علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۵، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۳ (ص ۳۱۷-۳۰۹)

اندازه‌گیری میزان لیگنین در بذر و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و لاکاز در آریل برخی ژنوتیپ‌های نرم‌دانه و سخت‌دانۀ انار طی مراحل مختلف رشدی میوه

عبدالکریم زارعی[۱]، ذبیح‌الله زمانی[۲*]، محمدرضا فتاحی مقدم[۳]، سیدعلی‌رضا سلامی[۴] و امیر موسوی[۵]
۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی سابق دکتری، استاد، دانشیار و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵. دانشیار مرکز ملی ژنتیک و زیست‌فناوری (NIGEB)
(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۷ - تاریخ تصویب: ۹۲/۳/۱۹)

چکیده

به‌منظور بررسی فرایند سخت‌شدن بذر در انار، برخی پارامترهای بیوشیمیایی مربوط به آن در قسمت گوشتی آریل یا در بذر تعدادی ژنوتیپ نرم‌دانه و سخت‌دانۀ انار در زمان‌های مختلف رشدی میوه، از تشکیل تا رسیدن آن ارزیابی شد. اندازه‌گیری میزان لیگنین در بذر و بقیۀ اندازه‌گیری‌ها در قسمت گوشتی آریل انجام شد. تجزیۀ واریانس داده‌ها تفاوت‌های معناداری بین ژنوتیپ‌ها و مراحل مختلف رشدی نشان داد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحلۀ اول نمونه‌گیری که دانه‌ها کاملاً نرم بودند، در همۀ آن‌ها نسبتاً زیاد بود، سپس در مراحل دوم (شروع سخت‌شدن در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه) و سوم اندازه‌گیری کاهش یافت و در مرحلۀ آخر در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه افزایش و به چهار برابر ژنوتیپ‌های نرم‌دانه رسید، درحالی‌که در انواع نرم‌دانه ثابت ماند. میزان فعالیت آنزیم لاکاز طی فصل رشد روند نامشخص‌تری از خود نشان داد و تفاوت‌های زیادی در ژنوتیپ‌های سخت و نرم دانه نشان نداد، اگرچه در اغلب ژنوتیپ‌ها میزان آن در مراحل پایانی رشد میوه کاهش یافت. در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه میزان پروتئین کل در مرحلۀ اول نمونه‌برداری بیشتر از بقیۀ مراحل بود و در مرحلۀ دوم کاهش یافت و در مراحل بعدی با کمی افزایش تقریباً ثابت ماند. در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه میزان پروتئین کل تا مرحلۀ سوم رشدی کاهش و سپس افزایش نشان داد و درنهایت میزان پروتئین کل در ژنوتیپ‌های نرم و سخت دانه در مرحلۀ آخر نمونه‌برداری به یک مقدار مشابه رسید. میزان لیگنین بذر طی مراحل رشدی در همۀ ژنوتیپ‌ها روند افزایشی نشان داد، ولی در همۀ مراحل در انواع نرم‌دانه مقداری کمتر از انواع سخت‌دانه بود. با توجه به نتایج، تفاوت قابل توجه در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحلۀ آخر رشدی، و فعالیت بسیار بیشتر این آنزیم نسبت به آنزیم لاکاز (حداقل ده‌هزار برابر)، ممکن است آنزیم پراکسیداز آنزیم اصلی در ایجاد تفاوت در سختی بذور انار باشد.

واژه‌های کلیدی: آریل، پارامترهای بیوشیمیایی، پراکسیداز، لاکاز، لیگنین

مقدمه

انار (*Punica granatum* L.) یکی از میوه‌های نیمه‌گرمسیری است که به‌طور وسیع در ایران کشت می‌شود. این میوه سازگاری بالایی برای کشت‌وکار در شرایط اقلیمی مختلف و بعضاً نامساعد برای بقیۀ درختان میوه از خود نشان داده است، به‌طوری‌که بیشتر در

* تلفن: ۰۹۱۲۷۰۶۰۲۸۸
E-mail: zzamani@ut.ac.ir

مناطقی کشت‌وکار آن گسترش یافته است که امکان کشت‌وکار تجاری برای دیگر درختان وجود نداشته است. با توجه به قدمت و گستردگی مناطق کشت این محصول، ژنوتیپ‌های انار ایران تنوع قابل توجهی از نظر ویژگی‌های میوه از خود نشان می‌دهند، به‌طوری‌که خصوصیات ویژه‌ای در برخی از ژنوتیپ‌ها قابل مشاهده است. یکی از صفات مطلوب که در برخی ژنوتیپ‌های انار مشاهده شده، صفت نرم‌دانگی است. ژنوتیپ‌های نرم‌دانهٔ انار همانند انواع سخت‌دانه آن تمام اجزای آریل و بذر را دارند، اما بافت تخمک پوش (Integument) که درحقیقت تستا یا پوستهٔ بذر است برخلاف ژنوتیپ‌های معمول سخت نشده است و بذر این ژنوتیپ‌ها به‌صورت کاملاً نرم دیده می‌شود. این ویژگی علاوه بر تسهیل در مصرف تازه‌خوری، سبب بهبود ارزش تغذیه‌ای و افزایش جذب اسیدهای چرب مفید موجود در بذر انار می‌شود و می‌تواند موجب بازارپسندی بیشتر آن شود.

