تعیین فعالیت آنزیم های پراکسیداز و نیترات ردوکتاز در گیاه *Thymus pubescens* Boiss.et kotschy et Celak.

فاطمه عسگری[1] و مه لقا قربانلی[2]

چکیده:

گیاه معطر *Thymus pubescens* Boiss.et kotschy et Celak. یکی از ۱٤ گونه آویشن موجود در ایران می باشد که پراکنش نسبتا وسیعی در شمال و غرب کشور دارد . جهت تعیین فعالیت آنزیم های پراکسیداز و نیترات ردوکتاز در شرایط مختلف اکولوژیک ، نمونه برداری از ۱۱ نقطه رویشی در٤ منطقه: دره لار ، دماوند ، سیراچال و فشم دراستان تهران و در دو مرحله رویشی (قبل از گلدهی) و گلدهی انجام شد .

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز دربرگ گیاهان ٤ منطقه با روش درزیوه (In vivo) تعیین شد . فعالیت آنزیم NR درگیاهان دره لار و سیراچال در مرحله گلدهی بیشتر ازمرحله رویشی بود . در گیاهان دماوند تغییرات متفاوتی در فعالیت آنزیم مشاهده شد و درگیاهان فشم فعالیت NR درمرحله گلدهی کمتر ازمرحله رویشی بود . گیاهان فشم در مرحله رویشی و گیاهان سیراچال در مرحله گلدهی فعالیت بیشتری نسبت به سایر مناطق نشان دادند . در مجموع گیاهان سیراچال و فشم (شمال غرب

---

[1] کارشناس ارشد موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

[2] عضو هیات علمی دانشگاه تربیت معلم

استان تهران) نسبت به گیاهان دره لار و دماوند (شرق استان تهران) فعالیت بیشتری نشان دادند .

فعالیت آنزیم پراکسیداز درگیاهان سیراچال و فشم و در دو مرحله رویشی و گلدهی پس از عصاره گیری با اندازه گیری میزان جذب آنها تعیین شد . فعالیت آنزیمی تمام نمونه ها در مرحله رویشی بیش از مرحله گلدهی بود . علاوه بر این ، گیاهان فشم نسبت به گیاهان سیراچال فعالیت آنزیمی بیشتری نشان دادند . افزایش فعالیت آنزیمی در مرحله رویشی نسبت به مرحله گلدهی ، بر اساس تحقیقات انجام شده ، می تواند به علت درجه حرارت کمتر در مرحله رویشی باشد .

واژه های کلیدی: آنزیم ، نیترات ردوکتاز ، پراکسیداز ، آویشن ، گلدهی ، رویشی

مقدمه:

مشخصات گیاهشناسی

Thymus pubescens "گونه ای آویشن کوهی" از رده دولپه ایها Dicotyledones زیررده پیوسته گلبرگها Gamopetales ، راسته Laminales ، تیره Labiatae است . اغلب نیمه بوته های کوتاه ، تقریبا چمنی ، با بن سخت وچوبی هستند .

ساقه در پایه چوبی ، پرشاخه ، باشاخه های افتاده-خیزان ، گاهی گسترده وخوابیده بسیارمنشعب ، با شاخه و شاخکهای عقیم وگلدار ، به طول ۸-۲ سانتیمتر ، خیزان یا ایستاده ، برگدار ، اغلب کرکدار ، علفی یادر پایه چوبی ، بامقطع چهارگوش است .

برگ تخم مرغی-سرنیزه ای یا بیضوی ، درقاعده کنجی و در راس نوک تیز ، درشاخه های گلدار به ابعاد ۳-۲/۳ × ۹-۶ میلیمتر ، ضخیم یاکم و بیش گوشتی ، تقریبا کمی ناوی و محدب ، یادرحاشیه تاشده ، بدون کرک یا کرکینه پوش ؛ غده ها بدون پایه ؛ رگبرگهای کناری دو زوج درحاشیه درهم شده و در راس بهم آمده است .

گل صورتی یا بنفش یاکمی متمایل به سفید ، اغلب مجتمع درگل آذین کپه مانند ؛ براکته ها سبز یا ارغوانی ، با لوله های نیمه استوانه ای ؛ لب فوقانی دارای دندانه های برابر ، دندانه های لب پایینی به طول ۱-۰/۷ میلیمتر ، زبر ، مژکدار ؛ جام به طول ۶-۵ میلیمتراست . موسم گل آن اردیبهشت تا خرداد ماه است (۶) .

انتشارجغرافیایی

شمال: کندوان ، گسل دره در دره هراز ، رودبار ، کوهین نزدیک منجیل آذربایجان: شلیل کوه نزدیک رزن ، خمسه ، بین زنجان وبیجار ، کوه انگوران ، تارم بین بیجار و دیواندره ، ارتفاعات حمزه عرب درجنوب شرقی بیجار

غرب: بین همدان و زنجان - بخش مرکزی: فریدن

البرز: تهران ، پلور ، شهرستانک ، رینه نزدیک لاریجان ، بین شمشک ودیزین ، آسمان ورک (۳)

سابقه تحقیق

با کاوشهای بعمل‌آمده در بانکهای اطلاعاتی کشاورزی و صنایع غذایی در مورد آنزیم های گونه *Thymus pubescens* ، هیچ گزارشی یافت نشد .

