

تأثیر مثبت آلومینیم در فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflora* L.)

فائزه فغانی* و فرنوش نعمتی

*گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

قلمه‌های ریشه‌دار شده گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflora* L.) با آلومینیم ($AlCl_3$) در غلظت $0/88$ میلی‌مولار و pH ثابت $4/5$ به مدت ۹۶ ساعت تیمار داده شدند. فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در ریشه‌های گیاهان تیمار داده شده با آلومینیم در مقایسه با گیاهان گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد. فعالیت نوع کوالانی آنزیم پراکسیداز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه نمونه‌های تیمار شده با آلومینیم نسبت به کنترل‌ها کاهش معنی‌دار داشت. در مدت ۹۶ ساعت بخش عمده‌ای از آلومینیم تیمار داده شده توسط ریشه‌های گیاه لیسیانتوس جذب شد. نتایج نشان داد که تیمار آلومینیم در گیاه لیسیانتوس نه تنها سبب بروز آثار سوء نمی‌شود، بلکه سیستم آنتی‌اکسیدان را فعال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آلومینیم، پراکسیداز، سیستم آنتی‌اکسیدان، لیسیانتوس، لیگنین

مقدمه

طور کامل مشخص نیست؛ با این حال، گزارش‌های زیادی نقش آن را در تولید گونه‌های فعال اکسیژن مولکولی و ایجاد تنش اکسیداتیو تأیید می‌کنند. در کشت سلولی گیاه آراییدوپسیس و تنباکو، تیمار آلومینیم سبب افزایش بیان ژن‌های مختلف (پراکسیداز، گلوتاتیون S-ترانسفراز و سوپر اکسید دیسموتاز) شد (Richards *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2002). در برخی گیاهان تجمع‌دهنده آلومینیم، نظیر چای تیمار با این یون سبب بهبود روند رشد (Matsumoto *et al.*, 1976; Konishi *et al.*, 2000) می‌گردد.

تجمع آلومینیم محلول در خاک‌های اسیدی ($pH < 5$) سبب ایجاد سمیت و کاهش رشد گیاه می‌گردد (Yamamoto *et al.*, 1994). یکی از فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان در شرایط تنش، تولید مقادیر فراوان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نظیر آنیون سوپر اکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) و در نتیجه آن ایجاد تنش اکسیداتیو است (Ogawa *et al.*, 2000). مکانیسم فیزیولوژیک سمیت آلومینیم به

Ca (NO₃)₂.4H₂O, 2.5; KNO₃, 2.5; KH₂PO₄, 0.5; Fe-EDTA, 0.003; H₃BO₃, 0.0005; MgSO₄.7H₂O, 1; Mn (MnCl₂.), 0.0005; Zn (ZnCl₂), 0.00005; Cu (CuCl₂.2H₂O), 0.00002; Mo (Na₂MoO₄), 0.00002 و pH=۶. محلول غذایی هر ۵ روز تعویض می‌شد. پس از این مراحل تیمار آلومینیم (AlCl₃.6H₂O) در غلظت ۰/۸۸ میلی‌مولار انجام شد و نمونه‌ها (حداقل سه گیاه شاهد و سه گیاه تیمار شده) در فواصل زمانی ۲۴ و ۹۶ ساعت پس از تیماردهی جمع‌آوری شدند. تعیین میزان غلظت آلومینیم بر اساس نتایج تحقیقات قبلی و منابع موجود صورت گرفت (Farrokhzad *et al.*, 2006؛ Liao *et al.*, 2001). پس از شستشو با آب مقطر، ریشه قلمه‌ها از محل یقه گیاه جدا گردید. نمونه‌ها با نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنالیزهای بعدی بر روی نمونه‌های فوق در ۳ تکرار مستقل صورت گرفت.

سنجش‌های بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) نمونه‌های منجمد شده (۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر)، در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH (pH=۷/۸) حاوی ۰/۱ میلی‌مول EDTA ساییده و سپس با دور $\times g$ ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد). بخش شناور رویی حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم با روش فتوشیمیایی (Cakmak and Horst, 1991) استفاده گردید. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی: ۵۰ میلی‌مول بافر HEPES-KOH (pH=۷/۸)، ۰/۱ میلی‌مول EDTA، ۵۰ میلی‌مول Na₂CO₃ با (pH=۱۰/۲)، ۱۲ میلی‌مول L-متیونین، ۷۵ میکرومول (Nitro Blue Tetrazoliumchloride) NBT، یک میکرومول ریبوفلاوین (Riboflavin) و ۳۰۰ میکرولیتر

