نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم
جلد۱۱، شماره ۱
تاریخ چاپ: پاییز ۱۳۹۱

فعالیت آنزیمی وبیان ژن‌های پراکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز در ریشهٔ گیاه کتان[1] در تنش آلومینیم

مریم دهجی‌پور، *فائزه قناتی، مهرداد بهمنش، مظفر شریفی:
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

چکیده

سمیت آلومینیم یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کنندهٔ رشد و نمو گیاهان در خاک‌های اسیدی (pH کمتر از ۵/۵) است که خطر آن به‌علت عملیات زراعی و باران‌های اسیدی رو به افزایش است. مکانیسم سمیت آلومینیم هنوز به‌روشنی مشخص نشده است. ممانعت رشد ریشه، اولین پاسخ گیاه به سمیت آلومینیم است و این ممانعت رشد از طریق توقف یا کاهش طویل شدن سلول‌های ریشه، احتمالاً با افزایش ترکیبات فنلی دیواره، اعمال می‌گردد. در این پژوهش تأثیر آلومینیم بر فعالیت و بیان آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز ترکیبات فنلی مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز و پراکسیداز بررسی شد. بدین منظور گیاهان کتان رشد یافته در محیط هوگلند برای دو هفته در معرض تیمار آلومینیم با غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار (به‌صورت $AlCl_3.6\ H_2O$) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار آلومینیم سبب کاهش رشد ریشه و افزایش میزان فنل‌های متصل به دیواره در مقایسه با گیاهان شاهد می‌گردد. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌ویژه در بخش یونی و کووالانی به‌خوبی کاهش رشد ریشه را توجیه می‌کند. افزایش فعالیت و بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز و نیز افزایش میزان لیگنین تنها در بیش‌ترین غلظت آلومینیم مشاهده گردید. بررسی بیان دو ایزوزیم پراکسیداز نشان داد که فلکسپر[2] ۳ در مقایسه با فلکسپر ۱ در سمیت آلومینیم در ریشه نقش دارد.

مقدمه

آلومینیم (Al) فراوان‌ترین فلز پوستهٔ زمین و سومین عنصر فراوان موجود در آن است، ولی برای رشد گیاه ضروری نیست. سمیت آلومینیم فاکتور عمدهٔ محدود کنندهٔ تولید محصول در خاک‌های اسیدی است که حدود ۴۰ درصد زمین‌های زراعی دنیا را تشکیل می‌دهند [۲۰]. اولین نشانهٔ سمیت Al، مهار رشد ریشه است که نتیجهٔ آن کاهش جذب مواد غذایی، آب و کاهش رشد گیاه خواهد بود [۷]، [۱۱]. همچنین تأثیر Al در ساختار و عمل‌کرد دیوارهٔ سلولی، غشای سیتوپلاسمی و اسکلت سلولی، تأثیر بر سنتز لیگنین و ترکیبات فنلی باند شده به دیواره، دپلاریزه کردن غشای پلاسمایی و در نتیجه افزایش نفوذپذیری غشا تحت تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، هومئوستازی کلسیم و متابولیسم فسفر به اثبات رسیده است [۹]، [۱۴].

واژه‌های کلیدی: آلومینیم، پراکسیداز، ترکیبات فنلی، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، کتان، لیگنین
دریافت ۸۹/۱۱/۲۳ پذیرش۹۰/۵/۲۵
*نویسنده مسئول ghangia@modares.ac.ir

۱. *Linum usitatissimum* L. ۲. Flaxper

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

بررسی‌ها نشان داده است که ممانعت رشد طولی ریشه به‌وسیلهٔ آلومینیم از طریق توقف طویل شدن سلول اعمال می‌گردد. دیوارهٔ سلولی اولین و مهم‌ترین محل تجمع آلومینیم است. یکی از مکانیسم‌های مهم سمیت آلومینیم از دست دادن انعطاف‌پذیری دیواره و سخت شدن آن در سلول‌های در حال طویل شدن در ریشه است [۱۵]. سخت شدن دیوارهٔ سلولی فرایند نسبتاً پیچیده‌ای است که با دخالت آنزیم‌ها و مواد حد واسط متعدد انجام می‌شود. در بین این آنزیم‌ها، پراکسیدازهای متصل شده به دیوارهٔ سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. این آنزیم‌ها در تشکیل اتصالات کووالانی بین کربوهیدرات‌ها و پلیمرهای فنلی و همچنین اتصال بین اکستنسین و پلی ساکاریدهای استری شده با فرولیک اسید و پلیمریزاسیون منومرهای فنلی و تشکیل لیگنین دخالت دارند [۸]. همچنین ارتباط نزدیکی بین فعالیت پراکسیدازهای آپوپلاستی و سنتز لیگنین در ریشه‌های تحت تنش آلومینیم وجود دارد [۱۳]، [۱۸]، [۲۲]. تا کنون، چهار توالی برای ژن پراکسیداز در گیاه کتان گزارش شده است. پاینل[۱] و همکاران (۲۰۰۹) با مشاهدهٔ افزایش بیان دو ایزوفرم فلکسپر ۱ و فلکسپر ۳ در تنش فلز کادمیوم، نقش این دو ایزوفرم را در اتصالات عرضی هموگالاکتورونان‌ها در دیواره‌های سلولی تحت تنش شرح دادند [۲۰]. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز که در پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف فعال می‌شود، آنزیمی کلیدی در بیوسنتز ترکیبات فنلی است که پیش‌سازهای لیگنین و سوبسترای لازم برای آنزیم پراکسیداز را فراهم می‌کند [۹]. گزارش‌های موجود نشان می‌دهد که بیان بیش از ۴۵ ژن توسط آلومینیم تنظیم می‌شود که ژن‌های دخیل در تقسیم و طویل شدن سلولی و تنش اکسیداتیو مهم‌ترین آن‌ها هستند [۱۶]. بنا بر این، آگاهی در زمینهٔ بیان ژن‌های القاشده توسط آلومینیم در درک مکانیسم سمیت آلومینیم اهمیت زیادی دارد. ریشه به‌عنوان اولین بخش پذیرندهٔ آلومینیم، مهم‌ترین محل دریافت سیگنال تنش آلومینیم است که رشد اندام هوایی و کل گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ از این رو در این تحقیق بررسی‌های لازم تنها روی اندام ریشه صورت گرفت. هدف از پژوهش حاضر بررسی تغییرات در فعالیت و بیان ژن رمزکنندهٔ آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ارتباط آن با ممانعت رشد طولی ایجاد شده به‌وسیلهٔ آلومینیم در ریشهٔ گیاه کتان بود. در سال‌های اخیر به این گیاه علاوه بر تولید فیبر و روغن، به‌عنوان مدل در تحقیقات پایه و کاربردی در پژوهش‌های سلول گیاهی و بیوتکنولوژی توجه شده است [۱۷].