مناطق مورد بررسی

حوزه آبخیزسدلار

آبخیزلار بین عرض جغرافیایی ″۳۵ ، ′٤ ، °۳٦ و″٤۰ ، ′٤۸ ، °۳۵ و طول جغرافیایی ′۳۲ ، °۵۱ و′٤ ،° ۵۲ واقع گردیده است . این حوزه مرتفع ترین آبخیز ایران بوده (حداقل ارتفاع ۲٤۰۰ متر در محل احداث سد و حداکثر ۵٦۷۰ متردر قله دماوند) و اوضاع طبیعی و اکولوژیکی خاصی دارد . به علت کوهستانی بودن منطقه (باشیب زیاد) دسترسی به تمام نقاط حوزه به سهولت امکان پذیرنیست . حوزه آبخیز

سدلار در شمال شرقی تهران و در دامنه جنوبی البرز قرارگرفته است به همین علت موقعیت آب وهوایی آن تحت تاثیر البرز است .

به طورکلی بارندگی تا ارتفاع ۳۰۰۰ متر در دامنه های شمالی ۳۷۰ میلیمتر و در دامنه های جنوبی این مقدار۲۰۰ میلیمتر است . در مقیاس جهانی به نحو عمده جزء منطقه خشک و نیمه خشک محسوب می گردد . این منطقه دارای آب وهوای ناحیه کوهستانی سرد با زمستانهای طولانی سرد ، فصل یخبندان زیاد و تابستانهای خنک و مرطوب است (٤) .

بر اساس آمارهای هواشناسی گرمترین ماه سال تیرماه با میانگین درجه حرارت ۱۸/۱۷°C و سردترین ماه سال دی ماه با میانگین درجه حرارت ۵/٤۵°C- می باشد . حداقل درجه حرارت ٤۰°C- دردی ماه و حداکثردرجه حرارت ٤۲°C مربوط به تیرماه می باشد .

واحد اراضی کوهستانها با خاک بسیارکم عمق تا کم عمق و در بعضی قسمتها نیمه عمیق همراه مقدار بسیار زیاد سنگریزه و آهکی است . PH خاک از ٦/۸ تا۷/۲ متغیر می باشد . قابلیت هدایت الکتریکی خاک بین ۰/۳۱ تا ۰/۵۱میلی موز برسانتیمتر متغیر می باشد(٤) .

دماوند

یکی از مناطق مورد مطالعه ، روستایی دربخش مرکزی شهرستان دماوند می باشد . روستای آرو میان کوهی سرد وخشک است . طول جغرافیایی آن ′۲٤ °۵۲ ، عرض جغرافیایی ′٤۰ °۳۵ و ارتفاع آن ۲۳٤۰ متر می باشد . بیشترین درجه حرارت

درتابستانها ۲۷°C و کمترین درجه حرارت در زمستانها ۲۷°C- می باشد . میزان بارندگی سالانه به طور میانگین ۳۵۰ میلیمتر است (۲) .

سیراچال

این منطقه در ٤٠ کیلومتری شمال کرج درمسیرجاده کرج _ چالوس قرار دارد . عرض جغرافیایی آن بین ′۵۹ ، °۳۵ الی ′۰۳ ، °۳٦ و طول جغرافیایی آن بین ′۰۸ ، °۵۱ الی ′۱۳ ،°۵۱ می باشد . منطقه کوهستانی است و وسعت آن حدود ۱۵۰۰ هکتار می باشد .

خاک منطقه را می توان خاکهای کوهستانی نامید که بر روی اراضی باشیب زیاد و مرتفع قرار دارند . با توجه به ارتفاع از سطح دریا ، مراحل تکمیل و دگرگونی خاک متغیر و غیریکنواخت بوده و عامل بارندگی و درجه حرارت در تغییر و تحول آنها دخالت دارند . خاک بیشتر جاها در اثر فرسایش ازبین رفته و سنگ مادر در آن ظاهر گشته و گاهی نیز متلاشی گردیده است (۱) .

فشم

طول جغرافیایی آن ′۳۲ ، °۵۱ ، عرض جغرافیایی ′۵٦ ، °۳۵ و ارتفاع بخش فشم ۱۹۳۰ متر است . رودخانه جاجرود که از رشته کوههای البرز مرکزی سرچشمه می گیرد ، از میان این بخش می گذرد . اطراف و پیرامون فشم را کوههای بهم پیوسته و مرتفع سلسله جبال البرز مرکزی احاطه نموده اند .

آب وهوای فشم سردسیر بوده ، بیشترین درجه حرارت در تابستانها ۲۰°C و کمترین درجه حرارت در زمستانها۲۵°C- می باشد . میزان بارندگی سالیانه به طور میانگین ٤۰۰ میلیمتر بوده و بیشتر نزولات آسمانی به صورت برف است (۲) .

