نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال پانزدهم، شماره ۵۸، تابستان ۱۳۹۹ / صفحات: ۱۰۳-۹۴

بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی جوانه خواب و جوانه فعال در ارقام کلون ۱۰۰ و هیبرید گیاه چای (*Camellia sinensis* L.)

سیده‌مهری جوادی[1*]، مینا بیگ محمدی[2]

[1]گروه پژوهشی فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی،پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

[2]گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی ، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۱۲

چکیده

عملکرد و کیفیت عصاره برگی گیاه چای (*Camellia sinensis* L.) به عنوان یک نوشیدنی سالم در سراسر جهان، بستگی به رشد رویشی شاخساره و خواب جوانه دارد. خواب جوانه در مرحله برداشت برگ باعث افزایش فاصله برداشت برگ می‌شود و عملکرد را کاهش می‌دهد. در این مطالعه تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در جوانه‌های فعال و خواب گیاه چای در دو رقم کلون ۱۰۰ و هیبرید بررسی شد. نتایج نشان داد تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی وجود داشت که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین آنها بود. فعالیت آنزیم‌ها از جمله آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز در جوانه خواب بالاتر از جوانه فعال بود، اما فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در جوانه فعال بیشتر از جوانه خواب بود. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد تغییرات بیوشیمیایی در ایجاد جوانه خواب و جوانه فعال نقش داشته و از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگر بیوشیمیایی در برآورد تشخیص عملکرد ارقام چای و کاهش دوره خواب جوانه بهره جست.

واژه‌های کلیدی: چای، جوانه خواب، جوانه فعال، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

چای (*Camellia sinensis* L.)، گیاهی چوبی و چند ساله است که معمولا در مناطق نیمه گرمسیری کشت می‌شود. گیاه چای یکی از منابع با ارزش ترکیبات زیستی فعال مانند پلی‌فنل‌ها، کاتچین‌ها، فلاونون‌ها، کافئین، تانن، ویتامین‌ها، اسیدآمینه، کربوهیدرات‌ها و گروه با ارزشی از ترکیبات شیمیایی است که دارای خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی هستند. همچنین، چای دارای ترکیبات معدنی گوناگون نظیر: پتاسیم، منیزیم، کروم، نیکل و روی است که برای سلامتی انسان ضروری هستند (Prasanth et al., 2019). رشد شاخساره یکی از مهم‌ترین مراحل فیزیولوژیکی است که تعیین کننده عملکرد نهایی گیاه چای می‌باشد و کاهش رشد شاخساره یکی از دلایل مهم کاهش عملکرد در باغات چای ایران است. عملکرد محصول چای از دو مشخصه مهم شامل تعداد شاخساره‌های تشکیل شده در واحد سطح و میزان وزن‌تر و رشد جوانه در نظر گرفته می شود (Wijeratne, 2001). از این دو مشخصه، عملکرد تعداد شاخساره‌ها در واحد سطح در میزان عملکرد نهایی برگ چای تاثیر بسزایی دارد (Wijeratne, 2001). تعداد شاخساره بستگی به فعالیت و رشد جوانه جانبی دارد. در بعضی از ارقام گیاه چای تعداد شاخساره در واحد سطح توسط ایجاد

*نویسنده مسئول: ghazalehjavadi.z@gmail.com

خواب جوانه، محدود می‌شود. خواب جوانه در مرحله برداشت برگ باعث افزایش فاصله برداشت گشته و عملکرد را کاهش می‌دهد. تنظیم خواب در جوانه‌های رویشی یک فرآیند بسیار پیچیده است که برای بقای گیاه و تمایز اندام‌های آن ضروری است. به‌هنگام وقوع خواب جوانه بعضی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی متوقف و در نتیجه گیاه در شرایط محیطی نامناسب به تنش‌های محیطی مقاوم و متحمل گردد (Thirugnanasambantham et al., 2013).

