تأثیر دما بر فعالیت آنزیم Beta-CAS و متابولیسم سیانید در ارقام سیب فوجی و عباسی مشهد

مسعود زاده‌باقری [۱] * ، یونس مستوفی [۲] ، مصطفی مصطفوی [۳] ، علیرضا طلائی [۴] ، فرزانه نجفی [۵]

چکیده

سیانید یک فرآورده مهم (Co-product) با بیوسنتز اتیلن در گیاهان عالی از مسیر ACC به شمار می‌آید. در برخی حالت‌های فیزیولوژیکی مانند رسیدن میوه، پیری گل، غرقاب، خشکی، اشعه ماوراء بنفش، اوزن، آلودگی پاتوژنی و سرمازدگی اتیلن به میزان بیش‌تری تولید می‌شود. سیانید یک یون مضر و خطرناک برای زندگی به شمار می‌آید و با ایجاد ترکیبات پایدار با عناصری مانند آهن و منیزیم می‌تواند فعالیت آنزیم‌ها را مختل سازد و بدین ترتیب، بافت را از انجام تنفس، تثبیت کربن و احیای نیترات ناتوان می‌سازد. تعدادی از گیاهان قادر به تولید سیانید هستند و تاکنون بیش از ۲۰۰۰ گونه سیانوژنیک شناسایی شده‌اند. در گیاهان عالی آنزیم Beta-CAS برای متابولیزه کردن سیانید کاربرد دارد. برای بررسی فعالیت آنزیم Beta-CAS و ارتباط آن با متابولیسم سیانید و بیوسنتز اتیلن در دورقم سیب فوجی و عباسی مشهد، آزمایشی به صورت فاکتوریل در کرت‌های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به اجرا درآمد. صفات کمی و کیفی شامل تولید اتیلن، میزان سیانید، ارزیابی فعالیت آنزیم Beta-CAS ، در سطوح مختلف دما (۲- ، صفر، ۲، ۴) مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم Beta–CAS با روش رنگ سنجی (Clorometric) و بر اساس میزان H_2S تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این تحقیق دریافتیم بافتی که دارای بالاترین فعالیت آنزیم Beta-CAS باشد، بیش‌ترین میزان تولید اتیلن را دارد. ارتباط مناسبی بین بیوسنتز اتیلن، تولید سیانید و فعالیت آنزیم Beta-CAS آشکار بود و این موضوع مشخص می‌کند که اتیلن می‌تواند ظرفیت متابولیزه شدن سیانید را بالا ببرد.

کلمه‌های کلیدی: اتیلن- سیانید- آنزیم Beta-CAS .

۱- دانش‌آموخته دکتری علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. (مسئول مکاتبه)
(E-Mail:Mzadehbagheri@Yahoo.com)
۲- دانشیار پردیس کشاورزی دانشگاه تهران.
۳- استاد پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
۴- استاد پردیس کشاورزی دانشگاه تهران.
۵- استادیار دانشگاه تربیت معلم تهران.

تاریخ دریافت : زمستان ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش : بهار ۱۳۸۸

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیوسنتز اتیلن در گیاهان عالی از مسیر ACC[1] صورت می‌گیرد و سیانید هم به عنوان یک محصول مشترک (Co-product) با بیوسنتز اتیلن از راه این مسیر تولید می‌شود. در حالت‌های ویژه فیزیولوژیکی مانند رسیدگی میوه، پیری گل و میوه، تنش‌های زنده و غیر زنده از قبیل غرقاب و یخزدگی میوه، بیوسنتز اتیلن به میزان بیش‌تری تحریک می‌شود و همزمان طبق واکنش‌های زیر موجبات تولید ماده سمی و خطرناک سیانید نیز فراهم می‌شود (Yip & All, 1988).

$$\text{L.methionine} \xrightarrow{\text{SAM synthetase}} \text{SAM} \xrightarrow{\text{ACC synthase}} \text{ACC}$$

$$\text{ACC} + O_2 + \text{ascorbate} \xrightarrow{\text{ACC oxidase}} C_2H_4 + CO_2 + \text{HCN} + \text{dehydroascorbat} + 2H_2O$$

به نظر می‌رسد به همان مقداری که اتیلن تولید می‌شود، ماده سمی و خطرناک سیانید نیز تولید می‌شود، ولی اگر قرار باشد سیانید در بافت تجزیه و از بین نرود، آسیب‌های جبران‌ناپذیری به همراه خواهد داشت. در این راستا، گیاهان از قابلیت بالایی برای سمیت‌زدایی و تجزیه سیانید در بافت برخوردارند. برای سمیت‌زدایی سیانید در گیاهان، آنزیم کلیدی و مهم بتا - سیانوآلانین‌سینتاز[2] ایفای نقش می‌کند(Hasegava & All, 1995). سیانید تولید شده با ماده اِل - سیستئین[3] موجود در بافت ترکیب شده و تحت تأثیر آنزیم مذکور به ترکیبات غیر فعال متابولیزه می‌شود (Akopyan & All, 1975 ; Ezzi & All, 2002).

$$\text{L. cysteine} + \text{HCN} \xrightarrow{\text{Beta-CAS}} \text{Beta} - \text{cyanoalanin} + H_2S$$

چون هورمون گیاهی اتیلن، تقریباً به وسیله‌ی همه گیاهان تولید می‌شود و سیانید نیز یک ماده هم تولید با اتیلن می‌باشد؛ بنابراین، عجیب نیست که آنزیم Beta-CAS منحصر به گیاهان سیانوژنیک نباشد؛ بلکه به صورت گسترده‌ای در همه‌ی گیاهان وجود داشته باشد. بیوسنتز اتیلن می‌تواند منبع اصلی تولید سیانید باشد. بنابراین هنگامی که میزان تولید اتیلن و توانایی سمیت‌زدایی سیانید مشخص باشد، امکان تخمین زدن غلظت پایدار سیانید در داخل بافت وجود دارد (Yip & All, 1991).

1- 1-Amino cyclopropane-1-carboxlicacid
2- Beta-cyanoalanine synthase (Beta-CAS) or (L-3-CAS)
3- L-cysteine

Archive of SID

www.SID.ir

$$ACC \xrightarrow{V_1} HCN \xrightarrow{V_2} L-3-cyanoalanine$$

V_1 = میزان تولید اتیلن = میزان تولید سیانید

V_2 = میزان متابولیسم سیانید به L – 3 – cyanoalanine

پذیرفتن این‌که میزان متابولیسم سیانید از قانون جنبش و معادله میکائلیس- منتون[1] تبعیت می‌کند، بنابراین:

$$V_2 = \frac{V \times [HCN]}{Km + [HCN]}$$

در اینجا، V بیش‌ترین میزان متابولیسم سیانید در غلظت اشباع سیانید بوده و با میزان آنزیم Beta-CAS ارتباط دارد. Km برای این آنزیم در محیط درون شیشه‌ای در حدود ۰/۵ mM تخمین زده شده است. چون میزان Km در ارتباط با غلظت سیانید مشاهده شده در بافت‌های گیاهی خیلی زیاد است، بنابراین:

$$V_2 = \frac{V \times [HCN]}{Km}$$

در حالت پایدار:

$$V_1 = V_2 = \frac{V \times [HCN]}{Km}$$

$$[HCN] = \left(\frac{V_1}{V}\right) \times KM$$

معادله بالا پیش‌بینی می‌کند اگر میزان تولید اتیلن افزایش یابد، غلظت سیانید به صورت خطی افزایش می‌یابد در صورتی که V (یا میزان L-3-CAS) و Km غیر قابل تغییر بماند. چنانچه فعالیت آنزیم کلیدی L-3-CAS در هر شرایط نامطلوبی مانند تنش و غیره متوقف شود، در این صورت سیانید در بافت تجزیه نشده و مقدمات سمیت و مرگ فراهم می‌شود (Fowden, 1965 ; Larsen, 2004 ; Yip & All, 1988). اتیلن[2] به عنوان یک هورمون گیاهی با فرمولاسیون ساده، می‌تواند با غلظت‌های اندک تأثیرات بیولوژیکی شگرفی را ایجاد کند. این هورمون