روشهای مطالعه فعالیت نیترات ردوکتازی:

۱- روشهای درشیشه (In vitro)

دراین روشها که به طورگسترده ای توسط پژوهشگران دهه های ۶۰ و۷۰ مورد استفاده قرارگرفته اند و کاربردآنها هنوز هم ادامه دارد مراحل زیر به چشم می خورد (۵۱ ، ۵۷ ، ۵۸ ، ۶۹ ، ۸۰ ، ۸۱):

- انتخاب گیاه یا اندام گیاهی .
- استخراج آنزیم از گیاه یا اندام گیاهی .
- استخراج آنزیم ازگیاه با بکارگیری سانتریفوژ دوربالا .
- بکارگیری ATP ، پیریدین نوکلئوتیدهای احیاء شده و نیزیونها و عوامل بهم پیوسته لازم دیگرکه شرایط فعالیت آنزیم را فراهم نمایند .
- کنترل حالت اسیدی-قلیایی محیط ، دما ، فشار و اکسیژن آن
- ازبین بردن موادی که به آنزیم نیترات ردوکتاز می چسبند و مانع فعالیت آن می گردند مانند فنلها و ترکیبهای مشابه آنها و یا ترکیبهای پروتئینی . این امر ممکن است به ویژه در محیط استخراج آنزیم روی دهد .
- جلوگیری ازعمل پروتئازهایی که ضمن استخراج آنزیم از درون جایگاههای خود در سلولها جدا شده و آنزیم را تخریب می نمایند .
- اندازه گیری فعالیت نیترات ردوکتازی با استفاده از رنگ سنجی و برآورد مقدار نیتریت تولیدشده در واحد زمان .

۲- روشهای درزیوه (In vivo) :

دراین روشها بدون نیاز به استخراج آنزیم و تخلیص آن ، همچنین بدون نیاز به استفاده از ناقلین پروتون و الکترون ، ATP و دیگرموادلازم برای فعالیت آنزیم درشرایط برون سلولی ، از اندامها و محتویات آنها که موارد یادشده را نیزدربر می گیرند ، استفاده می شود .

ازاین روشها به ویژه در دهه های ۷۰ ، ۸۰ و ۹۰ (٦٤ ، ۷۳) ، استفاده گردیده است . به طورخلاصه می توان مراحل زیر را در بررسیهای درزیوه تشخیص داد :

-انتخاب گیاه یا اندام مورد مطالعه .

-قراردادن آن در محلولی مانند الکل ، استن یا اتر ، برای برهم زدن ساختارغشاهای سلولی و کمک به آسان شدن ورود وخروج نیترات و نیتریت .

-تنظیم حالت اسیدی-قلیایی (بکارگیری تامپونها) ، دما ، نور و اکسیژن .

-برآورد فعالیت نیترات ردوکتازی از روی مقدار نیتریت تولید و رهاشده به خارج از اندام توسط رنگ سنجی .

بکاربردن گیاهان کامل برای بررسی روندجذب و همگون شدن نیترات

۳- روشهای درسیبه (In situ) :

این شیوه نیز دردهه های ۷۰ و۸۰ (۲٦ ، ۲۷ ، ۲۸ ، ۳۸ ، ۸۲) به چشم می خورد .

این روش را می توان شامل مراحل زیر دانست:

-اندازه گیری مقدارنیترات جذب شده توسط گیاه از روی مقدارنیتراتی که پس از مدت زمان معلوم ، در محلول غذایی ناپدید می گردد .

-اندازه گیری مقدارنیترات درون گیاه .

-تخمین فعالیت نیترات ردوکتازی کل گیاه (یایک اندام) از تفاضل مقدار نیترات انباشته شده درگیاه از مقدار نیترات جذب شده توسط آن .

خاطرنشان می گردد که اندازه گیری فعالیت نیترات ردوکتازی توسط هریک از سه روش یاد شده امتیازات و معایبی دارد که در زیربه آنها اشاره می شود :

-در روش درشیشه هرچند می توان عوامل مختلف را بدون واسطه برآنزیم و فعالیت آن اثرداد ولی نمی توان مطمئن بودکه این عوامل دردرون گیاه شناسایی و قابل بکارگیری درشرایط برون سلولی شده اند . ازسوی دیگرفعالیت نیترات ردوکتازی دراین حالت چندین برابرفعالیت در شرایط درون سلولی است (حدود۱۰برابر) . بنابراین اعداد بدست آمده بیشتراز نظرمقایسه شرایط مختلف قابل قبول هستند .

-در روش درزیوه ، ضمن اینکه کارآسانتر انجام می پذیرد ، اعداد بدست آمده در مقایسه با روش درشیشه قابل اعتمادتر هستند ، هرچندممکن است نسبت به روش درسیبه ۳ یا ٤ برابر بیشتر باشند . به ویژه به این دلیل که هریک از اندامها به طور مستقیم با نیترات محیط تماس می یابند . درحالی که درشرایط طبیعی ممکن است تنها ریشه ، با آن مقدار نیترات در تماس باشد و چگونگی دریافت نیترات توسط هر اندام متفاوت باشد . بااین حال این روش در مقایسه های نسبی ارزشمنداست .

-در روش استفاده ازگیاهان کامل ، می توان به واقعی بودن اعداداعتماد زیادی داشت ، بااین حال بااین روش نمی توان فعالیت اندامهای گوناگون را با دقتی که بسیار بهتراز روش درزیوه باشد برآورد نمود . ویژگی مهم این روش آن است که همراه باآگاهی

ازچگونگی تغییرات احیاء نیترات می توان تغییرات جذب و انباشتگی را نیز درنظرگرفت . بنابراین بااین روش درک بهتری از چگونگی تغییر روند جذب و همگون شدن نیترات به عنوان یک مجموعه فراگیرحاصل می شود .

خاطرنشان می گردد که اشکال مهم این روش غیرقابل استفاده بودن آن درموردگیاهان درختی و بزرگ است . درچنین مواردی روشهای درشیشه و درزیوه کارآیی دارند . علاوه بر این ، استفاده از N نشاندار نیز چه درگیاهان علفی و چه درگیاهان درختی می تواند نه تنهادرمطالعه روند جذب و همگون شدن نیترات درکل گیاه ، بلکه درچگونگی جایگیری آن در اندامهای سلولی نیزکاربرد داشته باشد (۷٤ ، ۷۵ ، ۷٦) .

