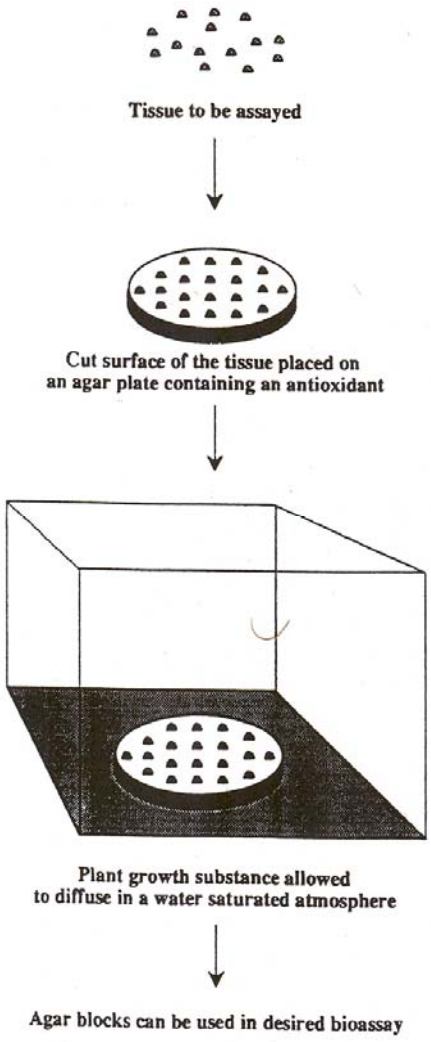
# فصل دوم : روشهای عصاره گیری، خالص سازی و شناسائی هورمون ها
# Methodology for Extraction, Purification and Determination of PGs

## ۱- روش های عصاره گیری (1-Extraction Methods)

### الف- روش انتشار یا پخشیدگی (Diffusion method)

- ✓ فقط برای بافت های سالم و تازه
- ✓ قرار دادن بافت بریده شده درمحلول ژلاتینی ۳۰°C
- ✓ بافت روی محیط کشت + آنتی اکسیدان (BHT 1-2% )
- ✓ انتقال مواد از بافت بریده شده به آگار
- ✓ زمان انتقال مواد
- ✓ ارزیابی سطوح نسبی هورمون ها در قسمت های مختلف گیاه


Tissue to be assayed
Cut surface of the tissue placed on
an agar plate containing an antioxidant
Plant growth substance allowed
to diffuse in a water saturated atmosphere
Agar blocks can be used in desired bioassay

## ب-عصاره گیری به کمک حلال (Solvent Extraction)

❖ **آماده سازی بافت** (Tissue preparation)

- ✓ جلوگیری از تجزیه هورمون (کوتاه مدت)
- ✓ برای نگهداری نمونه و کار دقیق

-یخ زدن نمونه در ازت مایع (Freeze in liquid nitrogen)

-خشک کردن به کمک خلا (Freeze-dry)

-نگهداری در دمای ۸۰°C- (Store at -80°C)

❖ **عصاره گیری:Extraction**

❖ **دستورالعمل های مختلف:** باید چک شود و روش مناسب انتخاب گردد.

مرحله اول له کردن بافت در حلال است بطوریکه هورمون از بافت وارد حلال شود

❖ **حلال ها**

-متانول یا اتانول: برای SA, JA, BR, Cytokinins, GA, ABA, IAA

-استون: برای GA, ABA, IAA

-ایزوپروپانول (۲-پروپانول) یا کلروفرم: برای BR

-حلال های مخلوط:

Bieleski medium برای سایتوکینین

methanol/ chloroform 90%/ formic acid, water or perchloric acid (12:5:1:2 V/V)

رایج ترین حلالی که برای کلیه هورمون ها بکار گرفته شده است متانول ۸۰٪ + آنتی اکسیدان مانند BHTمیباشد.

