

فعالیت آنزیمی و بیان ژن‌های پراکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در ریشه گیاه کتان^۱ 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 کننده رشد و نمو گیاهان در خاک‌های اسیدی (pH کمتر از ۵/۵) است که خطر آن به علت عملیات زراعی و باران‌های اسیدی رو به افزایش است. مکانیسم سمیت آلومینیم هنوز به روشنی مشخص نشده است. ممانعت رشد ریشه، اولین پاسخ گیاه به سمیت آلومینیم است و این ممانعت رشد از طریق توقف یا کاهش طول 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 آمونیا لیاز 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 (به صورت $AlCl_3 \cdot 6 H_2O$) 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 به ویژه در بخش یونی و کروالانی به خوبی کاهش رشد ریشه را توجیه می‌کند. افزایش فعالیت و بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و نیز افزایش میزان لیگنین تنها در بیشترین غلظت آلومینیم مشاهده گردید. بررسی بیان دو ایزوزیم پراکسیداز نشان داد که فلکسپر^۲ ۳ در مقایسه با فلکسپر^۱ ۱ در سمیت آلومینیم در ریشه نقش دارد.

مقدمه

آلومینیم (Al) فراوان‌ترین فلز پوسته زمین و سومین عنصر فراوان موجود در آن است، ولی برای رشد گیاه ضروری نیست. سمیت آلومینیم فاکتور عمده محدود کننده تولید محصول در خاک‌های اسیدی است که حدود ۴۰ درصد زمین‌های زراعی دنیا را تشکیل می‌دهند [۲۰]. اولین نشانه سمیت Al، مهار رشد ریشه است که نتیجه آن کاهش جذب مواد غذایی، آب و کاهش رشد گیاه خواهد بود [۷]، [۱۱]. همچنین تأثیر Al در ساختار و عملکرد دیواره 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، فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، کتان، لیگنین

دریافت ۸۹/۱۱/۲۳ پذیرش ۹۰/۰۵/۲۵

*نویسنده مسئول ghangia@modares.ac.ir

۱. *Linum usitatissimum* L.

۲. Flaxper

بررسی‌ها نشان داده است که ممانعت رشد طولی ریشه به‌وسیله آلومینیم از طریق توقف طولی شدن سلول اعمال می‌گردد. دیواره 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 طولی شدن در ریشه است [۱۵]. سخت شدن دیواره سلولی فرایند نسبتاً پیچیده‌ای است که با دخالت آنزیم‌ها و مواد حد واسط متعدد انجام می‌شود. در بین این آنزیم‌ها، پراکسیدازهای متصل شده به دیواره 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 مشاهده 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 فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز 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 طولی شدن سلولی و تنش اکسیداتیو مهم‌ترین آن‌ها هستند [۱۶]. بنا بر این، آگاهی در زمینه بیان ژن‌های القا شده توسط آلومینیم در درک مکانیسم سمیت آلومینیم اهمیت زیادی دارد. ریشه به‌عنوان اولین بخش پذیرنده 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 رمزکننده آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز و ارتباط آن با ممانعت رشد طولی ایجاد شده به‌وسیله آلومینیم در ریشه 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 (حاوی ۵ درصد کلرین فعال) و اتانول ۷۰ درصد، در تاریکی و دمای ۲۲°C انجام گردید. دانمرست‌های با طول یکسان، انتخاب و به محلول هوگلدن تغییر یافته شامل (برحسب میلی‌مولار): $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ، $2/5$ ؛ KNO_3 ، $2/5$ ؛ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، $1/0$ ؛

^۱. Paynel

؛ $0/00076$ ، $ZnCl_2$ ؛ $0/0091$ ، $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ؛ $0/045$ ، H_3BO_3 ؛ $0/032$ ، $Fe-EDTA$ ؛ $0/5$ ، KH_2PO_4 ؛ $0/00031$ ، $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ، $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ، ؛ $0/00021$ ، با $pH=6$ 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 $22^\circ C$ ، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و شدت نور $107 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ با غلظت‌های مختلف آلومینیم (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در $pH=4/5$ 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 پذیرنده 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 آب مقطر جداسازی و در نیتروژن مایع منجمد و منهای $80^\circ C$ برای بررسی‌های بعدی به فریزر منتقل شدند. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید.