روش کار:

منابع گیاهی مورد استفاده

منابع گیاهی استفاده شده در این طرح شامل برگهای گیاه *T. pubescens* بود که در دو مرحله قبل از گلدهی (تصویر شماره ۱) و گلدهی (تصویر شماره ۲) از رویشگاههای مختلف در چهار منطقه در استان تهران (دره لار ، دماوند ، سیراچال و فشم) به منظور تعیین فعالیت آنزیم های پراکسیداز و نیترات ردوکتاز جمع آوری گردید . نمونه ها بلافاصله پس از جمع‌آوری در سرما نگهداری شده و به سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند . لازم به ذکر است که همراه هرجمع‌آوری ،

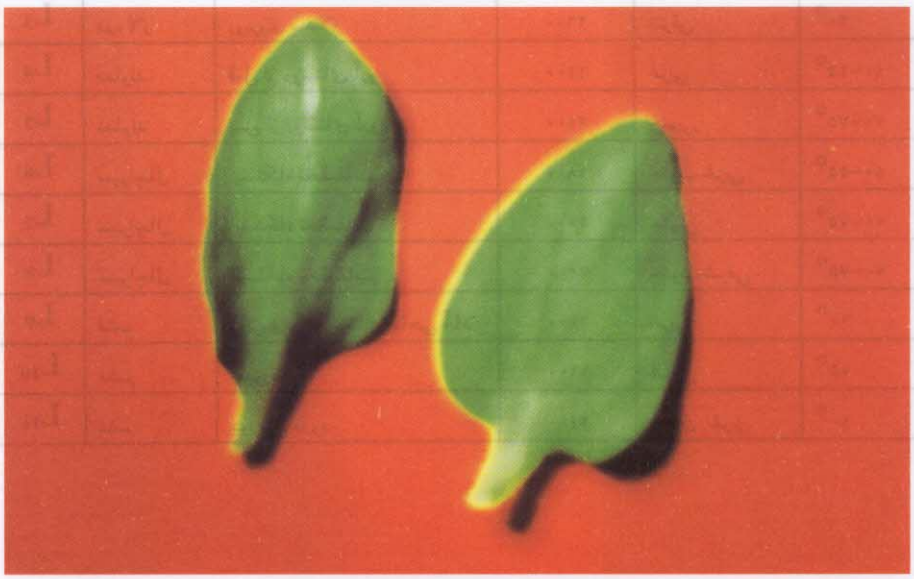
نمونه ای نیز جهت شناسایی و صحت گونه برداشت شده به بخش گیاهشناسی ارسال شد (تصاویر شماره ۳ و ٤).

تصویر شماره ۱- گیاه ***Thymus pubescens*** درمرحله قبل ازگلدهی

پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه عملیات آماده سازی ، شامل جداکردن خاروخاشاک ، پاک کردن گیاه و خردکردن آن انجام شده و روشهای آزمایشگاهی در مورد آنان اعمال شد .

تصویر شماره ۲- گیاه ***Thymus pubescens*** در مرحله گلدهی

تصویر شماره ۳- گل گیاه ***Thymus pubescens***



تصویر شماره ٤- برگ گیاه ***Thymus pubescens***

نمونه های گیاهی از ۱۱ محل رویش در٤ منطقه استان تهران : دره لار ، دماوند ، سیراچال و فشم با ویژگیهای اکولوژیکی مختلف جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند . آمار هواشناسی مناطق مورد بررسی از نزدیکترین ایستگاههای هواشناسی دریافت شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت .

جدول شماره ۱- ویژگی مناطق نمونه برداری شده

کد	منطقه	آدرس	ارتفاع (متر)	جهت شیب	درصدشیب
L_1	دره لار	بعد از روستای آبعلی	۲٤۰۰	جنوبی	٤۰-٤٥°
L_2	دره لار	کنار ایستگاه آب وهواشناسی	۲۲۰۰	شرقی	۱۰°
L_3	دره لار	روبروی سدلار	۲٦۰۰	شرقی	۲۰°
L_4	دماوند	قبل از روستای آرو	۲۲۰۰	غربی	٤۰-٤٥°
L_5	دماوند	پس از روستای آرو	۲٤۰۰	جنوبی	۷۰-۷٥°
L_6	سیراچال	ایستگاه تحقیقات	۱۸۰۰	جنوب غربی	٥۰-٥٥°
L_7	سیراچال	ایستگاه تحقیقات	۲۰۰۰	جنوبی	۷۰-۷٥°
L_8	سیراچال	ایستگاه تحقیقات	۲۲۰۰	جنوب شرقی	۷۰-۷٥°
L_9	فشم	روبروی راهدارخانه حاجی آباد	۱۸۰۰	غربی	٦۰°
L_{10}	فشم	جیرود	۲۲۰۰	شرقی	۷٥°
L_{11}	فشم	دوراهی درود	۲٤۰۰	شمال غربی	۹۰°

۱- اندازه گیری فعالیت نیترات ردوکتازی در برگ به روش درزیوه (۱۱):

