش PEGE
۹۱	۲-۳-۴ طرز تهیه ژل تحرک ملکولها
۹۱	۲-۳-۵ طرز تهیه ژل سفید
۹۱	۲-۳-۶ نحوه درست کردن محلول الکترولیت
۹۲	۲-۳-۷ نحوه آماده کردن ژل الکتروفورز طبق روش کروری

عنوان	صفحه
نحوه آماده کردن محلول آمونیوم پرسولفات	۹۲
بررسی آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارس	۹۲
روش ظهور پلی فنل اکسیدازها روی ژل پلی اکریل آمید	۹۳
بررسی آنزیم پراکسیداز در ارس	۹۳
روش ظهور پراکسیداز بر روی ژل	۹۴
دانسیتومتری نوارهای آنزیمی در ژل پلی اکریل آمید	۹۴
سنجش میزان پروتئین	۹۵
کشت بافت ارس	۹۷
طرز تهیه محیط MS	۹۹
طرز تهیه هورمونها	۱۰۱
طرز تهیه محیط کشت تغییر یافته MS	۱۰۲

فصل سوم: نتایج

نتایج حاصل از بررسی اسانس	۱۰۴
میزان تولید اسانس در طول سال	۱۰۴
شناسائی اجزای تشکیل دهنده اسانس	۱۰۶
نتایج مطالعات کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و	۱۵۸
تغییرات کمی فعالیت پراکسیداز در فصول مختلف	۱۵۸
بررسی کیفی آنزیم پراکسیداز در ارس	۱۶۲
تغییرات کمی فعالیت پلی فنل اکسیداز در فصول مختلف	۲۱۱
بررسی کیفی آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارس	۲۱۵
تغییرات پروتئینهای محلول در فصول مختلف	۲۵۶
مقایسه تغییرات فصلی پروتئینهای محلول، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز	۲۵۹

صفحه	عنوان
۲۶۹	۳-۳ نتایج حاصل از کشت بافت
۲۶۹	۳-۳-۱ کالزایی در تیمارهای متفاوت محیط پایه MS
۲۶۹	۳-۳-۱-۱ تأثیر اکسینها
۲۶۹	۳-۳-۱-۲ اثر اکسینها و سینوکینینها
۲۸۹	۳-۳-۲ کالزایی سرشاخه‌های سبز نهالهای چند ساله ارس
۳۰۱	۳-۳-۳ اندام‌زایی
فصل چهار: بحث در نتایج	
۳۰۸	۴-۱ تولید اسانس
۳۱۰	۴-۲ مقایسه اجزای تشکیل دهنده اسانس در پایه‌های مختلف
۳۱۲	۴-۳ تغییرات فصلی اسانس و اجزای آن
۳۱۴	۴-۴ مطالعه اثر خشکانیدن نمونه روی اجزای اسانس
۳۱۵	۴-۵ مطالعه مقطع عرضی چوب از نظر تولید رزین
۳۱۵	۴-۶ فعالیت پراکسیداز در شاخه و سرشاخه سبز
۳۲۰	۴-۷ فعالیت پلی فنل اکسیداز در شاخه و سرشاخه‌های سبز
۳۲۲	۴-۸ فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در مخروط نر
۳۲۲	۴-۹ فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در مخروط ماده
۳۲۳	۴-۱۰ تغییرات فصلی پروتئینهای محلول
۳۲۴	۴-۱۱ ویژگی سیستماتیک گیاه مورد مطالعه
۳۲۶	۴-۱۲ کشت بافت
۳۲۸	۴-۱۳ اندام‌زایی
۳۲۹	ضمیمه
۳۵۸	منابع
۳۷۲	چکیده انگلیسی

پیشگفتار

منابع طبیعی هر جامعه، ثروتی است که فقط به نسل حاضر تعلق ندارد بلکه میراثی است که باید برای آیندگان حفظ شود. امروزه یکی از مشکلات محیط زیست از بین رفتن منابع طبیعی از جمله جنگلها و مراتع است. جنگلها و مراتع عامل اصلی حفاظت خاک، تغذیه دام و طیور، طراوت و پاکیزگی هوا، تنظیم رطوبت و نفوذپذیری آب، زیستگاه حیوانات و گیاهان و زیبایی و چشم‌نوازی محیط می‌باشد.

