زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره دوم ، (پیاپی ۴) تابستان ۱۳۸۹، صفحه ۲۱ -۳۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۲۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۸/۱۲/۲۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۴/۱۵

تغییرات الگوی الکتروفورتیک و فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه‌های پستهٔ احمد آقایی (*Pistacia vera* L.) رفسنجان در پاسخ به آلودگی با قارچ آسپرژیلوس نیجر (*Aspergillus niger*)

مهوش هادوی، شیده منتصر کوهساری[1] و ریحانه سریری[2]*
[1] دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران
[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان

چکیده

پسته از گیاهان استراتژیک و مهم در کشور ماست که سلامت و کیفیت آن نقش مهمی در صادرات آن دارد. از طرفی، تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در اغلب موارد می تواند به عنوان مارکر برای تنش های مختلف در گیاهان استفاده شود. هدف از این پژوهش، مقایسه فعالیت پراکسیدازها در گیاهچه پسته در دو حالت سالم و آلوده به قارچ آسپرژیلوس نیجر (*Aspergillus niger*) است. به منظور بررسی فعالیت پراکسیدازها پس از کشت دانه های پسته، ۶ بار نمونه‌برداری به صورت یک روز در میان انجام شد. بررسی فعالیت آنزیم از طریق سنجش اسپکتروفتومتری و نیز با استفاده از الکتروفورز پلی آکریل آمید (PAGE)، نشان داد که میزان فعالیت پراکسیدازها در گیاهچه پسته آلوده به قارچ آسپرژیلوس نیجر بیش از پسته غیر آلوده است.

واژه‌های کلیدی: پستهٔ احمد آقایی، پراکسیداز،PAGE، آسپرژیلوس نیجر

مقدمه

گیاهان موجوداتی غیر متحرک هستند و به همین علت تحت تأثیر شرایط متغیر محیط، مانند خشکسالی، توفان، دمای بالا، غلظت بالای نمک، فلزات سنگین، تابش اشعه با شدت بالا و آلودگی با عوامل بیماری‌زا قرار می گیرند. بنابراین، باید متابولیت‌های لازم برای سازگاری با تنش‌های محیط را تولید کنند. بدین منظور، درگیاهان به طور طبیعی برنامهٔ ژنتیکی برای تولید پروتئین‌های ویژه در برابر تحریکات تنش‌زا وجود دارد .برای مثال، بافت‌های غوطه‌ور گیاهان ضمن سنتز الکل دهیدوژناز (ADH) تشکیل اتانول را به همراه اکسیداسیون (NADH) کاتالیز می کنند و سبب ثابت ماندن سرعت گلیکولیز در سلول‌های بی‌هوازی می گردند (Ho and Sachs, 1989; Michell and Barrett, 2002).

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: sariri@guilan.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۱۱۳۲۵۸۲۴

گیاهان در برابر عوامل تنش‌زای زیستی پروتئین هایی با نام کلی پروتئین‌های وابسته به عامل بیماری‌زا (PRPs: Pathogen Related Proteins) تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. تحقیقات نشان داده‌اند که اعضای یک تا پنج این پروتئین‌ها (PRP1 - PRP5) فعالیت آنزیمی ندارند، ولی از PRP6 تا PRP11 همگی دارای خاصیت آنزیمی هستند و آنزیم پراکسیداز در خانواده PRP9 قرار دارد (Caruso *et al.*, 1999; Chittoor *et al.*, 1999; Van Loon and Vanstrien, 1999).