- یافتن وزن تر اندام موردنظر
- خردکردن اندام به ابعاد ۳-۲ میلیمتر
- حل کردن ۰/۵ گرم اسیدسولفانیلیک $4\text{-}(NH_2)C_6H_4SO_3H$ در۵۰ میلی لیتر اسیداستیک CH_3COOH و رساندن حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر (محلول گریس I)
- حل کردن ۰/۲ گرم آلفانفتیلامین $C_{10}HGN$ در۵۰ میلی لیتر اسیداستیک و رساندن حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر (محلول گریس II)
- تهیه مخلوط پتاسیم منوهیدروژن فسفات HK_2O_4P و پتاسیم دی هیدروژن فسفات H_2KO_4P N/10 به نسبت حجمی ۱:۷ (تامپون فسفات)
- تهیه ۵ میلی لیتر محلولی که غلظت نیترات پتاسیم KNO_3 درآن ۱۵۰ میلی مولار، پروپانول ۳٪ حجمی و تامپون فسفات ۱۰۰ میلی مولار باشد(محلول انکوباسیون) وریختن آن دریک لوله آزمایش.
- قراردادن نمونه گیاهی در محلول انکوباسیون
- خروج هوا با استفاده از گاز نیتروژن و بستن دهانه لوله با در پلاستیکی.
- قراردادن لوله در آون در دمای ۳۰°C و در تاریکی به مدت یک ساعت.
- بیرون آوردن لوله ها از آون و صاف کردن محلول
- برداشت ۲ میلی لیتر از محلول بالا و به ترتیب افزودن ۱ میلی لیتر از گریس I و محلول گریس II و خواندن جذب آن در۵۲۰ نانومتر
- غلظت نیتریت حاصل از احیاء نیترات را از روی جذب خوانده و به کمک منحنی استاندارد بدست آمده از نیتریت سدیم در غلظتهای گوناگون (c) بدست

می آوریم . خاطر نشان می گردد که محلولهای نیتریت سدیم نیز بامحلولهای گریس I و II به ترتیبی مانندخود نمونه مخلوط شدند .لازم به یادآوری است که میزان جذب نوری نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتری Hitachi مدل۳٤۰ اندازه گیری شد .

- پیدا کردن فعالیت نیترات ردوکتازی نمونه از روی مقدار نیتریت تولیدشده درساعت به ازای هرگرم ماده تر(A) ازرابطه زیر:

$$A = \frac{C \times 0.005}{W} (mM\ No_2^-\ .g^{-1}.h^{-1})$$

۲- روش سنجش فعالیت پراکسیداز:

الف) تهیه محلول عصاره گیری

۱- اسیداسکوربیک Ascorbic Acid ۲گرم

۲- پلی اتیلن گلیکول Polyethylenglycol ۵۰ گرم

۳- بوراکس Borax ۳/۸ گرم

٤- کلریدسدیم Nacl ۳/٦ گرم

۵- $EDTA - Na_2$ ۲ گرم

٦-تریس Tris ۱/۲ گرم

موارد فوق را با آب مقطربه حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

ب) روش عصاره گیری:

یک گرم نمونه مورد نظر را ساییده و با ۳ میلی لیتر محلول عصاره گیری مخلوط می کنیم. بعد در ظرف را بسته و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤°C نگهداری کرده، و بعد با ۱٤۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و از محلول رویی (قسمت شفاف) برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی استفاده می کنیم.

ج) تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه گیری فعالیت پراکسیدازها از معرفهای زیر استفاده می کنیم:

۱- تامپون استات ۰/۱ مولار PH=6 ۲میلی لیتر

۲- آب اکسیژنه ۳ H202 درصد ۰/٤ میلی لیتر

۳- بنزیدین (Nh2 C6 H64 C6 H4 NH2) ۰/۰۱ مولار ۰/۲ میلی لیتر

بلافاصله به مجموعه فوق ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی اضافه می شود ، و منحنی تغییرات جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری Hitachi مدل۳٤۰ تعیین شد .

نتایج :