پژوهش‌های بیوشیمیایی

سنجش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز (PAL) و پراکسیداز (POD) و نیز اندازه‌گیری محتوای لیگنین و فنل‌های متصل به دیواره با روش‌های رایج انجام گرفت [۸]. آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز 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 $0/2$ گرم بافت ریشه در بافر پتاسیم‌بورات $0/1$ مولار، $pH=8/8$ حاوی β -مرکاپتواتانول ۲ میلی‌مولار روی یخ، ساییده شد. بعد از سانتریفیوژ نمودن با سرعت 16000 g به‌مدت ده دقیقه در دمای $4^\circ C$ ، محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. مخلوط واکنش، شامل L -فنیل‌آلانین 4 mM به‌عنوان سوبسترا، بافر پتاسیم‌بورات (بدون مرکاپتواتانول) و عصاره آنزیمی، به‌مدت یک ساعت در حمام آب‌گرم با دمای $37^\circ C$ قرار داده شد. واکنش آنزیمی با افزودن کلریدریک اسید 5 مولار متوقف گردید و سینامیک اسید موجود در نمونه‌ها (فرآورده 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 ستون ODS-80Ts ($4/6 \times 250$ mm) انجام گرفت. از شیب خطی $30-80$ درصد متانول حاوی استیک‌اسید $0/1$ درصد با "جریان"^۲ $0/5$ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد و میزان سینامیک‌اسید تولیدشده در یک ساعت در طول موج 273 nm سنجیده شد. فعالیت آنزیم برحسب میزان سینامیک‌اسید به‌ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۸]. میزان پروتئین به روش براندفورد با استفاده از BSA به‌عنوان استاندارد محاسبه گردید [۴].

۱. KNAUER

۲. Flow rate

آنزیم پراکسیداز در سه بخش محلول، یونی و کووالانی جداسازی و فعالیت آن اندازه‌گیری شد. ۰/۳ گرم بافت ریشه در بافر تریس‌مالئات $\text{pH} = 6, 50 \text{ mM}$ در دمای 4°C ساییده و با سرعت $12000 \times \text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی به منظور سنجش فعالیت بخش محلول پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی این بخش با افزودن مقادیر مناسبی از عصاره آنزیمی، بافر فسفات‌پتاسیم 60 mM ، $\text{pH} = 6/1$ ، گایاکول 28 mM به عنوان دهنده الکترون و پراکسید هیدروژن 5 mM در طول موج 470 nm به کمک اسپکتروفتومتر (سینترا^۱، استرالیا، GBC) اندازه‌گیری شد. رسوب مرحله قبل با کلرید کلسیم $0/2 \text{ M}$ به مدت دو ساعت در درجه حرارت محیط همراه با همزدن پیوسته نگهداری و سپس با سرعت $18000 \times \text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت بخش یونی پراکسیداز و رسوب حاصل با افزودن بافر به طور مستقیم برای سنجش فعالیت بخش کووالانی پراکسیداز استفاده شد. فعالیت آنزیمی بخش یونی و کووالانی با سیرینگ‌آلدازین $41/6 \text{ nM}$ ، بافر تریس‌مالئات، پراکسید هیدروژن 16 mM و مقادیر مناسب عصاره آنزیمی یا دیواره سلولی در طول موج 530 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 دیواره بیان شد.

