

## مقایسه ویژگی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی پوست نرم پسته در میوه‌های زودخندان و سالم

مریم دهجی پور حیدرآبادی<sup>۱\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۳

تاریخ ارسال: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷

### چکیده

در اثر بروز عارضه زودخندانی در پسته نفوذ اسپور قارچ آسپرژیلوس به مغز تسهیل و با فراهم شدن شرایط مناسب رشد و تکثیر قارچ مقادیر قابل ملاحظه‌ای آفلاتوکسین در توده پسته تولید خواهد شد. از آنجایی‌که هر نوع تنش زیستی یا غیرزیستی متوجه پوست میوه است، بنابراین رشد سلول‌های پوست و انعطاف‌پذیری آن، در مقاومت پوست در برابر این تنش‌ها نقش مهمی به عهده دارد. به منظور بررسی ویژگی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی مرتبط با انعطاف‌پذیری پوست نرم، نمونه‌های سالم و زودخندان رقم کله‌قوچی در زمان برداشت به آزمایشگاه منتقل گردید. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاپاز و پراکسیداز و میزان لیگنین، ترکیبات فنلی، پروتئین تام و کلسیم و منیزیم محلول و باند شده در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاپاز، پراکسیداز و میزان فنل‌های متصل به دیواره در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم افزایش نشان داد. همچنین میزان کلسیم و منیزیم محلول در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم کاهش یافت. در نتیجه پوست نرم نمونه‌های سالم به دلیل کاهش فعالیت پراکسیداز و میزان ترکیبات فنلی متصل به دیواره و کاهش کلسیم و منیزیم باند شده به دیواره‌ی سلولی، در مقابل فشار وارد شده از سوی پوست استخوانی انعطاف‌پذیری بیشتری نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** پراکسیداز، پسته، دیواره سلولی، زودخندانی، فنیل‌آلانین آمونیاپاز

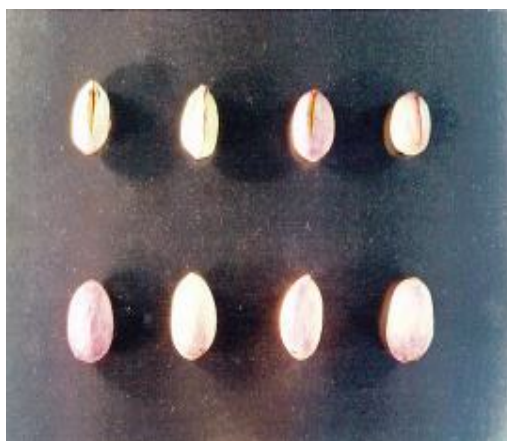
### مقدمه

آلودگی پسته به قارچ آسپرژیلوس در مرحله قبل از برداشت از طریق پسته‌های زودخندان (Early split) صورت می‌گیرد (۱، ۲۱). درصد کمی از پسته‌ها که به عنوان زودخندان شناخته می‌شوند پسته‌هایی غیرطبیعی هستند که هم پوست رویی (Hull) و هم پوست استخوانی (Shell) در طول قسمت خندانی شکاف خورده و مغز در معرض هجوم قارچ‌ها و حشرات قرار می‌گیرد (شکل ۱). علت عمده این عارضه عدم جدا شدن پوست نرم رویی به اندازه کافی

<sup>۱</sup> - استادیار گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، ایران

\*نویسنده مسئول: m.dahaji@vru.ac.ir

از پوست استخوانی می‌باشد به گونه‌ای که پوست رویی همراه با خندان شدن پوست استخوانی شکاف برمی‌دارد (۲۲). رشد سلول‌ها و نرمی بافت‌های پوست و در نتیجه خاصیت انعطاف‌پذیری آن نقش مهمی در مقاومت در برابر فشار وارد شده از طرف پوست استخوانی ایفا می‌کند. عدم انعطاف‌پذیری پوست نرم در مقابل فشار وارد شده از طرف پوست استخوانی به خواص فیزیکیوشیمیایی دیواره سلولی آن مرتبط می‌باشد (۲).



شکل ۱- میوه‌های پسته با پوست نرم زودخندان (ردیف بالا) و میوه‌های پسته با پوست نرم سالم (ردیف پایین).