۱- نتایج حاصل ازتعیین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

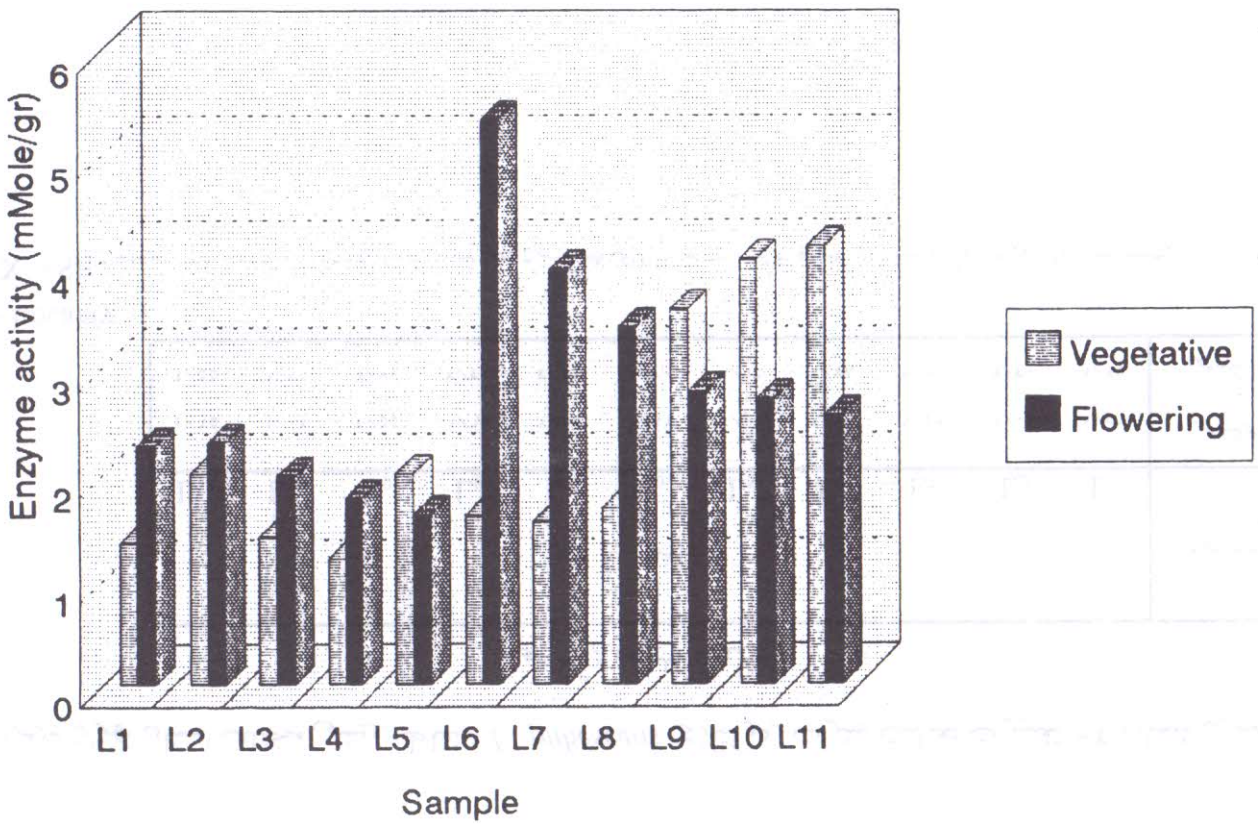
فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز درگیاهان ۱۱ نمونه از ٤ منطقه (دره لار ، دماوند ، سیراچال و فشم) بررسی شد . تغییرات فعالیت این آنزیم در جدول شماره ۵ آمده است . همچنین مقایسه تغییرات این آنزیم در دو مرحله قبل از گلدهی و گلدهی در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است . فعالیت آنزیم NR درگیاهان دره لار و سیراچال در مرحله گلدهی بیشتر ازمرحله رویشی بود . در گیاهان دماوند تغییرات متفاوتی در فعالیت آنزیم مشاهده شد و درگیاهان فشم فعالیت NR درمرحله گلدهی کمتر ازمرحله رویشی بود . در مرحله رویشی گیاهان فشم و در مرحله گلدهی گیاهان سیراچال فعالیت بیشتری نسبت به سایر مناطق نشان می دهند . در مجموع گیاهان سیراچال و فشم (شمال غرب استان تهران) نسبت به گیاهان دره لار و دماوند (شرق استان تهران) فعالیت بیشتری نشان دادند .

جدول شماره ۲- تغییرات فعالیت نیترات ردوکتازی *T. pubescens* ازنقاط رویشی مختلف استان تهران درمراحل قبل ازگلدهی وگلدهی

فعالیت آنزیم	مناطق										
	L_1	L_2	L_3	L_4	L_5	L_6	L_7	L_8	L_9	L_{10}	L_{11}
قبل ازگلدهی	۱/۳۶	۲/۰۱	۱/۴۲	۱/۲۱	۲/۰۱	۱/۶۱	۱/۵۵	۱/۶۸	۳/۵۵	٤/۰۲	٤/۱۵
پس ازگلدهی	۲/۲۷	۲/۳۰	۱/۹۹	۱/۷۸	۱/۶۳	۵/۳۰	۳/۹۲	۳/۳۹	۲/۷۷	۲/۷۱	۲/۵۵

L = Locality

فعالیت برحسب میلی مول نیترات احیاء شده به ازای هرگرم وزن تر اندام محاسبه شده است (X_+SE).



نمودار شماره ۱- تغییرات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ گیاه **Thymus pubescens** در مراحل قبل از گلدهی و گلدهی در مناطق مختلف استان تهران