به منظور استخراج دیواره سلولی نمونه‌های ریشه بعد از ساییدن در آب مقطر با سرعت $10000 \times \text{g}$ سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل به طور متوالی با اتانول دوبار (دو دقیقه و یک ساعت)، مخلوط $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (v/v) (۱:۲) 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 [۸]. محتوای لیگنین دیواره سلولی با روش استیل بروماید اندازه‌گیری شد. بدین منظور به ۶ میلی‌گرم پودر نرم‌شده دیواره، $2/5$ میلی‌لیتر مخلوط استیل بروماید اسیداستیک (۲۵٪ w/w) حاوی $0/1$ درصد پرکلریک‌اسید ۷۰٪ افزوده و در حمام آب‌گرم با دمای 70°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 میلی‌لیتر شامل پنج میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم دو نرمال منتقل و با اسیداستیک به حجم رسانده شد. میزان لیگنین با اندازه‌گیری جذب در 280 nm و با استفاده از ضریب جذب ویژه $\text{g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ۲۰ محاسبه گردید [۱۲].

به منظور استخراج فنل‌های متصل به دیواره، به 30 mg دیواره سلولی استخراج‌شده، اگزالات آمونیوم 20 mM افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای 70°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 $0/1 \text{ M}$ NaOH، افزوده شد و پس از قرار گرفتن به مدت یک شب تحت گاز N_2 ، محلول رویی حاصل استخراج به محلول‌های قبلی افزوده شد. ترکیبات فنلی سه بار با اتیل‌استات استخراج و توسط جریانی از هوا

۱. Cintra

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 به مدت دو ساعت قرار گرفتند. پس از سرد شدن یک میلی‌لیتر از 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 سازنده (کویشن ساینس، آلمان MD, USA)^۵ استخراج گردید. پس از اندازه‌گیری غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ، cDNA با استفاده از پریم اسکریپ آر تی 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 بر اساس 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 به صورت واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت دو دقیقه انجام شد که با ۳۰ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز به مدت ۶۰-۲۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و سنتز نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C توسط دستگاه ترمال سایکلر^۸ 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

منبع	اندازه قطعه تکثیر شده (جفت باز)	ترادف آغازگر	Accession number GeneBank	ژن
Hano <i>et al.</i> (2006)	۱۳۲	5 CATCAGATTTGAGATCTTGAAGC 3 5 GTTAGCAAACCAGCAATATAAGAG 3	:Forward :Reverse AY837828	LuPAL
Paynel <i>et al.</i> (2009)	۱۰۱	5 TTGGATACAACCCCGACAAAA 3 5 GGGCCCTTGACCAGTCAAG 3	:Forward :Reverse L07554	Flaxper1
Paynel <i>et al.</i> (2009)	۱۸۵	5 TACTTCACCAATCTCCAGACC 3 5 GCGAACCTGTTGACGAGCTC 3	:Forward :Reverse U59284	Flaxper3