مطالعات نشان می‌دهد که در زمان رسیدن میوه، تغییراتی در دیواره‌ی سلولی و پلیمرهای تشکیل دهنده آن رخ می‌دهد که در اثر آن بافت میوه نرم شده و انعطاف‌پذیری بیشتری در برابر فشارهای وارده از طرف داخل میوه نشان می‌دهد. این تغییرات به وسیله پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی مسئول در دیواره‌ی سلولی انجام می‌شود، که تغییرات عمده‌ای در خواص مکانیکی پوست ایجاد می‌کنند (۴، ۵، ۱۲). سخت شدن دیواره‌ی سلولی فرایندی نسبتاً پیچیده است که با دخالت آنزیم‌ها و مواد حدواسط متعدد انجام می‌شود. در بین این آنزیم‌ها، پراکسیدازها (EC: 1.11.1.7) نقش مهمی را ایفا می‌کنند. پراکسیدازها در تشکیل اتصالات کووالانی بین کربوهیدرات‌ها و پلیمرهای فنلی و همچنین اتصال بین اکستنسین و پلی‌ساکاریدهای استری شده با فرولیکاسید و پلیمریزاسیون منومرهای فنلی و تشکیل لیگنین دخالت دارند (۱۰). همچنین ارتباط نزدیکی بین فعالیت پراکسیدازهای آپوپلاستی و سنتز لیگنین در دیواره‌ی سلولی وجود دارد. افزایش فعالیت پراکسیدازها به سفت شدن دیواره منجر می‌شود که در بسیاری موارد با کاهش میزان رشد همراه است (۶). بررسی‌ها نشان داده است که رشد سلول از طریق طولی شدن و انبساط سلولی حاصل می‌شود که انبساط‌پذیری و شل شدن دیواره‌ی سلولی در سلول‌های در حال رشد نقش مهمی دارد (۷، ۲۶). مسیر فنیل پروپانوییدی در بسیاری از میانکنش‌های گیاه با تنش‌های محیطی دخالت دارد. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (EC:

4.3.1.24) یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ترکیبات فنلی است که پیش‌سازهای لیگنین و سوبسترای لازم برای آنزیم پراکسیداز را فراهم می‌کند (۱۱). همچنین در زمان رسیدن میوه با افزایش فعالیت آنزیم‌های پکتین‌متیل‌استراز و پلی-گالاکتوروناز حلالیت پکتین‌های دیواره‌ی سلولی، افزایش می‌یابد (۲۰). حلالیت بیشتر پکتین‌ها، با تغییر تجمع و تقسیم بندی کاتیون‌های دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم، ویسکوزیته‌ی دیواره را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۹، ۲۵). شناخت مکانیسم‌های سلولی دخیل در عارضه زودخندانی گامی مؤثر در جهت تقویت یا تضعیف این مکانیسم‌ها می‌باشد؛ لذا در پژوهش حاضر ویژگی‌های آنزیمی و بیوشیمیایی پوست نرم پسته در دانه‌های زودخندان و سالم مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

این تحقیق بر روی رقم تجاری کله‌قوچی در منطقه رفسنجان در شهریور ۱۳۹۲ صورت گرفت. در زمان برداشت محصول ۲۵ درخت به صورت تصادفی انتخاب و از هر درخت ۵۰ عدد میوه برداشت شد. با توجه به اهمیت جمع‌آوری نمونه برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنزیمی، نمونه‌های سالم و زودخندان در داخل بسته‌بندی‌های جداگانه قرار داده و بلافاصله در نیتروژن مایع فرو برده و با انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام آزمایش در فریزر  $^{\circ}\text{C} -80$  نگهداری شدند. لازم به ذکر است که کلیه بررسی‌های آزمایشگاهی بر روی پوست نرم پسته که به عنوان عاملی مهم در ترکیبگی مطرح است، انجام شد.

### مطالعات آنزیمی

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز، ۴ گرم پوست نرم پسته، در بافر پتاسیم بورات ۰/۱ مولار،  $\text{pH} = 8/8$  حاوی  $\beta$ -مرکاپتواتانول ۲ میلی مولار بر روی یخ ساییده شد. بعد از سانتریفیوژ نمودن با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $^{\circ}\text{C} 4$ ، محلول رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. مخلوط واکنش، شامل L- فنیل آلانین ۴ mM بعنوان سوبسترا، بافر پتاسیم بورات (بدون مرکاپتواتانول) و عصاره آنزیمی، به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای  $^{\circ}\text{C} 37$  قرار داده شد. واکنش آنزیمی با افزودن کلریدریک اسید ۵ مولار متوقف گردید و سینامیک اسید موجود در نمونه‌ها (فراورده آنزیم PAL)، سه بار با اتیل استات استخراج و توسط جریان‌ی از هوای تصفیه شده خشک گردید. میزان سینامیک اسید بعد از حل نمودن نمونه‌های خشک شده در متانول مطلق با استفاده از دستگاه HPLC (KNAUER, Germany) مجهز به ستون ODS-80Ts (۴/۶ × ۲۵۰ mm) انجام گرفت. از شیب

خطی ۸۰-۳۰ درصد متانول حاوی استیک اسید ۰/۱ درصد با Flow rate ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده شد و میزان سینامیک اسید تولید شده در یک ساعت در طول موج ۲۷۳ nm سنجیده شد. فعالیت آنزیم برحسب میزان سینامیک اسید به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد (۱۱). میزان پروتئین به روش برادفورد با استفاده از BSA به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۳).