۲- نتایج حاصل ازتعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز

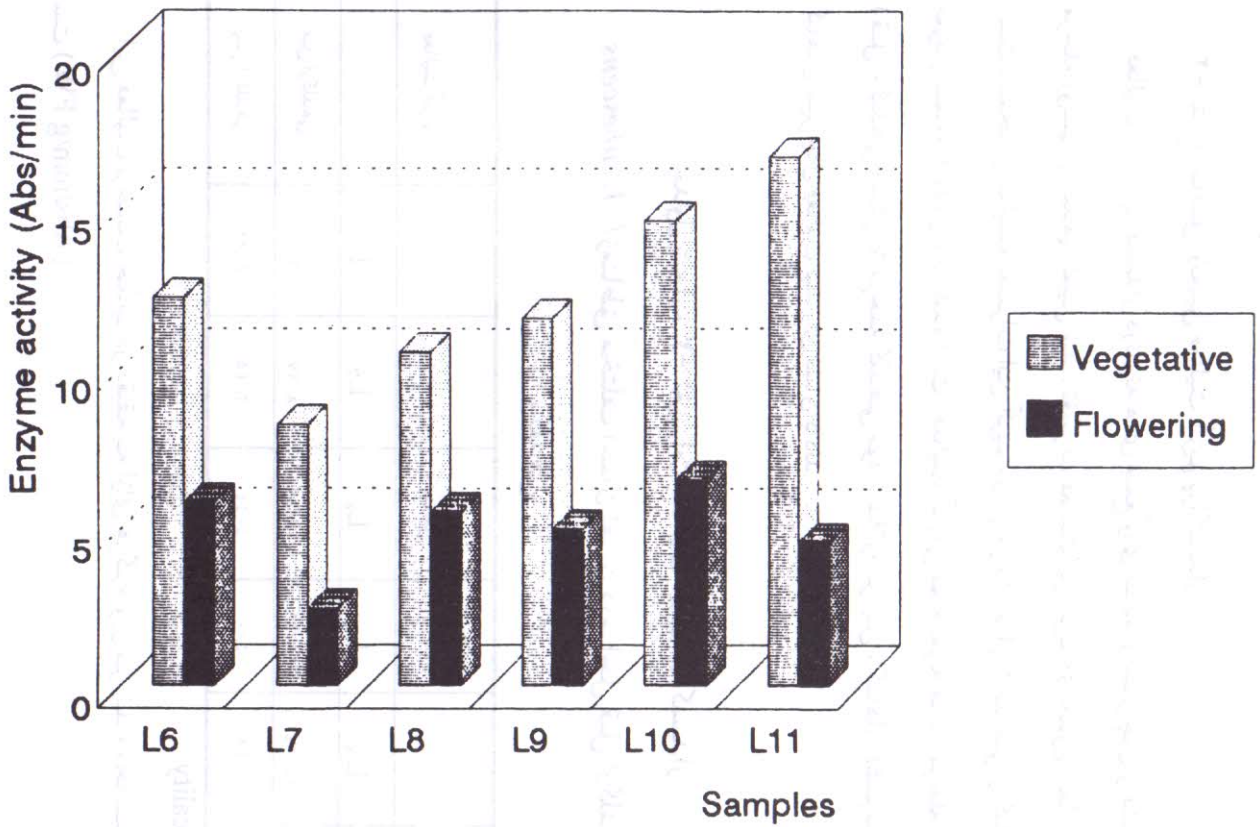
فعالیت آنزیم پراکسیداز درنمونه های جمع‌آوری شده از سیراچال و فشم در دو مرحله رویشی و گلدهی تعیین شد . تغییرات فعالیت این آنزیم در جدول شماره ۳ آمده است . همچنین مقایسه تغییرات این آنزیم در دو مرحله قبل از گلدهی و گلدهی در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است . فعالیت آنزیمی تمام نمونه ها در مرحله رویشی (قبل ازگلدهی) بیش از مرحله گلدهی بود . علاوه بر این ، گیاهان فشم نسبت به گیاهان سیراچال فعالیت بیشتری نشان دادند .

جدول شماره ۳- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز *T. ubescens* /زمناطق مختلف استان تهران درمراحل قبل ازگلدهی وگلدهی

فعالیت آنزیم			مناطق			
	L_6	L_7	L_8	L_9	L_{10}	L_{11}
قبل ازگلدهی	۱۲/۲۷	۸/۲۷	۱۰/۵۲	۱۱/۶۱	۱٤/٦٤	۱٦/٦۷
پس ازگلدهی	۵/۸۲	۲/٤۵	۵/۵٤	۵/۰	٦/۵۸	٤/۵۸

L = Locality

این فعالیت برحسب جذب در دقیقه به ازای هرگرم وزن تر اندام محاسبه شده است (Abs/min/g FW) .



نمودار شماره ۲- تغرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه **Thymus pubescens** در مراحل قبل از گلدهی و گلدهی در مناطق مختلف استان تهران

بحث

نیترات ردوکتاز

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز درگیاهان ٤ منطقه بررسی شد . با توجه به نمودار شماره ۱ فعالیت آنزیم NR درگیاهان دره لار و سیراچال در مرحله گلدهی بیشتر ازمرحله رویشی بود . در گیاهان دماوند تغییری در فعالیت آنزیم مشاهده نشد و درگیاهان فشم فعالیت NR درمرحله گلدهی کمتر ازمرحله رویشی بود . در مرحله رویشی گیاهان فشم و در مرحله گلدهی گیاهان سیراچال فعالیت بیشتری نسبت به سایر مناطق نشان می دهند . در مجموع گیاهان سیراچال و فشم (شمال غرب استان تهران) نسبت به گیاهان دره لار و دماوند (شرق استان تهران) فعالیت بیشتری نشان دادند .

عوامل بسیاری در میزان فعالیت این آنزیم موثرند . به عنوان نمونه نور همراه نیترات برای القاء بافتهای ریشه و ساقه موردِ نیاز است (۱۰) ، فعالیت آنزیم های نیترات و نیتریت ردوکتاز با فصل ارتباط دارد (۱۲) ، ویروس موزائیک باعث افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز می شود . (۱۸) نشان داده شده است که بیشتر فعالیتهای نیترات ردوکتاز در طی ۳۰ روز اول رشد مشاهده می شود و با ادامه رشد تمایل به کاهش فعالیت است (۹) .