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

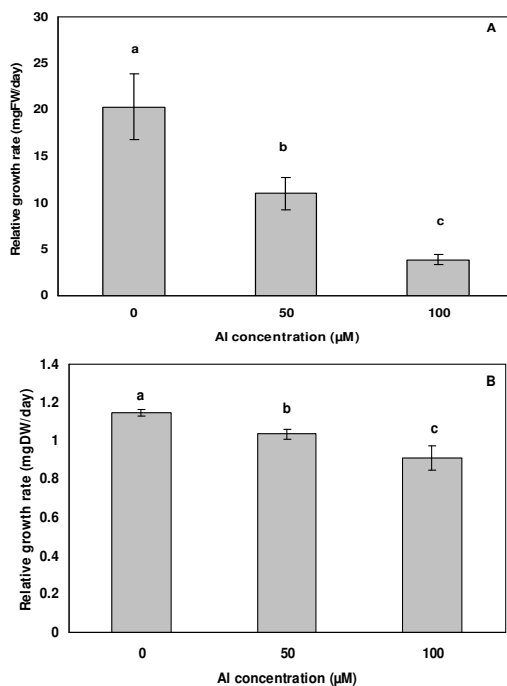
بررسی‌های آماری

طرح آزمایش و انجام تیمارها به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. همه آنالیزهای بیوشیمیایی در سه تکرار مستقل، هر یک با سه نمونه و آنالیزهای مولکولی در سه تکرار مستقل انجام شدند. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها، از بسته نرم‌افزاری اکسل^۱ استفاده شد. همچنین برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (آنوآ^۲) با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ در بسته 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) به ترتیب به میزان ۴۵/۹۰ و ۸۰/۹۸ درصد نسبت به گیاهان کنترل می‌شود (شکل ۱A). کاهش وزن خشک گیاه در تیمار با آلومینیم به نسبت گیاه شاهد گرچه معنی‌دار بود اما به شدت کاهش در وزن تر نبود (شکل ۱B). بنا بر این نتیجه‌گیری می‌شود که تنش آلومینیم سبب افزایش بیوسنتز مواد خشکی نظیر لیگنین شده است.



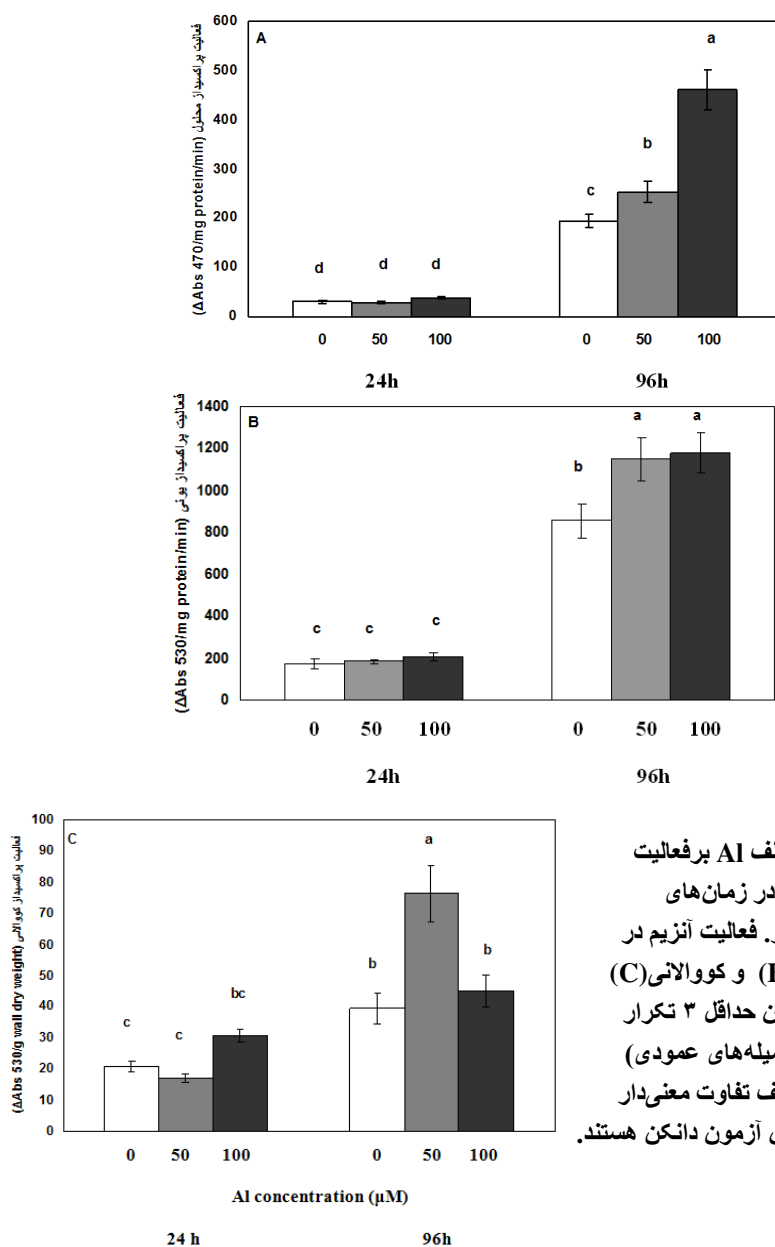
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف AI بر رشد برحسب وزن تر (A) و وزن خشک (B) گیاه کتان. داده‌ها میانگین حداقل ۵ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میل‌های عمودی) است. حروف غیریک‌سان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ $P \leq$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