از جمله آنزیم‌هایی که بر اثر تنش‌های زیستی فعال می‌شود، پراکسیدازها هستند .دیوارهٔ سلولی، یکی از اولین سطوح دفاع گیاه بر علیه حمله پاتوژن است و پراکسیدازها نقشی کلیدی در فرآیند سنتز دیواره سلولی دارند. نخستین بار Schonbein در سال ۱۸۵۵ به وجود این دسته از پروتئین‌ها پی برد و Linossier در سال ۱۸۹۸ نام پراکسیداز را بر آن‌ها نهاد. پراکسیدازها، گلیکوپروتئین هایی واجد گروه هم هستند که به کمک پراکسید هیدروژن باعث انجام اکسیداسیون در بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی، مانند: سیتوکروم C، نیتریت، آسکوربیک‌اسید، ایندول آمین‌ها و یون‌های ید می‌گردند (Parida *et al.*, 2004). این فرآیندها شامل اکسیداسیون هیدروکسی سینامیل الکل‌ها به همراه رادیکال‌های آزاد، اکسیداسیون فنل، واکنش چلیپایی پلی ساکاریدها ومونومرهای اکستنسین، چوبی و چوب پنبه‌ای شدن است. به‌طور کلی، مطالعاتی که به رسوب مواد قوی‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی و فعالیت های پراکسیدازی مرتبط‌اند، نشان می‌دهند که عملکرد این آنزیم‌ها در رابطه با استحکام دیوارهٔ سلولی است. در زمان فعالیت پراکسیدازها، انواع اکسیژن فعال تولید می‌شود که بسیار سمّی است. از طرفی، این فعالیت ممکن است به عنوان یک پیام‌رسان برای ایجاد پاسخ‌های دفاعی از طرف گیاه عمل کند (Chittoor *et al.*, 1999; Habib *et al.*, 2003 Van Loon, 1982).

قارچ آسپرژیلوس، که یکی از گونه‌های آن، *Aspergillus niger* است، سبب بیماری کپک سیاه در میوه، دانه و سبزیجات می‌شود و یک آلوده‌کنندهٔ معمول مواد غذایی است. بیماری زایی این قارچ در دانه های پسته به اثبات رسیده است. در کالیفرنیا گزارش شده است که این قارچ در دانه پسته، بیماری کپک دانه و پوست را ایجاد می‌نماید (Samson *et al.*, 2001).

در آمریکا آفت ریشه و جوانه و انواع مختلف تخریب دانه و پوست پسته را به این قارچ نسبت داده‌اند. این قارچ ها در میوه های طبیعی که به وسیله حشرات و یا فشارهای مکانیکی زخمی شده‌اند، ایجاد بیماری می‌نمایند. میزان شیوع بیماری در میوه هایی که به طور طبیعی باز می‌شوند، بیش از میوه‌هایی است که زخمی شده‌اند (Themis, 2004). کلونی های این قارچ در محیط دکستروز آگار اسیدی (Acidified potato dextrose Agar) ابتدا سفید یا زرد رنگ‌اند. سپس به صورت یک لایهٔ متراکم قهوه‌ای یا مشکی گسترش می‌یابند. دمای مناسب برای رشد ۲۵ - ۳۳ درجه سانتی‌گراد است. این قارچ دارای کاربردهای صنعتی متفاوت نیز است (Themis, 2004).

گیاه پسته از گیاهان مهم و اقتصادی جنوب ایران است که محصول آن علاوه بر ارزش غذایی بالا، اهمیت صادرات دارد. با توجه به اثبات بیماری‌زایی قارچ آسپرژیلوس در قسمت‌های مختلف گیاهان، در صورت آلوده شدن قسمت های خوراکی گیاه، خطر آلودگی در مغز پسته وجود خواهد شد. این قارچ می‌تواند موجب

استرس در گیاه پسته شده، واکنش های پاسخی متناسب با آن مانند تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز را موجب شود. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی فعالیت آنزیمی در گیاهچه‌های در حال رشد پسته سالم و آلوده به قارچ آسپرژیلوس نیجر است.

مواد و روش‌ها

برای انجام کارهای عملی در این تحقیق، از دانه‌های پستهٔ سالم و آلوده به قارچ در دوره‌های مختلف رشد، عصارهٔ پروتئینی تهیه شد و سپس فعالیت ویژه آنزیمی بر حسب u/ml، به‌دست آمد. در انجام روش‌های عملی حداکثر دقت در استریل کردن دانه‌ها و استخراج پروتئین به عمل آمد تا نتایج واقعی به دست آمده و خطاهای احتمالی به حداقل برسند. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز، ابتدا سوبسترای ترکیبی H_2O_2 و۴- آمینو آنتی پیرین آماده شد و سپس میزان تغییرات جذب نوری در زمان‌های صفر و یک دقیقه پس از تلقیح آنزیم در طول موج ۵۱۰ نانو متر محاسبه گردید.