❖ **مراحل کار**

- ✓خرد و له کردن بافت در حلال
- ✓فیلتر کردن . تکراربرای دو بار دیگر.ریختن محلول ها روی هم
- ✓سانتریفیوژ کردن
- ✓کاهش حجم عصاره به کمک خلا

## ۲-خالص سازی عصاره (2-Purification of Extract)

الف-هورمون های اسیدی

- ✓ pH عصاره خام به ۲/۵ رسانده شود.
- ✓ هم حجم عصاره خام محلول Diethyl ether (Ethyl acetate) اضافه شود.
- ✓ داخل قیف جداکننده ریخته و تکان داده می شود.
- ✓ چند دقیقه ثابت قرار میدهیم تا دو فاز جدا شود.

  ⟵ هورمون به فاز diethylether می رود.
- ✓ فازآبکی پائین قرار می گیرد. (دور ریخته می شود)
- ✓ تکرارمراحل بالا قبل از دور ریختن فازآبکی
- ✓ فاز diethylether در خلا خشک می شود (دما حداثر ۳۶ درجه سانتیگراد)

ب- Solid-liquid extraction

- ✓ حالت جامد بافت در یک ستون یکبار مصرف پیچیده شده و حلال از آن عبور داده می شود.

ج- روشهای مختلف کروماتوگرافی. Paper, Thin layer, Column, HPLC

## ۳- روش های تعیین مقدار (3-Quantification)

- ✓ a-Bioassays سنجش های حیاتی
- ✓ b-Physiochemical methods
  - -Gas-liquid chromatography (GC)
  - -High performance liquid chromatography (HPLC)
- ✓ c-Immunological method
  - -Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
  - -Radio immunoassays (RIA)

برای تمامی روش های فوق لازم است منحنی استاندارد تهیه شود تا بتوان به کمک آن مقدار هورمون در عصاره را ارزیابی کرد.

# سنجش های حیاتی a-Bioassays

**تعریف:** یک سنجش حیاتی یک سیستم بیولوژیکی است که بکار گرفته می شود تا فعالیت یک ماده را در رابطه بایک واکنش فیزیولوژیکی آزمایش نماید.

برای اینکه یک سنجش حیاتی مفید واقع شود باید دارای خصوصیات زیر باشد:

۱- فقط خاص ترکیبی باشد که سنجش می شود.

۲- بایستی نسبت به مقادیر جزئی هورمون حساس باشد.

۳- از نظر تهیه و تدارک مقدار بافت گیاهی یکنواخت (محک) سریع و آسان باشد.

۴- ترکیب مورد نظر که برای آن سنجش صورت می گیرد در گیاه (محک) نباشد یا خیلی جزئی باشد.

**Yopp et al (1986)**

✓ سنجش های حیاتی را به ۵ گروه تقسیم کرده است:

۱- سنجش های حیاتی شناسائی 1-Diagnostic bioassays

سنجش حیاتی با خصوصیت کاملاً اختصاصی برای شناسائی یک PGs خاص.

2-Bioassays for determination of structure-activity relationships

سنجش های حیاتی که تفاوت در واکنش را برای اعضای مختلف یک گروه PGs که از نظر ساختمان شیمیائی مشابه اند، نشان می دهد (جیبرالین ها).

3-Detection and screening bioassays

سنجش های حیاتی با حساسیت بالا و واکنش سریع همراه با حالت اختصاصی کافی که امکان استفاده از آنها را برای پیگیری غلظت های بسیار کم PGs میسر می سازد.

4- Total class activity bioassays

سنجش های حیاتی با حساسیت مساوی یا تقریباً مساوی نسبت به اعضا یک گروه PGs که از نظر ساختمان شیمیائی متفاوتند تا اجازه تعیین کل فعالیت یک گروه بخصوص PGs را در یک عصاره بدهد (همه جیبرالین ها).

5- Simple equipment bioassays

سنجش های حیاتی که مواد گیاهی موردنظر آن آسان تهیه می شود، وسائل و فضای کمی نیاز دارد و کم هزینه است.