۱. Excel

۲. ANOVA

تأثیر آلومینیم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

چنان‌که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش سن گیاه فعالیت هر سه بخش پراکسیداز افزایش یافت. در تیمار ۲۴ 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 میکرومولار آلومینیم 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 تیمار ۵۰ میکرومولار آلومینیم افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار ۱۰۰ میکرومولار و شاهد نشان داد.



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف Al بر فعالیت پراکسیداز در ریشه 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 \pm انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیر یکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

تأثیر آلومینیم بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز

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 میکرومولار آلومینیم در ۲۴ ساعت معنی‌دار است (جدول ۲).

جدول ۲. تغییرات فعالیت آنزیم PAL در ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف AI

PAL Activity ($\mu\text{g CA}/\text{mg protein}/\text{h}$)		
غلظت آلومینیم (میکرومولار)	زمان (ساعت)	
	۶	۲۴
۰	$5.5/43 \pm 4.9/22^c$	$57.6/85 \pm 37/43^c$
۵۰	$82.3/36 \pm 6.9/36^b$	$41.3/74 \pm 3.4/0.5^c$
۱۰۰	$56.3/0.9 \pm 2.6/7.0^{bc}$	$197.2/99 \pm 91/86^a$

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 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. در صورتی‌که تفاوتی بین میزان لیگنین در تیمار ۵۰ میکرومولار آلومینیم و شاهد دیده نشد. همچنین میزان فنل‌های متصل به دیواره در ریشه گیاهان تیمار شده با آلومینیم نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳. تأثیر آلومینیم بر تجمع لیگنین و میزان فنل‌های متصل به دیواره

غلظت آلومینیم (میکرومولار)	محتوای لیگنین (% از دیواره سلولی)	فنل‌های متصل به دیواره (میکروگرم بر گرم وزن خشک دیواره)
۰	$12/16 \pm 0.28^b$	$14/17 \pm 1/0.5^c$
۵۰	$12/14 \pm 1/0.1^b$	$18/46 \pm 0.53^b$
۱۰۰	$15/82 \pm 2/16^a$	$21/68 \pm 1/0.4^a$

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 است.

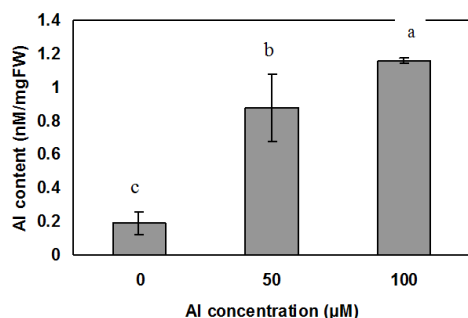
میزان جذب آلومینیم ریشه

بر اساس نتایج به‌دست آمده از جذب اتمی، ارتباط مستقیمی بین مقدار آلومینیم جذب شده به‌وسیله 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 (شکل ۳).