دانه های پسته (*Pistacia vera*) از مرکز تحقیقات پسته رفسنجان تهیه شد. در این تحقیق، از ورمی کولیت خاک مانند (شرکت Shawa Mine) استفاده شد. به منظور جلوگیری از آلوده شدن دانه‌های پسته، بستر ورمی‌کولیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $^{\circ C}$ ۱۲۰ اتوکلاو شد. در درون ظروف مقاوم به حرارت با ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر، ورمی‌کولیت تا ارتفاع ۲ تا ۳ سانتی‌متر ریخته شد. به منظور آماده‌سازی دانه های پسته، ابتدا از پوسته سخت جدا و به ظرفی دیگر انتقال یافتند و سپس به آن آب اضافه شد. پس از گذشت ۶ ساعت که دانه‌ها به اندازهٔ کافی آب جذب کرده و متورم شدند، برای کشت آماده شده بودند. ظرف‌های کشت‌داده شده داخل دستگاه ژرميناتور (مدل GL60 شرکت طراحی مهندسی گروک) قرار داده شد، تنظیم دستگاه به ترتیب زیر انجام گرفت: در سیکل ۱ (سیکل روز)، دما $^{\circ C}$ ۳۰ و رطوبت ۲۵٪ و در سیکل ۲ (سیکل شب)، دما $^{\circ C}$ ۲۷ و رطوبت ۲۰٪ تنظیم شدند. تأمین نور در دستگاه ژرميناتور به کمک شش عدد لامپ مهتابی ۳۰ وات صورت گرفت که در شرایط اول، از ماکزیمم نور به معنی روشن بودن همهٔ لامپ ها و فقدان نور یا تاریکی برای شرایط دوم استفاده شد. به منظور آلوده‌سازی دانه‌های پسته ، محیط کربوکسی متیل سلولز ۲٪ (محلول در آب) تهیه و استریل شد. سپس توسط لوپ فلزی زیر هود لامینار در شرایط کاملاً استریل، اسپور قارچ *A. niger* (تهیه شده از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه گیلان) به محیط افزوده شد. آنگاه دانه‌های پسته خیسانده و به محیط اضافه شد و به مدت نیم ساعت روی شیکر قرار گرفت. پس از طی مراحل فوق، پسته به طریق گفته شده، در روی ورمی کولیت و داخل ظروف ویژه کشت داده شد. از دانه‌های پسته در بازه‌های زمانی۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز پس از کشت، هر بار به میزان پنج گرم از اندام هوایی و ریشه هر گیاهچه نمونه‌برداری شد. برای جداسازی آنزیم پراکسیداز، پنج گرم پسته وزن و ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار، pH=۷/۲ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل درون هموژنایزر کاملاً همگن شد. محلول به‌دست آمده در دمای $^{\circ C}$ ۴ به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵۰۰ دور (rpm) سانتریفیوژ شد. برای جلوگیری از افزایش دما هنگام عمل از سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای تنظیم شده روی $^{\circ C}$ ۴ استفاده شد. سپس محلول رویی به ظرف جدید منتقل و رسوب دور ریخته شد (Mitchel and Barrett, 2002). در مورد دانه‌های آلوده به قارچ، پس از

نمونه‌برداری ، باید دانه‌ها چندین مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو شود تا احتمال وجود قارچ و ترشحات خارج سلولی از بین برود. برای افزایش غلظت پروتئین در عصاره استخراجی، رسوب‌دهی پروتئین توسط آمونیوم سولفات ۸۵٪ صورت گرفت. به هر ۱۰ ml عصاره استخراج شده، ۵/۵۹ گرم نمک آمونیوم سولفات افزوده شد. به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت آنزیمی، این مراحل باید در دمای $^{\circ C}$ ۴ و با سرعت انجام شود (Habib *et al.*, 2003). پس از آنکه نمک اضافه و حل شد، محلول به لوله منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در در دمای $^{\circ C}$ ۴ و سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. سرانجام رسوب حاصل، پس از دور ریختن محلول رویی، دیالیز شد.

