

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

مهوش هادوی، شیده منتصر کوهساری<sup>۱</sup> و ریحانه سریری<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، 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 می‌تواند به عنوان مارکر برای تنش‌های 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 دانه‌های 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 پلی‌آکریل آمید (PAGE)، نشان داد که میزان فعالیت پراکسیدازها در گیاهچه پسته آلوده به قارچ آسپرژیلوس نیجر بیش از پسته غیر آلوده است.

**واژه‌های کلیدی:** پسته احمد آقایی، پراکسیداز، PAGE، آسپرژیلوس نیجر

### مقدمه

برنامه ژنتیکی برای تولید پروتئین‌های ویژه در برابر تحریکات تنش‌زا وجود دارد. برای مثال، بافت‌های غوطه‌ور گیاهان ضمن سنتز الکل دهیدروژناز (ADH) تشکیل اتانول را به همراه اکسیداسیون (NADH) کاتالیز می‌کنند و سبب ثابت ماندن سرعت گلیکولیز در سلول‌های بی‌هوازی می‌گردند (Ho and Sachs, 1989; Michell and Barrett, 2002).

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 می‌گیرند. بنابراین، باید متابولیت‌های لازم برای سازگاری با تنش‌های محیط را تولید کنند. بدین منظور، در گیاهان به طور طبیعی

بسیار سمی 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 آلوده‌کننده معمول مواد غذایی است. بیماری زایی این قارچ در دانه‌های 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 قارچ‌ها در میوه‌های طبیعی که به وسیله حشرات و یا فشارهای مکانیکی زخمی شده‌اند، ایجاد بیماری می‌نمایند. میزان شیوع بیماری در میوه‌هایی که به طور طبیعی باز می‌شوند، بیش از میوه‌هایی است که زخمی شده‌اند (Themis, 2004). کلونی‌های این قارچ در محیط دکستروز آگار اسیدی (Acidified potato dextrose Agar) ابتدا سفید یا زرد رنگ‌اند. سپس به صورت یک لایه 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 قسمت‌های خوراکی گیاه، خطر آلودگی در مغز پسته وجود خواهد شد. این قارچ می‌تواند موجب

گیاهان در برابر عوامل تنش‌زای زیستی پروتئین‌هایی 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. دیواره 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، گلیکوپروتئین‌هایی واجد گروه هم هستند که به کمک پراکسید هیدروژن باعث انجام اکسیداسیون در بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی، مانند: سیتوکروم C، نیتريت، آسکوربیک اسید، 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 و مونومرهای اکستنسین، چوبی و چوب پنبه‌ای شدن است. به طور کلی، مطالعاتی که به رسوب مواد قوی‌کننده دیواره سلولی و فعالیت‌های پراکسیدازی مرتبط‌اند، نشان می‌دهند که عملکرد این آنزیم‌ها در رابطه با استحکام دیواره سلولی است. در زمان فعالیت پراکسیدازها، انواع اکسیژن فعال تولید می‌شود که

ظرف‌های کشت داده شده داخل دستگاه ژرمیناتور (مدل GL60 شرکت طراحی مهندسی گروک) قرار داده شد، تنظیم دستگاه به ترتیب زیر انجام گرفت: در سیکل ۱ (سیکل روز)، دما  $30^{\circ}\text{C}$  و رطوبت ۲۵٪ و در سیکل ۲ (سیکل شب)، دما  $27^{\circ}\text{C}$  و رطوبت ۲۰٪ تنظیم شدند. تأمین نور در دستگاه ژرمیناتور به کمک شش عدد لامپ مهتابی ۳۰ وات صورت گرفت که در شرایط اول، از ماکزیم نور به معنی روشن بودن همه لامپ‌ها 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 زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ روز پس از کشت، هر بار به میزان پنج گرم از اندام هوایی و ریشه هر گیاهچه نمونه برداری شد. برای جداسازی آنزیم پراکسیداز، پنج گرم پسته وزن و ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار،  $\text{pH}=7/2$  به آن اضافه شد. مخلوط حاصل درون هموژنایزر کاملاً همگن شد. محلول به دست آمده در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ دقیقه در  $6500$  دور (rpm) سانتریفیوژ شد. برای جلوگیری از افزایش دما هنگام عمل از سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای تنظیم شده روی  $4^{\circ}\text{C}$  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

استرس در گیاه پسته شده، واکنش‌های 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 اسپرژیلوس نیجر است.

## مواد و روش‌ها

برای انجام کارهای عملی در این تحقیق، از دانه‌های پسته سالم و آلوده به قارچ در دوره‌های مختلف رشد، عصاره پروتئینی تهیه شد و سپس فعالیت ویژه آنزیمی بر حسب  $\text{u/ml}$ ، به دست 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  و ۴-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.