1- Michaelis-Menten
2- Ethylene

Archive of SID

www.SID.ir

گازی، می‌تواند به آسانی در جاهای مختلف پخش شود (Goudey & All, 1989 ; Kende, 1993) در گیاهان سیانید می‌تواند به صورت گلیکوزیدهای سیانوژنیک نیز وجود داشته باشد. به عنوان مثال، در کاساوا[1]، سورگوم[2]، ذرت[3]، سیب‌زمینی شیرین[4]، سیب و غیره می‌توان این ماده را یافت (Goudey & All, 1989 ; Blumenthalas, 1968). در حال حاضر، بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی قابلیت تولید سیانید را دارند و بیش‌تر فرم گلیکوزید سیانید برای تدابیر دفاعی گیاه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. گلیکوزیدهای سیانوژنیک یا سیانوژن‌ها[5] شامل آمیگدالین[6]، پرونازین[7]، لیناماریـن[8] و دهورین[9] می‌باشد. ترکیب سیانید با مولکول‌های قند، سبب تولید این گلیکوزیدهای سیانوژنیک می‌شود. گلیکوزیدهای سیانوژنیک تحت تأثیر آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز و هیدروکسی نیتریل‌لیاز در نهایت به سیانید هیدروژن و دیگر ترکیبات تبدیل می‌شوند (Liang, 2003).

$$\text{Cyanogenic glycosides} \xrightarrow{\beta.\text{ glucosidase}} \text{sugar} + \text{aglycone}$$
$$\text{Aglycone} \xrightarrow{\text{Hydroxy nitrilelyase}} \text{HCN} + \text{aldehyde or ketone}$$

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه علوم باغبانی واقع در مجتمع مجهز آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در سال ۸۶- ۱۳۸۵ انجام شده است. آزمایش در قالب طرح آماری فاکتوریل در کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کاملاً در چهار تکرار انجام شد، به طوری که فاکتورهای رقم و دمای انبار به صورت فاکتوریل در کرت‌های اصلی و فاکتور زمان نگهداری در انبار در کرت‌های فرعی قرار گرفتند.

رقم فوجی (*Malus domestica* Borkh., CV. Fuji) به عنوان یکی از ارقام تجاری و مهم سیب به شمار می‌آید و از تلاقی دو رقم (Red Delicious×Ralls Janet) به دست آمده است (Blankenship & All, 1968)

1- Cassava
2- Sorghum
3- Maiz
4- Sweet potatoes
5- Cyanogens
6- Amygdalin
7- Prunasin
8- Linamarin
9- Dhurrin

Archive of SID

www.SID.ir

و رقم عباسی مشهد نیز یکی از ارقام دیررس سیب در کشور به شمار می‌آید. سیب فوجی از منطقه‌ی دماوند و ۱۷۰ روز بعد از تمام گل و سیب عباسی مشهد از منطقه‌ی خور نیشابور برداشت و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. میوه‌ها به صورت تصادفی به چهار قسمت جداگانه تقسیم و در چهار دما شامل ۲- ، صفر، ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه‌های معمولی با طوبت نسبی ۲±۸۵ به مدت ۴ ماه نگهداری شدند. در تمام مدت به صورت روزانه و گاهی هفتگی دمای انبار و دیگر مسایل آن مورد بررسی و کنترل قرار می‌گرفت. اندازه‌گیری مربوط به صفات اتیلن و سیانید در ۳ زمان قبل از انبار، ۲ ماه پس از انبار و ۴ ماه پس از انبار انجام گرفت. برای اندازه‌گیری گاز اتیلن از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) مدل SHIMADZU-GC-8IT استفاده شد. ابتدا وزن و حجم نمونه اندازه‌گیری شد، به مدت یک ساعت نمونه در یک ظرف کاملاً مسدود با گنجایش ۷۰۰ میلی‌لیتر قرار داده شد، سپس با یک سوزن دو طرفه محتویات گازی ظرف از راه سپتوم به ونوژکت های خلاءدار منتقل و با استفاده از سرنگ، یک میلی‌لیتر گاز برای آنالیز اتیلن به دستگاه تزریق شد.

برای اندازه‌گیری سیانید، تکه‌های بافت سیب به وزن ۲ گرم به مدت ۲ ساعت در محلول کلرید کلسیم ۲ درصد خیسانده شد، سپس نمونه‌ها در یک ظرف ۱۰ میلی‌لیتر دارای ۲۰۰ میکرو لیتر سود ۰/۱ نرمال در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر اسید استیک[1] یک مولار، یک میلی‌لیتر سوکسینامید[2] ۰/۲۵ درصد در ان-کلروسوکسینامید[3] ۰/۰۲۵ درصد و در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر باربیتوریک اسید[4] ۳ درصد در پیریدین[5] ۳۰ درصد اضافه شد. محلول به دست آمده به خوبی تکان داده می‌شود و بعد از ۱۰ دقیقه میزان جذب رنگ تولید شده توسط اسپکتروفتومتر مدل Cary50 در۵۸۰ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از سیانید پتاسیم استفاده شد (Yip & All, 1988 ; Yip & All, 1991).

برای اندازه‌گیری آنزیم Beta-CAS ابتدا تکه‌های بافت گوشت سیب با وزن ۲۵ گرم در هاون تکه تکه و له شد و سپس دو برابر وزن نمونه، یعنی ۵۰ میلی‌لیتر محلول Tris-HCl با pH = ۸/۵ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار اضافه شد، سانتریفیوژ صورت گرفت. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده در یک لوله آزمایش دارای سپتوم ریخته شد و ۴ میلی‌لیتر سوبسترای تازه آماده شده به آن افزوده شد. بعد از به هم زدن و قرار دادن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول به دست آمده را در یک تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و توسط

1- Acetic acid
2- Succinimide
3- N-chlorosuccinimide
4- Barbituric acid
5- Pyridin

Archive of SID
www.SID.ir

سپتوم ۰/۱ میلی‌لیتر از ماده N,N-Dimethyl-s-phenylene diamine sulfate ۰/۰۲ نرمال برای توقف واکنش اضافه و در نهایت، ۰/۱ میلی‌لیتر از ماده ۰/۰۳ مولار کلرید آهن که در اسید کلریدریک ۱/۲ نرمال حل شده بود، اضافه شد. بعد از تشکیل رنگ، شدت جذب در ۶۵۰ نانومتر قرائت شد. از ماده Na_2S برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (Meyer & Ahmad, 1991 ; Wurt & All, 1985). داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سیانید، اتیلن و آنزیم Beta-CAS در دوره نگهداری انبار

تجزیه واریانس عوامل مورد بررسی بر سیانید در دوره‌ی انبارداری میوه نشان می‌دهد که اثر ساده دما، رقم و زمان نگهداری در انبار در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده‌اند. هم‌چنین، اثر متقابل رقم و دمای انبار در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. افزون بر این، اثر متقابل دما در زمان، رقم در زمان و اثر سه گانه رقم در دما در زمان نگهداری از نظر آماری معنی‌دار نیست (جدول ۱). همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، نتایج حاصل از تجزیه واریانس اتیلن نشان می‌دهد، اثر ساده رقم و دمای انبار و اثر متقابل رقم در دما در سطح یک درصد معنی‌دار شده است و بقیه اثرها ساده و متقابل معنی‌دار نمی‌باشند.