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایش

جوانه‌زنی بذرهای گیاه کتان بعد از ضدعفونی کردن سطحی آن‌ها با سدیم هیپوکلریت (حاوی۵ درصد کلرین فعال) و اتانول ۷۰ درصد، در تاریکی و دمای ۲۲°C انجام گردید. دانه‌رست‌های با طول یکسان، انتخاب و به محلول هوگلند تغییریافته شامل (برحسب میلی‌مولار): $Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$، ۲/۵؛ KNO_3، ۲/۵؛ $MgSO_4 . 7H_2O$، ۰/۱؛

۱. Paynel

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

KH_2PO_4، ۰/۵؛ Fe-EDTA، ۰/۰۳۲؛ H_3BO_3، ۰/۰۴۵؛ $MnCl_2.4H_2O$، ۰/۰۰۹۱؛ $ZnCl_2$، ۰/۰۰۰۷۶؛ $CuCl_2.2H_2O$، ۰/۰۰۰۳۱؛ $NaMoO_4.2H_2O$، ۰/۰۰۰۲۱، با pH=۶ منتقل و پس از دو هفته رشد در این محیط در اتاقک‌های رشد با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، درجه حرارت ۲۲°C، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و شدت نور $107 \mu mol s^{-1} m^{-2}$ با غلظت‌های مختلف آلومینیم (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در pH=۴/۵ تیمار شدند. سپس نمونه‌ها برای بررسی‌های بیوشیمیایی و ملکولی در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۹۶ ساعت پس از تیمار آلومینیم برداشت شدند. با توجه به منابعی که در مقدمه ذکر گردید، ریشه، اولین بخش پذیرندهٔ آلومینیم و مهم‌ترین اندام گیاه در پاسخ به تنش آلومینیم است که رشد اندام‌هوایی و رشد کل گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌همین دلیل مطالعات بیوشیمیایی و ملکولی تنها روی ریشه انجام شد. به‌این منظور، ریشه‌های گیاهان تیمار شده بعد از شست‌شو با آب‌مقطر جداسازی و در نیتروژن مایع منجمد و منهای ۸۰°C برای بررسی‌های بعدی به فریزر منتقل شدند. آزمایش به‌صورت طرح کاملا" تصادفی با سه تکرار اجرا گردید.

پژوهش‌های بیوشیمیایی

سنجش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز(PAL) و پراکسیداز (POD) و نیز اندازه‌گیری محتوای لیگنین و فنل‌های متصل به دیواره با روش‌های رایج انجام گرفت [۸]. آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز به‌عنوان آنزیمی کلیدی در متابولیسم ترکیبات فنلی، پیش‌سازهای لازم برای آنزیم پراکسیداز را فراهم می‌کند. بنا بر این فعالیت آن ۶ و ۲۴ ساعت پس از تیمار و فعالیت پراکسیداز ۲۴ و ۹۶ ساعت پس از تیمار آلومینیم اندازه‌گیری شد.

مقدار ۰/۲ گرم بافت ریشه در بافرپتاسیم‌بورات ۰/۱ مولار، pH =۸/۸ حاوی β- مرکاپتواتانول ۲ میلی‌مولار روی یخ، ساییده شد. بعد از سانتریفیوژ نمودن با سرعت g ۱۶۰۰۰ به‌مدت ده دقیقه در دمای ۴ °C، محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. مخلوط واکنش، شامل L- فنیل‌آلانین ۴ mM به‌عنوان سوبسترا، بافرپتاسیم‌بورات (بدون مرکاپتواتانول) و عصارهٔ آنزیمی، به‌مدت یک ساعت در حمام آب‌گرم با دمای ۳۷°C قرار داده شد. واکنش آنزیمی با افزودن کلریدریک اسید ۵ مولار متوقف گردید و سینامیک اسید موجود در نمونه‌ها (فراوردهٔ آنزیم PAL)، سه بار با اتیل‌استات استخراج و توسط جریانی از هوای تصفیه‌شده خشک گردید. میزان سینامیک‌اسید بعد از حل نمودن نمونه‌های خشک شده در متانول مطلق با استفاده از دستگاه (کنوئر[۱]، آلمان) HPLC مجهز به ستـون ODS -80Ts (۲۵۰mm×۴/۶) انجام گرفت. از شیب خطی ۸۰-۳۰ درصد متانول حاوی استیک‌اسید ۰/۱ درصد با "جریان[۲]" ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان فازمتحرک استفاده شد و میزان سینامیک اسید تولیدشده در یک ساعت در طول موج ۲۷۳nm سنجیده شد. فعالیت آنزیم برحسب میزان سینامیک اسید به‌ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۸]. میزان پروتئین به روش برادفورد با استفاده از BSA به‌عنوان استاندارد محاسبه گردید [۴].