آنزیم پراکسیداز در سه بخش محلول، یونی و کووالانی جداسازی و فعالیت آن اندازه‌گیری شد. ۶ گرم نمونه در بافر تریس مالئات ۵۰ mM، pH = ۶ در دمای ۴ °C ساییده و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جهت سنجش فعالیت بخش محلول پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی این بخش، با افزودن مقادیر مناسبی از عصاره آنزیمی، بافر پتاسیم فسفات ۶۰ mM، pH=۶/۱، گاپاکول mM ۲۸ بعنوان دهنده الکترون و پراکسید هیدروژن ۵ mM در طول موج ۴۷۰ nm به کمک اسپکتروفتومتر (GBC, Cintra, Australia) 6 اندازه‌گیری شد. رسوب مرحله قبل با کلرید کلسیم ۰/۲M به مدت دو ساعت در درجه حرارت محیط همراه با به همزدن پیوسته نگهداری و سپس با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت بخش یونی پراکسیداز و رسوب حاصل با افزودن بافر بطور مستقیم برای سنجش فعالیت بخش کووالانی پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی بخش یونی و کووالانی با سیرینگالدازین ۴۱/۶ nM، بافر تریس مالئات، پراکسید هیدروژن ۱۶ mM و مقادیر مناسب عصاره آنزیمی یا دیواره سلولی در طول موج ۵۳۰ nm اندازه‌گیری شد. فعالیت بخش محلول و یونی به صورت میزان افزایش جذب در یک دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد. میزان فعالیت بخش کووالانی به صورت افزایش جذب به ازای وزن خشک دیواره‌ی سلولی بیان شد (۱۸).

### مطالعات بیوشیمیایی

به منظور استخراج دیواره سلولی، ۶ گرم بافت تازه پوست نمونه‌های پسته بعد از ساییدن در آب مقطر با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل به طور متوالی با اتانول دوبار هر بار به مدت ۳۰ دقیقه، مخلوط CHCl<sub>3</sub>-MeOH (۱:۲ v/v) به مدت یک شب و استون به مدت یک ساعت شسته و سپس خشک شد. دیواره سلولی حاصل برای سنجش لیگنین و فنل‌های متصل به دیواره استفاده گردید (۱۱). محتوای لیگنین دیواره سلولی با روش استیل بروماید اندازه‌گیری شد. بدین منظور به ۶ میلی‌گرم پودر نرم شده دیواره، ۲/۵ میلی‌لیتر مخلوط استیل بروماید در اسید استیک (۰/۲۵ w/w) حاوی ۰/۱ درصد پرکلریک اسید ۷۰٪ افزوده و در حمام آب گرم با دمای ۷۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته و در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای تکان داده شد. بعد از سرد نمودن نمونه‌ها در یخ، محتوای لوله‌ها به یک

بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتر شامل ۵ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۲ نرمال منتقل و با اسید استیک به حجم رسانده شد. میزان لیگنین با اندازه گیری جذب در ۲۸۰ nm و با استفاده از ضریب جذب ویژه  $20 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  محاسبه گردید (۱۳). به منظور استخراج فنل های متصل به دیواره به ۳۰ میلی گرم دیواره ی سلولی استخراج شده، اگزالات آمونیوم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای  $70^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. پس از صاف نمودن محلول رویی این عمل دو بار دیگر تکرار شد و هر بار محلول رویی به محلول قبلی اضافه شد. به رسوب باقی مانده NaOH،  $0.1\text{M}$  اضافه شد و پس از قرار گرفتن به مدت یک شب تحت گاز  $\text{N}_2$ ، محلول رویی حاصل استخراج به محلول های قبلی اضافه شد. ترکیبات فنلی سه بار با اتیل استات استخراج و توسط جریانی از هوا خشک شدند. رسوب حاصل که حاوی فنل های متصل به پکتین دیواره بود در متانول مطلق حل شد و میزان فنل های متصل به دیواره با دستگاه HPLC با همان شرایطی که برای آنزیم PAL ذکر شد، در طول موج ۲۸۰ nm اندازه گیری گردید (۱۱). غلظت ترکیبات فنلی، از مقایسه مساحت زیر منحنی با استانداردهای لازم (اسیدفرولیک، اسیدسینامیک، اسیدگالیک، اسیدتانیک و اسید-هیدروکسی بنزوئیک) در غلظت های ۰ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بررسی یونی مطابق روش سوان و پوویا (۲۳) انجام شد. بدین طریق که پوست نرم ۳۰ عدد میوه از هر نمونه جداسازی و با فریزدرایر خشک شد. سپس در هاون به صورت پودر نرمی درآمد.  $0.5$  گرم از نمونه های پودر شده با  $10$  میلی لیتر آب دوبار تقطیر به وسیله همزدن به مدت یک ساعت استخراج و توسط کاغذ واتمن ۵۴۱ بدون خاکستر صاف شد. صاف شده ها برای تعیین سطوح یون های کلسیم و منیزیم محلول استفاده گردید. مواد غیر قابل حل باقی مانده روی کاغذ واتمن در  $550^{\circ}\text{C}$  برای چهار ساعت خاکستر و سپس در  $5$  میلی لیتر اسید کلریدریک  $5\%$  حل شدند و سطوح کلسیم و منیزیم باند شده تعیین شد. برای تعیین عناصر کلسیم و منیزیم از دستگاه جذب اتمی مدل PHILIPS PU9100 استفاده شد.