با مشاهده شکل ۱ و رجوع به جدول ۱ در خصوص سیانید می‌توان گفت که با افزایش دامنه دمایی از ۲- به ۴ درجه سانتی‌گراد میزان و غلظت سیانید کاهش یافته است. این کاهش غلظت HCN در دمای ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری ندارد. با افزایش مدت زمان نگهداری در میزان سیانید کاهش مشاهده می‌شود و رقم فوجی نسبت به عباسی مشهد از قابلیت بالاتری برای تجمع سیانید برخوردار می‌باشد.

شکل ۲ نشان می‌دهند که در دماهای مختلف انبار رقم فوجی و عباسی مشهد از نظر میزان سیانید با هم تفاوت دارند و به جز در شاهد و دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در بقیه دماها بین این دو رقم از نظر تجمع سیانید اختلاف معنی‌داری وجود ندارند.

شکل ۳ اثر متقابل زمان نگهداری در انبار در دمای انبار را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود با گذشت زمان میزان سیانید کم‌تر می‌شود، یعنی تجمع سیانید در چهار ماه نسبت به دو ماه کم‌تر می‌باشد و البته این اختلاف فقط در دمای صفر درجه سانتی‌گراد معنی‌دار می‌باشد و در بقیه دماها معنی‌دار نیست و از طرفی، با رجوع به جدول ۱ و پی بردن به این نکته که اثر متقابل عامل‌های دما در زمان نگهداری در انبار معنی‌دار نیست، می‌توان گفت داشت که این روند تغییر سیانید در هر دو رقم به صورت مشابهی اتفاق می‌افتد. در ضمن می‌توان گفت تغییرات میزان سیانید در زمان‌های مختلف انبارداری صرف‌نظر از نوع رقم، تحت تأثیر دمای انبار قرار

Archive of SID

www.SID.ir

نمی‌گیرد، مگر در دمای صفر درجه سانتی‌گراد که اختلاف معنی‌دار است. شکل ۴ نشان می‌دهند که ارقام مورد مطالعه از نظر تجمع سیانید در زمان‌های مختلف انبار تفاوت معنی‌داری دارند. در هر دو حالت دو و چهار ماه تجمع سیانید در سیب فوجی بیش‌تر است. این نوع تغییرات می‌تواند بیانگر عدم وجود اثر متقابل معنی‌دار بین این دو عامل باشد که نتایج جدول ۱ این موضوع را تأیید می‌کند.

مطالعه جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل سه عامل رقم، زمان نگهداری در انبار و دمای انبار معنی‌دار نیست که این مطلب بیانگر وجود روند مشابه تغییرات میزان سیانید در ارتباط با این سه عامل است. در شکل ۵ دیده می‌شود که در تمام مواردی که اختلاف معنی‌دار است، رقم فوجی از قابلیت بیش‌تری برای تجمع سیانید برخوردار است. به عبارت دیگر، تغییرات میزان سیانید در اینجا روند مشابهی را نشان می‌دهد که همین موضوع سبب عدم معنی‌دار شدن این سه عامل در جدول ۱ شده است.

با مراجعه به جدول ۱ و نظر به شکل ۶ در خصوص اثر ساده رقم، دمای انبار و زمان نگهداری در انبار بر میزان تولید اتیلن می‌توان عنوان کرد که رقم عباسی مشهد نسبت به رقم فوجی از قابلیت بیش‌تری برای تولید اتیلن برخوردار است و بین این دو از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. با افزایش مدت زمان نگهداری ارقام در انبار، میزان تولید اتیلن بیش‌تر می‌شود، ولی این اختلاف بین دو و چهار ماه معنی‌دار نیست. دماهای مختلف، اثر نسبتاً متفاوتی بر تولید اتیلن دارند به طوری که کم‌ترین میزان تولید اتیلن در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد رخ داده و بین سایر دماها از نظر تولید اتیلن اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

با توجه به جدول ۱ که نشان می‌دهد اثر متقابل رقم و دمای انبار در سطوح مورد آزمون معنی‌دار شده است و با توجه به شکل ۷ می‌توان گفت که روند تغییرات تولید اتیلن در سطوح مختلف درجه حرارت برای هر دو رقم از دمای ۲- تا ۴ درجه سانتی‌گراد با یک روند صعودی افزایش می‌یابد و البته این روند صعودی در برخی موارد معنی‌دار نمی‌باشد. برای مثال، تغییرات در دماهای ۲ و ۴ درجه سانتی‌گراد معنی‌دار نیست.

با توجه به شکل ۸ و با مراجعه به جدول ۱ روند تغیرات دو دوره زمانی مشابه است و همین مورد سبب عدم معنی‌دار شدن اثر متقابل دمای انبار در زمان نگهداری در انبار شده است.

ارقام فوجی و عباسی مشهد از نظر تولید اتیلن در زمان‌های مختلف انبار، تفاوت معنی‌دار از خود نشان می‌دهد. در واقع، این تفاوت هم در دو ماه و هم در چهار ماه معنی‌دار می‌باشد و در هر دو زمان تولید اتیلن رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی بیش‌تر است (شکل ۹). این نوع تغییرات می‌تواند بیانگر عدم وجود اثر متقابل معنی‌دار بین این دو عامل (رقم و زمان نگهداری در انبار) باشد که نتایج جدول ۱ این موضوع را تأیید می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعه جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل سه عامل رقم، زمان نگهداری در انبار و دمای انبار معنی‌دار نیست. این مطلب بیانگر روند تقریباً مشابه تغییرات میزان اتیلن در ارتباط با این سه عامل است. شکل ۱۰ نشان می‌دهد که رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی در تمامی مواردی که اختلاف معنی‌دار بوده، از سفتی بافت بیش‌تری برخوردار است. شکل ۱۱ اثرات رقم، دمای انبار و زمان نگهداری در انبار را به صورت مستقل بر میزان فعالیت آنزیم Beta-CAS نشان می‌دهد. فعالیت این آنزیم در رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی بیش‌تر است و بین این دو نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با گذشت زمان انبارداری از دو ماه به چهار ماه میزان فعالیت این آنزیم به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. در ضمن، با افزایش دما فعالیت این آنزیم یک سیر صعودی دارد. هر چند که بین برخی دماها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

شکل ۱۲ اثرات متقابل عامل‌های رقم و دمای انبار را نشان می‌دهد. در این‌جا با افزایش دما، میزان فعالیت آنزیم در هر دو رقم افزایش می‌یابد و به جز در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در دیگر دماها اختلاف معنی‌داری از نظر فعالیت این آنزیم در بین ارقام مورد مطالعه دیده نمی‌شود. لازم به توضیح است که در تجزیه واریانس حداقل یک تفاوت سبب معنی‌دار شدن عامل مورد نظر می‌شود و به همین دلیل در جدول ۱ اثر متقابل دمای انبار در رقم معنی‌دار شده است.

اثر متقابل دمای انبار در زمان نگهداری در انبار در شکل ۱۳ نشان داده شده است. در سطوح مختلف درجه حرارت بین زمان‌های دو و چهار ماه از نظر میزان فعالیت آنزیم Beta-CAS اختلاف معنی‌داری وجود دارد. اثر متقابل رقم و زمان نگهداری در انبار با توجه به جدول ۱ دلالت بر عدم معنی‌دار شدن دارد، یعنی روند تغییرات ارقام مورد مطالعه در زمان‌های دو و چهار ماه روندی مشابه بوده است (شکل ۱۴).

در خصوص اثرات سه گانه رقم، دما و زمان نگهداری در انبار با توجه به عدم معنی‌دار شدن اثر متقابل این سه عامل می‌توان گفت که روند مشابهی در تغییرات فعالیت این آنزیم در ارتباط با این سه عامل وجود دارد و در شکل ۱۵ دیده می‌شود که رقم عباسی مشهد نسبت به فوجی در تمام مواردی که اختلاف معنی‌داری وجود دارد، از میزان فعالیت بیش‌تری در خصوص این آنزیم برخوردار است.