1985). بررسی‌های انجام شده بر روی کشت سلولی چای و نیز قلمه‌های ریشه‌دار شده این گیاه نشان داده است که عدم سمیت آلومینیم در چای و حتی تحریک رشد آن با این یون، ممکن است به علت تأثیر مثبت آلومینیم در افزایش کارایی سیستم ایمنی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باشد (Ghanati *et al.*, 2005). تاکنون گزارشی از تحمل گیاه لیسیاتوس (*Eustoma grandiflora* L.) نسبت به آلومینیم دیده نشده است، اما مطالعات انجام شده بیانگر افزایش ماندگاری گلدانی، افزایش جذب آب و وزن تر گل‌های بریده این گیاه در تیمار با سولفات آلومینیم است (Liao *et al.*, 2001, Farrokhzad *et al.*, 2006). این تحقیقات اثر مثبت سولفات آلومینیم بر ماندگاری گلدانی شاخه‌های گل لیسیاتوس را به تأثیر بازدارنده آلومینیم بر رشد میکروارگانیسم‌ها در طول زندگی گلدانی مربوط دانسته‌اند؛ حال آن که احتمال ایجاد تغییر در فعالیت‌های آنزیمی سیستم آنتی‌اکسیدان و ساختار غشای این گیاه در تیمار با آلومینیم (همان‌گونه که در مورد گیاه چای مشاهده شده است) وجود دارد. لذا در تحقیق حاضر، نحوه تأثیر این یون (Al³⁺) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در قلمه‌های ریشه‌دار شده گیاه لیسیاتوس بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و انجام تیمار

برای انجام تحقیق، قلمه‌های ریشه‌دار شده گیاه لیسیاتوس از بازار گل و گیاه استان تهران تهیه شد. قلمه‌ها به مدت ۱۰ روز به منظور سازگاری و خروج مواد جذبی خود در محلول غذایی تغییر یافته هو گلند (۱/۲) با ترکیب زیر (مقادیر بر حسب میلی‌مول) قرار گرفتند:

فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Nakano and Asada, 1981).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه حالت محلول، یونی و کووالانی متصل به دیواره بررسی گردید. به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز محلول که در پاسخ‌های استرسی گیاه نقش دارد، از گایاکول (guaiacol) و در حالت یونی و کووالانی که در فرآیندهای چوبی و چوب پنبه‌ای شدن سلول‌ها دخالت دارند، از سیرینگالدازین (Syringaldazine) به عنوان الکترون‌دهنده استفاده شد. نمونه‌های منجمد شده (۲۰۰ میلی گرم وزن تر)، در ۳ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مول (pH=۶/۸) ساییده و با دور $g \times 12000$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). از بخش شناور رویی حاصل برای سنجش فعالیت کاتالاز (CAT) استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مول (pH=۶/۸)، ۱۰ میلی مول H_2O_2 و عصاره آنزیم تهیه شد و سپس روند واکنش با کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه دنبال شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Cakmak and Horst, 1991).

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ۲۰۰ میلی گرم نمونه منجمد شده در ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول (pH=۶) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA ساییده و سپس با دور $g \times 12000$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). بخش شناور رویی حاصل به منظور سنجش فعالیت APX استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول (pH=۶) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA، ۰/۵ میلی مول آسکوربیک اسید، ۱ میلی مول H_2O_2 و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه و اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت یک دقیقه سنجیده شد.

فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Nakano and Asada, 1981).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه حالت محلول، یونی و کووالانی متصل به دیواره بررسی گردید. به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز محلول که در پاسخ‌های استرسی گیاه نقش دارد، از گایاکول (guaiacol) و در حالت یونی و کووالانی که در فرآیندهای چوبی و چوب پنبه‌ای شدن سلول‌ها دخالت دارند، از سیرینگالدازین (Syringaldazine) به عنوان الکترون‌دهنده استفاده شد. نمونه‌های منجمد شده (۴۰۰ میلی گرم وزن تر) در ۳ میلی لیتر بافر Tris-maleat ۵۰ میلی مول (pH=۶) ساییده و سپس با دور $g \times 12000$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت). به دنبال مراحل استخراج، بخش شناور رویی حاصل برای سنجش پراکسیداز محلول (SPO) و رسوب آن برای سنجش پراکسیداز یونی و کووالانی استفاده شد (Ghanati et al., 2005).

به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز محلول ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل: بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی مول (pH=۶/۱)، ۲۸ میلی مول گایاکول و ۵ میلی مول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تهیه شد و سپس با افزودن عصاره آنزیمی دانسیته نوری آن در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Pandolfini et al., 1992).

پراکسیداز یونی (IPO) و کووالانی (CPO): رسوب حاصل از مرحله قبل با محلول کلرید کلسیم (CaCl₂) ۰/۲ مولار به مدت ۲ ساعت انکوبه و با دور $g \times 12000$ به

عصاره آنزیمی تهیه شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور قرار گرفتند. سپس دانسیته نوری آن توسط اسپکتروفتومتر (مدل 6 Cintra، GBC، ساخت استرالیا) در ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت SOD بر اساس مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰٪ احیا NBT محاسبه شد. به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز نمونه‌های منجمد شده (۲۰۰ میلی گرم وزن تر)، در ۳ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مول (pH=۶/۸) ساییده و با دور $g \times 12000$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). از بخش شناور رویی حاصل برای سنجش فعالیت کاتالاز (CAT) استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مول (pH=۶/۸)، ۱۰ میلی مول H_2O_2 و عصاره آنزیم تهیه شد و سپس روند واکنش با کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه دنبال شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Cakmak and Horst, 1991).