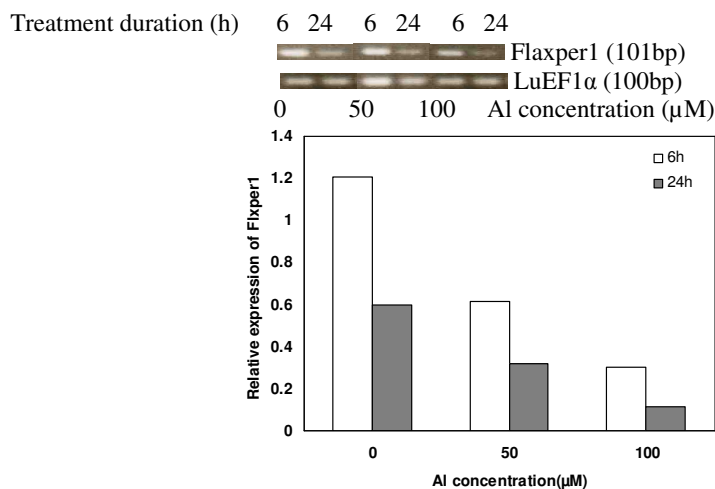
تأثیر آلومینیم بر بیان ژن پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز

بیان ژن‌های دو ایزوزیم پراکسیداز (فلکسپر ۱، فلکسپر ۳) و ژن فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز LuPAL بررسی شد. در بررسی‌های اولیه نشان داد که ژن ACTIN (ACT-F2) به‌عنوان کنترل داخلی تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده

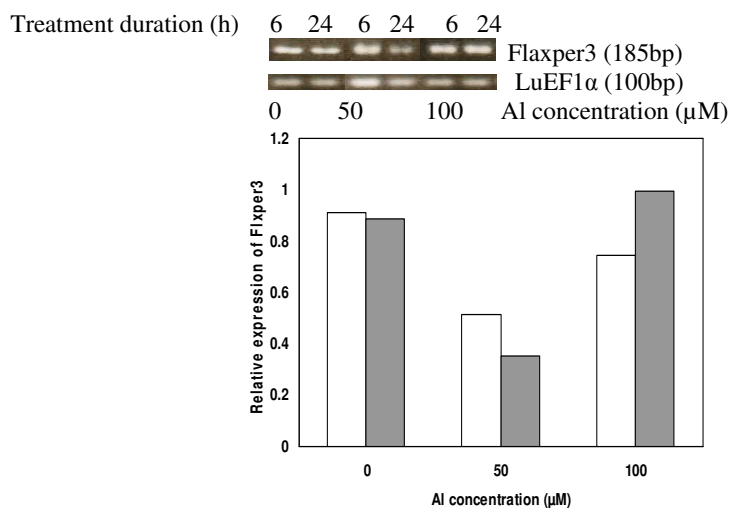
قرار گرفت. این امر در پژوهش‌های سایر محققان نیز نشان داده شده است [۱۰]؛ از این رو از ژن مربوط به فاکتور طویل شدن (LuEF1 α) به عنوان ژن کنترل داخلی^۱ استفاده شد [۱۹].



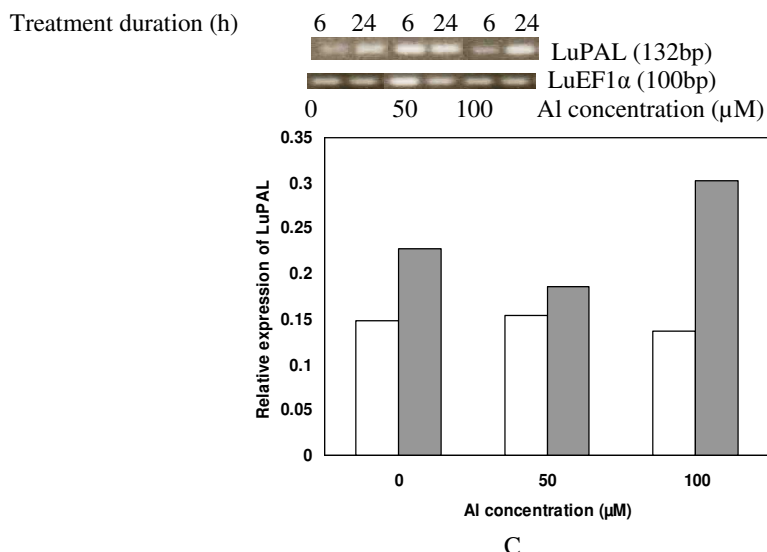
شکل ۳. مقدار جذب آلومینیم به وسیله ریشه‌ها در غلظت‌های مختلف آلومینیم. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل \pm انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریک‌سان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