پراکسیداز

پراکسیداز آنزیمی است که در تمام گونه های گیاهی یافت می شود و نقشهای بسیاری در فیزیولوژی گیاهان دارد . نقش آن در رشد ، نمو و تمایز گیاهی اهمیت

بسیاری دارد فعالیت آنزیم پراکسیداز درگیاهان سیراچال و فشم و در دو مرحله رویشی و گلدهی تعیین شد . فعالیت آنزیمی تمام نمونه ها در مرحله رویشی (قبل ازگلدهی) بیش از مرحله گلدهی بود . علاوه بر این ، گیاهان فشم نسبت به گیاهان سیراچال فعالیت بیشتری نشان دادند .

افزایش فعالیت در مرحله گلدهی را با توجه به تحقیقات صالحی (٤) می توان این طور توجیه کرد که فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش دما رابطه ای معکوس دارد بطوری که با گرم شدن محیط و شروع رشد و نمو (درمرحله گلدهی) از میزان فعالیت پراکسیداز کاسته می شود .

گزارشهای بسیاری در مورد نقش پراکسیدازها در ممانعت از رشد وجود دارد . احتمالااین آنزیم در ساخته شدن مواد تشکیل دهنده دیواره دخالت داشته و باایجاد اتصال عرضی بین پلیمرهای فنلی دیواره سلولی ، انعطاف پذیری دیواره را کاهش می دهد . این فرآیند باعث سخت شدن غیرقابل برگشت دیواره می شود . به علاوه این آنزیم اثر اکسینها را بر اتساع پذیری غشاهای اسکلتی و در مرحله کاتابولیسم آنها ، با ایفای نقش اکسین اکسیدازی کنترل می نماید . از این رو ، با افزایش دمای محیط و شروع فعالیتهای زیستی گیاه از جمله فتوسنتز ، تنفس ، رشدونمو فعالیت پراکسیدازها کاهش می یابد (٤) .

منابع:

۱- آئینه چی ، یعقوب ، مضرات پزشکی و گیاهان دارویی ایران ، ۱۳٦۵

۲- شاهرخی ، نوبهار ، روشهای کنترل کیفی مواد اولیه داروهای گیاهی ، مرکزانتشارات جهاددانشگاهی شهیدبهشتی ، ۱۳۷۵

۳- شریفی ، گلنوش ، (باراهنمایی دکتردیناعزیزیان) ، بررسی تاکسونومی گیاه آویشن درایران ، دانشگاه شهیدبهشتی ، (پایان نامه کارشناسی) ، بهمن ماه ۱۳٦۸

٤- صالحی شانجانی ، پروین (باراهنمایی حسن ابراهیم زاده) ، کشت بافت و بررسی اثرعوامل محیطی برمتابولیسم فرآورده های ثانوی و تغییرات کمی و کیفی پروتئینی ، ایزوآنزیمی پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در ارس *Juniperus Spp.* ، دانشگاه تهران ، دانشکده علوم ، (پایان نامه کارشناسی ارشد) ، ۱۳۷۵

۵- طرح جامع آب کشور-حوزه آبریزشور کرج جاجرود ، شرکت مهندسین مشاور جاماب وابسته به وزارت نیرو ، ۱۳٦۸

٦- قهرمان ، احمد ، فلور رنگی ایران ، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلهاومراتع ، شماره انتشار۱۱۱٤

7- Deans,S.G., Simpson,E., Noble,R.C.,MacPherson,A., Penzes,L., Schilcher,H., Phillipson, J.D.,Loew,D., "Natural antioxidants from

Thymus vulgaris (thyme) Volatile: the beneficial effects upon mammalian lipid metabolism. ", Acta-Horticulture, (1993), No.332, 177-182,13 ref.

8- Edreva, A., Salcheva, G., Georgieva, D. "Stress damage in related to peroxidase induction in wheat plants." ; Plant peroxidase symposium (1993).

9- Fonseka, H.D., Asanuma, K.I., Ichii, M., "Changes in nitrate reductases activity of leaf and nitrogen distribution with growth in potato plants "(1997), Japanese Journal of Crop Science, 66:4, 669-674; 15ref

10- Li, Xiu-Zhen, Oaks, A., " The effect of light on the nitrate and nitrite reductases in Zea Mays " Plant science (1995),109, 115-118

11- Pinon,D., Sachez,A., " Relationship between the growth of plants and the enzyme activity of peroxidase and nitrate reductase in sugarcane varieties inoculated with mosaic virus. "

12- Pizelle, G., Thiery, G., "Relationship between nitrite and nitrate reductase activities in leaves of *Alnus glutinosa* and *Robinia pseudoacacia* "(1994),32(6),869-873

Activity changes of *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex celak. peroxidase and nitrat reductase Enzymes

Askari. F. and Ghorbanly M.

Abstract

Nitrate reductase activity of leaf Thymus pubescens assimilation from 11 sample of four various locality (Lar valley, Damavand, Cirachal and Fasham in Tehran province). Nitrate reductase activity in samples of Lar valley and Cirachal at full flowering stage (B. F.). NR activity in samples of Fasham at full flowering stage was less than samples of before flowering stage. NR activity in samples of Damavand was no changes. Most of activity At B. F. stage was in the samples of Fasham and at FF. Stage was in the samples of Cirachal. In essence the sample of Cirachal and Fasham showed NR activity more than sample of Lar valley and Damavand.

Peroxidase activity assimilation from 6 samples of Cirachal and Fasham (Northern west Tehran province) at before flowering stage and full flowering stage. All samples showed peroxidase activity in BF stage more than FF stage. In addition samples of Fasham were more active than samples of Chirachal.