نحوهٔ انجام دیالیز

الف- کیسه دیالیز (خریداری شده از شرکت پژوهش گستر خراسان) به قطر ۴ و طول ۲۰ سانتی‌متر برش داده شد و سپس در محلول حاوی $NaHCO_3$ ۱۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۱۰ میلی‌مولار، که به نسبت مساوی (v/v) در ساخت محلول از آنها استفاده شده است، به مدت پنج دقیقه جوشانده شد.

ب- کیسه‌ها در اتانول ۲۰٪ در فریزر با سرمای $^{\circ C}$ ۴- نگهداری و قبل از مصرف، با آب دوبار تقطیر، خوب شستشو داده شد. ته کیسه دیالیزها مسدود شد و رسوب حاصل از سانتریفیوژ به کیسه ها منتقل گردید. در انتها سر کیسه ها نیز بسته شد. برای خارج کردن نمک موجود در محلول، کیسه های دیالیز حاوی نمونه، به مدت ۶ ساعت در بشر حاوی محلول بافر فسفات قرارگرفت. در این مدت، سه بار بافر فسفات خالی و بشر با بافر تازه پر شد. شایان ذکر است که دیالیز به منظور حفظ فعالیت آنزیمی در دمای $^{\circ C}$ ۴ انجام شد. پس از اتمام کار، عصاره‌ها برای استفاده در مراحل بعدی، از کیسه‌های دیالیز به درون لوله منتقل شد (Mitchel and Barrett, 2002). میزان پروتئین کل نمونه توسط روش برادفورد اندازه‌گیری شد. مراحل فوق طی سه تکرار و هر بار حداقل در مورد ۳۰ گیاهچهٔ پسته انجام شد.

سنجش فعالیت پراکسیداز

برای تعیین فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز گیاهی می‌توان از رابطه زیر استفاده نمود که در آن فعالیت ویژه بر حسب unit/mg محاسبه می‌شود. فعالیت ویژه یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک میکرومول پراکسیدهیدروژن در مدت زمان یک دقیقه و در در دمای $^{\circ C}$ ۲۵ است.

$$Unit/mg = \Delta A_{510}/(6.58\times C)$$

ΔA_{510}: تفاوت جذب در دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر و C: میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر مخلوط واکنش است. برای اندازه‌گیری جذب آنزیمی از اسپکتروفتومتر (مدل Pharmacia biotech) استفاده شد (Sariri *et al.*, 2006).

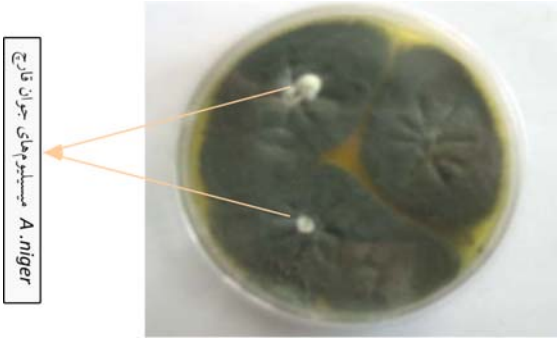
سنجش فعالیت روی ژل الکتروفورز
(PAGE: Poly Acrylamid Gel Electrophoresis)

لازم است آنزیم مورد نظر؛ یعنی پراکسیداز در ضمن حفظ فعالیت خود، تا حد امکان از بقیه پروتئین ها جدا گردد. در این حال، از الکتروفورز توسط ژل پلی آکریل‌آمید (PAGE) ناپیوسته استفاده شد که پروتئین را واسرشت نمی‌کند. ژل تحتانی ۱۰٪ و ژل فوقانی ۵ ٪ است. پس از مخلوط نمودن یک حجم بافر نمونه با چهار حجم از عصاره‌های حاصل از دیالیز، ۶۰ میکرولیتر نمونه به داخل