دانه‌های 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 ورمی کولیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $120^{\circ}\text{C}$  اتوکلاو شد. در درون ظروف مقاوم به حرارت با ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر، ورمی کولیت تا ارتفاع ۲ تا ۳ سانتی‌متر ریخته شد. به منظور آماده‌سازی دانه‌های پسته، ابتدا از پوسته سخت جدا و به طرفی دیگر انتقال یافتند و سپس به آن آب اضافه شد. پس از گذشت ۶ ساعت که دانه‌ها به اندازه کافی آب جذب کرده و متورم شدند، برای کشت آماده شده بودند.

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 گیاهچه 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 پراکسید هیدروژن در مدت زمان یک دقیقه و در در دمای ۲۵ °C است.

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

$\Delta A_{510}$ : تفاوت جذب در دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر و C: میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر مخلوط واکنش است. برای اندازه‌گیری جذب آنزیمی از اسپکتروفوتومتر (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 پروتئین‌ها جدا گردد. در این حال، از الکتروفورز توسط ژل پلی‌آکریل‌آمید (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

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 ۴ °C 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 ۴ °C و سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. سرانجام رسوب حاصل، پس از دور ریختن محلول رویی، دیالیز شد.

### نحوه انجام دیالیز

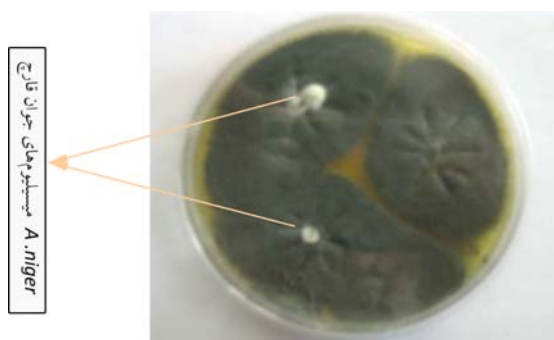
الف- کیسه دیالیز (خریداری شده از شرکت پژوهش گستر خراسان) به قطر ۴ و طول ۲۰ سانتی‌متر برش داده شد و سپس در محلول حاوی  $\text{NaHCO}_3$  ۱۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۱۰ میلی‌مولار، که به نسبت مساوی (v/v) در ساخت محلول از آنها استفاده شده است، به مدت پنج دقیقه جوشانده شد.

ب- کیسه‌ها در اتانول ۲۰٪ در فریزر با سرمای ۴ °C- نگهداری و قبل از مصرف، با آب دوبار تقطیر، خوب شستشو داده شد. ته کیسه دیالیزها مسدود شد و رسوب حاصل از سانتریفیوژ به کیسه‌ها منتقل گردید. در انتها سر کیسه‌ها نیز بسته شد. برای خارج کردن نمک موجود در محلول، کیسه‌های دیالیز حاوی نمونه، به مدت ۶ ساعت در بشر حاوی محلول بافر فسفات قرار گرفت. 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 ۴ °C

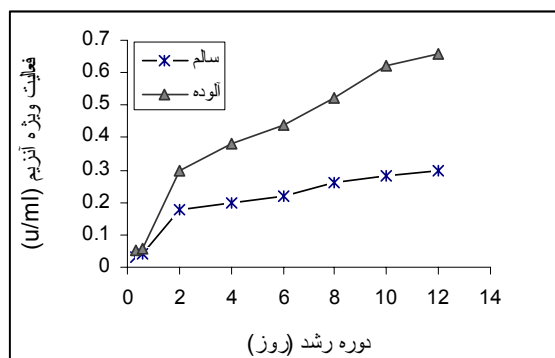
### نتایج

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.

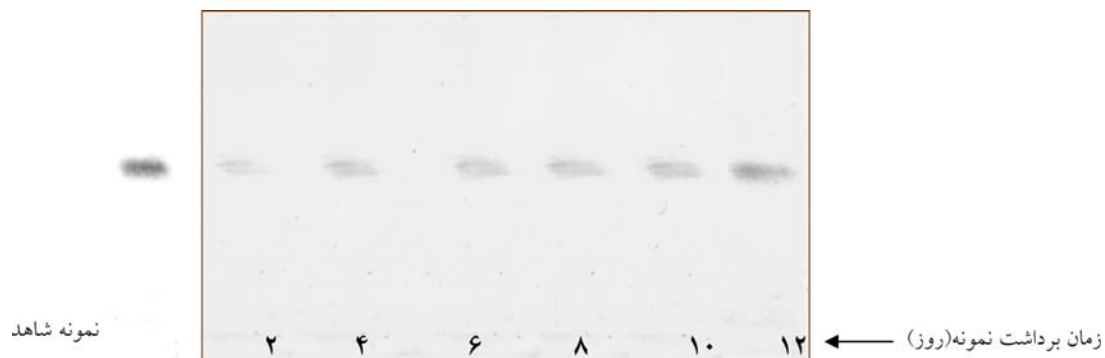
هر یک از چاهک‌های ژل تزریق شد. به منظور جلوگیری از گرم شدن ژل و کاهش فعالیت آنزیمی در مورد ژل فوقانی ولتاژ ۷۰ میلی‌آمپر و برای ژل تحتانی ۴۰ میلی‌آمپر به کار برده شد. محلول رنگ آمیزی عبارت بود از: ۵۰ ml محلول ۵۰ میلی‌مولار استات سدیم، ۳۳۰ ml محلول ۳۰٪  $H_2O_2$  و ۳۳۰ ml گایاکول. این محلول باید سریعاً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