# Selected Auxin Bioassays

1- Avena (oat) coleoptile curvature bioassay

سنجش حیاتی خمش کولئوپتیل یولاف

2- Nicotinia (tobacco) gene expression bioassay

سنجش حیاتی بیان ژن توتون

3- Avena (oat) coleoptile segment straight growth bioassay

سنجش حیاتی رشد مستقیم کولئوپتیل یولاف

## Selected Auxin Bioassays

4- Phaseolus (bean) internode bioassay

سنجش حیاتی میانگره لوبیا

5- Vigna (mung bean) adventitious root induction bioassay

سنجش حیاتی القا ریشه نابجا در ماش

# Selected Gibberellin Bioassays

1- Hordeum (barley) endosperm reducing sugar production bioassay

سنجش حیاتی تولید قندهای احیا کننده در آندوسپرم جو

2- Rumex (broad leaf duck) leaf bioassay

سنجش حیاتی برگ ترشک

3- Lactuca (lettuce) hypocotyl bioassay

سنجش حیاتی ساقه زیر لپه کاهو

4- Dwarf maize (corn), rice and pea bioassay

سنجش های حیاتی ذرت، برنج و نخود فرنگی پاکوتاه

# Selected Cytokinin Bioassays

1- Nicotinia (tobacco) stem pith callus bioassay

سنجش حیاتی تشکیل کالوز مغز ساقه توتون

2- Nicotinia (tobacco) gene expression bioassay

سنجش حیاتی بیان ژن توتون

3- Raphanus (radish) cotyledon expression bioassay

سنجش حیاتی تورم لپه های تربچه

## Selected Cytokinin Bioassays

4- Glycine (soybean) hypocotyl elongation bioassay

سنجش حیاتی ساقه زیر لپه سویا

5- Amaranthus (pigweed) dark betacyanin promotion bioassay

سنجش حیاتی تشکیل بتاسیانین درتاریکی در زلف عروس

# Selected Abscisic Acid Bioassays

1- Lactuca (lettuce) seed germination inhibition bioassay

سنجش حیاتی جلوگیری از جوانه زنی بذر کاهو

2- Gossypium (cotton) petiol abscission bioassay

سنجش حیاتی ریزش دمبرگ پنبه

3- Oryza (rice) seedling growth inhibition bioassay

سنجش حیاتی جلوگیری از رشد نهال برنج

4- Commelina (day flower) stomatal closure bioassay

سنجش حیاتی بسته شدن روزنه در کاملینا

# Selected Ethylene Bioassays

1- Pisum (pea) etiolated stem inhibition, swelling and diageotropism induction (triple response) bioassay

سنجش حیاتی سه گانه نخود فرنگی

2- Lycopersicom (tomato) leaf and stem epinasty induction bioassay

سنجش حیاتی روخمشی گوجه فرنگی

## Selected Ethylene Bioassays

3- Fruit-ripening promotion bioassay

سنجش حیاتی رساندن میوه

4- Gossypium (cotton) debladded cotyledonary petiol abscission bioassay

سنجش حیاتی ریزش دمبرگ پنبه

# Selected Brassinosteroid Bioassays

1- Phaseolus (bean) first internode bioassay

سنجش حیاتی اولین میانگره لوبیا

2- Oryzae (rice) lamina inclination bioassay

سنجش حیاتی شیب پهنک برگ برنج

3- Pisum (pea) inhibition test

سنجش حیاتی بازدارندگی در نخودفرنگی

## ب-آزمون های فیزیوکیمیکال (سنجش های فیزیوشیمیائی)
## b-Physiochemical Assays

1- GC (Capillary Gas Chromatography)