۱. KNAUER ۲. Flow rate

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

آنزیم پراکسیداز در سه بخش محلول، یونی و کووالانی جداسازی و فعالیت آن اندازه‌گیری شد. ۰/۳ گرم بافت ریشه در بافرتریس‌مالئات ۵۰mM ،pH = ۶ در دمای ۴ °C ساییده و با سرعت ۱۲۰۰۰×g به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی به‌منظور سنجش فعالیت بخش محلول پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی این بخش با افزودن مقادیر مناسبی از عصارهٔ آنزیمی، بافرفسفات‌پتاسیم ۶۰mM، pH=۶/۱، گایاکول ۲۸mM به‌عنوان دهندهٔ الکترون و پراکسیدهیدروژن ۵mM در طول موج ۴۷۰nm به‌کمک اسپکتروفتومتر (سینترا[۱]، استرالیا، GBC) اندازه‌گیری شد. رسوب مرحلهٔ قبل با کلریدکلسیم ۰/۲M به‌مدت دو ساعت در درجه حرارت محیط همراه با همزدن پیوسته نگه‌داری و سپس با سرعت ۱۸۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت بخش یونی پراکسیداز و رسوب حاصل با افزودن بافر به‌طور مستقیم برای سنجش فعالیت بخش کووالانی پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی بخش یونی و کووالانی با سیرینگالدازین ۴۱/۶nM، بافرتریس‌مالئات ، پراکسیدهیدروژن ۱۶ mM و مقادیر مناسب عصارهٔ آنزیمی یا دیوارهٔ سلولی در طول موج ۵۳۰nm اندازه‌گیری شد. فعالیت بخش محلول و یونی به‌صورت میزان افزایش جذب در یک دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد. میزان فعالیت بخش کووالانی به‌صورت افزایش جذب به‌ازای وزن خشک دیواره بیان شد.

به‌منظور استخراج دیوارهٔ سلولی نمونه‌های ریشه بعد از ساییدن در آب‌مقطر با سرعت ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل به‌طور متوالی با اتانول دوبار(دو دقیقه و یک ساعت)، مخلوط $CHCl_3$–MeOH (v/v ۱:۲) به‌مدت یک شب و استون به‌مدت یک ساعت شسته و سپس خشک شد. دیوارهٔ سلولی حاصل برای سنجش لیگنین و فنل‌های متصل به دیواره استفاده گردید [۸]. محتوای لیگنین دیوارهٔ سلولی با روش استیل بروماید اندازه‌گیری شد. بدین منظور به ۶ میلی‌گرم پودر نرم‌شدهٔ دیواره، ۲/۵ میلی‌لیترمخلوط استیل‌بروماید در اسیداستیک (w/w ۲۵%) حاوی۰/۱ درصد پرکلریک‌اسید ۷۰% افزوده و در حمام آب‌گرم با دمای ۷۰°C به‌مدت 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 میلی‌لیتر شامل پنج میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم دو نرمال منتقل و با اسیداستیک به حجم رسانده شد. میزان لیگنین با اندازه‌گیری جذب در ۲۸۰nm و با استفاده ازضریب جذب ویژه $g\ L^{-1}cm^{-1}$ ۲۰ محاسبه گردید [۱۲].

به‌منظور استخراج فنل‌های متصل به دیواره، به ۳۰mg دیوارهٔ سلولی استخراج‌شده، اگزالات‌آمونیوم ۲۰mM افزوده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۷۰°C قرار داده شد. پس از صاف کردن محلول رویی این عمل دو بار دیگر تکرار و هر بار محلول رویی به محلول قبلی افزوده شد. به رسوب باقی‌مانده NaOH، ۰/۱M افزوده شد و پس از قرار گرفتن به‌مدت یک شب تحت گاز N2، محلول رویی حاصل استخراج بـه محلول‌های قبلی افزوده شـد. ترکیبات فنلـی سه بار با اتیل‌استات استخراج و تـوسط جریانـی از هـوا

۱. Cintra

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

خشک شدند. رسوب حاصل در متانول مطلق حل شد و میزان فنل‌های متصل به دیواره با دستگاه HPLC با همان شرایطی که برای آنزیم PAL ذکر شد، در طول موج ۲۸۰nM اندازه‌گیری شد [۸].

برای اندازه‌گیری میزان آلومینیم نمونه‌های ریشه پس از شست‌شوی دقیق با آب معمولی سه بار در آب‌مقطر آب‌کشی و پس از تعیین وزن در دمای ۳۵۰°C و ۵۵۰°C هر کدام به‌مدت دو ساعت قرار گرفتند. پس از سرد شدن یک میلی‌لیتراز مخلوط ۱:۱ آب و کلریدریک‌اسید غلیظ (۱۲ N) به خاکستر حاصل افزوده و سپس در حمام شن در دمای ۱۱۰°C خشک شد. رسوب حاصل پس از حل کردن در اسیدکلریدریک ۱ نرمال برای تعیین محتوای آلومینیم به دستگاه جذب اتمی (آنالیتیک‌ژنا[۱]، آلمان، کانتر[۲] AA700)، تزریق شد [۲].

بررسی بیان ژن‌های PAL و POD با RT-PCR نیمه کمی[۳]

RNA کل با استفاده از آرنیزی پلانت مینی کیت[۴] و با استفاده از روش پیشنهادی شرکت سازندهٔ (کویژن ساینس، آلمان MD, USA)[۵] استخراج گردید. پس از اندازه‌گیری غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومترنانودراپ، cDNA با استفاده از پریم اسکریپ آرتی رجنت کیت[۶] ساخت شرکت تاکارا[۷] ژاپن سنتز گردید. cDNA سنتز شده با غلظت ۸ng/µL جهت واکنش‌های PCR استفاده شد. پرایمرهای ژن‌های مدنظر براساس جدول ۱ تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند [۱۹]. بهینه‌سازی واکنش‌های PCR جهت ژن‌های مدنظر با استفاده از گرادیان دمایی صورت گرفت و دمای بهینه جهت اتصال آغازگرها در هر سه ژن ۶۰°C تعیین شد. شرایط PCR ژن‌ها به‌صورت واسرشت‌سازی اولیه در۹۵°C به‌مدت دو دقیقه انجام شد که با ۳۰ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، سنتز به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه در دمای ۷۲°C و سنتز نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C توسط دستگاه ترمال سایکلر[۷] ادامه یافت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۳ درصد تفکیک و با استفاده از اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی شدند. برای کمی نمودن داده‌های حاصل از بیان ژن، نرم‌افزار (ایمیج گایج[۸]) استفاده شد.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در واکنش‌های RT-PCR