فرایند چوبی‌شدن در گیاهان مربوط به تشکیل پلیمر لیگنین است که عمدتاً در بافت‌های محافظ و هادی به وجود می‌آید. لیگنین یک بیوپلیمر منشعب و طبیعی گیاهی است که از زیرواحدهای هیدروکسی سینامیل الکل (Hydroxycinnamyl Alcohols) که مونولیگنول نامیده می‌شوند ساخته می‌شود (Boerjan *et al*., 2003). سه نوع مونولیگنول اصلی شرکت‌کننده در ساختمان لیگنین عبارت از P-کوماریل، کونیفریل، و سیناپیل هستند که به‌ترتیب به انواع مختلف واحدهای فنیل‌پروپانوئیدی در ساختمان لیگنین به نام هیدروکسی فنیل (H)، گوای‌اسیل (G)، و سیرینژیل (S) تبدیل می‌شوند (Koutaniemi *et al*., 2007). بیش از نیمی از لیگنین ساخته‌شده در گیاهان گلدار از مونولیگنول نوع سیناپیل است. در فرایند ساخته‌شدن لیگنین دو مرحلهٔ مشخص وجود دارد، ابتدا ساخته‌شدن مونولیگنول‌ها که از مسیر فنیل پروپانوئید و بر اثر دآمینه‌شدن اسید آمینه فنیل‌آلانین به وجود می‌آیند و ممکن است در بافت‌های نرم هم به وجود آیند و سپس الحاق این مونولیگنول‌ها در آرایش‌های مختلف به یکدیگر که به تشکیل پلیمر پیچیده و منشعب لیگنین منجر می‌شود (Brunow *et al*., 1998).

پراکسیداز و لاکاز دو آنزیم اصلی هستند که در پلیمریزه‌کردن مونولیگنول‌ها در گیاهان نقش کلیدی ایفا می‌کنند (Koutaniemi *et al*., 2007). پراکسیدازها از آنزیم‌هایی هستند که به‌طور گسترده در میکروارگانیسم‌ها و موجودات عالی یافت می‌شوند و نقش‌های مختلفی از جمله لیگنیفیکاسیون، سوبرینی‌شدن، متابولیسم اکسین، و نقش کلیدی در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده و واکنش‌های تجزیهٔ آب‌اکسیژنه را عهده‌دارند (Gaspar *et al*., 1985). نقش این آنزیم در پلیمرکردن مونولیگنول‌ها در گیاهان بسیاری بررسی و تأیید شده است (Fagerstedt *et al*., 2010). پراکسیدازها احیای پراکسید هیدروژن را به وسیلهٔ گرفتن الکترون از ملکول‌های دهندهٔ مختلف از قبیل فنول‌ها و پیش‌سازهای لیگنین کاتالیز می‌کنند (Marjamaa *et al*., 2009).

لاکازها متعلق به آنزیم‌های کلاس مولتی کوپراکسیدازها هستند که به‌طور وسیع در گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و حیوانات گسترش یافته‌اند و اکسیداسیون تک‌الکترونی (one-electron oxidation) سوبستراهای زیادی را در حضور (با مصرف) اکسیژن انجام می‌دهند (Baldrian, 2006). لاکازها در گیاهان نه‌تنها در پلیمرکردن مونولیگنول‌ها نقش دارند (Sterjiades *et al*., 1992)، بلکه گزارش شده است که در بهبود زخم، جذب آهن، پاسخ به تنش‌ها، حفظ ساختار و یکپارچگی دیوارهٔ سلول، و اکسیداسیون دیگر پلی‌فنل‌ها از جمله پروآنتوسیانیدین دخیل‌اند. (Pourcel *et al*., 2005) برخلاف آن، در قارچ‌ها لاکازها برای تخریب لیگنین استفاده می‌شوند (Thurston, 1994).

به‌منظور درک بهتری از فرایند سخت‌شدن یا نرم‌دانگی در بذور انار، در پژوهش حاضر میزان لیگنین بذر و فعالیت دو آنزیم اصلی پلیمرکنندهٔ آن، یعنی پراکسیداز و لاکاز، در آریل شش ژنوتیپ انار که درجهٔ سختی متفاوت داشتند طی مراحل مختلف رشدی سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

میوه‌های شش ژنوتیپ انار شامل سه ژنوتیپ نرم‌دانه به نام‌های 'بی‌هستهٔ راور'، 'بی‌هستهٔ نجف‌آباد'،'بی‌هستهٔ نیریز' و سه ژنوتیپ سخت‌دانه به نام‌های 'ترش زابل'،'ملس یزدی' و 'ملس اصفهانی' از کلکسیون انار موجود در شهر یزد طی زمان‌های مختلف رشدی ۲۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۵ و ۱۳۰ روز بعد از تمام‌گل (DAF)