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ۲۰۰ میلی گرم نمونه منجمد شده در ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول (pH=۶) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA ساییده و سپس با دور $g \times 12000$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمام مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد). بخش شناور رویی حاصل به منظور سنجش فعالیت APX استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول (pH=۶) حاوی ۰/۱ میلی مول EDTA، ۰/۵ میلی مول آسکوربیک اسید، ۱ میلی مول H_2O_2 و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه و اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت یک دقیقه سنجیده شد.

برای تعیین میزان لیگنین ابتدا جداسازی دیواره سلولی انجام گرفت. به این منظور، نمونه‌های منجمد شده (یک گرم) در آب مقطر، هموژن و سپس با دور ۱۰۰۰ در ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل ۲ بار با اتانول مطلق و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شد و پس از هر بار شستشو با استفاده از خلأ، روی قیف بوختر، کاغذ صافی و نایلون مش صاف شد. رسوب حاصل یک شب در محلول ۱۰ برابر حجم کلروفرم-متانول (۲:۱) قرار گرفت و پس از صاف کردن، رسوب با استون ۱۰ برابر حجم شسته و خشک شد. ماده خشک دیواره حاصل ساییده و از الک ۱۵۰ میکرونی عبور داده شد. پودر حاصل به منظور تعیین لیگنین موجود در دیواره سلولی با استفاده از روش استیل بروماید محاسبه شد. به ۶ میلی گرم پودر ساییده شده دیواره سلولی، ۲/۵ میلی لیتر مخلوط استیل بروماید ۲۵ درصد در استیک اسید و ۰/۱ میلی لیتر پرکلریک اسید ۷۰ درصد افزوده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای تکان داده شد. مخلوط لوله‌ها پس از سرد شدن در یخ به بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی لیتری حاوی ۵ میلی لیتر هیدروکسید سدیم (NaOH) ۲ نرمال و ۶ میلی لیتر استیک اسید، اضافه و با استیک اسید به ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. محتوای لیگنین با اندازه‌گیری جذب در ۲۸۰ نانومتر و با ضریب مخصوص $g^{-1}Lcm^{-1}$ ۲۰ تعیین شد (Iiyama and Wallis, 1990).

به منظور سنجش میزان جذب آلومینیم ۰/۲ گرم از نمونه‌های گیاهی در دمای ۳۵۰ درجه سانتی گراد و سپس در ۵۵۰ درجه سانتی گراد و هر بار به مدت ۲ ساعت داخل کوره قرار گرفت. پس از سرد شدن به نمونه‌ها ۱ میلی لیتر از مخلوط آب مقطر - HCl (۱:۱) اضافه شد. سپس نمونه‌ها

مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از بخش شناور رویی برای سنجش فعالیت پراکسیداز یونی (IPO) و رسوب آن برای پراکسیداز کووالانی (CPO) استفاده شد. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر سدیم فسفات ۶۰ میلی مول با $pH=6$ ، ۴۱/۶ نانومول سیرینگالدازین و ۱۶ میلی مول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و عصاره آنزیمی تهیه شد و فعالیت پراکسیداز یونی بر حسب تغییرات جذب آن در ۵۳۰ نانومتر به مدت یک دقیقه به نسبت میلی گرم پروتئین عصاره و فعالیت پراکسیداز کووالانی بر حسب تغییرات جذب آن در ۵۳۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه به نسبت میلی گرم وزن خشک دیواره بیان شد (Ghanati et al., 2005).

محتوای پروتئین‌ها با روش برادفورد (Bradford, 1976) با استفاده BSA (Bovine Serum Albumin) در غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر به عنوان استاندارد تعیین شد.

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دی آلدهید به عنوان محصول نهایی این واکنش در نظر گرفته و سنجیده شد. ۲۰۰ میلی گرم از ریشه نمونه‌های گیاهی در محلول ۱۰ درصد (حجم/وزن) تری کلرو استیک اسید ساییده شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به یک میلی لیتر بخش بر رو شناور حاصل تیوباریتوریک اسید ۰/۲۵ درصد افزوده شد و مخلوط حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. دانسیته نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. میزان MDA با استفاده از ضریب جذب ثابت $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ و تفاوت جذب در دو طول موج ذکر شده محاسبه شد (Cakmak and Horst, 1991).