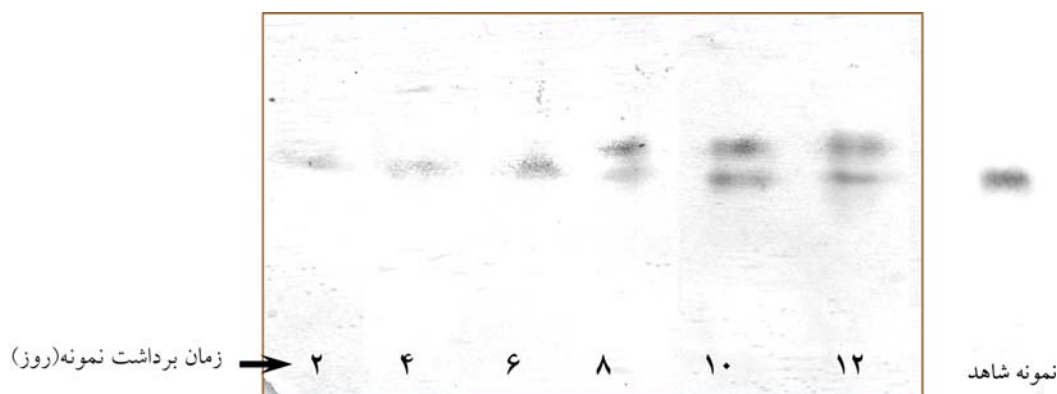
شکل ۱- نمونه قارچ آسپرژیلوس نیجر در محیط کشت دکستروز آگار (دو هفته پس از کشت) که از اسپور آن برای آلوده‌سازی دانه پسته استفاده شد.



شکل ۲- مقایسه فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌های 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، باندهای که در ستون 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.

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 برگ‌های آلوده و غیر آلوده گیاه می‌شود. از طرفی، آنزیم پراکسیداز ویژه سوبرینی شدن، در گیاه گوجه‌فرنگی در

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 نشان‌دهنده افزایش تدریجی فعالیت ویژه آنزیم است. مطالعات آماری با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ONE WAY ANOVA) نشان می‌دهد که تفاوت‌های موجود بین میزان

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 ۱۹۹۴ و 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 سی‌امین 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 گیاهیچه پسته مشاهده شده و

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 گیاهیچه‌های 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، آگروکیتیناز، کیتوبیاز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، لکتین و مهارکننده‌های 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 گیاهیچه آلوده به قارچ، دخیل بودن این آنزیم در سنتز لیگنین و سوپرین دیواره سلولی باشد. با افزایش فعالیت این آنزیم، سرعت ساخت دیواره سلولی که یکی از سدهای دفاعی اولیه گیاه در برابر انتشار عوامل پاتوژن است، افزایش می‌یابد. در واقع، با افزایش فعالیت این آنزیم، گیاه اولین گام را برای دفاع علیه عوامل پاتوژن بر می‌دارد. این افزایش می‌تواند با افزایش بیان آنزیم اولیه و یا بیان یک ایزوزیم جدید از آنزیم رخ دهد. همان‌گونه که بر روی ژل (شکل‌های ۲ و ۳) مشاهده شد تعداد باندها از روز هشتم نمونه‌برداری به بعد افزایش می‌یابد. می‌توان افزایش باند را بیان ایزوزیم جدیدی از آنزیم پراکسیداز دانست که فقط

### تقدیر و تشکر

از حمایت مالی دانشگاه گیلان سپاسگزاری می‌شود.

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

- 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.
- Levin, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, Ch. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 catalase 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., Houbroken, J., Summerbell, R. C., Flannigan, B. and Miller, J. D. (2001) Microorganisms 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.*



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 comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.

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

**Mahvash Hadavi, Shideh Montasser Kohssari<sup>1</sup> and Reyhaneh Sariri<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> School of Biology, College of Sciences, University of Tehran

<sup>2</sup> 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, ahmadaghahi 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 ammonium 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:** Ahmadaghahi Pistachio, Peroxidase, PAGE, *Aspergillus niger*