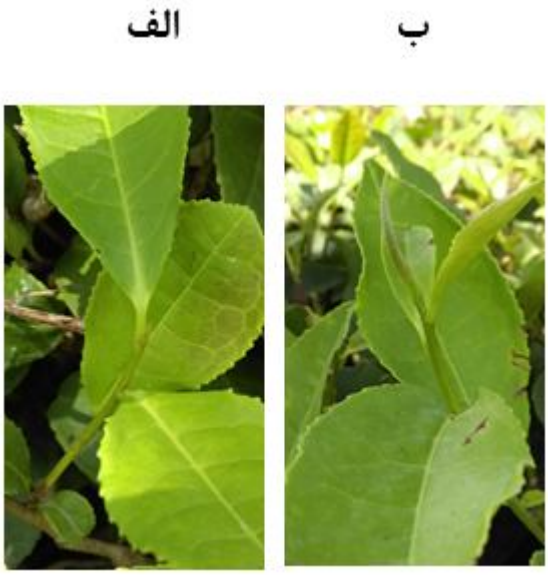
در انواع مختلفی از خواب شناسایی شده در گیاهان، فعالیت‌های متابولیکی مانند فتوسنتز، رونویسی، ترجمه و حتی تنفس متوقف شده است. این رخدادها نتیجه ایجاد تغییراتی در سطح مولکولی و فیزیولوژیکی است (Pnueli et al., 2002). خواب جوانه توسط بسیاری از عوامل نظیر مکانیسم‌های مکانیکی، محیطی و مولکولی تنظیم می‌شود (Jeyaraj et al., 2014). گرچه این پدیده در نتیجه برهمکنش بین علایم درون گیاهی است ولی مطالعه هر کدام از اعضای تاثیرگذار، می‌تواند فرصت مناسبی برای به دست آوردن اطلاعات در مورد خواب جوانه باز کند. بنابراین درک عکس‌العمل‌های گیاه به پدیده خواب جوانه و نحوه ایجاد این پدیده برای تلاش‌های اصلاحی به منظور غلبه بر محدودیت‌های وارده از این پدیده بر تولید محصول از اهمیت خاصی برخوردار است.

برخی از ترکیبات شیمیایی مانند اشکال فعال اکسیژن از قبیل آنیون سوپراکساید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن منفرد که معمولاً در شرایط نامناسب فعالیت می‌نمایند (Gholamalipour et al., 2019)، می‌توانند در ایجاد چرخه فعالیت–خواب جوانه دخیل باشند (Wojtyla et al., 2016). این مولکول‌های فعال می‌توانند موجب صدمه به ماکرومولکول‌ها و ساختار سلولی شوند یا اینکه به عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاه گردند. به منظور کاهش صدمات، گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی برای دفاع در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال استفاده می‌نمایند (Agrimonti and Marmiroli, 2008). همچنین مشخص شده است برخی ترکیبات آنتی اکسیدان مانند فنل‌ها در *Fagus Sylvatica* (Codignola et al., 1988)، آنزیم‌هایی مانند کاتالاز در سیب زمینی (M'Hamdi et al., 2009)، پراکسیداز (Benkeblia and Shiomi, 2004) در پیاز و آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در چای (Vyas et al., 2007) در چرخه فعالیت–خواب جوانه نقش دارند. شناخت این مکانیسم و فرایندهای بیوشیمیایی و همچنین شناسایی تفاوت ترکیبات فنلی و آنزیمی در بافت جوانه در حال خواب و جوانه فعال می‌تواند در ارائه راهکارهای مناسب برای شکستن خواب جوانه راهگشا باشد. در این راستا هدف از این پژوهش ارزیابی تغییرات فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در جوانه‌های فعال و خواب در دو رقم کلون ۱۰۰ و هیبرید گیاه چای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: در این تحقیق دو نمونه بافت گیاه چای *Camellia sinensis* شامل جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال (شکل ۱) از درختچه‌های ۵ ساله در مرحله برگ چینی دو رقم هیبرید و کلون ۱۰۰ گیاه چای از ایستگاه تحقیقاتی چای شهید افتخاری پژوهشکده چای کشور واقع در شهرستان فشالم استان گیلان با مختصات جغرافیایی ۲۵ درجه و ۴۹ دقیقه طول و ۲۵ درجه و ۳۷ دقیقه عرض جغرافیایی با شیب شمال به جنوب، ۳ متر بالاتر از سطح دریا، متوسط بارندگی ده ساله ۱۱۰۰ میلی لیتر، حداقل

دمای میانگین ۳- درجه سانتی‌گراد و حداکثر دمای میانگین ۳۵ درجه سانتی‌گراد در اواسط مرداد ماه ۱۳۹۷با زنجیره انتقال سرد توسط تانک ازت جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد و در فریزر ۸۰- ذخیره شد.