به منظور اندازه‌گیری میزان آسکوربات کل، به مخلوط فوق ۵۰ میکرولیتر دای تایاترایاتول (DTT) ۱۰ میلی‌مولار اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. پس از این مرحله ۵۰ میکرولیتر N-اتیل مالیمید ۵/۵ درصد به نمونه‌ها افزوده و دانسیته نوری آنها در ۵۲۵ نانومتر تعیین شد (Sreenivasulu *et al.*, 2000).

آنالیزهای آماری

کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل و هریک با سه نمونه انجام گرفت. از نرم‌افزار Excel برای محاسبه میانگین، انحراف معیار و رسم نمودارها استفاده شد. تحلیل داده‌ها و معنی‌دار بودن اختلاف بین آنها با آزمون t (T-test) در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

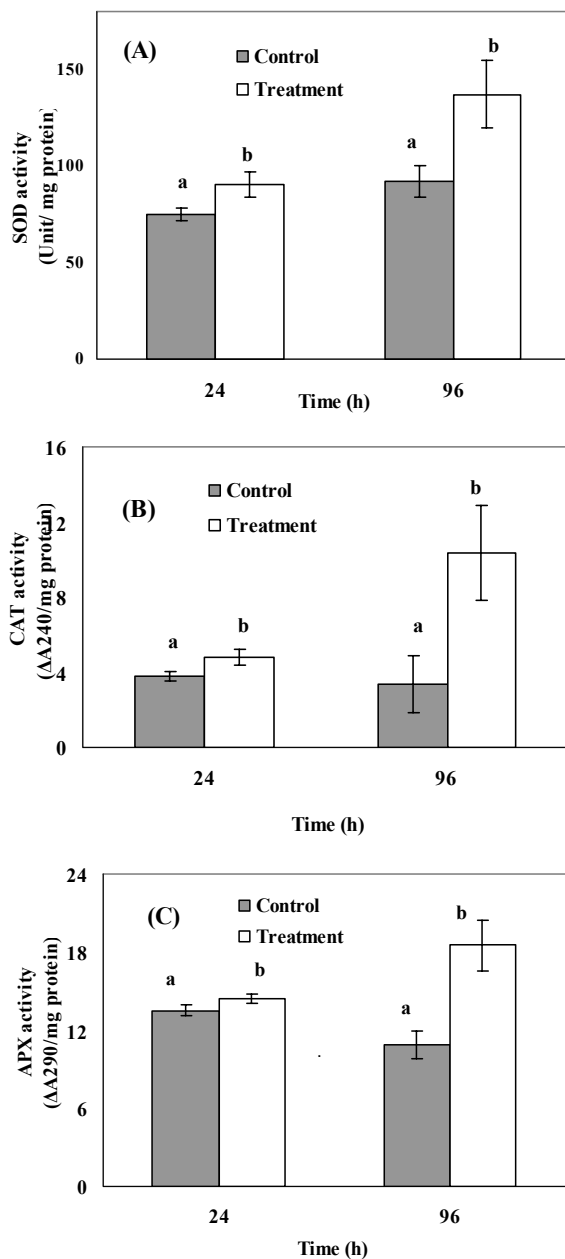
نتایج

فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان

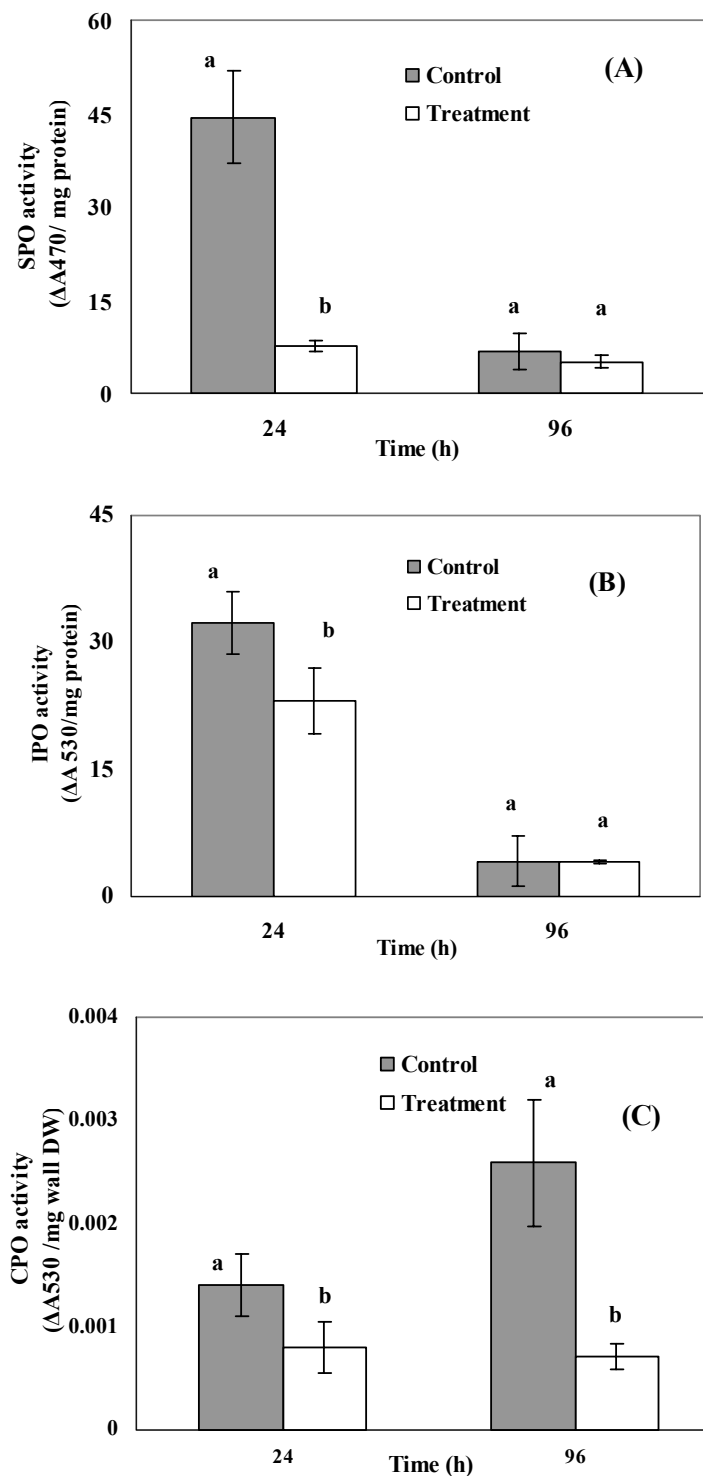
فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار آلومینیم در ریشه افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۱A). در مقایسه با نمونه‌های شاهد، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در ریشه در تیمار با آلومینیم افزایش معنی‌دار داشت (شکل ۱B). همان‌طور که در شکل ۱C مشاهده می‌شود، تیمار آلومینیم سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آسکوربات پراکسیداز ریشه شد. افزایش فعالیت آنزیم‌های جاروب‌کننده ترکیبات ROS سبب کاهش میزان H_2O_2 می‌شود که سوبسترای اصلی سنتز لیگنین و تولید و تجمع ترکیبات فنلی است.