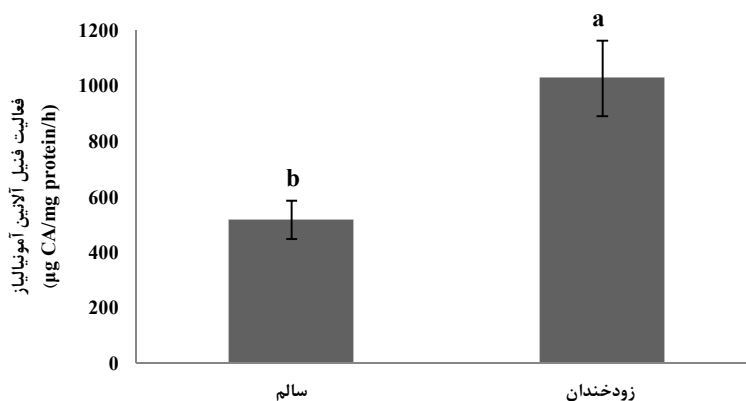
### بررسی های آماری

کلیه بررسی های آنزیمی و بیوشیمیایی در سه تکرار مستقل، هر یک با سه نمونه انجام شد. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها، از بسته ی نرم افزاری Excel استفاده شد. هم چنین برای تعیین معنی دار بودن تفاوتها در سطح  $P \leq 0.05$  از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در بسته نرم افزاری SPSS نسخه ۱۵ استفاده شد.

## نتایج

چنانچه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم به میزان دو برابر افزایش یافته است.

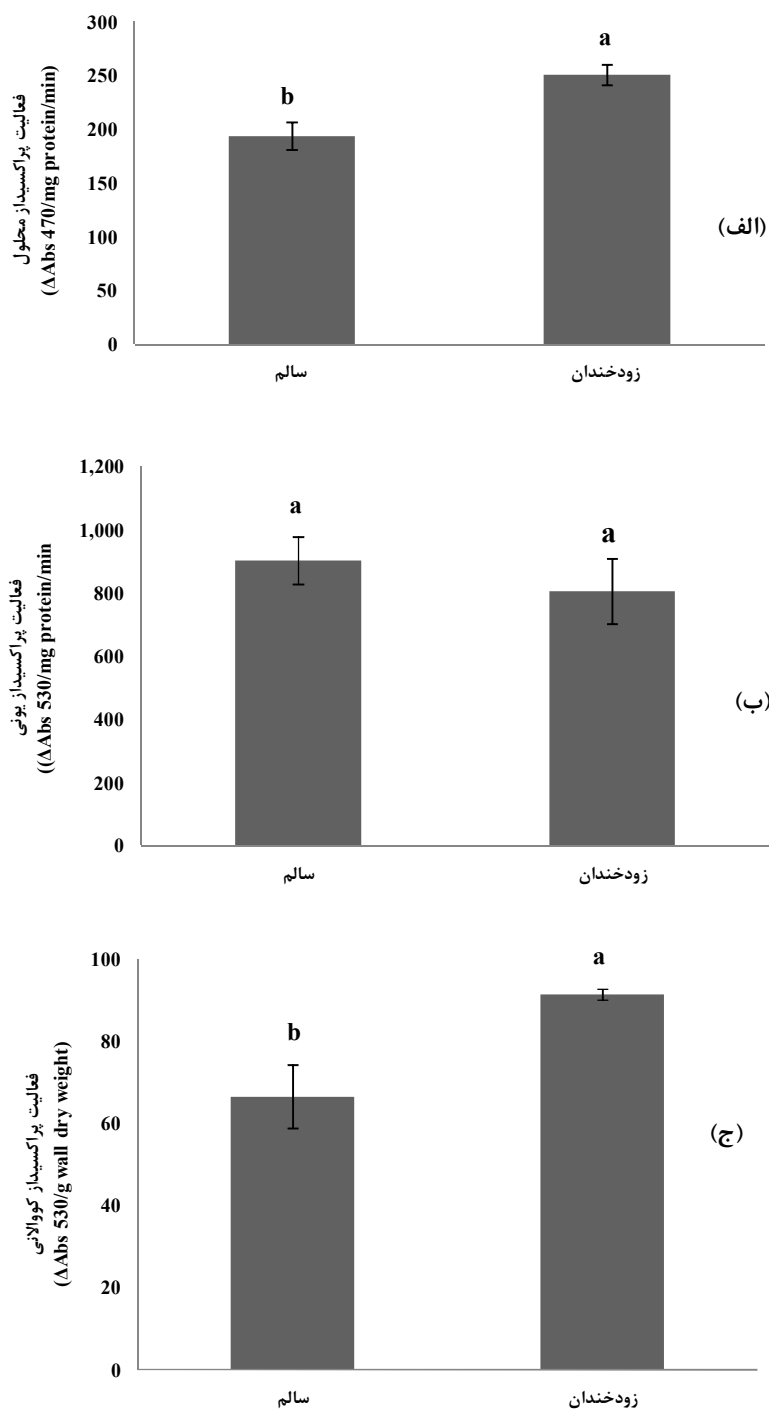
فعالیت پراکسیداز محلول یا بخش کاتیونی پراکسیداز که معرف شرایط تنش است در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم افزایش نشان داد (شکل ۳-الف). اما فعالیت بخش یونی در نمونه‌های سالم و زودخندان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۳-ب). همچنین فعالیت بخش کووالانی این آنزیم به‌طور معنی‌داری در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم افزایش نشان داد (شکل ۳-ج).