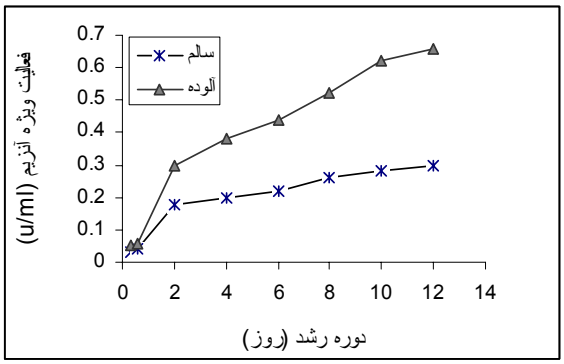
هر یک از چاهک های ژل تزریق شد. به منظور جلوگیری از گرم شدن ژل و کاهش فعالیت آنزیمی در مورد ژل فوقانی ولتاژ ۷۰ میلی‌آمپر و برای ژل تحتانی ۴۰ میلی‌آمپر به کار برده شد. محلول رنگ‌آمیزی عبارت بود از: ۵۰ ml محلول ۵۰ میلی‌مولار استات سدیم، ۳۳۰ml محلول ۳۰٪ H_2O_2 و ۳۳۰ml گایاکول. این محلول باید سریعاً ساخته و استفاده شود. رنگ‌آمیزی ژل در محیط کاملاً تاریک انجام شد. ژل تا زمان مشاهده باندهای قهوه‌ای تیره در محلول رنگ‌آمیزی نگهداری شد (Mitchel and Barrett, 2002). از نمونه قارچ آسپرژیلوس نیجر دو هفته پس از کشت، برای آلوده نمودن نمونه‌های پسته، استفاده شد.

نتایج

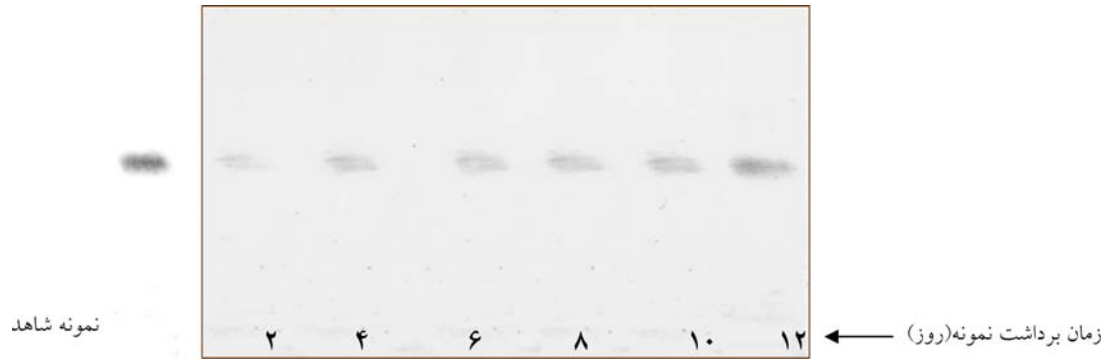
اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم نشان می‌دهند که میزان فعالیت در نمونه‌های آلوده بیش از نمونه‌های سالم است. شکل ۲ مقایسه فعالیت آنزیمی را در دو حالت سالم و آلوده نشان می‌دهد. در شکل‌های ۳ و ۴ ژل‌های PAGE مربوط به دو حالت سالم و آلوده آورده شده‌اند. به طوری که از شکل ۳ نتیجه می‌شود، در نمونه سالم پراکسیداز دارای یک باند است و با افزایش زمان برداشت، غلظت آن افزایش می‌یابد و در نمونه آلوده دو باند مشاهده می‌شود (شکل ۴) و در این حالت نیز غلظت نسبت مستقیم با زمان برداشت نمونه دارد.