در حمام شن در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از خشک شدن، ۵ میلی‌لیتر HCl ۱ نرمال به آنها افزوده و محلول شفاف و بی‌رنگ مشاهده شد. پس از تهیه نمونه‌های استاندارد در غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول میزان جذب آلومینیم توسط دستگاه جذب اتمی (ICP-OES, VISTA-PRO, Varian, Australia) تعیین گردید.

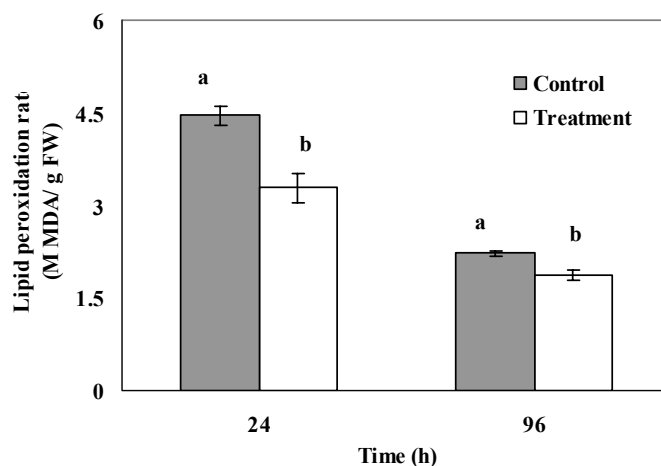
به منظور سنجش میزان آسکوربات کل و دهیدروآسکوربات، نمونه‌های ریشه منجمد شده (۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر)، در ۳ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۵ درصد (حجم/وزن) ساییده شد. سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به بخش شناور رویی حاصل ۸۰۰ میکرولیتر فسفات پتاسیم ۱۵۰ میلی‌مولار با $pH=6/4$ افزوده شد. به مخلوط فوق به ترتیب: ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۲۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد (حجم/وزن)، ۲۰۰ میکرولیتر اورتوفسفریک اسید ۴۴ درصد (حجم/حجم)، ۲۰۰ میکرولیتر بی‌پیریدین ۴ درصد (حجم/وزن) و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آهن ۳ درصد (حجم/وزن) افزوده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان، میزان دهیدروآسکوربات نمونه‌ها در دانسیته نوری ۵۲۵ نانومتر تعیین شد.



شکل ۱- تأثیر آلومینیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در قلمه‌های ریشه‌دار شده لیسیاتوس، (A) SOD، (B) CAT و (C) APX. داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.



شکل ۲- تأثیر آلومینیم بر فعالیت پراکسیداز در قلمه‌های ریشه‌دار شده لیسیانوس. فعالیت آنزیم در سه بخش محلول SPO (A)، یونی IPO (B) و کووالانی CPO (C) تعیین شد. داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.