جمع‌آوری شدند. آریل‌های این میوه‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به تفاوت در میزان سختی بذور نرم و سخت و به‌منظور پودرشدن یکنواخت مواد گیاهی، از قسمت گوشتی آریل برای سنجش فعالیت آنزیمی و پروتئین کل استفاده شد. همچنین بذر بدون قسمت گوشتی، برای سنجش لیگنین به کار گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس تبدیل گوئیکول به تتراگوئیکول در حضور پراکسید هیدروژن و تغییر رنگ مخلوط واکنش و افزایش در جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر، به روش Chance & Maehly (1955) انجام گرفت. به‌منظور تهیهٔ عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH ۷) استفاده شد. بدین منظور پس از پودرکردن ۳۵۰ میلی‌گرم از بافت آریل در حضور ازت مایع و انتقال آن به تیوب ۲ میلی‌لیتری، ۱۵۰۰ مایکرولیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی ۲ درصد PVPP و ۱/۳ میلی‌مولار EDTA، به آن افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. به‌منظور سنجش فعالیت آنزیمی ۶۰۰ مایکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار به همراه ۲۷۰ مایکرولیتر گوئیکول ۲درصد و ۱۷۰ مایکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱درصد به‌مدت ۹ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۱۵۰ مایکرولیتر از عصارهٔ آنزیمی به مخلوط واکنش افزوده و به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفوتومتر، افزایش جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت این آنزیم براساس کیلو کاتال در میلی‌لیتر عصارهٔ میوه گزارش شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکاز

به‌منظور تهیهٔ عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم لاکاز از بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH ۶) استفاده شد. بدین منظور پس از پودرکردن ۳۵۰ میلی‌گرم از بافت آریل در حضور ازت مایع، ۱۵۰۰ مایکرولیتر از بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار به آن افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم روش Erkurt *et al.* (2007) به کار گرفته شد که براساس اکسیدشدن گوئیکول توسط لاکاز و افزایش در جذب نوری در طول موج ۴۶۵ نانومتر است. به این منظور ۶۰۰ مایکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار به‌علاوه ۱۰۰ مایکرولیتر گوئیکول ۲۰۰ میلی‌مولار و ۳۰۰ مایکرولیتر از عصارهٔ آنزیمی به مخلوط واکنش اضافه شد، و میزان تجزیهٔ گوئیکول بر اثر آنزیم لاکاز و درنتیجه افزایش جذب نوری در طول موج ۴۶۵ نانومتر به‌مدت یک ساعت به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. میزان فعالیت این آنزیم بر اساس کاتال در میلی‌لیتر عصارهٔ میوه گزارش شد.

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل با استفاده از معرف برادفورد

در این آزمایش پروتئین‌های محلول کل به روش Bradford (1976) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا ۳۵۰ میلی‌گرم از بافت گوشتی آریل در ازت مایع پودر شد و ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH ۷/۵) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل بلافاصله پس از ورتکس، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای۴ درجهٔ سانتی‌گراد در ۲۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحلهٔ روشناور برداشته شده و تا زمان اندازه‌گیری پروتئین در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

به‌منظور سنجش غلظت پروتئین نمونه‌های آزمایش‌شده، با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) منحنی استاندارد رسم شد (ضریب پیوستگی منحنی استاندار رسم‌شده طی انجام آزمایش ۰/۹۹۴ بود). بعد از تهیهٔ منحنی استاندارد، ۲۰ مایکرولیتر از نمونه‌های عصارهٔ آنزیمی با یک میلی‌لیتر از معرف برادفورد ۲۰ درصد مخلوط شد و بعد از ۵ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری لیگنین بذور انار

به‌منظور اندازه‌گیری لیگنین در بذور انار از مادهٔ تیوگلیکولیک اسید استفاده شد. اندازه‌گیری ترکیب تیوگلیکولیک-لیگنین به روش Bruce & West (1989) با اندکی تغییرات انجام گرفت. بدین منظور ۵۰ میلی‌گرم از

بذر (بدون قسمت گوشتی آریل) با استفاده از ازت مایع به‌طور کامل پودر شد، سپس ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۹/۵درصد به نمونه‌های پودرشده افزوده و در ۲۰۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خالی‌کردن روشناور، پلت در متانول ۹۹/۵درصد ورتکس و دوباره در ۲۰۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف روشناور، پلت شب تا صبح در دمای اتاق خشک شد. در روز دوم، ۱۶۰۰ مایکرولیتر هیدروکلریک اسید ۲ نرمال و ۲۰۰ مایکرولیتر تیوگلیکولیک اسید به نمونه‌ها افزوده شد. پس از بستن درِ تیوب‌ها با پارافیلم، به‌مدت ۸ ساعت درون حمام آب‌گرم ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و هنگام جوشیدن چندین مرتبه نمونه‌ها ورتکس شدند. سپس نمونه‌ها در ۲۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، پس از حذف روشناور، پلت دو بار با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر شسته شد و ۱۶۰۰ مایکرولیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال به پلت افزوده و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد درون شیکر قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در ۲۰۰۰۰ g به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، ۱۲۰۰ مایکرولیتر از روشناور برداشته و به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و ۲۴۰ مایکرولیتر هیدروکلریک اسید غلیظ (۳۷درصد) به آن‌ها افزوده شد و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰ g، روشناور تخلیه و پلت با آب دیونیزه دو مرتبه شست‌وشو و در ۱۲۰۰ مایکرولیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال حل شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفوتومتر و در برابر بلانک (هیدروکسیدسدیم یک نرمال) اندازه‌گیری شد. پس از تهیهٔ غلظت‌های مختلف لیگنین تجاری در هیدروکسید سدیم یک نرمال، منحنی جذب لیگنین تهیه و میزان لیگنین نمونه‌ها براساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان شد.

در تمام آزمایش‌ها برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Perkin Elmer, Lambda EZ201, U.S.A استفاده شد.