شکل ۱: تصویر الف) جوانه خواب ب) جوانه فعال گیاه چای

تعیین پروتئین کل عصاره به روش برادفورد: اندازه‌گیری میزان پروتئین کل با استفاده از عصاره تهیه شده، معرف رنگی کوماسی بریلیانت بلو در اتانول ۹۵ درصد و ارتوفسفریک اسید ۸۵ درصد انجام شد.از پروتئین گاما گلوبولین پلاسمای گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.بدین منظور مایع رویی آنزیمی استخراج شده، به ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد اضافه و محتویات لوله‌ها پس از مخلوط شدن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین کل براساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده، براساس میلی‌گرم وزن‌تر برگ بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی آنزیم پراکسیداز (EC 1. 11. 1. 7) براساس روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) با اندکی تغییرات انجام شد. یک گرم از بافت جوانه در ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH= ۷ هموژنایز شده به مدت ۱۰ دقیقه در مای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت تهیه شده جهت سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط قابل سنجش ۳ میلی‌لیتر شامل ۲/۹۲ میلی لیتر بافر فسفات سدیم، گایاکول ۸۰ میلی مولار ۵۰ میکرو لیتر، ۵ میکرولیتر از آنزیم استخراج شده و ۳۰ میکرو لیتر از هیدروژن پراکسید ۸۰ میلی مولار بود. مقدار جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6) موجود در عصاره از روش Luck (۱۹۷۴) استفاده شد نیم گرم از بافت جوانه در ۲۵ میلی‌مولار از بافرسدیم فسفات با pH= ۷

هموژنایز شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مخلوط قابل سنجش شامل ۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با pH= ۷، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت و ۰/۱ میلی‌لیتر از پراکسید هیدروژن ۲۵میلی‌مولار است. فعالیت این آنزیم توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر، در مدت ۵ دقیقه هر ۵ ثانیه یکبار، مورد طیف سنجی قرارخواهدگرفت.

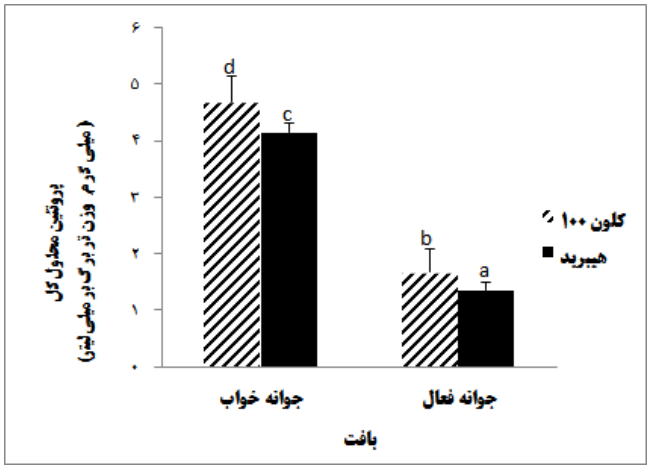
سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (EC 1.11.1.11) موجود در عصاره از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) استفاده شد. ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت جوانه در ۱ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی-مولار با pH=۷ شامل ۱ درصد پلی وینیل پیرولیدن (PVP) و ۲ میلی‌مولار آسکوربات هموژنایز شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مخلوط قابل سنجش شامل ۱/۱۴ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷، ۱/۵ میلی‌لیتر اسکوربات ۲میلی‌مولار، ۳۰۰ میکرولیتر از EDTA ۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیترسوپرناتانت استخراج شده و ۲۴ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۲/۳ میلی‌مولار بود. فعالیت این آنزیم توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز: جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Kar و Mishra (۱۹۷۶) استفاده شد. محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر برای پلی فنل اکسیداز شامل ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با (pH=۶/۸)، ۱۰۰میلی‌لیتر پیروگالول ۰/۳ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تغییرات جذب محلول واکنش به شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و توسط آزمون تی (T-test) معنی‌دار بودن و نبودن اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel تهیه گردید.