شکل ۲- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز در پوست نرم نمونه‌های سالم و زودخندان.

داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل  $\pm$  انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵.

$P \leq$  بر اساس آزمون داتکن می‌باشد.



شکل ۳- فعالیت آنزیم پراکسیداز در پوست نرم سالم و زودخندان.

فعالیت آنزیم در سه بخش محلول (الف)، یونی (ب) و کووالانی (ج). داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل  $\pm$  انحراف استاندارد (میله‌های

عمودی) است. حروف غیر یکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

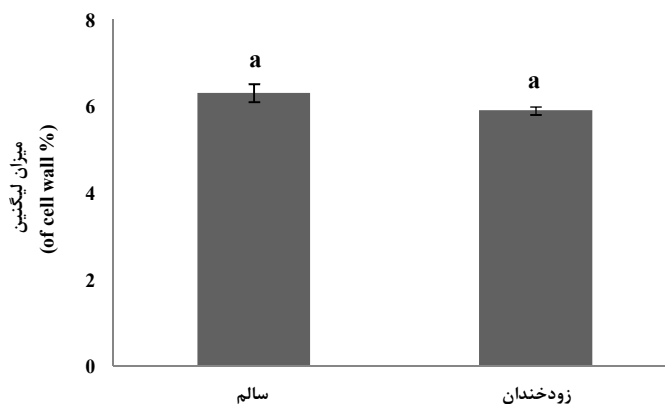
میزان فنل‌های متصل به دیواره در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱). اما نتایج حاصل از تعیین محتوای لیگنین دیواره نشان داد که برخلاف افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل-آلانین آمونیالیز و پراکسیداز، میزان لیگنین دیواره در نمونه‌های سالم نسبت به نمونه‌های زودخندان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴).

جدول ۱- میزان فنل‌های متصل به دیواره در پوست نرم دانه‌های سالم و زودخندان.

کل	اسیدفرولیک	اسید هیدروکسی بنزوئیک	اسیدگالیک	اسیدسینامیک	اسیدتانیک	
(µg/g wall per dry weight)						
۱۸/۰۸ ± ۰/۴۷ <sup>b</sup>	۳/۹۲ ± ۰/۰۲	۶/۱۲ ± ۰/۱	N	۸/۰۴ ± ۰/۲	N	سالم
۲۴/۸۹ ± ۳/۱۰ <sup>a</sup>	۵/۵۷ ± ۰/۱	N	۲/۸۲ ± ۰/۲	۷/۱۷ ± ۰/۴	۹/۳۳ ± ۰/۰۲	زودخندان

داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد است.

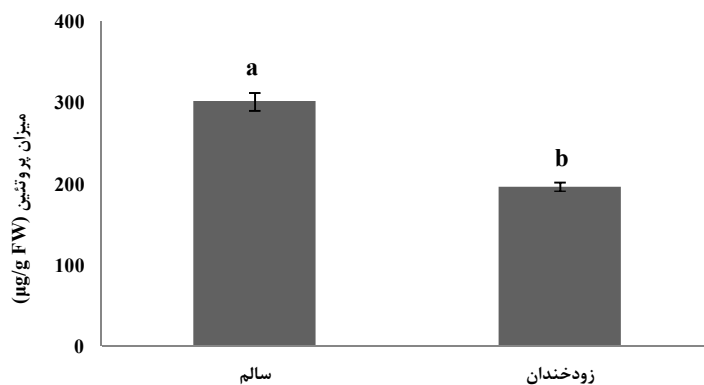
حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  بر اساس آزمون دانکن می‌باشد. N، نمایانگر این است که ترکیب مورد نظر در نمونه مربوطه مشاهده نشده است.



شکل ۴- میزان لیگنین در پوست نرم نمونه‌های سالم و زودخندان.

داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.





شکل ۵- میزان پروتئین تام در پوست نرم نمونه‌های سالم و زودخندان.

داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل  $\pm$  انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0/05$  بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

جدول ۲- سطوح یون های کلسیم و منیزیم محلول و باند شده در پوست نرم (Hull) دانه‌های سالم و زودخندان

یون	محلول		باند شده	
	سالم	زودخندان	سالم	زودخندان
Ca <sup>2+</sup>	۰/۷۹ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۰/۰۶ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۳/۵۱ $\pm$ ۰/۵۷ <sup>a</sup>	۳/۸۹ $\pm$ ۰/۳۹ <sup>a</sup>
Mg <sup>2+</sup>	۰/۲۶ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۰/۱۸ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۰/۵۳ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>b</sup>	۰/۷ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>

مقادیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شده است. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل  $\pm$  انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0/05$  بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است میزان پروتئین تام در نمونه‌های سالم نسبت به نمونه‌های

زودخندان افزایش معنی‌داری را نشان داد.

میزان کلسیم محلول در پوست نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم ۲۴٪ کاهش نشان داد. در مقابل

یک افزایش ۱۰٪ در کلسیم باند شده نمونه‌های زودخندان در مقایسه با نمونه‌های سالم وجود داشت که از لحاظ

آماري معنی‌دار نبود. میزان منیزیم محلول در نمونه‌های زودخندان نسبت به سالم ۳۱٪ کاهش نشان داد. در حالی‌که

میزان منیزیم باند شده ۲۴٪ افزایش یافت (جدول ۲).

## بحث

پسته‌های زودخندان به دلیل فرصت بیشتر جهت پایداری و توسعه آلودگی قارچی، منبع اصلی آلودگی به آفلاتوکسین می‌باشند (۸، ۹). پوست نرم پسته به عنوان خارجی‌ترین لایه میوه پسته، از طریق پوشش کوتیکولی یک سد حفاظتی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کند. مقاومت پوست نرم به دیواره سلولی و پلیمرهای تشکیل دهنده آن بستگی دارد (۱). خواص مکانیکی دیواره سلولی به وسیله ترکیب شیمیایی و میانکنش بین پلیمرهای سازنده آن تعیین می‌شود (۶، ۲۴). نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در نمونه‌های زودخندان افزایش فعالیت این آنزیم را نسبت به نمونه‌های سالم نشان داد. از طرفی افزایش فعالیت آنزیم با افزایش میزان فنل‌های متصل شده به دیواره سلولی همراه بود. فنیل‌آلانین آمونیا لیاز آنزیمی کلیدی در متابولیسم ترکیبات فنلی و چوبی-شده دیواره سلولی است. گزارش‌های موجود نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد. از آنجایی که هر نوع تنش زیستی و غیرزیستی متوجه پوست میوه می‌باشد انعطاف‌پذیری پوست نرم پسته، تنش‌های وارد شده را تا حدودی خنثی می‌کند. بنابراین نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم به دلیل کاهش انعطاف‌پذیری پوست نرم در برابر تنش، مقاومت کمتری از خود نشان دادند. به عبارت دیگر شدت تنش وارد شده در نمونه‌های زودخندان بیشتر از نمونه‌های سالم بود. نادرزاد و همکاران (۱۵) ارتباط مثبتی بین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و میزان ترکیبات فنلی در ارقام مختلف پسته مشاهده کردند. همچنین تجمع ترکیبات فنلی در گیاه پسته با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان داده شده است (۱۵، ۱۶). در این تحقیق نیز بین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز همبستگی مثبتی مشاهده شد.

لیگنین یک هتروپلیمر فنلی است که از پلیمریزه شدن اکسیداتیو سه منولیگنول P-کوماریل، کونیفریل و سیناپیل‌الکل توسط آنزیم پراکسیداز دیواره سلولی تشکیل می‌شود. منومرهای لیگنینی همچنین با اتصال به پکتین، اکستنسین و سایر پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ای سبب افزایش اتصالات عرضی و کاهش انعطاف‌پذیری و رشد دیواره می‌گردند (۱۱). بیوسنتز این منومرها از پیش ماده فنیل‌آلانین و با فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز آغاز می‌شود. این آنزیم یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر متابولیسمی ترکیبات فنلی است که تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. این آنزیم با فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای فعالیت آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در سنتز لیگنین دارد (۱۴).

پراکسیدازها گروهی از آنزیم‌ها هستند که در واکنش‌های مرتبط با طعم، بافت و رنگ میوه‌ها دخالت دارند. ارتباط بین پراکسیدازها و رسیدن میوه در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است (۵، ۱۴، ۲۴). پراکسیدازها از جمله