محاسبات آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای Excel و SAS (version 9.1.3) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده نشان داد که تفاوت معناداری بین ژنوتیپ‌ها و زمان‌های مختلف رشدی میوه در فاکتورهای اندازه‌گیری شده وجود داشته و تمام شاخص‌های بررسی‌شده در سطح یک درصد از نظر آماری معنادار شدند (جدول۱).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز طی مراحل مختلف رشد بذر تغییرات قابل توجهی از خود نشان داد (شکل۱). در مرحلهٔ اول نمونه‌گیری که دانه‌ها در تمام ژنوتیپ‌ها نرم بودند و از کل آریل برای نمونه‌گیری استفاده شد، فعالیت این آنزیم نسبتاً بالا بود و میانگین فعالیت آن در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه، بیش از ژنوتیپ‌های نرم‌دانه بود. در مرحلهٔ ۶۰ روز پس از تمام‌گل، میزان فعالیت آنزیم نسبت به مرحلهٔ اول کاهش یافت و در ژنوتیپ سخت‌دانه 'ترش زابل' میزان فعالیت آنزیم بالاتر از بقیهٔ ژنوتیپ‌ها بود. لازم به ذکر است که این ژنوتیپ سخت‌ترین دانه‌ها را بین ژنوتیپ‌های بررسی‌شده داشت. فعالیت این آنزیم در مرحلهٔ ۸۰ روز پس از تمام‌گل در بیشتر ژنوتیپ‌ها تفاوت معناداری با مرحلهٔ قبل نداشت، فقط در ژنوتیپ 'ترش زابل' کاهش بسیار زیادی در فعالیت آنزیم مشاهده شد و در این مرحله میزان فعالیت آنزیم در تمام ژنوتیپ‌ها در کمترین حد خود بود. در مرحلهٔ ۱۰۵ روز پس از تمام‌گل، میزان فعالیت آنزیم در تمام ژنوتیپ‌های سخت‌دانه و همچنین ژنوتیپ نرم‌دانه 'بی‌هستهٔ نیریز' شروع به افزایش کرد ولی در دو ژنوتیپ نرم‌دانه دیگر ('بی‌هستهٔ راور' و 'بی‌هستهٔ نجف‌آباد') ثابت ماند. در آخرین مرحلهٔ نمونه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه افزایش قابل توجهی از خود نشان داد و به حدود چهار برابر میزان فعالیت آن در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه رسید.

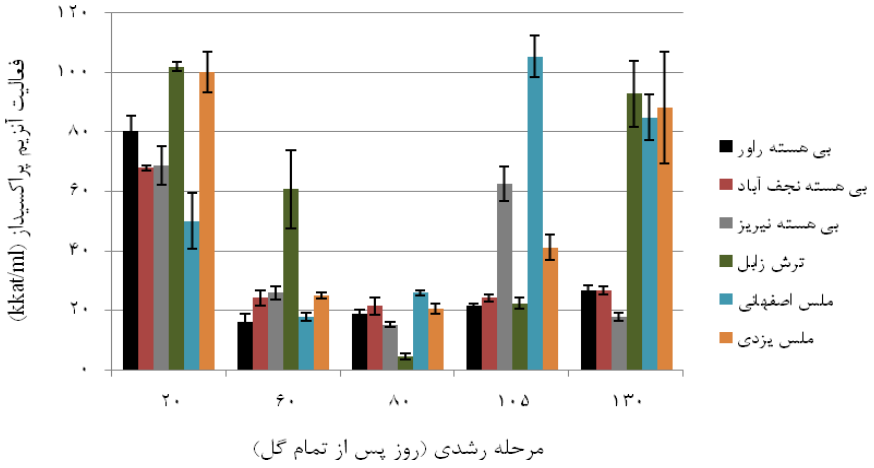
در بیشتر مطالعات انجام‌شده روی آنزیم پراکسیداز (Awad *et al*., 2011; Thompson *et al*., 1998; Civello *et al*., 1995; Silva *et al*., 1990)، افزایش و یا کاهش فعالیت این آنزیم روند یکسانی در تمام ژنوتیپ‌های بررسی‌شده داشته است، ولی نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در پژوهش حاضر بیانگر روند متفاوتی در فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه و

سخت‌دانه، حداقل در مراحل پایانی رشد میوه بود. همچنین فعالیت این آنزیم در تمامی مراحل بررسی‌شده در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه بیشتر از ژنوتیپ‌های نرم‌دانه بود. آنزیم پراکسیداز یکی از آنزیم‌های کلیدی آنتی‌اکسیدان است که برای حفاظت گیاه در شرایط تنش، میزان فعالیت آن افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های بررسی‌شده در یک مکان کشت شده و شرایط داشت یکسانی روی آن‌ها انجام گرفته بود و همچنین نمونه‌گیری و شرایط آزمایشگاهی برای همگی یکسان بود، بعید به نظر می‌رسد که فعالیت بیشتر این آنزیم در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه در پاسخ به تنش بوده باشد. هم‌زمان، فعالیت آنزیم کاتالاز هم بررسی شد تا با مقایسهٔ فعالیت این دو آنزیم، بتوان زمینهٔ افزایش فعالیتی که در شرایط تنش به وجود آمده را مشخص کرد (داده‌ها نشان داده نشده است) که نتایج مؤید این مطلب است که تفاوتی بین ژنوتیپ‌های بررسی‌شده از نظر شرایط تنش‌زا وجود نداشته است. بنابر مشاهدات حاصله، و با توجه به فعالیت بیشتر آنزیم پراکسیداز به‌خصوص در مراحل پایانی رشد میوه، شاید بتوان نتیجه گرفت که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز یکی از نقاط تاثیرگذار در ایجاد صفت نرم‌دانگی در انار است. البته باید توجه کرد که سختی دانه‌ها در انار حدود مرحلهٔ ۶۰ روز پس از تمام‌گل آغاز می‌شود و در این زمان، تفاوت در سختی بذور نرم و سخت به‌صورت حسی قابل تشخیص است.