کروماتوگرافی گازی

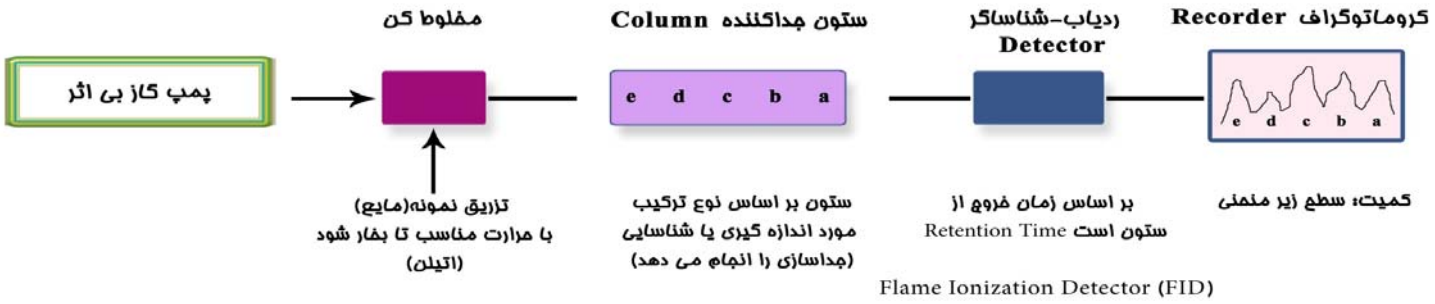
2-HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