بحث

در مسیر بیوسنتز اتیلن، سیانید یک محصول مشترک (Co-Product) با تولید اتیلن به شمار می‌آید (Castric & All, 1972). اتیلن به واسطه‌ی برخی تنش‌ها مانند خشکی و سرما به میزان بیش‌تری تولید می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

پس انتظار می‌رود به همان میزان ماده سمی و خطرناک سیانید نیز تولید شود و فعالیت آنزیم Beta-CAS می‌تواند سبب تجزیه و بی‌اثر کردن سیانید شود. سیانید افزون بر اثرات بازدارنده‌ای که قبلاً در مورد آن‌ها اشاره شد، بر فعالیت آنزیم‌هایی مانند سیتوکروم‌اکسیداز[1] و ریبولوزبی‌فسفات‌کربوکسیلاز[2] در گیاه اثر باز دارنده دارد. هم‌چنین، با اثر منفی بر گیرنده‌ی Cu-protein-plastocyanin که در پروسه انتقال الکترون در واکنش‌های نوری مربوط به فتوسنتز دخالت دارد، مانع انجام فتوسنتز به شکل بهینه می‌شود (Liang & Li, 2001). سیانید حتی در میزان کم، می‌تواند تنفس را در میتوکندری مهار کند و بدین ترتیب، سبب توقف رشد و یا حتی مرگ سلول شود (Ezzi & All, 2002). در اثر تنش سرما تولید اتیلن به میزان بیش‌تری تحریک می‌شود و میزان تولید سیانید نیز، افزایش می‌یابد (Maruyama & All, 2001).

هم‌چنین، تنش‌هایی مانند یخزدگی و خشکی با تأثیر بر روی غشاء سلول و با در نظر گرفتن نقش آنزیم‌ها، می‌تواند موجب افزایش میزان سیانید و ایجاد سمیت شوند (Blumenthalas, 1968). سیانید به عنوان سوبسترای آنزیم Beta-CAS مورد استفاده قرار می‌گیرد و این ماده سمی و خطرناک به مواد غیر سمی متابولیزه می‌شود (Meyer & Ahmad, 1991). در این تحقیق میزان سیانید در مدت چهار ماه نسبت به دو ماه به طور کلی از میزان کم‌تری برخوردار می‌باشد و بالا بودن میزان فعالیت آنزیم Beta-CAS در مدت زمان چهار ماه دلیلی بر کاهش میزان سیانید می‌باشد. هم‌چنین، فعالیت این آنزیم در سیب عباسی مشهد نسبت به فوجی بیش‌تر است بنابراین پایین بودن میزان سیانید در عباسی مشهد نسبت به فوجی دور از انتظار نبود.

وجود آنزیم Beta-CAS در بسیاری از گیاهان گزارش شده است. برگ‌های گیاهچه جو به صورت ویژه یک میزان زیادی از فعالیت این آنزیم و حدود ۱/۱ μ mol min^{-1} mg^{-1} chloroplast را نشان می‌دهند و میزان زیاد این آنزیم حاکی از انجام یک عمل مهم است و ثابت می‌کند که سوبسترای این آنزیم، یعنی سیانید در بافت موجود است. در برگ‌های گیاه جو مقدار کمی سیانید وجود دارد ولی در عین حال، میزان فعالیت این آنزیم زیاد می‌باشد و این اهمیت متابولیزه شدن سریع سیانید را در بافت منعکس می‌کند (Akopyan & All, 1975).

تحقیقات نشان می‌دهد این آنزیم در سیتوپلاسم ساخته می‌شود و سپس به مکان اصلی خودش، یعنی میتوکندری منتقل می‌شود. این آنزیم به صورت غالب و نه همیشه در میتوکندری فعالیت می‌کند، باند شدن سیانید با Cytaa3 سبب اختلال در تنفس می‌شود و بنابراین، وجود این آنزیم در میتوکندری می‌تواند موجب روان

1- Cytochromec oxidase
2- Ribulose-bisphosphate carboxylase

Archive of SID
www.SID.ir

کردن فعالیت تنفس شود. افزون بر این، شواهد حاکی از آن است که اتیلن از مسیر ACC می‌تواند در میتوکندری ساخته شود و این موضوع به اثبات می‌رساند که یکی از منابع تولید سیانید در میتوکندری مسیر ACC می‌باشد. فعالیت این آنزیم در بافت‌ها و نواحی انتهایی رشد که میزان تولید اتیلن قابل توجه است، بیش‌تر می‌باشد و یا هم‌چنین، در جاهایی که اتیلن در اثر پیری یا زخم القاء می‌شود (Liang & Li, 2001).

در این پژوهش تولید اتیلن با افزایش دما، افزایش یافت به طوری که بالاترین میزان تولید اتیلن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در سیب عباسی مشهد مشاهده می‌شود. میزان آنزیم Beta-CAS یک همبستگی نزدیکی با میزان تولید اتیلن دارد، یعنی با افزایش اتیلن، فعالیت آنزیم Beta-CAS نیز افزایش می‌یابد. این یافته با نتیجه پژوهش Goudey & All (۱۹۸۹) با این مضمون که تیمار $\mu l.L^{-1}$ ۱ اتیلن در لوبیا موجب افزایش میزان این آنزیم از ۷ به ۱۸، در جو از ۶۴ به ۱۷۵ و در نخود از ۱۸ به $nmol\ H_2S\ min^{-1}\ mg^{-1}$ ۳۵ مطابقت داشت. تحقیقات Mizutani & All (۱۹۹۲) و Hasegawa & All (۱۹۹۵) دلیلی بر اثبات این عقیده می‌باشد. اگر در یک زمان کوتاه ۳-۲ ساعته بافت در معرض اتیلن قرار گیرد در این حالت این آنزیم پایدارتر خواهد ماند. استفاده از موادی مانند نوربورنادین‌ها سبب متوقف کردن عمل اتیلن می‌شود و به دنبال آن، فعالیت این آنزیم نیز مختل می‌شود.

به نظر می‌رسد اتیلن سبب افزایش میزان پروتیین آنزیم Beta-CAS می‌شود و فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. یک سری پروتیین‌هایی وجود دارند که در زمان تنش‌های گوناگون ایفای نقش می‌کنند. این پروتیین‌ها و آنزیم‌ها مانند کاتالاز[1]، سوپر اکسید دیسموتاز[2]، اسکوربات پراکسیداز[3] و گلوتاتیون رداکتاز[4] سبب نگهداری از غشاءها و مولکول‌های بزرگ و هم‌چنین، مسئولیت سمیت‌زدایی را در برخی واکنش‌ها بر عهده دارند. ممکن است آنزیم Beta-CAS نیز یکی از آنزیم‌های مهمی باشد که در زمان تنش برای سم‌زدایی در سیستم دفاعی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Liang & Li, 2000).

در این تحقیق، دمای ۲ درجه سانتی‌گراد نیز به برخی دلایل از جمله تولید بهینه هورمون اتیلن، حفظ سفتی بافت میوه، عدم وجود سرمازدگی بافت ارقام مورد مطالعه، از دست دادن رطوبت بافت میوه در حد قابل قبول، تولید سطح مناسبی از آنزیم Beta-CAS برای تجزیه سیانید و غیره در هر دو رقم مورد مطالعه به عنوان دمای بهینه و مطلوب مورد توجه خواهد بود. دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دلیل تولید بالای اتیلن و عدم داشتن سفتی

1- Catalase
2- Super oxide dismutase
3- Ascorbate peroxidase
4- Glutathione reductase

Archive of SID

www.SID.ir

بافت و رطوبت مناسب میوه مورد توجه نیست، هر چند که از نظر سطح تولید ماده سمی سیانید در شرایط مناسبی قرار دارد. دمای صفر و ۲- درجه سانتی‌گراد نیز به دلیل آسیب‌های سرمازدگی و داشتن سطح نامعقول ماده سمی سیانید قابل توصیه نیست، هر چند که این دما از نظر برخی صفات مطلوب مانند حفظ بافت میوه قابل توجه است.