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس صفات اندازه‌گیری‌شده در مراحل مختلف رشدی ژنوتیپ‌های مختلف انار

منبع	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات			
		لیگنین	پراکسیداز	لاکاز	پروتئین کل
ژنوتیپ	۵	۳/۲۲**	۱۸۳/۵۵**	۱۰/۹۳**	۶۰۹۵۱/۱۱**
مرحله	۴	۲۳/۶۳**	۱۱۷/۴۴**	۱۳/۷۶**	۱۰۸۰۵/۵۳**
ژنوتیپ × مرحله	۲۰	۰/۴۲**	۲۸/۲۶**	۳/۸۱**	۳۸۱۵/۷۶**
خطا	۶۰	۰/۰۳	۲/۲۴	۰/۱۵	۵/۹۵
CV%	-	۹/۳۷	۲۱/۶۹	۸/۱۸	۲/۰۶

**: معناداری در سطح ۰/۰۱.

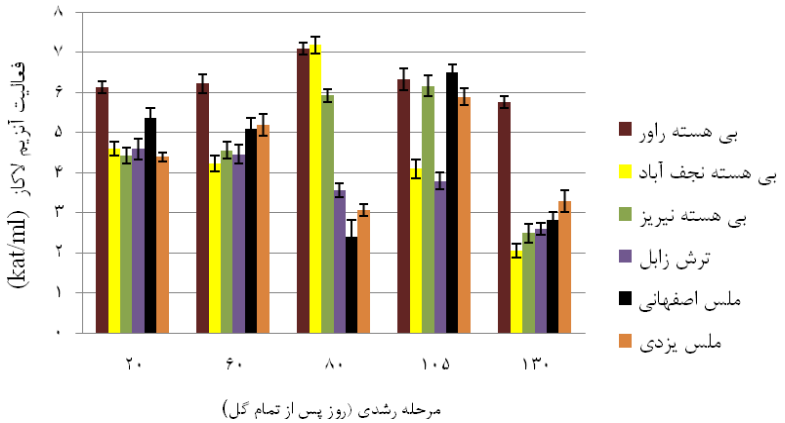


شکل ۱. تغییرات در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (کیلوکاتال/ میلی‌لیتر) در آریل ژنوتیپ‌های مختلف انار طی مراحل مختلف رشد بر اساس روز پس از تمام‌گل

فعالیت آنزیم لاکاز

نتایج حاصل نشان داد که میزان فعالیت آنزیم لاکاز در ژنوتیپ‌ها نسبتاً کم بود و این آنزیم روند تغییرات فعالیت نسبتاً کمی را نیز در مراحل مختلف از خود نشان داد اگرچه تفاوت‌ها از نظر آماری معنادار بود (شکل۲). در مرحلهٔ اول نمونه‌برداری ژنوتیپ نرم‌دانه 'بی‌هستهٔ راور' بیشترین فعالیت را از خود نشان داد و بعد از آن ژنوتیپ سخت‌دانهٔ 'ملس اصفهانی' فعالیت بالاتری از بقیهٔ ژنوتیپ‌ها داشت. در مرحلهٔ دوم ژنوتیپ‌ها تفاوت معناداری نسبت به مرحلهٔ اول نشان ندادند. در مرحلهٔ

سوم نمونه‌گیری در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه مقداری افزایش فعالیت و در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه کاهش در فعالیت آنزیم نسبت به مرحلهٔ قبل مشاهده شد. در مرحلهٔ چهارم نمونه‌گیری برخی ژنوتیپ‌ها افزایش و برخی کاهش فعالیت این آنزیم را نشان دادند. در آخرین مرحلهٔ نمونه‌گیری، فعالیت آنزیم به‌جز در ژنوتیپ 'بی‌هستهٔ راور' (که همچنان فعالیت نسبتاً بالایی داشت) در بقیهٔ ژنوتیپ‌ها کاهش معناداری از خود نشان داد.



شکل ۲. تغییرات در میزان فعالیت آنزیم لاکاز (کاتال/میلی‌لیتر) در آریل ژنوتیپ‌های مختلف انار طی مراحل مختلف رشد براساس روز پس از تمام‌گل

با بررسی روند تغییرات فعالیت آنزیم لاکاز طی فرایند رسیدن میوهٔ هلو، Harel *et al.* (1970) گزارش کردند که فعالیت این آنزیم نسبت به آنزیم کاتکل اکسیداز بسیار کمتر بوده است، به‌طوری‌که در مراحل اولیهٔ رشد تقریباً غیرقابل اندازه‌گیری بود، ولی فعالیت آن طی رسیدن میوه روندی افزایشی از خود نشان داد. با مطالعهٔ تغییرات فیزیکوشیمیایی طی روند رسیدن حبه در پنج رقم انگور، Popescu *et al.* (2009) مشاهده کردند که فعالیت این آنزیم در تمام ارقام روند مشابهی را طی رسیدن میوه از خود نشان داد، به‌طوری‌که با افزایش در میزان فعالیت، در زمان بلوغ فیزیولوژیکی به بیشترین حد رسیده و پس از آن دوباره روند کاهشی را نشان داد. در پژوهش حاضر هم مشاهده شد که میزان فعالیت آنزیم لاکاز در بیشتر ژنوتیپ‌های انار در مرحلهٔ رسیدن کاهش یافت.