کروماتوگرافی مایع کارا

# 1-GC (Capillary Gas Chromatography)

**کروماتوگرافی= رنگ نگاری گازی**

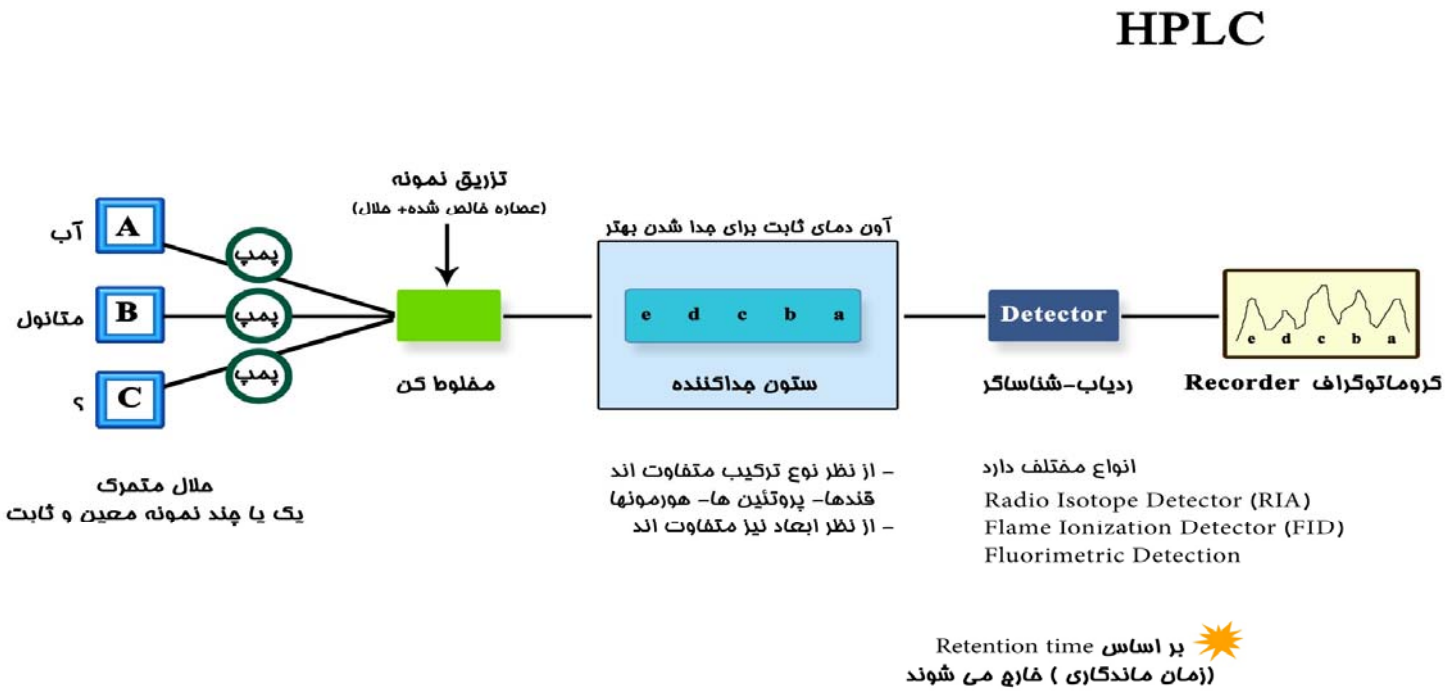
**(Cappilary Gas Chromatography) GC**




Flame Ionization Detector (FID)

عمدتاً Detector های GC شعله ای هستند

# 2-HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



# شناساگرهای اختصاصی فلورسنجی
# Flurometric detection

IAA ⟵ مستقیم

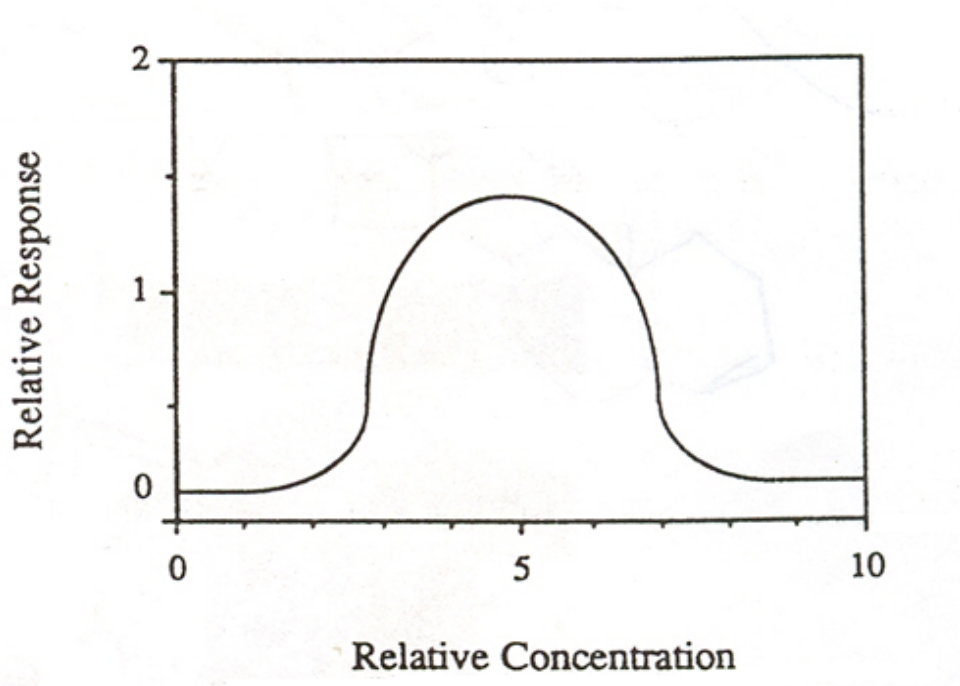
پیش ازاستفاده از شناساگرهای فلورسنجی:

Jasmonic acid, ABA ⟵ تبدیل به Fluorescent hydrazone

Brassinosteroides ⟵ تبدیل به Fluorescent bisborante

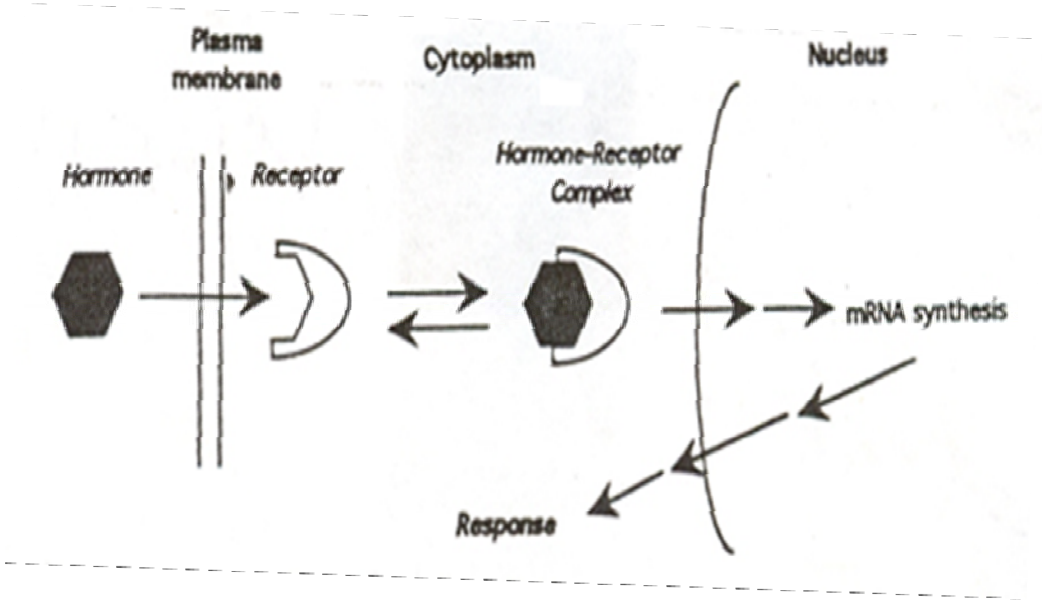
# 4 - Chemistry, Biological effects and Mechanism of action of PGs