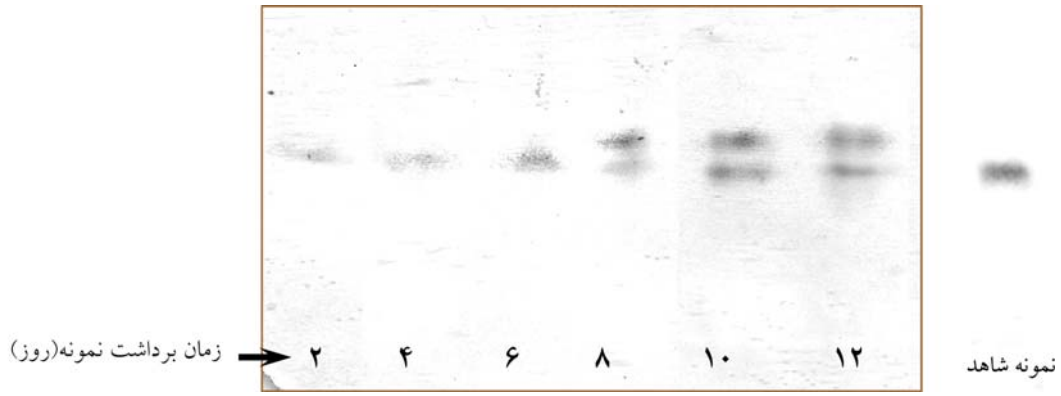
شکل۱- نمونه قارچ آسپرژیلوس نیجر در محیط کشت دکستروز آگار (دو هفته پس از کشت) که از اسپور آن برای آلوده‌سازی دانه پسته استفاده شد.



شکل ۲ - مقایسه فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه های سالم و آلوده به قارچ پسته احمد آقایی طی روزهای مختلف رشد دانه. الگوی فعالیت آنزیم در دو نمونه سالم و آلوده تقریباً یکسان است، اما مقدار فعالیت آن در نمونه‌های آلوده بیشتر است. همه اندازه‌گیری‌ها با ۳ تکرار انجام شده و $P \leq 0.05$ بود.



شکل ۳ – ژل PAGE در نمونه سالم پسته احمد آقایی، باندی که درستون سمت چپ، مشاهده می‌شود (نمونه شاهد) مربوط به آنزیم پراکسیداز (E.C. 1.11.1.7) تهیه شده از شرکت Sigma است.



شکل ۴ – ژل PAGE در نمونه آلوده به قارچ آسپرژیلوس نیجر پسته احمد آقایی. به طوری که ملاحظه می‌شود، در نمونه‌های آلوده دو باند وجود دارند.

در دانه‌های آلوده به قارچ آسپرژیلوس نیجر، تغییر آنزیم در دانه‌های خشک و کاشته شده دارای الگوی مشابه با دانه‌های سالم است؛ با این تفاوت که میزان افزایش آنزیم در دانه آلوده طی روزهای مختلف رشد بسیار بیشتر از دانه سالم است. شایان ذکر است که در دانه کشت داده نشده و خیسانده آلوده به قارچ ، نسبت به این دو حالت از نمونه سالم تغییری مشاهده نمی‌شود. شکل ۲ نیز نشان‌دهندهٔ افزایش تدریجی فعالیت ویژه آنزیم است. مطالعات آماری با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ONE WAY ANOVA) نشان می‌دهد که تفاوت‌های موجود بین میزان آنزیم پراکسیداز در دانه‌های سالم پسته احمد آقایی با میزان آن در دانه‌های آلوده معنادار ($P \leq 0.05$) است.

بحث و جمع‌بندی

Lagramini و همکاران در سال ۱۹۹۰ و Samson و همکاران در سال ۲۰۰۱ به طور جداگانه نشان داده‌اند که آلوده شدن گیاه تنباکو توسط ویروس موزائیک تنباکو، باعث القای بیان دو نوع از ایزوزیم‌های آنزیم پراکسیداز در برگ های آلوده و غیر آلوده گیاه می‌شود. از طرفی، آنزیم پراکسیداز ویژه سوبرینی شدن، در گیاه گوجه‌فرنگی در