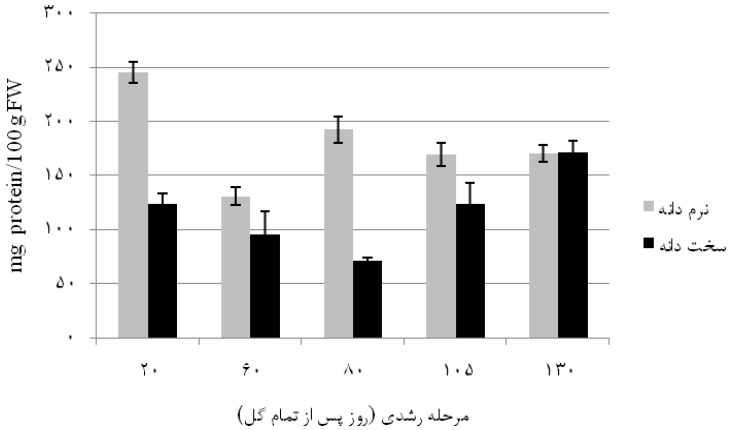
هرچند که فعالیت آنزیم لاکاز تا کنون در گیاهان عالی زیادی تأیید نشده است (Mayer & Staples, 2002)، اما بنابر نتایج حاصل، انار را می‌توان جزء گیاهانی دانست که فعالیت لاکاز در آریل آن وجود دارد. اگرچه بین ژنوتیپ‌های مختلف انار فعالیت این آنزیم تفاوت‌هایی را نشان داد، ولی این تفاوت‌ها همبستگی با میزان سختی دانه نداشت و بعید به نظر می‌رسد که این آنزیم نقش قابل توجهی در فرایند سخت‌شدن پوستهٔ بذر انار ایفا کند. ممکن است فعالیت این آنزیم مرتبط با تشکیل دیوارهٔ سلولی و نه منحصراً لیگنیفیکاسیون باشد (Mayer & Staples, 2002).

پروتئین کل

نتایج حاصل از بررسی میزان پروتئین کل طی فصل رشد بیانگر روند نسبتاً کاهشی در مراحل اولیه و افزایشی یا تثبیت در دو مرحلهٔ آخر نمونه‌گیری بود (شکل۳). بیشترین مقدار پروتئین کل ثبت‌شده به میزان ۲۵۶/۹ میلی‌گرم پروتئین در ۱۰۰ گرم وزن تازه مربوط به ژنوتیپ 'بی‌هستهٔ نجف‌آباد' در مرحلهٔ ۲۰ روز پس از تمام‌گل و کمترین عدد به‌دست‌آمده به میزان ۶۴/۳ میلی‌گرم پروتئین در ۱۰۰ گرم وزن تازه آریل مربوط به ژنوتیپ 'ملس یزدی' در مرحلهٔ ۶۰ روز پس از تمام‌گل مشاهده شد. میانگین عددی پروتئین کل در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه در بیشتر مراحل نمونه‌برداری بیش از ژنوتیپ‌های سخت‌دانه بود. میزان پروتئین کل ژنوتیپ‌های نرم در مرحلهٔ اول نمونه‌گیری تقریباً دو برابر ژنوتیپ‌های سخت‌دانه بود. در مرحلهٔ دوم نمونه‌گیری در تمام ژنوتیپ‌ها میزان پروتئین کل کاهش یافت و تقریباً نزدیک به هم قرار گرفت. در مرحلهٔ سوم نمونه‌گیری ژنوتیپ‌های سخت‌دانه همچنان روند کاهشی در میزان

پروتئین خود نشان دادند، در صورتی که میزان پروتئین ژنوتیپ‌های نرم‌دانه نسبت به مرحلهٔ دوم افزایش نشان داد. در مرحلهٔ چهارم و پنجم نمونه‌برداری ژنوتیپ‌های نرم‌دانه تفاوت قابل توجهی در مقدار پروتئین خود نشان ندادند، درحالی‌که ژنوتیپ‌های سخت‌دانه روند افزایشی از خود نشان دادند و درنهایت در آخرین مرحلهٔ نمونه‌برداری تفاوت معناداری بین بیشتر ژنوتیپ‌ها دیده نشد.

با بررسی انار رقم ’گانش‘ در کشور هند، کاهش نسبی در میزان پروتئین کل در آریل این رقم طی فصل گزارش شد (Kulkarni & Aradhya, 2005). روند کاهشی در محتوی پروتئینی طی فرایند رسیدن میوه در گیاهان دیگری هم گزارش شده است (Martin *et al*., 1979; Jimenez *et al*., 2002). روند مشابهی در میوه‌های دانه‌دار توسط Frenkel *et al*. (1968) گزارش شد و کاهش در پروتئین کل به‌علت نیاز کمتر به آنزیم‌های درونزاد مربوط به فعالیت‌های آنابولیکی، که با رسیدن میوه کاهش می‌یابند، عنوان شد.