ژن	Accession number GeneBank	ترادف آغازگر		اندازهٔ قطعهٔ تکثیر شده (جفت باز)	منبع
LuPAL	AY837828	:Forward :Reverse	5' CATCAGATTTGAGATCTTGGAAGC 3' 5' GTTAGCAAACCAGCAATATAAGAG 3'	۱۳۲	Hano *et al*. (2006)
Flaxper1	L07554	:Forward :Reverse	5' TTGGATACAACCCCGACAAAA 3' 5' GGGCCCTTGTACCAGTCAAG 3'	۱۰۱	Paynel *et al*. (2009)
Flaxper3	U59284	:Forward :Reverse	5' TACTTCACCAATCTCCAGACC 3' 5' GCGAACCTGTTGACGAGCTC 3'	۱۸۵	Paynel *et al*. (2009)

۱. Analyticjena ۲. Contr ۳. Semi-quantitative ۴. RNeasy Plant Mini Kit
۵. Qiagen Science, Germantown, MD, USA ۶. Prime Script RT reagent Kit ۷. TaKaRa
۸. Mastercycler gradient, Eppendorf, Germany ۸. Image Gauge

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

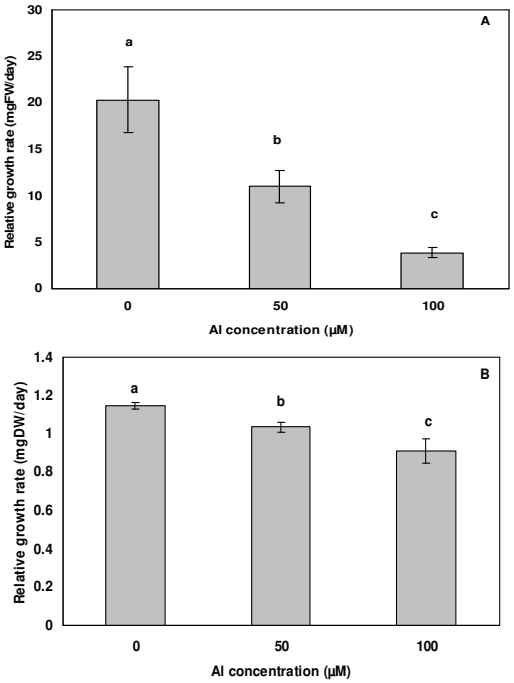
بررسی‌های آماری

طرح آزمایش و انجام تیمارها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. همهٔ آنالیزهای بیوشیمیایی در سه تکرار مستقل، هر یك با سه نمونه و آنالیزهای مولکولی در سه تکرار مستقل انجام شدند. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها، از بستهٔ نرم‌افزاری اکسل[۱] استفاده شد. همچنین برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه (آنوا[۲]) با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P \leq ۰/۰۵$ در بستهٔ نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۵ استفاده شد.

نتایج

تأثیر آلومینیم بر رشد

نتایج نشان داد که آلومینیم با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سبب کاهش رشد گیاه کتان (وزن تر) به‌ترتیب به‌میزان ۴۵/۹۰ و۸۰/۹۸ درصد نسبت به گیاهان کنترل می‌شود (شکل ۱A). کاهش وزن خشک گیاه در تیمار با آلومینیم به نسبت گیاه شاهد گرچه معنی‌دار بود اما به‌شدت کاهش در وزن تر نبود (شکل1B). بنا بر این نتیجه‌گیری می‌شود که تنش آلومینیم سبب افزایش بیوسنتز مواد خشکی نظیر لیگنین شده است.



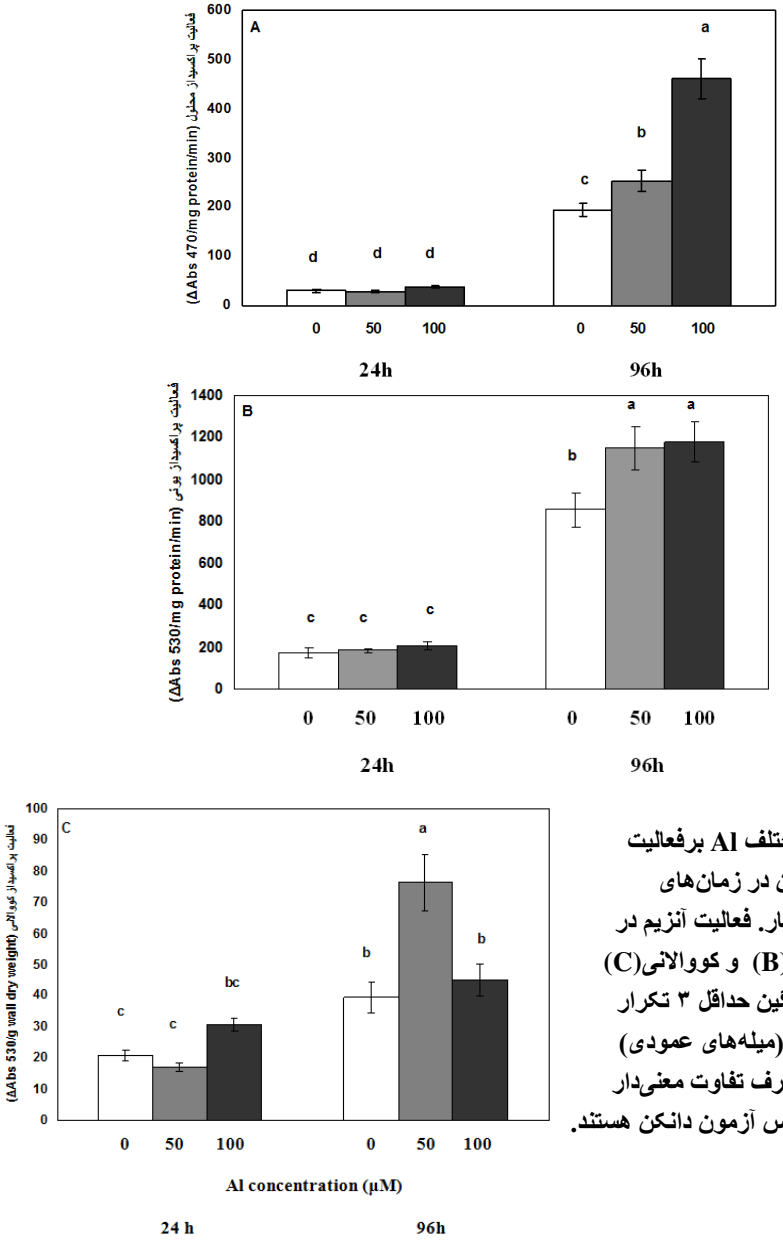
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف Al بر رشد برحسب وزن تر(A) و وزن خشک (B) گیاه کتان. داده‌ها میانگین حداقل ۵ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ≥ P بر اساس آزمون دانکن هستند.