صورت آلودگی با *Verticillie alboartum* فعال می‌شود. (Lagramini *et al.*, 1990; Samson *et al.*, 2001). Caruso و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که میزان آنزیم پراکسیداز گیاه گندم در روزهای مختلف رشد، متفاوت است. شدت فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های آلوده به قارچ، با گذشت روزهای رشد افزایش می‌یابد. در سال ۲۰۰۲ نتایج پژوهشی نشان داد که آنزیم پراکسیداز هم در دانه خشک (قبل از کشت) و هم در دانه در حال رشد گیاهان مختلف موجود است. وجود این آنزیم در کنار آنزیم‌های دیگر، همچون: اندوکیتیناز، اگزوکیتیناز، کیتوبیاز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، لکتین و مهار کننده‌های پروتئازی به صورت یک سیستم دفاعی مرکب عمل می‌کنند که دانه را در طی جوانه‌زنی و رشد حمایت می‌نمایند (Mitchell and Barrett, 2002). میزان آنزیم پراکسیداز در دانه خشک و خیسانده (دو نقطه اول نمودار شکل ۱) کمتر از دانه‌های در حال رویش است و با افزایش روزهای جوانه‌زنی، میزان آنزیم نیز افزایش می‌یابد.

شاید یکی از علل افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه آلوده به قارچ، دخیل بودن این آنزیم در سنتز لیگنین و سوبرین دیوارهٔ سلولی باشد. با افزایش فعالیت این آنزیم، سرعت ساخت دیوارهٔ سلولی که یکی از سدهای دفاعی اولیه گیاه در برابر انتشار عوامل پاتوژن است، افزایش می یابد. در واقع، با افزایش فعالیت این آنزیم، گیاه اولین گام را برای دفاع علیه عوامل پاتوژن بر می‌دارد. این افزایش می تواند با افزایش بیان آنزیم اولیه و یا بیان یک ایزوزیم جدید از آنزیم رخ دهد. همان‌گونه که بر روی ژل (شکل های ۲ و ۳) مشاهده شد تعداد باندها از روز هشتم نمونه‌برداری به بعد افزایش می یابد. می توان افزایش باند را بیان ایزوزیم جدیدی از آنزیم پراکسیداز دانست که فقط در شرایط آلودگی سنتز می‌شود. Macrae و Fergusson در سال ۱۹۸۱ طی تحقیقی دریافتند که بر اثر ایجاد تنش، ابتدا آنزیم سوپراکسید دیسموتاز فعال می‌شود که همراه با NADPH اکسیداز باعث افزایش H_2O_2 می‌گردد. این امر سبب فعال شدن آنزیم‌هایی، چون: پراکسیداز، کاتالاز و اکسیدازهای وابسته به آنها که در امر دفاع دخالت دارند، می‌گردد. پس از آن، گیاه وارد فاز دوم دفاع می‌گردد که در آن میزان آنزیم‌های فوق به جز سوپراکسید دیسموتاز و NADPH اکسیداز کاهش می‌یابد. Levin و همکاران در سال ۱۹۹۴و Kumar در سال ۲۰۰۱ به طور جداگانه بیان کردند که در این هنگام غلظت پراکسید هیدروژن با توجه به فعالیت اندک آن، افزایش چشم‌گیری را نشان می‌دهد. افزایش بیش از حد H_2O_2 به عنوان علامت برای گیاه تلقی شده، باعث فعال شدن سیستم دفاعی آن می‌گردد. معمولاً گیاه بعد از سی‌اُمین روز پس از ایجاد تنش وارد فاز دوم دفاعی می‌گردد (Chandru *et al.*, 2003).

در این بررسی، میزان فعالیت آنزیمی دانه پسته فقط تا روز دوازدهم بررسی شده است، پس به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت با توجه به فعالیت ویژه آنزیمی، دانه در فاز اول دفاعی بوده و هنوز وارد فاز دوم نشده است. این امر را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که گیاه ابتدا با افزایش میزان آنزیم پراکسیداز سدهای دفاعی اولیه خود همچون دیواره سلولی را تقویت می‌نماید و پس از آن، با کاهش میزان آنزیم و افزایش تجمع سوبسترای آن؛ یعنی پراکسید هیدروژن، باعث راه‌اندازی سیگنال‌های دفاعی جدید می‌گردد. به عبارت دیگر، گیاه در مرحله اول با افزایش میزان آنزیم پراکسیداز و در مرحله بعد، با کاهش میزان آن باعث راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی متفاوت در برابر پاتوژن می‌گردد. نتایج فوق در مورد گیاهچه پسته مشاهده شده و

ممکن است، گیاه بالغ پسته از این الگو پیروی نکند و مکانیزم دفاعی متفاوتی را در مقابله با پاتوژن انتخاب نماید. بدیهی است حصول اطمینان در این زمینه نیازمند آزمایش فرضیه فوق در گیاه کامل پسته است.