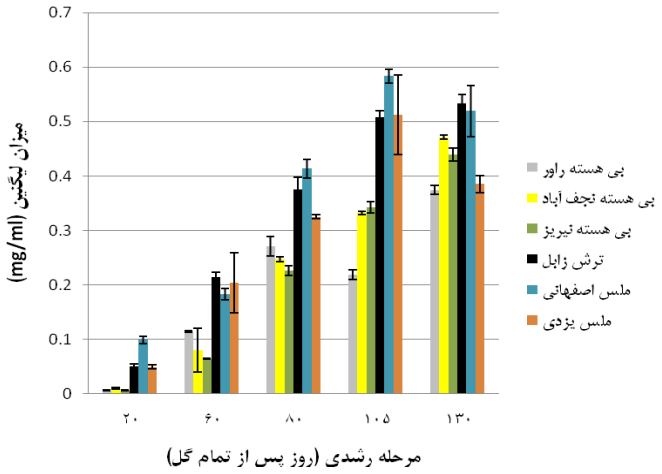
شکل ۳. تغییرات در میزان پروتئین کل در آریل ژنوتیپ‌های نرم‌دانه و سخت‌دانه انار طی مراحل مختلف رشد بر اساس روز پس از تمام‌گل (نرم‌دانه: میانگین مربوط به سه ژنوتیپ نرم‌دانه، سخت‌دانه: میانگین مربوط به سه ژنوتیپ سخت‌دانه)

میزان لیگنین

بررسی میزان لیگنین بذور ژنوتیپ‌های نرم و سخت در مراحل مختلف رشدی نشان داد که هرچند ژنوتیپ‌های نرم‌دانه هم میزان لیگنین قابل توجهی در بذور خود داشتند، میانگین میزان لیگنین در این ژنوتیپ‌ها در تمامی مراحل کمتر از ژنوتیپ‌های سخت‌دانه بود (شکل۴). با اینکه در ژنوتیپ سخت‌دانهٔ ’ملس اصفهانی‘ بیشترین میزان لیگنین در مرحلهٔ چهارم (۱۰۵ روز پس از گلدهی) ثبت شد، میزان این پلیمر طی فصل رشد در همهٔ ژنوتیپ‌ها روند افزایشی از خود نشان داد. کمترین میزان لیگنین در بذور تمامی ژنوتیپ‌ها، در مرحلهٔ اول (۲۰ روز پس از گلدهی) مشاهده شد که در این مرحله میزان لیگنین در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه بسیار کم بود. در آخرین مرحلهٔ نمونه‌برداری کاهش اندکی در میزان لیگنین در بذر ’ملس اصفهانی‘ مشاهده شد، ولی تغییرات لیگنین در بذور نرم‌دانه روند افزایشی خود را حفظ کرد.

هرچند میزان لیگنین در انواع ژنوتیپ‌های نرم‌دانه و سخت‌دانه در مراحل مختلف رشدی تفاوت‌هایی را نشان داد ولی این تفاوت به‌خصوص در مراحل پایانی رشد قابل توجه نبوده است و شاخص مناسبی برای تشخیص انواع نرم‌دانه و سخت‌دانه محسوب نمی‌شود. بنابراین، نمی‌توان سخت یا نرم بودن بذور ژنوتیپ‌های انار را فقط به میزان لیگنین بذور نسبت داد. هرچند روش اسپکتروفوتومتری برای سنجش لیگنین به‌طور گسترده در گیاهان مختلف به کار گرفته شده است، بایستی به این نکته هم توجه کرد که چون سنجش در این روش براساس جذب نوری حلقه آروماتیک صورت می‌گیرد، ممکن است مونومرهایی هم که در مراحل قبلی حذف نشده باشند سبب جذب نوری در طول موج استفاده شوند. بنابراین، جذب نوری می‌تواند مربوط به مونولیگنول‌هایی باشد که در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه وجود داشته ولی به‌صورت پلیمر درنیامده باشند. در پژوهش جدیدی Bunzel *et al*. (2011) گزارش کردند که این روش سنجش، میزان

لیگنین در دانه‌های غلات و سبوس آن‌ها را بسیار بیشتر از میزان واقعی نشان می‌دهد. با مقایسهٔ روش‌های مختلف، این پژوهشگران مشاهده کردند که پلیمرهای دیگر مانند کوتین و سوبرین هم ممکن است با استفاده از این روش به عنوان لیگنین در نظر گرفته شوند. بنابر نظر این پژوهشگران، در بسیاری از گزارش‌هایی که به وجود لیگنین بالا در گیاهان مختلف به‌خصوص در قسمت فیبر خوراکی اشاره شده است بایستی تجدید نظر کرد (Bunzel *et al*., 2011). همچنین ممکن است میزان پلیمرشدن مونولیگنول‌ها در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه به حدی نباشد که سبب سختی در آن‌ها شود. یا اینکه نحوهٔ آرایش مونولیگنول‌ها در پلیمر نهایی، در انواع نرم‌دانه متفاوت از انواع سخت‌دانه باشد. بنابراین، استفاده از روش‌های دقیق‌تر برای اندازه‌گیری نوع و نسبت مونولیگنول‌هایی که در ژنوتیپ‌های نرم و سخت به کار رفته‌اند ضروری به نظر می‌رسد.