۱. Excel ۲. ANOVA

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

تأثیر آلومینیم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

چنان‌که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش سن گیاه فعالیت هر سه بخش پراکسیداز افزایش یافت. در تیمار۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و شاهد دیده نشد. فعالیت پراکسیداز در تیمار ۹۶ ساعت تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان داد. بیش‌ترین فعالیت بخش محلول در تیمار ۱۰۰ میکرومولارآلومینیم دیده شد، ولی تفاوت معنی‌داری در بخش یونی بین غلظت‌های مختلف آلومینیم به‌کار رفته مشاهده نگردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، فعالیت بخش کووالانی در تیمار۵۰ میکرومولارآلومینیم افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار ۱۰۰ میکرومولار و شاهد نشان داد.



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف Al برفعالیت پراکسیداز در ریشهٔ گیاه کتان در زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت پس از تیمار. فعالیت آنزیم در سه بخش محلول(A)، یونی(B) و کووالانی(C) اندازه‌گیری شد. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح P ≤ ۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن هستند.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

تأثیر آلومینیم بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL در زمان ۶ و ۲۴ ساعت پس از تیمار با آلومینیم، نسبت به شاهد افزایش نشان داد و این افزایش در تیمار ۵۰ میکرومولار در زمان ۶ ساعت و در تیمار ۱۰۰ میکرومولارآلومینیم در ۲۴ ساعت معنی‌دار است (جدول ۲).

جدول۲. تغییرات فعالیت آنزیم PAL در ریشهٔ گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف Al

PAL Activity (µg CA/mg protein/h)		
غلظت آلومینیم (میکرومولار)	زمان (ساعت)	
	٦	٢٤
۰	٥٠٥/٤٣ ±٤٩/٢٢^{c}	٥٧٦/٨٥ ± ٣٧/٤٣^{c}
٥٠	٨٢٣/٣٦ ± ٦٩/٣٦^{b}	٤١٣/٧٤ ± ٣٤/٠٥^{c}
١٠٠	٥٦٣/٠٩ ± ٢٦/٧٠^{bc}	١٩٧٢/٩٩ ± ٩١/٨٦^{a}

داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریک‌سان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن است.

تأثیر آلومینیم بر تجمع لیگنین و میزان فنل‌های متصل به دیواره

نتایج حاصل از تعیین لیگنین دیواره نشان داد که آلومینیم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، لیگنین دیواره را نسبت به شاهد ۱/۲۵ برابر افزایش می‌دهد. درصورتی‌که تفاوتی بین میزان لیگنین در تیمار۵۰ میکرومولارآلومینیم و شاهد دیده نشد. همچنین میزان فنل‌های متصل به دیواره در ریشهٔ گیاهان تیمار شده با آلومینیم نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد(جدول ۳).

جدول۳. تأثیر آلومینیم بر تجمع لیگنین و میزان فنل‌های متصل به دیواره

غلظت آلومینیم (میکرومولار)	محتوای لیگنین (% از دیوارهٔ سلولی)	فنل‌های متصل به دیواره (میکروگرم برگرم وزن خشک دیواره)
۰	١٢/١٦ ± ٠/٢٨^{b}	١٤/١٧ ± ١/٠٥^{c}
٥٠	١٢/١٤ ± ١/٥١^{b}	١٨/٤٦ ± ٠/٥٣^{b}
١٠٠	١٥/٨٢ ± ٢/١٦^{a}	٢١/٦٨ ± ١/٠٤^{a}

داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریک‌سان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن است.

میزان جذب آلومینیم ریشه

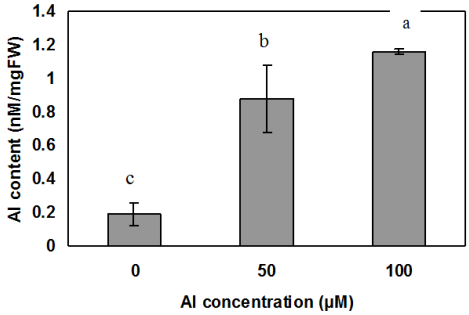
براساس نتایج به‌دست آمده از جذب اتمی، ارتباط مستقیمی بین مقدار آلومینیم جذب شده به‌وسیلهٔ ریشه با میزان آلومینیم موجود در محیط رشد گیاه در تیمارهای مختلف آلومینیم دیده می‌شود، چنان‌که با افزایش غلظت آلومینیم در محیط، مقدار جذب آن توسط گیاه نیز افزایش می‌یابد (شکل۳).

تأثیر آلومینیم بر بیان ژن پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

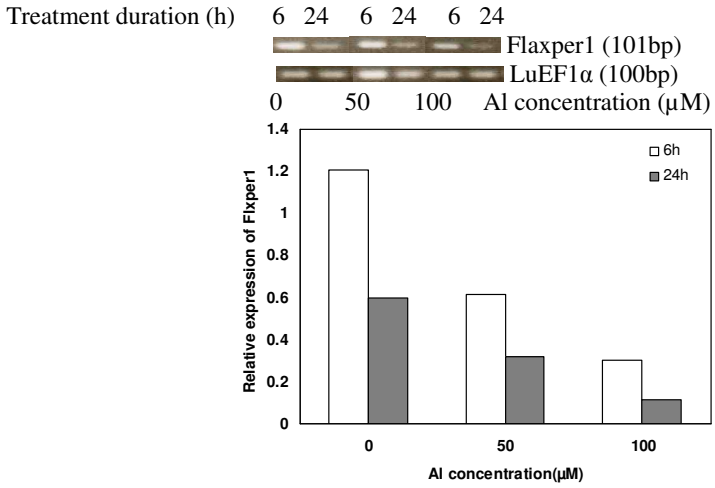
بیان ژن‌های دو ایزوزیم‌پراکسیداز (فلکسپر۱، فلکسپر۳) و ژن فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز LuPAL بررسی شد. در بررسی‌های اولیه نشان داد که ژن ACTIN (ACT-F2) به‌عنوان کنترل داخلی تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