آنزیم‌هایی که بر اثر تنش‌های زیستی فعال می‌شوند و نقش مهمی در فرایند سنتز دیواره‌ی سلولی به عهده دارند. پراکسیدازها، گلیکوپروتئین‌هایی شامل هم (Heme) هستند که نقش اصلی آنها اکسید کردن ملکول‌ها در حضور  $H_2O_2$  می‌باشد. اغلب پراکسیدازها ویژه بافت بوده در مرحله‌ی خاصی ظاهر می‌شوند و به وسیله عوامل محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۷، ۱۷). فعالیت آنزیم پراکسیداز، در سه بخش محلول، یونی و کووالانی اندازه‌گیری شد. بخش محلول در پاسخ به تنش دخالت دارد درحالی‌که دو بخش یونی و کووالانی بیشتر در سنتز لیگنین و سوبرین نقش دارند. افزایش فعالیت پراکسیداز محلول در نمونه‌های زودخندان، تنش بیشتر در این نمونه‌ها را منعکس می‌کند. از طرف دیگر کاهش فعالیت بخش محلول در نمونه‌های سالم نشان می‌دهد که این نمونه‌ها تحت تنش کمتری قرار داشتند. داده‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت پراکسیداز بخش دیواره‌ای در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم افزایش یافت. پراکسیدازهای موجود در دیواره‌ی سلولی می‌توانند خواص دیواره‌ی سلولی را تغییر دهند. فعالیت این بخش پراکسیداز با تشکیل اتصال عرضی بین اکستنسین و پلی‌ساکاریدهای متصل به فرولیک اسید، سبب افزایش سختی و کاهش انبساط‌پذیری دیواره‌ی سلولی می‌گردد. افزایش فعالیت بخش کووالانی پراکسیداز با افزایش فنل‌های متصل به دیواره کاهش انعطاف‌پذیری پوست نرم را در مقابل فشار وارده از طرف پوست استخوانی در زمان خندانی موجب می‌شود. مطالعات نشان داده است که پراکسیدازها در بلوغ سلولی و تمایز بافتی نقش مهمی دارند و در انتهای مرحله طویل شدن فعال می‌شوند (۱۷). نتایج سنجش میزان لیگنین در دیواره‌ی سلولی نشان داد که با افزایش فعالیت بخش کووالانی پراکسیداز افزایشی در میزان لیگنین در دیواره سلولی نمونه‌های زودخندان مشاهده نشد. فعالیت پراکسیداز در یک بافت معمولاً با چوبی شدن بافت همراه است. از آنجایی‌که چوبی شدن به میزان خیلی کم در پوست میوه رخ می‌دهد، این نتیجه حاصل می‌شود که پراکسیداز نقش متفاوتی را در زمان بلوغ میوه ایفا می‌کند که فعالیت آن در دیواره‌ی سلولی پوست میوه با توقف رشد میوه مقارن است. تامسون و همکاران (۲۴) یک ارتباط مستقیم بین توقف رشد میوه و فعالیت آنزیم پراکسیداز باند شده به دیواره در پوست میوه مشاهده کردند.

نتایج مربوط به تغییرات کلسیم در پوست نرم کاهش کلسیم محلول در نمونه‌های زودخندان نسبت به نمونه‌های سالم را نشان داد. به نظر می‌رسد که افزایش در کلسیم باند شده و کاهش در کلسیم محلول در پوست نمونه‌های زودخندان به علت تجزیه کمتر پکتین‌ها در تیغه میانی باشد که کاهش حلالیت پکتین‌ها با فراوانی بیشتر آن‌ها در دیواره توأم بوده است. بررسی‌ها نشان داده است که حلالیت بیشتر پکتین‌ها و کاهش کلسیم در نرم شدن بافت نقش مهمی دارد. به‌گونه‌ای که ایجاد این تغییرات در پوست نمونه‌های سالم نسبت به نمونه‌های زودخندان باعث نرم شدن بیشتر و ویسکوزیته کمتر پلیمرهای دیواره‌ی سلولی پوست شده و در برابر فشارهای وارده از سوی پوست

استخوانی انعطاف‌پذیری بیشتری از خود نشان می‌دهند. همچنین در نمونه‌های زودخندان میزان منیزیم محلول نسبت به نمونه‌های سالم کاهش و میزان منیزیم باند شده در این نمونه‌ها افزایش نشان داد. نتایج تغییرات منیزیم در پوست نرم دانه‌های زودخندان با نتایج تایمن و هاندا (۲۵) در میوه گوجه فرنگی و افشاری و همکاران (۲) در پسته مطابقت داشت به گونه‌ای که با کاهش فعالیت پکتین متیل استراز در نمونه‌های زودخندان میزان منیزیم محلول و باندشده تحت تأثیر قرار گرفت. در میوه‌های سالم کاهش کاتیون‌های دو ظرفیتی در زمان رسیدن به علت حلالیت بیشتر پکتین‌ها در دیواره سلولی می‌باشد. تجزیه پکتین‌ها توسط آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و کاهش میزان کلسیم و منیزیم دیواره‌ی سلولی نقش بسزایی در نرم شدن میوه دارد. این تغییرات در دیواره نرم شدن بیشتر و ویسکوزیته کمتر پلیمرهای دیواره سلولی را باعث می‌شود. در نتیجه پوست نرم در مقابل فشار وارد شده از طرف پوست استخوانی مقاومت بیشتری نشان می‌دهد. از طرف دیگر به دلیل فعالیت کمتر این آنزیم‌ها در پوست نرم دانه‌های زودخندان نرم‌شدگی کمتر و ویسکوزیته بیشتر دیواره سلولی، مقاومت پوست نرم را در مقابل فشار وارد شده از طرف پوست استخوانی کاهش و پارگی آن را موجب می‌گردد.