A



B



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 و ۲۴ 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 فلکسپر ۳ در ریشه‌های شاهد با گذشت زمان تغییری نکرد؛ در صورتی‌که کاهش بیان آن در تیمار آلومینیم ۵۰ میکرومولار و افزایش بیان آن در تیمار آلومینیم ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. بیان ژن فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز در زمان ۲۴ ساعت نسبت به ۶ ساعت افزایش نشان داد و بیش‌ترین افزایش بیان در تیمار آلومینیم ۱۰۰ میکرومولار دیده شد.

بحث

دیواره سلولی ریشه به‌دلیل تجمع بارهای منفی به‌عنوان اصلی‌ترین محل اتصال آلومینیم در نظر گرفته شده است. براساس پژوهش‌های انجام شده، اتصال آلومینیم به ماتریس پکتینی و دیگر ترکیبات دیواره سلولی، باعث تغییر خواص دیواره سلولی و عمل‌کردهای آن همچون کشش، تخلخل، فعالیت آنزیمی و نیز تغییرات سیمپلاستی از طریق ارتباط بین دیواره 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

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 دیواره 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 دیواره سلول‌های ریشه کتان سبب سختی دیواره، کاهش رشد ریشه و در نهایت کاهش رشد کل گیاه گردید. لیگنین یک هتروپلیمر فنلی است که از پلیمریزه شدن اکسیداتیو سه منولیگنول p-کوماریل، کونیفریل و سیناپیل‌الکل با آنزیم پراکسیداز دیواره سلولی تشکیل می‌شود. منومرهای لیگنینی همچون 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 فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز 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 به وسیله فرآورده 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 فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز نسبت به زمان ۶ ساعت متناسب بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده احتمال دارد کاهش فعالیت آنزیم PAL به دلیل 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 هم^۱ هستند که نقش اصلی

۱. Heme

آن‌ها اکسید کردن ملکول‌ها در حضور H_2O_2 است. اغلب پراکسیدازها ویژه بافت هستند که در مرحله نموی خاص ظاهر می‌شوند و به‌وسیله عوامل محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند [۲۲]. پراکسیدازهای موجود در دیواره سلولی می‌توانند خواص دیواره سلولی را تغییر دهند. فعالیت این پراکسیدازها با اکسیداسیون ترکیبات فنلی، اتصال عرضی پروتئین‌های دیواره 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 مرحله 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 ادامه فعالیت بخش یونی در غلظت‌های بیش‌تر آلومینیم (۱۰۰ میکرومولار) نسبت به بخش کووالانی، پیشنهاد می‌شود که این بخش سهم بیش‌تری در پلیمریزاسیون منوفنلها و بیوسنتز 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 تیمار ۱۰۰ میکرومولار آلومینیم سبب شد که کاهش وزن خشک نسبت به کاهش وزن تر در این تیمار از شدت کم‌تری برخوردار باشد. مطالعات صورت گرفته در هیپوکوتیل کتان نشان داد که فلکسپر ۱ و فلکسپر ۳ علاوه بر تسریع ایجاد اتصالات عرضی بین فنل‌ها و پلی‌ساکاریدها، به‌واسطه 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 فلکسپر ۱ 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 فلکسپر ۳ در تیمار با ۱۰۰ میکرومولار آلومینیم در ۲۴ ساعت این احتمال را تقویت می‌کند که از بین دو ایزوزیم بررسی شده، فلکسپر ۳ 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 دیواره سلول گیاهی نقش کلیدی دارند (نظیر آنزیم پکتین‌متیل‌استراز) را نیز نباید از نظر دور داشت.

منابع

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

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

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).