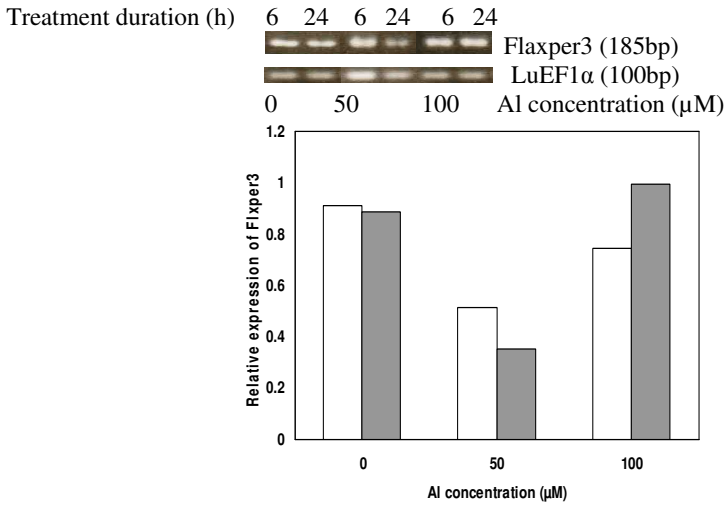
قرار گرفت. این امر در پژوهش‌های سایر محققان نیز نشان داده شده است [۱۰]؛ از این‌رو از ژن مربوط به فاکتور طویل شدن (LuEF1α) به‌عنوان ژن کنترل داخلی[۱] استفاده شد [۱۹].



شکل۳. مقدار جذب آلومینیم به‌وسیلهٔ‌ریشه‌ها درغلظت‌های مختلف آلومینیم. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح P ≤ ۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن است.

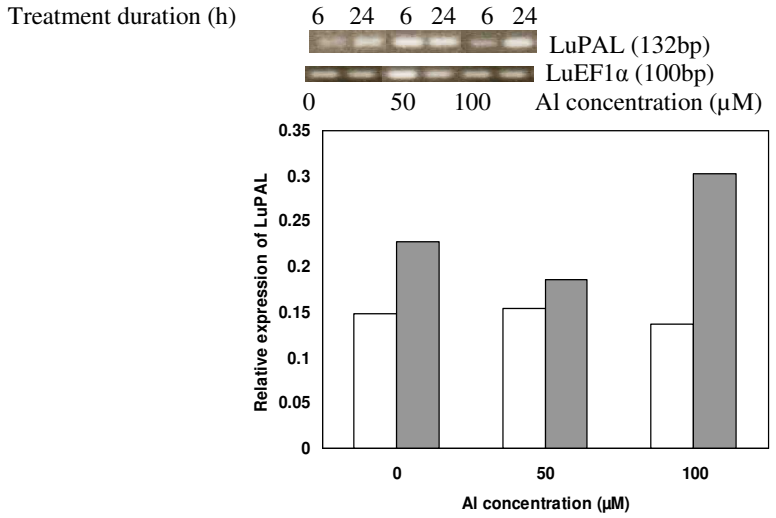


A



B

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]



C

شکل ۴. بررسی مقدار بیان نسبی ژن‌های A Flaxper1)، B Flaxper3) و C LuPAL) در ریشه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف آلومینیم در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از تیمار آلومینیم

LuEF1α به‌عنوان Housekeeping gene برای نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد (A-C). نمودار اندازه‌گیری مقدار کمی بیان ژن در تیمارهای مختلف آلومینیم با استفاده از نرم‌افزار Image Gauge. ستون سفید و خاکستری به ترتیب ۶ ساعت و۲۴ ساعت پس از تیمار آلومینیم را نشان می‌دهند (D-F).

چنان‌که در شکل ۴A-C مشاهده می‌شود بیان ایزوزیم فلکسپر ۱ با افزایش زمان کاهش یافته است. همچنین با افزایش غلظت آلومینیم در محیط، کاهش بیش‌تری در بیان آن مشاهده شده است. بیان ایزوزیم فلکسپر۳ در ریشه‌های شاهد با گذشت زمان تغییری نکرد؛ درصورتی‌که کاهش بیان آن در تیمار آلومینیم ۵۰ میکرومولار و افزایش بیان آن در تیمار آلومینیم ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. بیان ژن فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در زمان ۲۴ ساعت نسبت به ۶ ساعت افزایش نشان داد و بیش‌ترین افزایش بیان در تیمار آلومینیم ۱۰۰ میکرومولار دیده شد.

بحث

دیوارهٔ سلولی ریشه به‌دلیل تجمع بارهای منفی به‌عنوان اصلی‌ترین محل اتصال آلومینیم در نظر گرفته شده است. براساس پژوهش‌های انجام شده، اتصال آلومینیم به ماتریس‌پکتینی و دیگر ترکیبات دیوارهٔ سلولی، باعث تغییر خواص دیوارهٔ سلولی و عمل‌کردهای آن همچون کشش، تخلخل، فعالیت آنزیمی و نیز تغییرات سیمپلاستی از طریق ارتباط بین دیوارهٔ سلولی-غشای پلاسمایی-اسکلت سلولی می‌شود که می‌تواند کاهش یا ممانعت رشد ریشه را موجب گردد [۲۳]. پژوهش‌های بسیاری نشان داده است که اولین اثر آلومینیم در کاهش رشد ریشه از طریق توقف رشد طولی سلول تا توقف تقسیم سلولی اعمال می‌گردد [۵]. نتایج به‌دست آمده از بررسی رشد گیاه کتان در حضور آلومینیم، کاهش میزان رشد را متناسب با افزایش غلظت آن در محیط رشد گیاه نشان می‌دهد. از طرفی میزان کاهش رشد، با افزایش محتوای آلومینیم ریشه ارتباط مستقیمی دارد. بنا بر این اثر سمیت آلومینیم