منابع

Levin, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, Ch. (1994) H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 79: 583-589.

Macrae, E. A. and Fergusson, I. B. (1981) Changes in catal.ase activity and hydrogen peroxide concentration in plant in response to low temperature. Plant Physiology 65:51-56.

Mitchell, W. C. and Barrett, S. H. (2002) Expression of peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes in *viola cornuta* L. during seed germination. Plant Peroxidase News Letter Issue 15: 23-28.

Parida, A. K., Das, A. B. and Mohanty, P. (2004) Defense potentials to NaCl in a mangrove, Bruguiera parviflora: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. Journal of Plant Physiology 161: 531-542.

Samson, R. A, Houbraken, J., Summerbell, R. C., Flannigan, B. and Miller, J. D. (2001) Microogranisms in home and indoor work environments. Taylor and Francis, NewYork.

Sariri, R., Sajedi, R. H., Jafarian, V. and Khaje, Kh. (2006) Inhibition of horseraddish peroxidase by thiol type inhibitors. Journal of Molecular Liquids 123: 20-23.

Themis, J. M. (2004) Above ground fungal. disease. Pest disease and physiological.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی دانشگاه گیلان سپاسگزاری می‌شود.

Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P. and Buonocore, V. (1999) Induction of pathogenesis related proteins in germinating wheat seeds infected with Fusarium culmorum. Plant Science 140: 107-120.

Chandru, H. K., Kim, E., Kuk, Y., Cho, K. and Han, O. (2003) Kinetics of wound induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential. activation at different growth stages. Plant Science 164: 935-941.

Chittoor, J. M., Leach, J. E, White, F. F. (1999) Pathogenesis related proteins in plants 171-193. CRC Press, London.

Habib, F., Khalil-ur-Rehman , Anjum Zia, M., Zia-ur-Rehman and Khalid Saeed, M. (2003) Peroxidase: Purification from soybean seeds. Pakistan Journal of Biological Sciences 6(2): 130-132.

Ho, D. and Sachs, M. M, (1989) Stress induced proteins characterization and the regulation of their synthesis. Journal of Plant Biochemistry 11:347-378.

Kumar, R. G., (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidase anion generation, superoxide anion germination and activities of antioxidant Enzymes. Cellular and Molecular Biology Letters 8: 279-284.

Lagramini, L. M., Bradford, S. and Rothstein, S. (1990) Peroxidase- induced wilting in transgenic tobacco plants. Plant Cell 2: 7-12.

disorders management 214-232.

Van Loon, L. C. (1982) Regulation of changes in proteins and enzymes associated with defense against virus infection, inactive defense mechanisms in plants. Plenum Press, New York.

Van Loon, L. C. and VanStrien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comoarative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Electrophoretic changes and peroxidase activities in infected and uninfected Ahmadaghaii Pistachio Seedlings (*Pistacia vera* L.) with *Aspergillus niger* from Rafsanjan – Iran

Mahvash Hadavi, Shideh Montasser Kohssari [1] and Reyhaneh Sariri [2*]

[1] School of Biology, College of Sciences, University of Tehran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan

Abstract

Peroxidase is one of the most important enzymes with many important functions in plant's defense system. In this study, the response of peroxidase to infection by *Aspergillus niger* was investigated. In order to measure the enzyme activity, ahmadaghaii pistachio nuts (*P. vera* L.) were infected with *Aspergillus niger* and then they were cultured in sterile vermiculite medium. Peroxidase was then extracted in phosphate buffer and precipitated by amonium sulfate. The enzyme activity was then assessed spectrophotometrically and by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). The results showed that the activity of peroxidase was higher in infected seedlings compared to uninfected samples.

Key words: Ahmadaghaii Pistachio, Peroxidase, PAGE, *Aspergillus niger*

*Corresponding Author: sariri@guilan.ac.ir