## Dose-response Curve



## Mechanism of Action مکانیزم عمل هورمون ها

# 1- Steroids Hormones

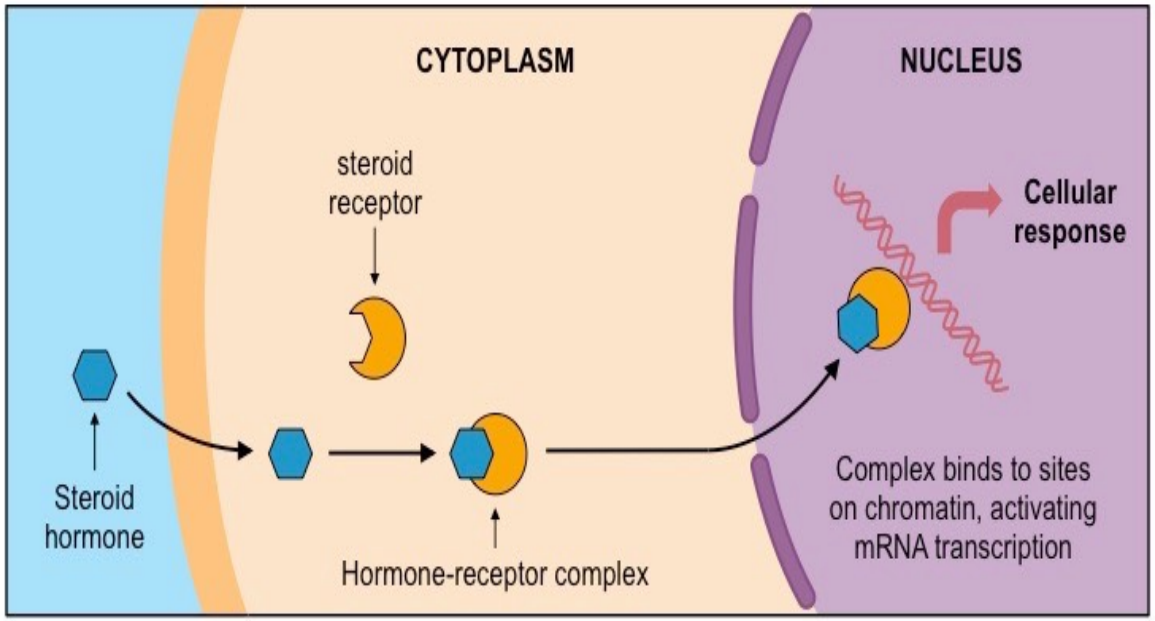



**Hormone Receptors**

Hormone receptors are proteins that bind hormones. Once bound, the hormone/receptor complex initiates a cascade of cellular effects resulting in some modification of physiology and/or behavior. Receptor binding and the associated cellular cascades amplify the hormone signal allowing hormones to act at very low concentrations, sometimes as low as parts per trillion! The location of the receptor shows where the hormone should be biologically active.

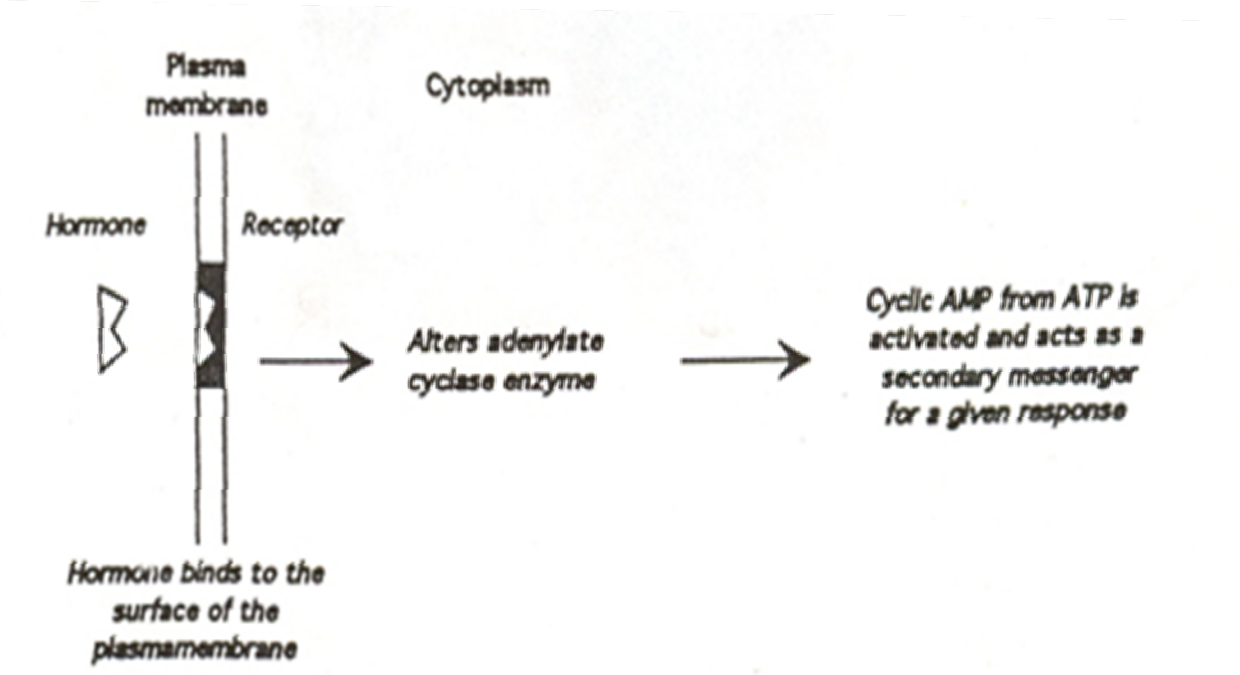
## Steroid Hormones

- Steroid hormones are lipophilic (fat-loving) – meaning they can freely diffuse across the plasma membrane of a cell
- They bind to receptors in either the cytoplasm or nucleus of the target cell, to form an active receptor-hormone complex
- This activated complex will move into the nucleus and bind directly to DNA, acting as a transcription factor for gene expression
- Examples of steroid hormones include those produced by the gonads (i.e. estrogen, progesterone and testosterone)