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

بر رشد گیاه تا حدودی با محتوای آلومینیم ریشه مرتبط است. این نتیجه در تحقیقات قبلی در مورد سلول‌های جدا کشت گیاهی در تیمار با غلظت‌های مختلف آلومینیم نیز مشاهده شده است [۱]، [۲]. تحقیقات بسیاری نشان داده است که آلومینیم با اتصال عرضی به پکتین‌ها، از طریق افزایش سختی دیوارهٔ سلولی و تغییر ساختار و عمل غشای سیتوپلاسمی، کاهش جذب آب و سایر مواد غذایی سبب کاهش رشد گیاه می‌گردد [۱۱]. در پژوهش حاضر نیز آلومینیم با افزایش میزان لیگنین و فنل‌های متصل به دیوارهٔ سلول‌های ریشه کتان سبب سختی دیواره، کاهش رشد ریشه و در نهایت کاهش رشد کل گیاه گردید. لیگنین یک هتروپلیمرفنلی است که از پلیمریزه شدن اکسیداتیو سه منولیگنول p-کوماریل، کونیفریل و سیناپیل‌الکل با آنزیم پراکسیداز دیوارهٔ سلولی تشکیل می‌شود. منومرهای لیگنینی همچنین با اتصال به پکتین، اکستنسین و سایر پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ای سبب افزایش اتصالات عرضی، کاهش انعطاف‌پذیری و رشد دیواره می‌گردند [۵]. بیوسنتز این منومرها از پیش‌ماده فنیل‌آلانین و با فعالیت آنزیم PAL آغاز می‌شود. این آنزیم یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر متابولیسمی ترکیبات فنلی است که تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک‌اسید را کاتالیز می‌کند. این آنزیم با فراهم کردن پیش‌ماده‌های لازم برای فعالیت آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در سنتز لیگنین دارد. فعالیت PAL از عوامل مختلفی مانند تنش‌های محیطی تأثیر می‌پذیرد [۶]. محققان نشان داده‌اند که تنش آلومینیم به سنتز چندین پروتئین و ژن منجر می‌شود که یکی از آنها فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز است [۳]. با توجه به این‌که فعالیت آنزیم PAL در سطح رونویسی تنظیم می‌شود، انتظار می‌رود که افزایش در میزان mRNA آن به افزایش فعالیت آنزیم منجر گردد. از آن‌جا که فعالیت PAL خیلی سریع به‌وسیلهٔ فراوردهٔ آن یعنی سینامیک‌اسید مهار می‌شود، در پژوهش حاضر فعالیت و بیان این آنزیم در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از تیمار بررسی شد. در تیمار آلومینیم با غلظت ۵۰ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت، کاهش بیان ژن PAL با کاهش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نسبت به زمان ۶ ساعت متناسب بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده احتمال دارد کاهش فعالیت آنزیم PAL به‌دلیل افزایش میزان سینامیک‌اسید حاصل باشد که میزان تولید آن در تیمار آلومینیم با غلظت ۵۰ میکرومولار بیش‌تر از تیمار ۱۰۰ میکرومولار است. بنا بر این کاهش فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار زودتر مشاهده شد. افزایش فعالیت آنزیم PAL در تیمار آلومینیم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت با افزایش بیان این ژن همخوانی داشت. افزایش فعالیت آنزیم در تیمار آلومینیم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، افزایش محتوای لیگنین دیواره و میزان فنل‌های متصل به آن را موجب گردید که با افزایش سختی دیواره، سبب کاهش رشد ریشه نسبت به شاهد و تیمار آلومینیم با غلظت کم‌تر گردید.

برای بررسی نقش آلومینیم در تنظیم فعالیت آنزیم پراکسیداز، فعالیت آن در سه بخش محلول، یونی و کووالانی اندازه‌گیری شد. بخش محلول در پاسخ به تنش دخالت دارد در حالی‌که دو بخش یونی و کووالانی بیش‌تر در سنتز لیگنین و سوبرین نقش دارند. پراکسیدازها، گلیکوپروتئین‌هایی شامل هِم[۱] هستند که نقش اصلی

۱. Heme

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

آن‌ها اکسید کردن ملکول‌ها در حضور H_2O_2 است. اغلب پراکسیدازها ویژهٔ بافت هستند که در مرحلهٔ نموی خاص ظاهر می‌شوند و به‌وسیلهٔ عوامل محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند [۲۲]. پراکسیدازهای موجود در دیوارهٔ سلولی می‌توانند خواص دیواره‌ی سلولی را تغییر دهند. فعالیت این پراکسیدازها با اکسیداسیون ترکیبات فنلی، اتصال عرضی پروتئین‌های دیوارهٔ سلولی و پلی‌ساکاریدها و تشکیل پلیمرهایی نظیر کوتین، سوبرین و لیگنین مرتبط است. بررسی‌ها نشان داده است که پراکسیدازها در بلوغ سلولی و تمایزبافتی نقش مهمی دارند و در انتهای مرحلهٔ طویل شدن فعال می‌شوند [۱۹]. داده‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت پراکسیداز نه تنها با افزایش طبیعی سن گیاه کتان، بلکه در حضور آلومینیم افزایش می‌یابد. حضور آلومینیم فعالیت و بیان ایزوزیم‌های پراکسیداز را تحت تأثیر قرار داد. فعالیت بخش دیواره‌ای پراکسیداز که با چوبی شدن دیواره مرتبط است در تیمارهای آلومینیم افزایش یافت. با توجه به ادامهٔ افزایش فعالیت بخش یونی در غلظت‌های بیش‌تر آلومینیم (۱۰۰ میکرومولار) نسبت به بخش کووالانی، پیشنهاد می‌شود که این بخش سهم بیش‌تری در پلیمریزاسیون منوفنلها وبیوسنتز لیگنین داشته باشد. افزایش لیگنین با افزایش غلظت آلومینیم مؤید این نتیجه است و با گزارش سایر پژوهش‌گران در مورد نقش بخش کووالانی پراکسیداز در افزایش لیگنین در تنش ناشی از فلزات سنگین هم‌خوانی دارد [۸]. افزایش لیگنین در تیمار۱۰۰ میکرومولار آلومینیم سبب شد که کاهش وزن خشک نسبت به کاهش وزن تر در این تیمار از شدت کم‌تری برخوردار باشد. مطالعات صورت گرفته درهیپوکوتیل کتان نشان داد که فلکسپر ۱ و فلکسپر ۳ علاوه بر تسریع ایجاد اتصالات عرضی بین فنل‌ها و پلی‌ساکاریدها، به‌واسطهٔ داشتن ساختار گلیکوپروتئینی قادرند که با باند شدن به هموگالاکتورونان‌های دیواره‌ای، سبب افزایش اتصالات عرضی موجود در دیواره شوند [۱۹]. تحقیقات مزبور همچنین نشان داد که در حضور کادمیوم بیان این دو ایزوزیم در هیپوکوتیل گیاه کتان افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر بیان فلکسپر۱ با افزایش سن گیاه کتان و افزایش آلومینیم در محیط رشد گیاه کاهش یافت که نقش این ایزوزیم در سنتز لیگنین و کاهش رشد ریشه را مورد تردید قرار می‌دهد. اما افزایش بیان ایزوزیم فلکسپر۳ در تیمار با ۱۰۰ میکرومولار آلومینیم در ۲۴ ساعت این احتمال را تقویت می‌کند که از بین دو ایزوزیم بررسی شده، فلکسپر۳ بیش‌تر در سنتز لیگنین و کاهش میزان رشد در ریشه‌ها دخالت داشته باشد. بدیهی است که در این راستا نقش سایر پراکسیدازها و آنزیم‌های دیگری که در تنظیم انعطاف‌پذیری و مقاومت دیوارهٔ سلول گیاهی نقش کلیدی دارند (نظیر آنزیم پکتین‌متیل‌استراز) را نیز نباید از نظر دور داشت.