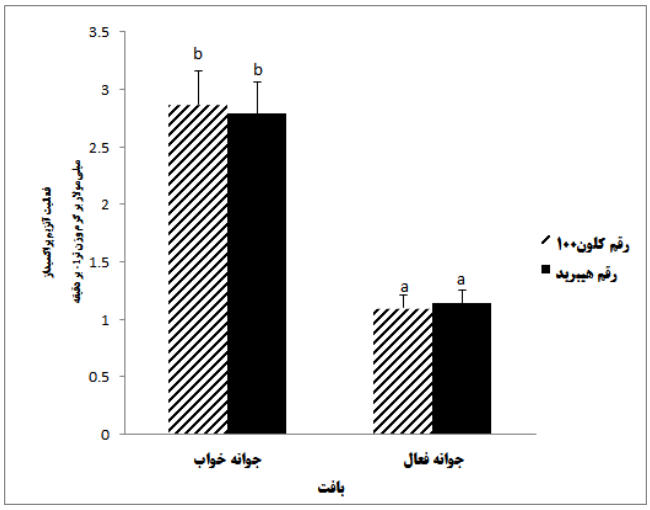
نتایج

اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل در عصاره بافت جوانه چای: شکل۲ نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین کل را نشان می‌دهد، به طوری که در این نمودار مشخص است، مقدار کل پروتئین‌ها برحسب (میلی‌گرم وزن تر برگ / میلی‌لیتر) در بافت جوانه خواب در دو رقم هیبرید و کلون ۱۰۰ نسبت به جوانه فعال افزایش یافته است و این افزایش در رقم کلون۱۰۰ نسبت به رقم هیبرید بیشتر است. جدول تجزیه واریانس جدول ۱ نشان می‌دهد که سطوح بافت‌ها و ارقام از نظر این صفت در سطح۵ درصد معنی‌دار بودند.

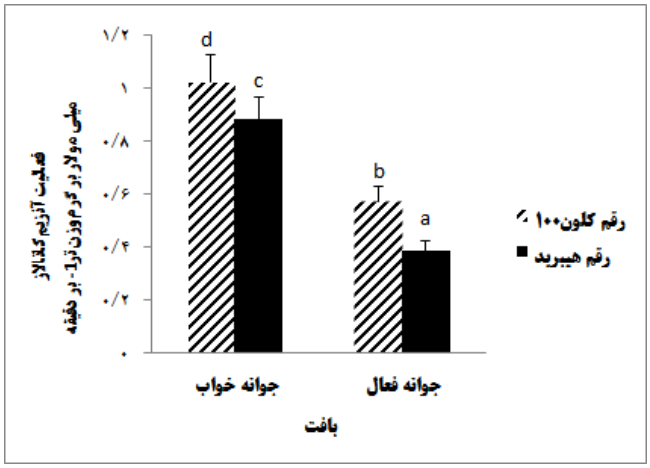
فعالیت آنزیمی آنزیم پراکسیداز: نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم هیبرید و کلون ۱۰۰ در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) بیشتر از بافت جوانه فعال می‌باشد (شکل ۳). طبق تجزیه واریانس جدول ۱ بین بافت‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح۵ درصد مشاهده شد.



شکل ۲: تغییرات مقدار کل پروتئین‌ها در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال در ارقام هیبرید و کلون ۱۰۰گیاه چای (داده‌های ارائه شده با میانگین۵ تکرار و SE ± می‌باشد).



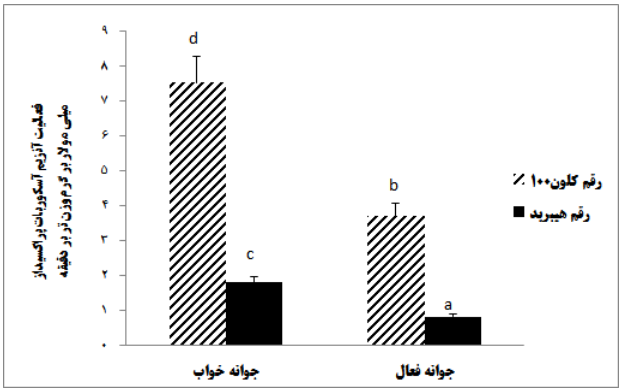
شکل۳: تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال در ارقام هیبرید و کلون ۱۰۰ در گیاه چای(داده‌های ارائه شده با میانگین۵ تکرار و SE ± می‌باشد).



شکل٤: تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال در ارقام هیبرید و کلون ۱۰۰ در گیاه چای(داده‌های ارائه شده با میانگین۵ تکرار و SE ± می‌باشد).

فعالیت آنزیمی آنزیم کاتالاز: نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در دو رقم هیبرید و کلون ۱۰۰ در بافت جوانه خواب بیشتر از بافت جوانه فعال می‌باشد (شکل۴) و این افزایش در رقم کلون ۱۰۰ بیشتر از رقم هیبرید می‌باشد. نتایج جدول تجزیه واریانس جدول ۱ نشان داد که برای صفت آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بین ارقام چای و بافت دیده شد.

فعالیت آنزیمی آنزیم آسکوربات پراکسیداز: طبق بررسی بعمل آمده در این تحقیق نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دو رقم هیبرید و کلون ۱۰۰ در بافت جوانه خواب بیشتر از بافت جوانه فعال می‌باشد و این افزایش در رقم کلون ۱۰۰ بیشتر از رقم هیبرید می‌باشد (شکل ۵). نتایج جدول تجزیه واریانس جدول ۱ نشان داد که اثر رقم، بافت و اثر متقابل رقم و بافت بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد.