جدول۱- تجزیه واریانس سیانید ، اتیلن و آنزیم Beta-CAS در دوره انبارداری

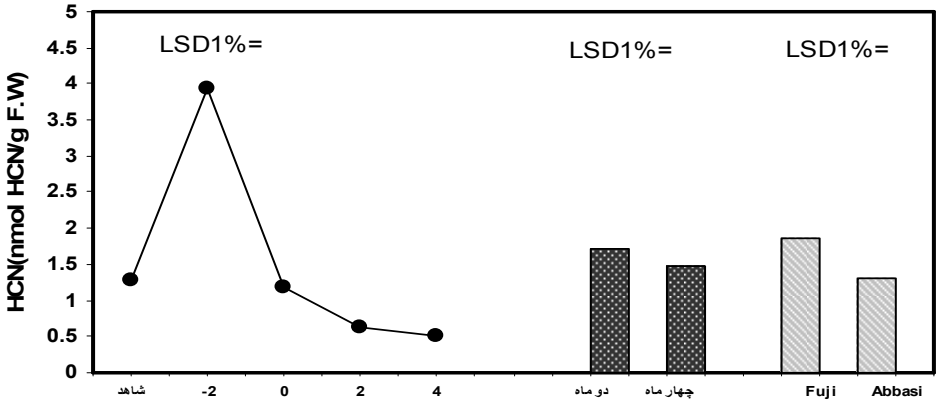
منبع تغییرات	سیانید		اتیلن		Beta-CAS	
	df	MS	df	MS	df	MS
Rep	۳	۰/۹۳۴**	۳	۰/۰۹۶^{ns}	۳	۱۴۷/۳۰۸^{ns}
دمای انبار	۴	۲۰/۹۶۸**	۴	۸/۹۶۹**	۴	۳۷۸۸۰/۵۱۲**
رقم	۱	۱/۹۷۳**	۱	۹/۶۹۰**	۱	۱۹۱۵۱۴/۹۸۲**
رقم × دمای انبار	۴	۰/۶۵۲*	۴	۰/۸۱۷**	۴	۴۷۶۷/۴۵۳**
خطا	۱۸	۰/۱۵۹	۲۵	۰/۱۶۹	۲۶	۲۸۲/۶۰۴
زمان نگهداری در انبار	۱	۰/۸۶۴**	۱	۰/۱۹۴^{ns}	۱	۱۳۶۵/۵۲۵*
دمای انبار × زمان نگهداری در انبار	۴	۰/۰۸۸^{ns}	۴	۰/۱۰۴^{ns}	۴	۲۳۳۲/۶۲۶**
رقم × زمان نگهداری در انبار	۱	۰/۱۵۰^{ns}	۱	۰/۰۶۷^{ns}	۱	۹۱۹/۸۱۱^{ns}
رقم × دمای انبار × زمان نگهداری در انبار	۴	۰/۰۴۰^{ns}	۴	۰/۱۴۱^{ns}	۴	۴۷۴/۳۴۰^{ns}
خطا	۲۰	۰/۰۷۱	۲۸	۰/۱۰۱	۲۵	۳۱۲/۶۲۲
کل	۶۰		۷۵		۷۳	
CV		۱۷/۵		۱۲/۹		۹/۲

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

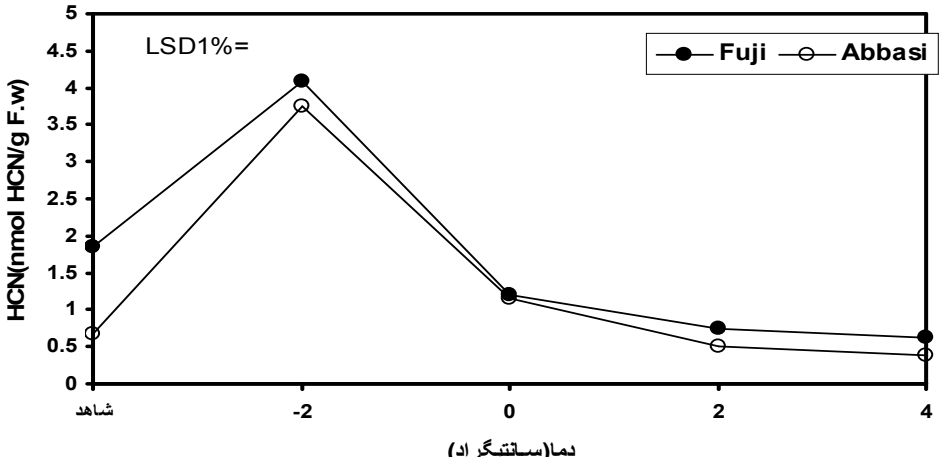
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