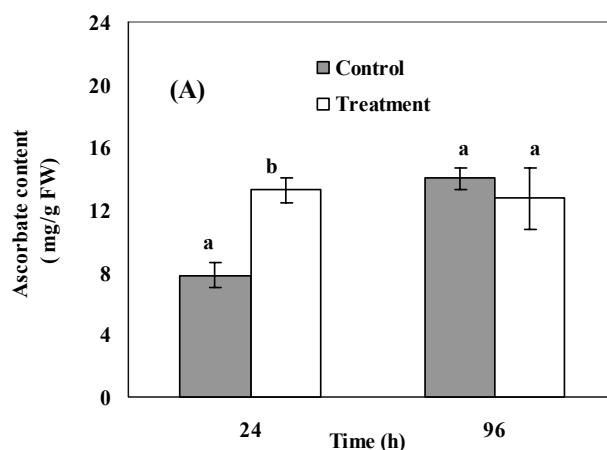
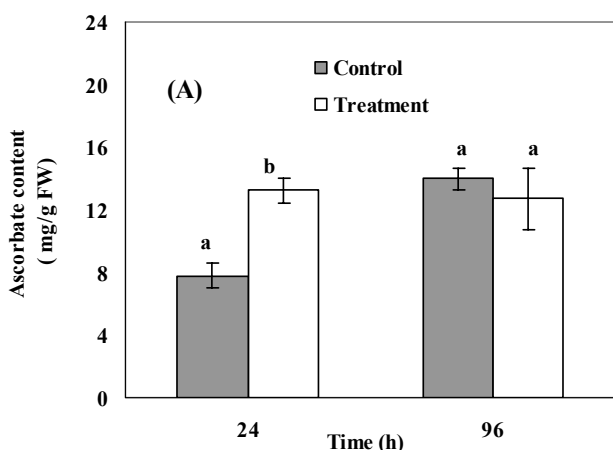
شکل ۳- اثر آلومینیم بر پراکسیداسیون لیپید در قلمه‌های ریشه‌دار شده لیسینتوس. داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در ریشه گیاهان تیمار شده با آلومینیم، در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۳).

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان آسکوربات کل و دهیدروآسکوربات در تیمار آلومینیم در ریشه پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌دار داشت، در حالی که در مقایسه با گیاهان شاهد، میزان این ترکیبات در تیمار ۹۶ ساعته تفاوت معنی‌داری نداشت.

میزان آسکوربات کل و دهیدروآسکوربات



شکل ۴- مقدار آسکوربات کل (A) و دهیدروآسکوربات (B) در قلمه‌های ریشه‌دار شده لیسینتوس. داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. در هر گروه حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

مقادیر لیگنین و میزان جذب آلومینیم

شاهد، به نصف کاهش یافت. در پایان دوره تیمار (۹۶ ساعت)، میزان جذب آلومینیم، به میزان ۴۰ درصد افزایش نشان داد (جدول ۱).

میزان لیگنین در ریشه ۲۴ ساعت پس از تیمار با آلومینیم نسبت به شاهد افزایش معنی داری داشت، حال آنکه پس از ۹۶ ساعت به طور تقریبی نسبت به نمونه‌های

جدول ۱- مقادیر آلومینیم و لیگنین در ریشه‌های لسیانتوس پس از تیمار با آلومینیم. داده‌ها میانگین سه تکرار و علامت ستاره، نشان‌دهنده تفاوت معنی دار تیمار با کنترل در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون T. Test است.

	شاهد	تیمار
مقدار آلومینیم پس از ۹۶ ساعت ($\mu\text{g.g FW}^{-1}$)	780.7 ± 25	$8395.2 \pm 226^*$
مقدار لیگنین (% of wall dry weight) پس از ۹۶ ساعت	1.74 ± 0.1	$0.85 \pm 0.1^*$
مقدار لیگنین (% of wall dry weight) پس از ۲۴ ساعت	1.293 ± 0.3	$3.36 \pm 0.1^*$

بحث

چگونگی تخریب اکسیداتیو اجزای سلولی، اثر آن بر سیستم آنتی اکسیدان و ایجاد ترکیبات ROS ضروری به نظر می‌رسد. گونه‌های فعال اکسیژن در فرآیندهای انتقال الکترون در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسیزوم‌ها تشکیل می‌شوند. گیاهان در شرایط فیزیولوژیک، با فعالیت متابولیت‌ها و آنزیم‌های مختلف آنتی اکسیدان غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را کنترل می‌کنند. ممانعت از ایجاد سمیت توسط این ترکیبات با وجود نقش مؤثر آن‌ها در رشد، توسعه و سیگنالینگ گیاه حائز اهمیت است (Dat et al. 2000).

افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی اکسیدان در تیمار آلومینیم در گیاه لسیانتوس نشان می‌دهد که مکانیسم تحمل در آن مانند چای (Ghanati et al., 2005) *Miscanthus* و *Andropogon virginicus* L.، سرکوب تخریب اکسیداتیو با تحریک آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز است. دیسموتاسیون آنیون‌های سوپر اکسید توسط SOD و به دنبال آن افزایش فعالیت

سمیت آلومینیم یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد محصولات زراعی در خاک‌های اسیدی است. گونه‌های گیاهی متحمل آلومینیم با مکانیسم‌های متعدد با آثار سمی آن مقابله می‌کنند. شواهد نشان می‌دهد که بسیاری از گونه‌های گیاهان دولپه و تک لپه با ترشح اسیدهای دی و تری کربو کسلیک مانع از ورود آلومینیم به درون سلول‌های ریشه می‌شوند. بدین ترتیب، با ایجاد ترکیبات پایدار و غیر سمی، آلومینیم در نوک ریشه تجمع می‌یابد (Kochian, 1995; Pineros et al. 2008).

گرچه در تحقیق حاضر ترشح اسیدهای آلی به منظور ممانعت از ورود آلومینیم توسط ریشه لسیانتوس بررسی نشده است، ولی این امر با توجه به افزایش ۴۰ درصدی جذب این عنصر پس از تیمار بعید به نظر می‌رسد. تیمار آلومینیم سبب تجمع پراکسیدهای لیپیدی در بافت‌ها می‌شود که نشان‌دهنده تنش اکسیداتیو است (Koshian, 2007; Becana, 1995). علی‌رغم آنکه مطالعات متعددی در ارتباط با سمیت آلومینیم صورت گرفته است؛ بررسی

احیای رادیکال‌های فنلی می‌شود (Sanchez *et al.*, 1997; Otter and Polle, 1994; Takahama, 1993a, b). در تشکیل لیگنین و دی فرولات آسکوربات موجود در آپوپلاست ابتدا به دی هیدرو آسکوربات تبدیل می‌شود. فرم احیای شده آسکوربات تنها بخش اندکی از واکنش اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط CPO را در *Kalanchoë Picea abies* و *Vigna angularis*, *daigremontiana* (Otter and Polle, 1994; Takahama, 1993a, b). مهار می‌کند.

در برخی تحقیقات بر نقش پراکسیدازهای دیواره‌ای در لیگنینی شدن و همراستایی افزایش فعالیت CPO با افزایش میزان لیگنین تأکید شده است (Pandolfini *et al.*, 1992; Wakabayashi *et al.*, 2009). در تحقیق حاضر نیز کاهش فعالیت CPO با کاهش میزان لیگنین در تیمار ۹۶ ساعته با آلومینیوم همراستاست، اما در تیمار ۲۴ ساعته، علی‌رغم کاهش فعالیت CPO میزان لیگنین ریشه نسبت به شاهد افزایش یافت. ذکر این نکته نیز ضروری است که به غیر از پراکسیدازها، آنزیم‌های دیگری نظیر لاکازها نیز می‌توانند واکنش رادیکالی شدن فنلها و اتصال پراکسیدی آنها به یکدیگر را پیش ببرند (Haroldson *et al.*, 2006).

بررسی فعالیت آنزیم لاکاز در بازه‌های زمانی مختلف تیمار لیسانتوس با آلومینیوم در تحقیقات آینده ممکن است بتواند توجیه مناسب‌تری برای این امر ارائه کند.

CAT و جاروب کردن H_2O_2 سبب تنظیم فعالیت پراکسیدازهای مختلف سلول مانند APX می‌شود. آنزیم‌های پراکسیداز در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نظیر کاتابولیسیم اکسین، دفاع در برابر پاتوژن‌ها، اتصالات عرضی میان پروتئین‌های دیواره، برقراری پیوند میان ترکیبات دیواره سلولی، اکسیداسیون سینامیل الکل‌ها و سنتز و پلیمریزاسیون لیگنین و سوبرین نقش دارند (Law *et al.*, 1983; Aquino-Bolaños and Mercado-Silva, 2004). در مرحله پایانی سنتز لیگنین اتصالات اکسیداتیو مونولیگنول‌ها با واکنش رادیکال‌های آزاد وابسته به H_2O_2 (به عنوان پذیرنده الکترون پراکسیداز متصل به دیواره) صورت می‌گیرد. به همین جهت، انتظار می‌رود که افزایش فعالیت کاتالاز و در نتیجه، کاهش میزان ترکیبات ROS (به طور ویژه H_2O_2) سبب کاهش فعالیت پراکسیداز، کاهش محتوای لیگنین و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید شود. به این ترتیب، کاهش مقدار لیگنین در ریشه‌های لیسانتوس پس از ۹۶ ساعت تیمار با آلومینیوم، می‌تواند در راستای افزایش چشمگیر فعالیت کاتالاز در این تیمار توجیه گردد. آسکوربات یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان زیستی است که در واکنش احیای فنوکسی رادیکال‌ها به عنوان الکترون‌دهنده ثانویه نقش دارد. این ترکیب در واکنش با پراکسید هیدروژن سبب

منابع

Aquino-Bolaños, E. N. and Mercado-Silva, E. (2004) Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biology and Technology* 33: 275-283.