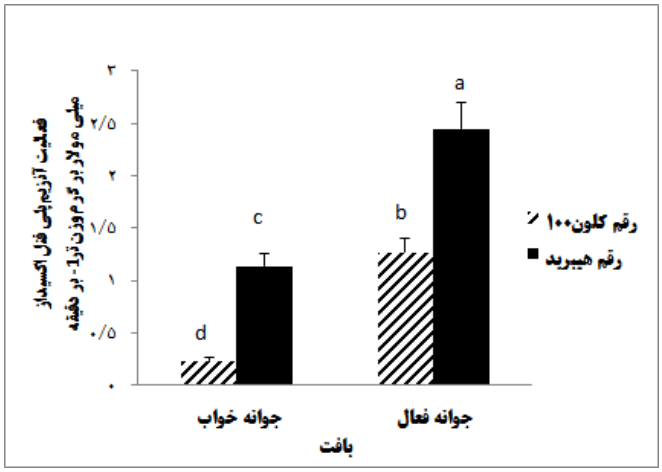
شکل ۵: تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال در ارقام هیبرید و کلون ۱۰۰ در گیاه چای(داده‌های ارائه شده با میانگین۵ تکرار و SE ± می‌باشد).

فعالیت آنزیمی آنزیم پلی فنل اکسیداز: نتایج این تحقیق در مقایسه بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال نشان داد که میزان فعالیت آنزیمی پلی فنل اکسیداز در بافت جوانه فعال نسبت به فعالیت این آنزیم در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) به‌طور معنی‌داری بالاتر است و با میزان بیشتری فعالیت می‌کند (شکل ۶). نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، نشانگر معنی‌دار بودن اثر رقم و بافت بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در سطح ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۱: تجزیه واریانس مقدار کل پروتئین‌ها برحسب (میلی‌لیتر/ میلی‌گرم) و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پراکسیداز، کاتالاز،آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز **بر حسب** (میلی مولار بر گرم وزن تر بر دقیقه) در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال در ارقام هیبرید و کلون ۱۰۰ در گیاه چای

منبع تغییر	درجه آزادی	پروتئین کل	پراکسیداز	کاتالاز	آسکوربات	پلی فنل اکسیداز
رقم	۱	۵/۰۹*	۰/۰۱۶ns	۰/۷۲*	۴۹۹/۴۴*	۲۷/۳۵*
بافت	۱	۲۲۷/۵۱*	۷۹/۱۷*	۵/۹۹*	۱۵۶/۷۹*	۳۵/۷۵*
رقم* بافت	۱	۰/۳۲ns	۰/۰۹۸ns	۰/۰۱۳ns	۵۴/۷۶*	۰/۳۵ns
اشتباه آزمایشی	۱۰۴	۰/۶۵	۰/۶۸	۰/۰۱۱	۰/۲۲	۰/۱۷۷

*وns به ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ درصد و غیر معنی‌داری می‌باشد.



شکل ٦: تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بافت جوانه به خواب رفته (بنجی) و جوانه فعال در ارقام هیبرید و کلون ۱۰۰ در گیاه چای(داده‌های ارائه شده با میانگین۵ تکرار و SE ± می‌باشد).

بحث

خواب جوانه در گیاه چای یک پدیده جهانی است و عملکرد و کیفیت آن بستگی به رشد رویشی شاخساره و خواب جوانه دارد (Barua and Das, 1979). گرچه دلایل تشکیل جوانه‌های به خواب رفته (بنجی) در چای به وضوح مشخص نشده است، با این حال، گزارش شده است که تشکیل جوانه خواب در نتیجه فرآیندهای پیچیده‌ای است که به تغییرات در رشد سلول و تکثیر آن وابسته است. بنابراین، درک مکانیسم مولکولی و بیوشیمیایی تشکیل جوانه خواب و فعال، برای حل مشکل شکستن مصنوعی یا القای خواب جوانه ضروری است. مطالعه در مورد تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌تواند در تعیین عوامل شکستن خواب جوانه راهگشا باشد.