Archive of SID

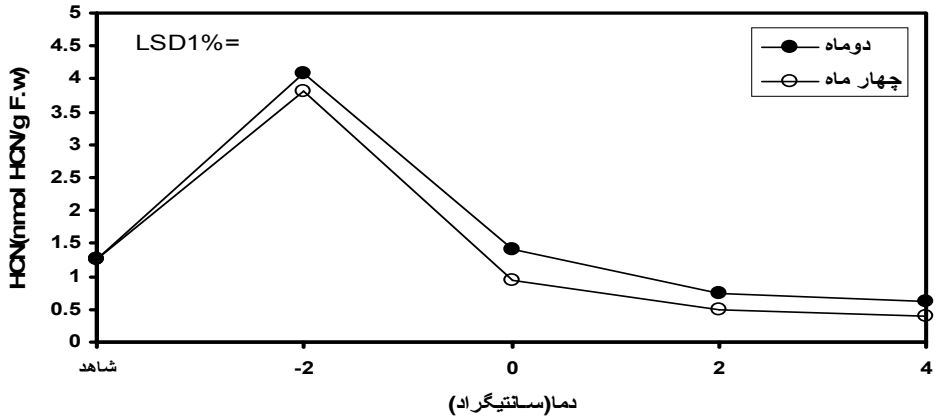
www.SID.ir



شکل ۱- نمایش اثر ساده دما، رقم و زمان بر سیانید در دوره انبارداری

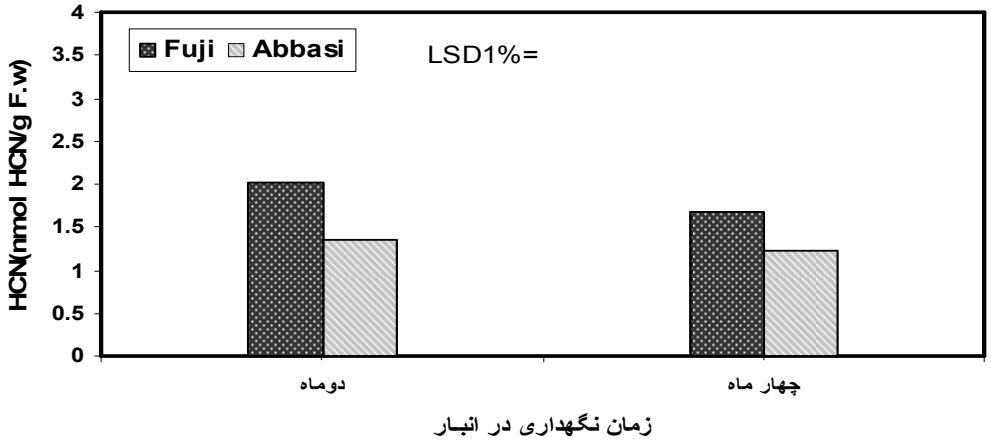


شکل ۲- اثر متقابل دما و رقم بر سیانید در دوره انبارداری

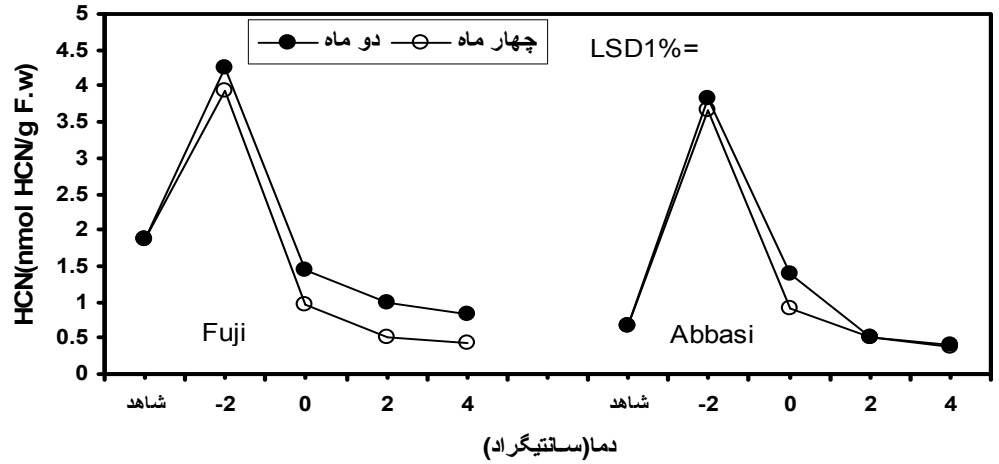


شکل ۳- اثر متقابل دما و زمان بر سیانید در دوره انبارداری

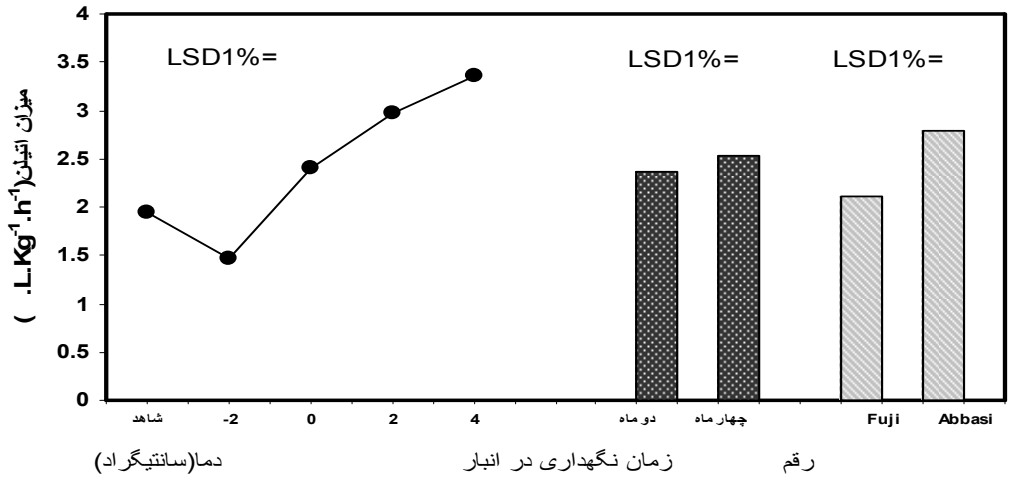
www.SID.ir



شکل ٤- اثر متقابل رقم و زمان بر سیانید در دوره انبارداری

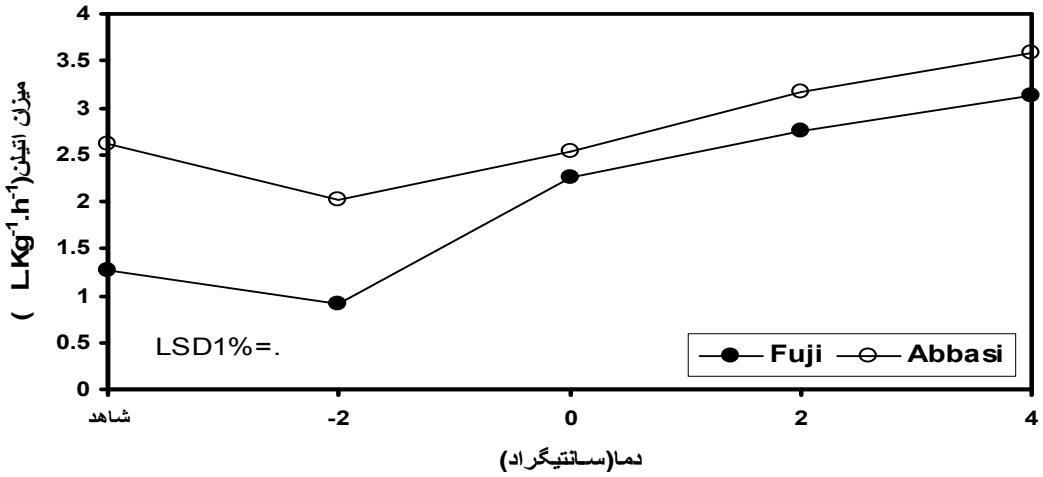


شکل ٥- اثر سه گانه دما، رقم و زمان بر سیانید در دوره انبارداری

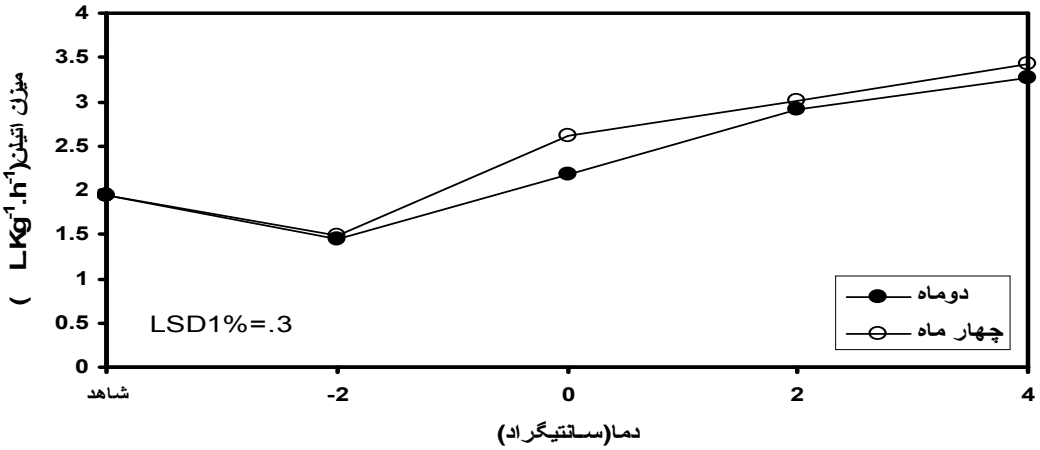


شکل ٦- نمایش اثر ساده دما، رقم و زمان بر اتیلن در دوره انبارداری

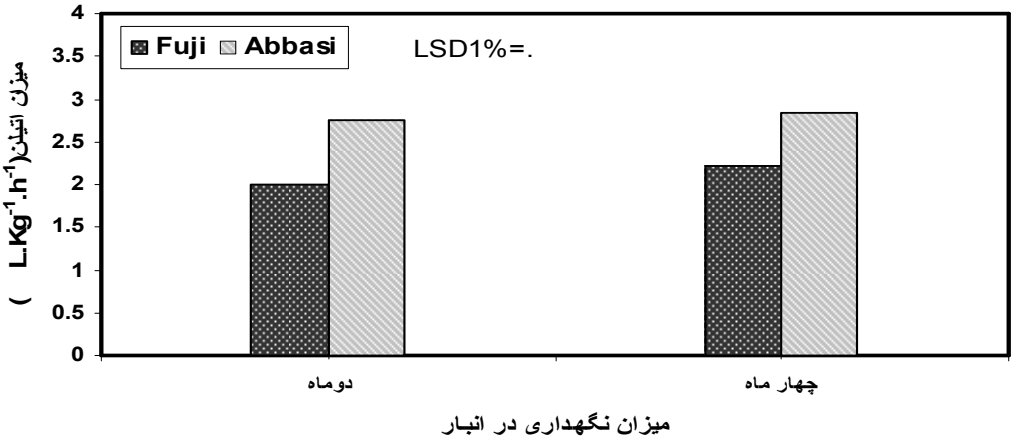
www.SID.ir



شکل ۷- اثر متقابل دما و رقم بر اتیلن در دوره انبارداری

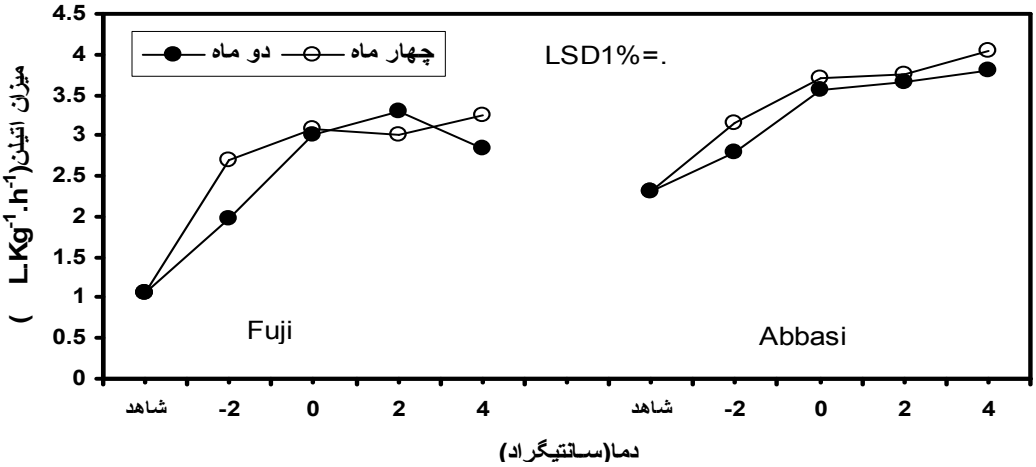


شکل ۸- اثر متقابل دما و زمان بر اتیلن در دوره انبارداری

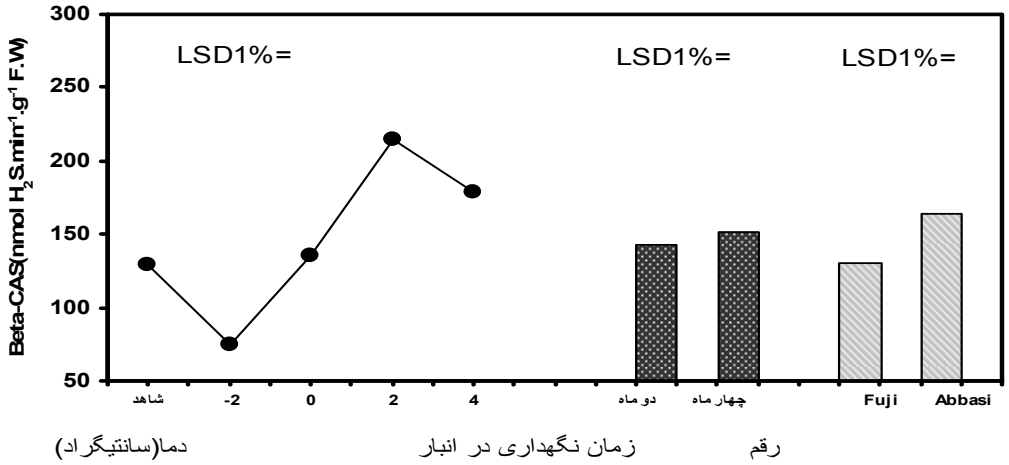


شکل ۹- اثر متقابل زمان و رقم بر اتیلن در دوره انبارداری

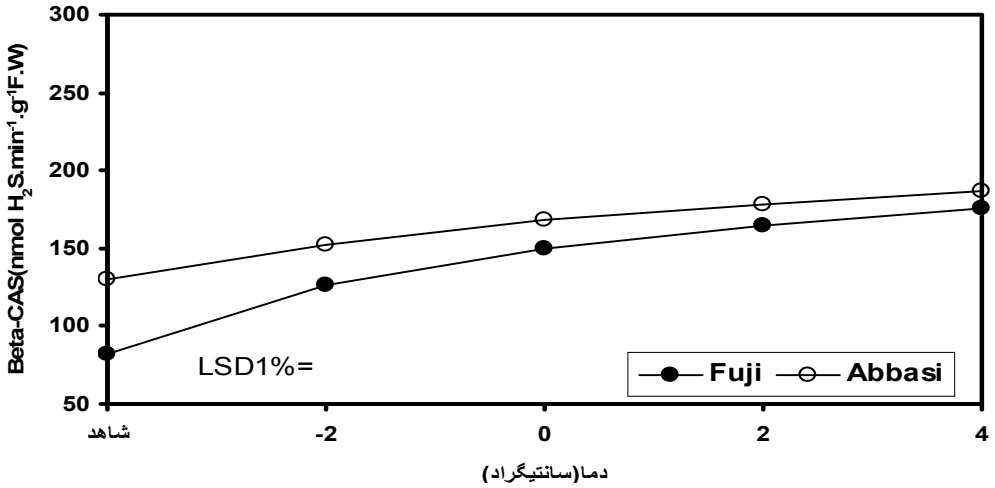
www.SID.ir



شکل ۱۰- اثر سه گانه دما، رقم و زمان بر اتیلن در دوره انبارداری

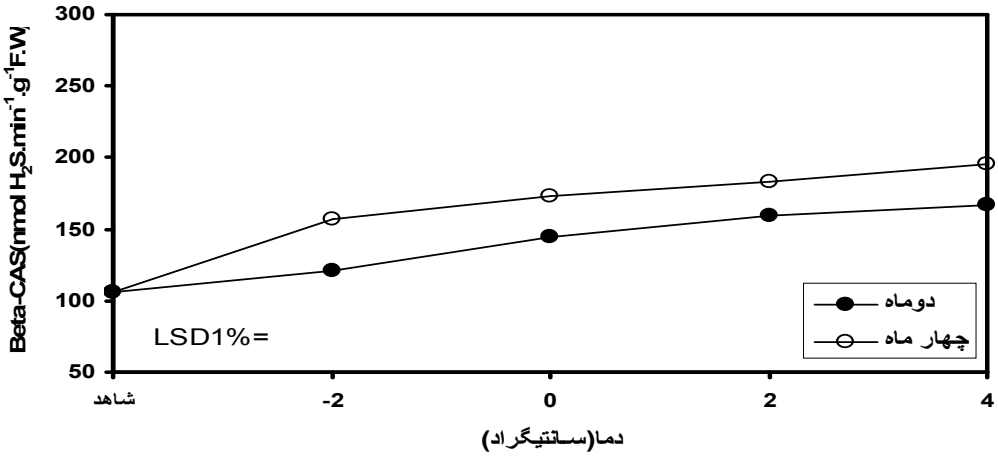


شکل ۱۱- نمایش اثر ساده دما، رقم و زمان بر آنزیم Beta-CAS

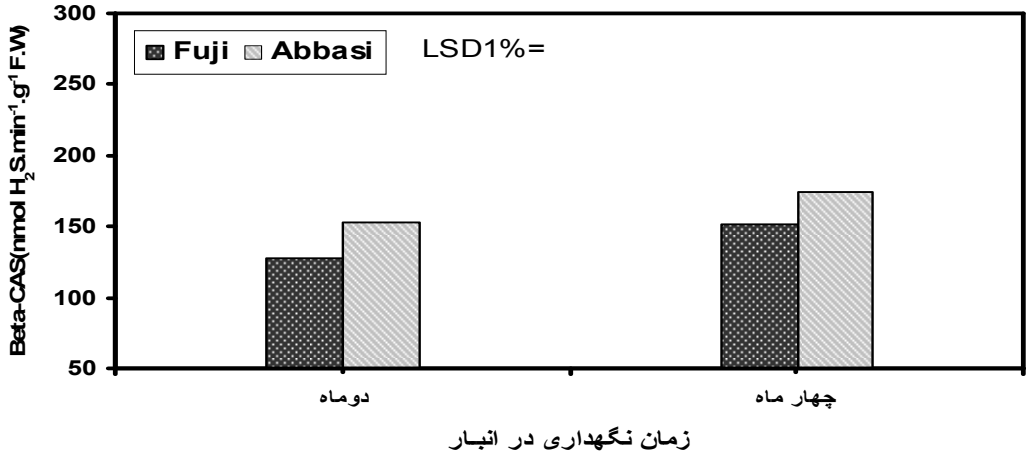


شکل ۱۲- اثر متقابل دما و رقم بر آنزیم Beta-CAS در دوره انبارداری

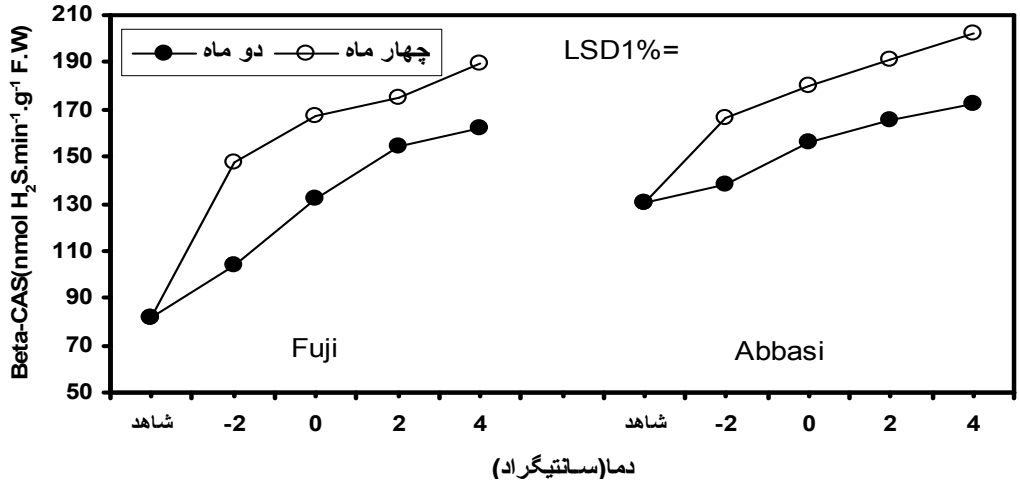
www.SID.ir



شکل ۱۳- اثر متقابل دما و زمان بر آنزیم Beta-CAS در دوره انبارداری



شکل ١٤- اثر متقابل زمان و رقم بر آنزیم Beta-CAS در دوره انبارداری



شکل ۱۵- اثر سه گانه دما، زمان و رقم بر آنزیم Beta-CAS در دوره انبارداری

www.SID.ir

References