### نتیجه‌گیری کلی

با مشاهدات انجام شده این نتیجه حاصل می‌گردد که در زمان رسیدن میوه، تغییرات ترکیبات دیواره‌ی سلولی پوست نرم در نمونه‌های سالم و زودخندان متفاوت است. به گونه‌ای که در نمونه‌های سالم با کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در سفت شدن دیواره‌ی سلولی، نرم‌شدن پوست بیشتر شده و با کاهش اتصالات پلیمرهای دیواره سلولی، در برابر فشار وارد شده از طرف پوست استخوانی انعطاف بیشتری از خود نشان می‌دهد. از طرف دیگر افزایش شکل محلول کاتیون‌های دو ظرفیتی و کاهش شکل باند شده این کاتیون‌ها در دیواره‌ی سلولی به دلیل افزایش حلالیت پکتین‌ها، تأثیر بسزایی در نرم شدن پوست در نمونه‌های سالم دارد.

### منابع

- 1- Adibian, M. 2016. Aflatoxins in pistachio, detection and prevention. *Journal of Novel Applied Sciences*, 5(1): 27-33.
- 2- Afshari, H. and H. Hokmabadi. 2008. Studying the effects of elements on early splitting of pistachio nuts and the effects of phenolic compounds on aflatoxin control. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 4 (2): 131-137.

- 3- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- 4- Brummell, D.A. and M.H. Harpster. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47: 311-340.
- 5- Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33: 103–119.
- 6- Cakmak, I. and W. Horst. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468.
- 7- Cosgrove, D.J. 2016. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany*, 67 (2): 463-476.
- 8- Doster, M.A. and T.J. Michailides. 1994. *Aspergillus* molds and aflatoxins in pistachio nuts in California. *Phytopathology*, 84: 583-590.
- 9- Doster, M.A. and T.J. Michailides. 1995. The relationship between date of hull splitting and decay of pistachio nuts by *Aspergillus* species. *Plant Disease*, 79: 766-769.
- 10- Fecht-Christoffers, M.M., P. Maier and W.J. Horst. 2003. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiologia Plantarum*, 117: 237-244.
- 11- Ghanati, F., K. Kobata, S. Hanada, A. Morita and H. Yokota. 2002. Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48: 357-364.
- 12- Goulao, L.F. and C.M. Oliveira. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1): 4-25.
- 13- Iiyama, K. and A.F.A. Wallis. 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51: 145-161.
- 14- Mondal, K., S.P. Malhotra, V. Jian and R. Singh. 2009. Oxidative stress and antioxidant systems in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15:327–334.
- 15- Nadernejad, N., A. Ahmadimoghadam, J. Hosseinifard and Sh. Pourseyedi. 2012. Phenylalanin ammonia-lyase activity, total phenolic and flavonoid content in flowers, leaves, hulls and kernels of three pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 12 (6): 807-814.
- 16- Nasibi, F., A. Barand, Kh. Manouchehri Kalantari, F. Rezanejad. 2013. The effect of arginine pretreatment on germination, growth and Physiological parameters in the increase of low temperature tolerance in *Pistacia vera* L. in vitro culture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(17): 1918-1925.

- 17- Pandey, V.P., S. Singh, R. Singh and U.N. Dwivedi. 2012. Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit. Applied biochemistry and biotechnology, 167: 367–376.
- 18- Pandolfini, T., R. Gabbrielli and C. Comparini. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. Plant Cell Environment, 15: 719-275.
- 19- Paynel, F., A. Schaumann, M. Arkoun, O. Douchiche and C. Morvan. 2009. Temporal regulation of cell-wall pectin methylesterase and isoforms in cadmium-treated flax hypocotyl, Annals Botany, 104: 1363-1372.
- 20- Pelloux, J., C. Rusterucci and E.J. Mellerowicz. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends in Plant Science, 12: 267-277.
- 21- Shahidi Bonjar, G.H. 2004. Incidence of aflatoxin producing fungi in early split pistachio nuts of Kerman, Iran. Journal of Biological Sciences, 4(2): 199-202.
- 22- Sommer, N.F., J.R. Buchanan and R.J. Fortlage. 1986. Relation of early splitting and tattering of pistachio nuts to aflatoxin in the orchard. Postharvest Pathology and Mycotoxins, 76: 692-694.
- 23- Suwwan, M.A. and B.W. Poovaiah. 1978. Association between elemental content and fruit ripening in rin and normal tomatoes. Plant Physiology, 61(6):883-885.
- 24- Thompson, A.J., M. Tor, C.S. Barry, J. Vrebalov, C. Orfila, M.C. Giovannoni, D. Grierson and G.B. Seymour. 1999. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Pleiotropic Tomato Ripening Mutant. Plant Physiology, 120: 383-389.
- 25- Tieman, D.M. and A.K. Handa. 1994. Reduction in pectin methyl esterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato fruit. Journal of Plant Physiology, 106: 429- 436.
- 26- Vogler, H., D. Felekis, J. Nelson and U. Grossniklaus. 2015. Measuring the mechanical properties of plant cell walls. Plants, 4: 167-182.