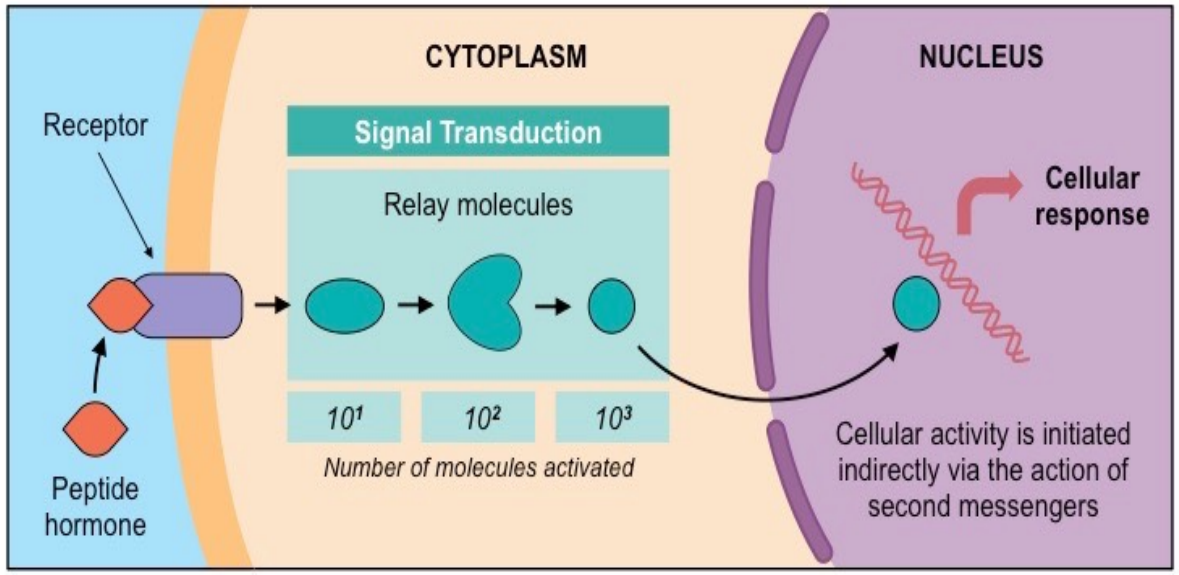
# مکانیزم عمل هورمون ها
# Mechanism of Action

## 1- Peptides Hormones



## Peptide Hormones

- Peptide hormones are hydrophylic and lipophobic (fat-hating) – meaning they cannot freely cross the plasma membrane
- They bind to receptors on the surface of the cell, which are typically coupled to internally anchored proteins (e.g. G proteins)
- The receptor complex activates a series of intracellular molecules called second messengers, which initiate cell activity
- This process is called signal transduction, because the external signal (hormone) is transduced via internal intermediaries
- Examples of second messengers include cyclic AMP (cAMP), calcium ions ($Ca^{2+}$), nitric oxide (NO) and protein kinases
- The use of second messengers enables the amplification of the initial signal (as more molecules are activated)
- Peptide hormones include insulin, glucagon, leptin, ADH and oxytocin



## جهت اختصاصی شدن پیوند هورمون –گیرنده:

- ساختار فضایی مشخص و ویژگی فضایی معین داشته باشد
- واکنش قابل اشباع باشد (تعداد نهایی و محدود محل های مشخص باشد)
- اختصاصی هر بافت باشد
- وابستگی و میل ترکیبی زیادی با هورمون داشته باشد
- قابل برگشت باشد
- فعالیت بیولوژیکی متناسب با واکنش ایجاد شود

# Regulatory Factors in Hormone Action: Level, Location and Signal Transduction

The way in which a plant hormone influences growth and development depends on:

1) The **amount** present: this is regulated by biosynthesis, degradation and conjugation.

2) The **location** of the hormone: this is affected by movement or transport.

3) The **sensitivity** (or responsiveness) of the tissue: this involves the presence of receptors and signal-transduction chain components.