Akopyan, T.A., Braunstein, A.E., Goryachenkova, E.V., 1975. Betacyanaolanine synthase: Purifocation and characterization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72, 1617-1621.

Blankenship, S.M., Parker, M., Unrath, C.R., 1997. Use of maturity indices for predicting post storage firmness of 'Fuji' apples. HortScience. 32, 909-910.

Blumenthalas, S.G., 1968. Cyanide metabolism in higher plant. III. The Biosynthesis of Cyanoalanine. J. Biochem. 243, 5302-5507.

Castric, P.A., Farnden, K.J.F., Conn, E.E., 1972. Cyanid metabolism in higher plants. Biochem. and Biophysic. 152, 62-69.

Chew, M.Y., Boey, C.G., 1972. Rhodanese of tapiocaleaf. Phytochem. 11, 167-169.

Dunnill, P., Fowden, L., 1965. Enzymatic formation of β-cyanoalanine from cyanide by Escherichia coli extracts. Nature 208, 1206-1207.

Evesyrkin, W.B., 1985. Suncellular and development distribution of β-etacyanoalanin synthase in barley leaves. Plant Physiol. 78, 285-290.

Ezzi, M.I., Lynch, J.M., 2002. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp.* Enzyme and Microbiol Tech. 31, 1042-1047.

Fowden, L., Bell, E.A., 1965. Cyamide metabolism by seedling. Nature 208, 110-112.

Goudey, J.S., Tittle, F.L., Spencer, M.S., 1989. A role of ethylene in the metabolism of cyanide by higher plants. Plant Physiol. 89, 1306-1310.

Hasegawa, R., Maruyama, A., Nakaya, M., Tsuda, S., Esashi, Y., 1995. The presence of two types of beta-cyanoalanine synthase in germinating seeds and their responses to ethylene. Physiol. Plantarum. 93, 713-718.

Kende, H., 1993. Ethylene biostynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 283-307.

Archive of SID

www.SID.ir

Larsen, M., Trapp, S., Pirandello, A., 2004. Removal of cyanide by woody plants. Chemosphere. 54, 325-333.