منابع

۱. خ. شکوهی، ف. قناتی، *تأثیر آلومینیم بر کاهش رشد و تغییر در ترکیبات دیوارهٔ سلول‌های توتون*، مجله علوم دانشگاه تربیت معلم، ۷ (۱۳۸۶) ۸۶۴-۸۵۵.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

۲. خ. شکوهی، ف. قناتی، تأثیر *آلومینیم بر میزان اجزای پلی ساکاریدهای دیواره‌ی سلول‌های چای (Comellia sinensis L. cv. Yabukita) حاصل از بساک در کشت تعلیقی*، مجله علوم دانشگاه تهران ۳۵ (۱۳۸۸) ۵۰-۳۵.

3. U. Basu, A. Basu, G. Taylor, "Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress", Plant Physiol. 106 (1994) 151-158.

4. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye bindig", Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

5. I. Cakmak, W. Horst, "Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*)", Physiol. Plant. 83 (1991) 463-468.

6. J. J. Camacho-Cristóbala, D. Anzellottib, A. Gonzalez-Fontes, "Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency", Plant Physiol. Biochem, 40 (2002) 997-1002.

7. E. Delhaize, P. R. Ryan, "Aluminum toxicity and tolerance in plants', Plant Physiol. 107 (1995) 315-321.

8. M. M. Fecht-Christoffers, P. Maier, W. J. Horst, "Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*", Physiol. Plant. 117 (2003) 237–244.

9. F. Ghanati, K. Kobata, S. Hanada, A. Morita, H. Yokota, "Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells", Soil Sci. Plant Nutr. 48 (2002) 357-364.

10. F. Ghanati, A. Morita, H. Yokota, "Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system", Plant Soil 276 (2005) 133-141.

11. C. Hano, M. Addi, L. Bensaddek, D. Cronier, S. Baltora-Rosset, J. Doussot, S. Maury, F. Mesnard, B. Chabbert, S. Hawkins, E. Laine,F. Lamblin, "Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures", Planta 223 (2006) 975-989.

12. W. J. Horst, Y. Wang, D. Eticha, "The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants", a review, Annals Botany 106 (2010) 185-197.

13. K. Iiyama, A. F. A. Wallis, "Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure", J. Sci. Food Agric. 51 (1990) 145-161.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]

14. B. R. Lee, K. Y. Kim, W. J. Jung, J. C. Avice, A. Ourry, T. H. Kim, "Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.)", Soc. Exp. Biol. 58 (2007) 1271-1279.

15. Q. Liu, J. L. Yang, L. S. He, Y. Y. Li, S. J. Zheng, "Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale", Biol. Planta 52(1) (2008) 87-92.

16. J. F. Ma, R. Shen, S. Nagao, E. Tanimoto, "Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots", Plant Cell Physiol. 45 (2004) 583-589.

17. M. Milla, E. Butler, A. Huete, C. Wilson, O. Anderson, J. Gustafson, "Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye", Plant Physiol. 130 (2002) 1706-1716.

18. S. Millam, B. Obert, A. Pretova, "Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* -a review. Plant Cell", Tissue and Organ Culture 82 (2005) 93-103.

19. F. Omann, H. Tyson, "An anionic, stem-specific flax peroxidase cDNA with C-terminal motifs also found in a blue copper-type pea protein correlated with lignin deposition", Aust. J. Plant Physiol. 23 (1996) 773-789.

20. F. Paynel, A. Schaumann, M. Arkoun, O. Douchiche, C. Morvan, "Temporal regulation of cell-wall pectin methylesterase and peroxidase isoforms in cadmium-treated flax hypocotyl", Annals Botany 104 (2009) 1363-1372.

21. C. Poschenrieder, B. Gunsé, I. Corrales, J. Barcelo, "A glance into aluminum toxicity and resistance in plants", Sci. Total Environ. 400 (2008) 356-368.

22. V. Vitorello, F. Capaldi, V. Stefanuto, "Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants", Braz. J. Plant Physiol. 17 (2005) 129-143.

23. Y. J. Xue, L. Tao, Z. M. Yang, "Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide", J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 9676-9684.

24. M. Yu, R. Shen, H. Xiao, M. Xu, H. Wang, Q. Zeng, J. Bian, "Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*)", Plant Soil (2008).

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-16]