شکل ۴. تغییرات در میزان لیگنین در بذور ژنوتیپ‌های مختلف انار طی مراحل مختلف رشد براساس روز پس از تمام گل

نتیجه‌گیری کلی

بنابر نتایج حاصل از این پژوهش، با توجه به اینکه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به آنزیم لاکاز در قسمت گوشتی آریل‌های انار بسیار بیشتر بود (حداقل ده‌هزار برابر) و در ژنوتیپ‌های سخت‌دانه میزان فعالیت آن به‌خصوص در مراحل آخر رشد بیشتر است، ممکن است بتوان فعالیت این آنزیم را به‌منزلهٔ یکی از نقاط تعیین‌کنندهٔ در ایجاد صفت نرم‌دانگی در انار برای انجام مطالعات بیشتر به‌خصوص مطالعات ملکولی از قبیل بررسی بیان ژن و یا شناسایی و مقایسهٔ این ژن در ژنوتیپ‌های نرم‌دانه و سخت‌دانه معرفی کرد. درحقیقت با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که نسبت به آنزیم لاکاز، پراکسیداز کاندیدای قوی‌تری برای ایفای نقش در صفت نرم‌دانگی در ژنوتیپ‌های انار است.

همچنین وجود پلیمر لیگنین در پوستهٔ بذور نرم‌دانه در مقداری نزدیک به ژنوتیپ‌های سخت‌دانه ممکن است بیانگر وجود مکانیسمی به‌جز تشکیل لیگنین برای سخت یا نرم شدن بذور دانه‌های انار باشد. به‌هرحال انجام مطالعات دقیق‌تر روی ساختار پلیمر لیگنین و همچنین میزان و نسبت مونولیگنول‌های مختلف تشکیل‌دهندهٔ در ژنوتیپ‌های نرم و سخت دانه ضروری می‌نماید.

REFERENCES

1. Awad, M.A., Al-Qurashia, A.D. & Mohamed, S.A. (2011). Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening. *Scientia Horticulturae*, 129, 688–693.
2. Baldrian, P. (2006). Fungal laccases–occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215–242.
3. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546.

4. Bradford, M.M. (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.
5. Bruce, R.J. & West, C.A. (1989). Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*, 91, 889–897.
6. Brunow, G., Kilpelainen I., Sipila, J., Syrjanen, K., Karhunen, P., Setala, H. & Rummakko, P. (1998). Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. In: Lewis, N.G. & Sarkanen, S. (Eds) *Lignin and Lignan Biosynthesis*. *ACS Symposium Series 697. American Chemical Society*, Washington, DC. p. 131–147.
7. Bunzel, M., Schubler A. & Saha, G.T. (2011). Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12506 – 12513.
8. Chance, B. & Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. *Academic Press*, New York, pp. 764–775.
9. Civello, P.M., Martınez, G.A., Chaves, A.R. & Anon, M.C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596-2601.
10. Erkurt, E.A., Unyayar, A. & Kumbur, H. (2007). Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*, 42, 1429–1435.
11. Fagerstedt, K.V., Kukkola1, E.M., Koistinen1, V.V.T., Takahashi, J. & Marjamaa, K. (2010). Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce. *Journal of Integrated Plant Biology*, 52, 186–194.
12. Frenkel, C., Klein, I. & Dilley, D.R. (1968). Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. *Plant Physiology*, 43, 1146–1153.
13. Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F.J. & Greppin, H. (1985). A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, 64, 418- 423.
14. Harel, E., Mayer, A.M. & Lerner, H.R. 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21, 542-544.
15. Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeyen, M. & Mullineaux, P. (2002). Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*, 214, 751-758.
16. Koutaniemi, S., Warinoski, T., Karkonem, A., Alatalo, E., Fossdal, C.G., Saranppa, P., Lakso, T., Fagerstedt, K.V., Simola, L.K., Paulin, L., Rudd, S. & Teeri, T.H. (2007). Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Molecular Biology*, 65, 311–328.
17. Kulkarni, A.P. & Aradhya, S.M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93, 319–324
18. Marjamaa, K., Kukkola, E.M. & Fagerstedt, K.V. (2009). The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 60, 367–376.
19. Martin, B.A., Gauger, J.A. & Tolbert, N.E. (1979). Changes in activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase and three peroxisomal enzymes during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiology*, 63, 486-489.
20. Mayer, A.M. & Staples, R.C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551–565.
21. Popescu, C., Postolache, E., Rapeanu, G., Bulancea, M. & Hopulele, T. (2009). Change of the physico-chemical indices and the oxidative enzymatic activities during the white grapes ripening. *Food Technology*, 13: 70-76.
22. Pourcel, L., Routaboul, J. & Kerhoas, L. (2005). *Transparent testa10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 17, 2966–2980.
23. Silva, E., Lourencuo, E.J. & Neves, V.A. (1990). Soluble and bound peroxidases from papaya fruit. *Phytochemistry*, 29, 1051-1056.
24. Sterjiades, R., Dean, J.F. & Eriksson, K.E. (1992). Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology*, 99, 1162–1168.
25. Thompson, D.S., Davies, W.J. & Ho, L.C. (1998). Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant, Cell and Environment*, 21, 589-599.
26. Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.