Becana, M. (2007) Oxidative stress as a response to salinity and aluminum. *Lotus Newsletter* 37(3): 98-100.

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.
- Cakmak, I. and Horst, W. J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83: 463-468.
- Dat, j., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 779-795.
- Ezaki, B., Nagao, E. Yamamoto Y., Nakashima S., and Enomoto, T. (2008) Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Andersson are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. *Plant Cell Reports* 27: 951-961.
- Farrokhzad A. R., Khalighi, A., Mostofi, Y. and Naderi, R. (2006) Effect of some chemical treatments on quality and vase life of lisianthus (*Eustoma grandiflora*) cut flowers. *Acta Horticulturae* 768: 479-486.
- Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H. (2005) Effect of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and Soil* 276: 133-141.
- Iiyama, K. and Wallis, A. F. A. (1990) Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *Journal of Science and Agriculture* 51: 145-161.
- Kochian, L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46:237-260.
- Konishi, S., Miyamoto, S. and Taki, T. (1985) Stimulatory effects of aluminum on tea plants growth under low and high phosphorus supply. *Soil Science and Plant Nutrition* 31:361-368.
- Law, M. Y., Charles, S. A. and Halliwell, B. (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Journal of Biochemistry* 253: 109-116.
- Liao, I. J., Lin, Y. H., Huang, K. L. and Chen, W. S. (2001) Vase life of *Eustoma grandiflora* as affected by aluminum sulfate. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42: 35-38.
- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S. and Takahashi, E. (1976) Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiology* 17: 627-631.
- Ogawa, T., Matsumoto, C. and Tezuka, T. (2000) Effect of Ca on Al-induced activation of antioxidant enzymes in the needles of Hinoki Cypress (*Chamaecyparis obtuse*). *Journal of Forest Research* 5: 81-85.
- Otter, T. and Polle, A. (1994) The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant and Cell Physiology* 35:1231-1238.
- Pandolfini, T., Gabbrielli, R. and Comparini, C. (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L.. *Plant and Cell Environment* 15: 719-725.
- Pineros, M. A., Cancxado, G. M. A. and Kochian, L. V. (2008) Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in xenopus oocytes: Functional and structural

- implications. *Plant Physiology* 147: 2131-2146.
- Richards, H. D., Schott, E. J., Sharma, Y. K., Davis, K. R., and Gardner, R. C. (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116: 409-418.
- Sánchez, M., Quiejeiro, E., Revilla, G. and Zarra, I. (1997) Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine hypocotyls. Effect on peroxidase activities associated with cell walls. *Physiologia Plantarum* 101: 815-820.
- Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U. and Weschke, W. (2000) Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum* 109: 435-442.
- Takahama, U. 1993a. Redox state of ascorbic acid in the apoplast of stems of *Kalanchoë daigremontiana*. *Physiologia Plantarum* 89:791-798.
- Takahama U. (1993b) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant and Cell Physiology* 34:809-817.
- Wakabayashi, K., Nakano, S., Soga, K. and Hoson, T. (2009) Cell wall-bound peroxidase activity and lignin formation in azuki bean epicotyls grown under hypergravity conditions. *Journal of Plant Physiology* 166: 947-954.
- Yamamoto, Y., Rikiishi, S., Chang, Y., Ono, K. Kasai, M. and Matsumoyo, H. (1994) Quantitative estimation of aluminum toxicity in cultured tobacco cells: Correlation between aluminum uptake and growth inhibition. *Plant and Cell Physiology* 128: 63-72.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, R. S., Rikiishi, S. and Matsumoyo, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* 128: 63-72.

Promotional effects of aluminum on antioxidant system of lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.)

*Faezeh Ghanati and Farnoosh Nemati

Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University

Abstract

Rooted cuttings of lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) were treated with aluminum as AlCl₃ to a final concentration of 0.88 mM at a constant pH of 4.5 for 96 hours. Significant increases were observed in the activities of superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase of roots of Al-treated plants as compared to those of the corresponding control plants. The activity of peroxidases and the level of peroxidation of membrane lipids of the aluminum - treated plants were significantly lower than those of the control plants. About 40% of supplied aluminum was absorbed by lisianthus plants during 96 h treatment. The results suggested that not only aluminum did not have any detrimental effects on lisianthus roots but also it triggered the activation of enzymatic antioxidant system of the plant. Therefore, Al can be introduced as a beneficial element for the growth of lisianthus plant.

Key words: Aluminum, Peroxidase, Antioxidant system, Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.), Lignin