حدود نیمی از جنگلهای جهان در مناطق کوهستانی واقع شده است. خاک و پوشش گیاهی در چرخه زیست‌محیطی کوهستان از ارزش بسیار والاتری نسبت به مناطق گرمتر و کم‌شیب‌تر نواحی پست برخوردار می‌باشد و به دلیل شرایط خاص حاکم بر محیط، نظیر پایین بودن دما، برای تولید یک سانتیمتر مکعب خاک یا رشد هر بوته و گیاه، زمانی به میزان چندین ده برابر نسبت به پایین دست نیاز است و پوشش گیاهی و خاک (به علت جایگزین نشدن در کوتاه مدت) به حفاظت بیشتری نیاز دارند. در نواحی کوهستانی به دلیل تغییر سریع وضعیت حاکم بر محیط همراه با افزایش ارتفاع، کاهش دما، پایین آمدن فشار هوا، افزایش میزان اشعه ماوراء بنفش (به خاطر رقیق شدن هوا) و عوامل دیگر، تنها گیاهان و درختانی رشد می‌کنند که توان سازگاری با شرایط سخت موجود را داشته باشند. ارس به عنوان یکی از مقاومترین درختان به سرماهای شدید (بیش از ۴۰ درجه سانتیگراد زیر صفر) و خشکی، جایگاه ویژه‌ای در نواحی کوهستانی ایران دارد (۱۰۴). این گیاه از جمله درختانی است که می‌تواند در حفاظت خاک، جلوگیری از فرسایش و خطرات ناشی از سیل و بهمن نقش اساسی بازی کند. ارزش پوشش گیاهی در این نواحی علاوه بر حفاظت خاک در دامنه‌های پرشیب و جلوگیری از فرسایش، از نظر اقتصادی نیز درخور اهمیت است. فرسایش خاک در قسمتهایی که فاقد پوشش گیاهی هستند یا سپر سبز حفاظتی طبیعی خود را از دست داده‌اند دارای عوارض بسیار منفی می‌باشد بطوریکه باعث ورود خاکهای فرسایش یافته به رودخانه‌ها و افزایش غلظت و گل‌آلود شدن آب

شده نه تنها شرایط زندگی موجود در اکوسیستم آب و حیات ماهیان را مورد تهدید قرار می دهد بلکه عمر مفید سدها را کوتاه و میزان فرود سیل و بهمن را افزایش می دهد. بنا بر ضرورت احیای جنگلهای ارس ایران ، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع طرح مطالعات اکوفیزیولوژی ارس (با مسئولیت کروری) را تدوین نمود که بخشی از پژوهش حاضر از طرح فوق الگو گرفته است .

بنابراین در پایان نامه حاضر سعی براین است با مطالعه:

۱- اثر عوامل محیطی بر تغییرات کمی و کیفی پروتئینی، آنزیمی و ایزوآنزیمی

پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

۲- اثر عوامل محیطی بر تغییرات کمی و کیفی فراورده های ثانوی

۳- کشت بافت

گامی در جهت بررسی مقدماتی اکوفیزیولوژی، بیوشیمیایی و گیاه شناسی ارس

برداشته و راه را برای پژوهشهای بعدی بسوی احیای جنگلهای ارس باز نماییم.

چکیده:

در پژوهش حاضر اثر عوامل محیطی بر متابولیسم فراورده‌های ثانوی و تغییرات کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز بررسی شد. به‌علاوه کالزایی و اندام‌زایی سرشاخه‌های ارس نیز در تیمارهای مختلف غذایی و هورمونی مطالعه گردید.

برای بررسی تغییرات فصلی فراورده‌های ثانوی، سرشاخه‌های سبز و میوه‌های پایه‌های مختلف ارس، پس از تقطیر با بخار تجزیه گردید. نتایج نشان می‌دهند که میزان اسانس میوه‌های ارس ۲ برابر سرشاخه‌های سبز بوده α -pinen با میزان ۷۰٪ بیشترین ترکیب اسانس ارس را تشکیل می‌دهد و تغییرات فصلی هریک از اجزای تشکیل دهنده اسانس ارس بسیار متفاوت می‌باشد. اثر متفاوت خشکانیدن روی ترکیبهای تشکیل دهنده ارس ارزش کاربردی در جداسازی اجزای مختلف دارد.

برای بررسی تغییرات فصلی کمی و کیفی (ایزوآنزیمی) پروتئین، آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز از اندامهای مختلف شاخه، سرشاخه‌های سبز، مخروط نر و مخروط ماده پایه‌های مختلف نر، نرماده و ماده ارس استفاده گردید. علی‌رغم تفاوت‌های فردی در هریک از پایه‌ها، روند فعالیت هر آنزیم مشخص می‌باشد. اصولاً بیشترین فعالیت پراکسیداز در سرشاخه‌های سبز و شاخه‌های ارس در فصل بهار و پاییز و کمترین فعالیت آن در تابستان و زمستان می‌باشد. میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز سرشاخه‌های سبز، از شروع فصل رویشی افزایش می‌یابد و بیشترین مقدار آن در زمستان می‌باشد. فعالیت پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و پروتئینهای محلول مخروط نر در زمستان کاهش بسیار محسوس را نشان می‌دهد. مقایسه فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در طول تکامل مخروط ماده نشان می‌دهد که بیشینه فعالیت پلی فنل اکسیداز در مرحله اول نمو و بیشینه فعالیت پراکسیداز در مرحله دوم نمو است.

برای بررسی میزان کالزایی و اندام‌زایی از ترکیبهای مختلف هورمونی و غذایی استفاده گردید نتایج نشان می‌دهد که نوع ترکیب غذایی بیش از ترکیب هورمونی محیط بر روی

کالزایی و اندام زایی ارس اهمیت دارد، بطوری که هنگامی میزان ترکیب نیتروژنی محیط (MS) نصف می شود بیشترین کالزایی مشاهده می گردد. در این شرایط افزودن گلونامین باعث افزایش کالزایی می شود و وقتی که نیترات آمونیوم کاملاً از محیط حذف می گردد نه تنها رشد جوانه های جانبی اولیه بلکه تشکیل اندامهای نوپدید بصورت مستقیم از پهنک برگ و از کال حاصل می شود.

11

فصل اول - مقدمه