Liang, W.S., Li, D.B., 2001. The two beta-cyanoalanine synthase isozymes of tobacco showed different antioxidative abilities. Plant Sic. 161, 1171-1177.

Liang, W.S., 2003. Drought stress increase both cyanogenesis and beta-cyanoalanine synthase activity in tobacco. Plant Sci. 165, 1109-1115.

Maruyama, A., Saito, K., Ishizawa, K., 2001. Beta-cyanoalanine synthase and cysteine synthase from potato: Molecular cloning biochemical charactization, and spatial and hormonal regulation. Plant Moleculat Biol. 46, 746-760.

Meyer, S.D., Ahmad, S., 1991. Link between L-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity of insects. Biochem. Biophs. Acta. 1075, 195-197.

Mizutani, F., Yamanaka, Y., Amano, S., 1992. Effect of ethylene and hydrogen cyanide on betacyanoalanine synthase activity in Satsuma mandarin '*Citris unsho*' fruit. Plant Sci. 49, 223-231.

Ogunlabi, O.O., Agboola, F.K., 2007. A soluble beta-cyano alanine synthase from the gut of the variegated grasshopper *Zonocerus variegates* L. Insect Biochem. and Molec. Biol. 37, 72-79.

Wurtele, E.S., Nikolau, B.J., Conn, E.E., 1985. Subcellular and development distribution of beta cyanoalanin synthase in barley leaves. Plant Physiol. 78, 285-290.

Yip, W.K., Yang, S.F., 1988. Cyanid metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. Plant Physiol. 88, 473-476.

Yip, W.K., Dong, J.G., Yang, S.F., 1991. Purification and characterization of ACC synthesis from apple fruits. Plant Physiol. 95, 251-257.

Yip, W.K., Yang, S.F., 1998. Ethylene biosynthesis in relation to cyanide metabolism. Bot. Bull.Acad.Sin.39.

Archive of SID

www.SID.ir