نتایج کار Jeyaraj و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که پروتئین از مهمترین مواد گیاه چای می‌باشد، زیرا در فرایند تولید چای سبز، پروتئین‌های آن تجزیه شده و آلدهیدها را می‌سازند که موجب ایجاد عطر و طعم چای می‌شوند ولی برعکس، در تولید چای سیاه، استفاده از برگ‌های چای که حاوی مقادیر بالاتری از پروتئین هستند، موجب کاهش رنگ و طعم می‌شود. طی تنش‌های محیطی و مکانیکی، پروتئین‌های جدیدی ساخته می‌شود یا پروتئین‌های موجود افزایش بیان می‌یابند. چندین فرآیند سلولی و متابولیکی طی خواب جوانه تغییر می‌یابند و این تغییرات به تجمع پروتئین‌هایی چون پروتئین محلول، نیاز دارد. در این مورد می‌توان به افزایش فعالیت و ساخت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به این تنش مکانیکی و تجمع پروتئین‌های مورد نیاز در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، تنظیم کننده‌های کیناز اشاره نمود (Afshar-Mohammadian et al., 2014). در این تحقیق نیز مقدار کل پروتئین‌ها برحسب (میلی‌گرم وزن تر برگ / میلی‌لیتر) در بافت جوانه خواب در دو رقم هیبرید و کلون ۱۰۰ نسبت به جوانه فعال افزایش یافته است و این افزایش در رقم کلون۱۰۰ نسبت به رقم هیبرید معنی‌دار است.

با مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در ارقام کلون ۱۰۰ و هیبرید، نتایج نشان داد که تغییرات معنی‌داری بین ارقام موجود است که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین ارقاممی‌باشد. بررسی فعالیت تمام آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نشان داد که فعالیت آنزیم-های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در جوانه خواب بالاتر از جوانه فعال است. نتایج فوق توسط یافته‌های قبلی تائید شده است (Pérez and Thirugnanasambantham; et al., 2013Lira, 2005).

پراکسیدازها به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان عالی شناسایی شده‌اند. اغلب پراکسیدازها، گلیکوپروتئین‌های حاوی هم می‌باشند که اکسیداسیون بین H_2O_2 و احیاکننده‌ها را کاتالیز می‌کنند. آنها معمولا از سوبسترای فنلی مختلف برای حذف H_2O_2 استفاده می‌کنند، به همین دلیل جزء شناساگرهای بسیار مفید تنش‌ها محسوب می‌شوند. Thirugnanasambantham و همکاران در سال میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را در بافت جوانه خواب و جوانه فعال بررسی نمودند. نتایج حاکی از افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت جوانه خواب بود. در مطالعه حاضر مشخص شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در جوانه‌های به خواب رفته بیشتر است. آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی نقش مهمی در بلوغ و پیری گیاهان دارد (Bravo, 1998). حضور فعالیت پراکسیداز با توانایی اکسیداسیون NADH و تولید OH، می‌تواند به عنوان راهی جایگزین برای تنظیم سطح H_2O_2 باشد (Pérez and Lira, 2005).

در این مطالعه مشخص شد که فعالیت آنزیم کاتالاز در جوانه‌های خواب بالاتر از جوانه‌های فعال بود که با گزارش‌های قبلی همسو بود (Kaminski and Rom, 1974). در مطالعه‌ای، همبستگی مثبت شدت خواب و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در جوانه انگور مشاهده شد (Nir et al., 1986). مشاهدات در روند فعالیت آنزیم کاتالاز در سیب زمینی نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در جوانه فعال تا زمانیکه میزان تجمع H_2O_2 به بالاترین میزان نرسد ادامه دارد (Bajji et al., 2007). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در بافت جوانه‌های طبیعی سبب افزایش سطح H_2O_2 درونی می‌شود و این افزایش سطح H_2O_2 ممکن است مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو را فعال کند که می‌تواند منجر به غلبه بر خواب جوانه شود (Agrimonti and Marmiroli, 2008). افزایش محتوای H_2O_2 احتمالاً یکی از وقایع اولیه در شکست خواب جوانه می‌باشد (Bajji et al., 2007; M'Hamdi et al., 2009). ارتباط بین متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن و شکستگی خواب در بذر (Wojtyla El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008 et al., 2016;) و جوانه‌های رویشی گزارش شده است (Pérez and Lira, 2005).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز آنزیم کلیدی برای تجزیه پراکسید هیدروژن است. براساس گزارش‌ها، جمع‌آوری H_2O_2 از کلروپلاست یا سیتوزول، می‌تواند سطح تنش‌های اکسیداتیو را کاهش دهد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز به کمک اسید آسکوربیک باعث حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود، بالا بودن فعالیت این آنزیم به معنی حذف بیشتر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه کاهش مرگ سلولی است. کاتالاز ممکن است مسئول از بین بردن ROS بالا در طی تنش باشد، در حالی که آنزیم آسکوربات پراکسیداز احتمالا مسئول تنظیم ROS برای سیگنالینگ است (Mazzitelli et al., 2007). در مطالعه‌ای بر روی گیاه تمشک مشاهده شد، شکستن خواب جوانه‌های جانبی که توسط سرما تحریک شده بودند، با القاء ژن APX و GR همراه است (Mazzitelli et al., 2007). نقش ROS در کنترل فرآیندهای گیاهی مختلف در حال حاضر شناخته شده است، اما چگونگی تعامل H_2O_2 با هورمون‌ها در طول القای خواب و شکستن خواب مشخص نیست. در مطالعه‌ای محرک‌های مختلف باعث شکستن خواب جوانه در گیاه انگور شدند، مشاهدات مطابق با این فرضیه است که استرس اکسیداتیو موقت و استرس تنفسی ممکن است بخشی از مکانیسم شکستن خواب جوانه باشد (Halaly et al., 2008). مطالعات نشان دادند که مرحله چرخه برداشت، درجه حرارت، کاهش ذخایر غذایی، انواع و سطوح کود، ویژگی های

کلونال، دوره نوردهی و دمای پایین نیز نقش مهمی در تشکیل جوانه‌های خواب ایفا می‌کنند (Jeyaraj et al., 2014).

پلی‌فنل اکسیدازها به طور گسترده‌ای در سلسله گیاهی یافت می‌شوند. طبق گزارشات گذشته مشخص شده است که مقدار این آنزیم در ضمن نمو گیاه به طور قابل توجهی تغییر می‌یابد. در مورد فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، نتایج نشان که برخلاف سایر آنزیم‌های مورد بررسی، میزان فعالیت این آنزیم در بافت جوانه فعال بیش از جوانه خواب در هر دو رقم مورد آزمایش می‌باشد. این افزایش در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ممکن است مسئول حذف برخی از فنل‌های مهار کننده رشد باشد و ماده فنلی می‌تواند فعالیت این آنزیم‌ها را به عنوان بازدارنده و یا تحریک کننده تغییر دهد (Wang et al., 1991).

نتیجه‌گیری نهایی

در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی جهت بررسی تنوع در جوانه‌های خواب و فعال در دو رقم از گیاه چای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌تواند نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیکی در چرخه فعالیت-خواب جوانه گیاه چای ایفا کند. درک بیوشیمیایی جوانه‌های خواب و فعال می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای حل مشکلات شکستن مصنوعی و القای خواب جوانه در گیاهان باشد. اگرچه تغییرات مرتبط با چگونگی کاشت، داشت و برداشت نیز می‌تواند بر میزان سایر ترکیبات بیوشیمیایی و تنظیم کننده‌های گیاهی در جوانه‌های خواب و فعال تأثیرگذار باشد که این مطلب می‌تواند موضوع تحقیقات آینده باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پروژه تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی با کد ۱۱-۲۴۲۱ می‌باشد و در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی(گروه پژوهشی فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی) انجام شده است که بدین وسیله مورد تشکر و قدردانی قرار می‌گیرند.

References

Afshar-Mohammadian, M., Mosayebi, M. and Jamal Omidi, M. (2014). Seasonal Variation of Phenolic Components in Two Clones of Tea (*Camellia Sinensis* (L.) O Kuntze). Iranian Journal Of Plant Biology. 6:17-28.

Agrimonti, C.and Marmiroli, N. (2008). Gene Expression During Transition from Dormancy to Sprouting in Potato Tubers. Fruit. vegetable and cereal science and biotechnology. 2:95-109.

Bajji, M., M'Hamdi, M., Gastiny, F., Rojas-Beltran, JA. and Du Jardin, P. (2007). Catalase Inhibition Accelerates Dormancy Release and Sprouting in Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Tubers. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 11:121-131.

Barua, D. and Das, S. (1979). Mechanism of Growth Periodicity in Tea [India]. Two and a Bud

Benkeblia, N. and Shiomi, N. (2004). Chilling Effect on Soluble Sugars, Respiration Rate, Total Phenolics, Peroxidase Activity and Dormancy of Onion Bulbs. Scientia Agricola, 61:281-285.

Bradford, MM. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry, 72:248-254.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition reviews, 56:317-333.

Chance, B. and Maehly, A. (1955). Assay of Catalases and Peroxidases. Methods of biochemical analysis. 1954;1:357-424.

Codignola, A., Maffei, M. and Fieschi, M. (1988). Phenols and Bud Dormancy: Ii. Qualitative Variations in Endogenous Phenols in Dormant Buds of *Fagus Sylvatica* L,. New phytologist, 110:473-477.

El-Maarouf-Bouteau, H. and Bailly, C. (2008). Oxidative Signaling in Seed Germination and Dormancy. Plant Signaling & Behavior, 3:175-182.

Halaly, T., Pang, X., Batikoff, T., Crane, O., Keren, A., Venkateswari, J., Ogrodovitch, A., Sadka, A., Lavee, S. and Or, E. (2008). Similar Mechanisms Might Be Triggered by Alternative External Stimuli That Induce Dormancy Release in Grape Buds. Planta, 228:79-88.

Jeyaraj, A., Chandran, V. and Gajjeraman, P. (2014). Differential Expression of Micrornas in Dormant Bud of Tea [*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze]. Plant cell reports, 33:1053-1069.

Kaminski, W. and Rom, R .(1974). Possible Role of Catalase in the Rest of Peach, *Prunus Persica,* Sieb. And Zucc., Flower Buds. Journal of the American Society for Horticultural Science, 84-86.

Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities During Rice Leaf Senescence. Plant physiology, 57:315-319..

Luck, H. (1974) Catalase in Methods of Enzymatic Analysis, Vol Ii, Edited by J Bergmeyer and M Grabi. Academic press, New York.885-890.

M'Hamdi, M., Beji, H., Belbahri, L., Bettaieb, T., Kouki, K. and Harbaoui, Y. (2009). Hydrogen Peroxide and a Catalase, Physiological Regulators of Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Tuber Dormancy. The African Journal of Plant Science and Biotechnology, 3:12-15.

MacAdam, JW., Nelson, CJ. and Sharp, RE. (1992). Peroxidase Activity in the Leaf Elongation Zone of Tall Fescue: I. Spatial Distribution of Ionically Bound Peroxidase Activity in Genotypes Differing in Length of the Elongation Zone. Plant Physiology, 99:872-878.

Mazzitelli, L., Hancock, RD., Haupt, S., Walker, PG., Pont, SD., McNicol, J., Cardle, L., Morris, J., Viola, R. and Brennan, R. (2007). Co-Ordinated Gene Expression During Phases of Dormancy Release in Raspberry (Rubus Idaeus L.) Buds. Journal of experimental botany, 58:1035-1045.

Nakano, Y.and Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. Plant and cell physiology, 22:867-880.

Nir, G., Shulman, Y., Fanberstein, L.and Lavee, S. (1986). Changes in the Activity of Catalase (Ec 1.11. 1.6) in Relation to the Dormancy of Grapevine (Vitis Vinifera L.) Buds. Plant physiology, 81:1140-1142.

Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, MV. and Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-Morphological Traits. Frontiers in plant science 8:537.

Pérez, FJ. and Lira, W. (2005). Possible Role of Catalase in Post-Dormancy Bud Break in Grapevines. Journal of Plant Physiology. 162:301-308.

Pnueli, L., HallakHerr, E., Rozenberg, M., Cohen, M., Goloubinoff, P., Kaplan, A. and Mittler, R. (2002). Molecular and Biochemical Mechanisms Associated with Dormancy and Drought Tolerance in the Desert Legume *Retama Raetam.* The Plant Journal. 31:319-330.

Prasanth, MI., Sivamaruthi, BS., Chaiyasut, C.and Tencomnao, T. (2019). A Review of the Role of Green Tea (*Camellia Sinensis*) in Antiphotoaging, Stress Resistance, Neuroprotection and Autophagy. Nutrients. 11(2):474.

Thirugnanasambantham, K., Prabu, G., Palanisamy, S., Chandrabose, SRS. and Mandal, AKA. (2013). Analysis of Dormant Bud (Banjhi) Specific Transcriptome of Tea (*Camellia Sinensis (*L.) O. Kuntze) from Cdna Library Revealed Dormancy-Related Genes. Applied biochemistry and biotechnology. 169:1405-1417.

Vyas, D., Kumar, S.and Ahuja, PS. (2007). Tea (*Camellia Sinensis*) Clones with Shorter Periods of Winter Dormancy Exhibit Lower Accumulation of Reactive Oxygen Species. Tree physiology. 27:1253-1259.

Wang, SY., Jiao, HJ.and Faust, M. (1991). Changes in Ascorbate, Glutathione, and Related Enzyme Activities During ThidiazuronInduced Bud Break of Apple. Physiologia Plantarum. 82:231-236.

Wijeratne, M. (2001). Shoot Growth and Harvesting of Tea.

Wojtyla, Ł., Lechowska, K., Kubala, S.and Garnczarska, M. (2016). Different Modes of Hydrogen Peroxide Action During Seed Germination. Frontiers in plant science. 7:66-82.