دانشکده علوم زیستی

رساله جهت دریافت درجه دکتری تخصصی
رشته زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی گیاهی

عنوان:

تغییرات آناتومیکی و متابولیکی رسوب لیگنین طی مراحل مختلف تکوینی در هالوفیت الروپوس لیتورالیس(*Aeluropus littoralis* Parl.)

استادان راهنما :
دکتر احمد مجد
دکتر قربانعلی نعمت زاده

استاد مشاور:
دکتر پریسا جنوبی

نگارش :
صدیقه کلیج

آبان ۱۳۹۲

تقدیم به:

همه کسانی که لحظه ای بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش نمی کنند و بر آستان گران سنگ انسانیت سر فرود می آورند و انسان را با همه تفاوت هایش ارج می نهند.

تقدیم به:

همسرم، اسطوره صبر و تحمل و همدلی کسی که حضورش مایه آرامش من است

و

دخترم، گل نازم کسی که آسایش او آرامش من است.

تقدیر و سپاس

شکر شایان نثار ایزد منان که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. پس از ارادت خاضعانه به درگاه خداوند بی همتا، بر خود لازم می دانم تا از استاد بزرگوارم ، استاد فرزانه ام ، جناب آقای دکتر احمد مجد، چهره ماندگار رشته زیست شناسی که در کمال سعه صدر از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند قدردانی و تشکر کنم و از خداوند متعال برای ایشان آرزوی سلامتی و بهروزی را دارم. از استاد گرانمایه و فرزانه ام جناب آقای دکتر قربانعلی نعمت زاده ، از اساتید و پژوهشگران برتر کشوری، نهایت تشکر را به خاطر راهنمایی این رساله دارم و از خداوند متعال برای ایشان که پدرانه در انجام این پروژه یاریم کردند آرزوی توفیق و سلامتی را دارم. تشکر و سپاس از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر پریسا جنوبی که زحمت مشاوره این رساله را به عهده داشتند، توفیق روز افزون ایشان را از درگاه خداوند متعال خواستارم.

از جناب آقای دکتر فرخ قهرمانی نژاد به خاطر زحمت داوری این رساله و همچنین زحماتی که در سایر امور مربوط متحمل شدند وهمچنین از جناب آقای دکتر سعید آیریان که داوری این پایان نامه را تقبل کردند بسیار سپاسگزارم. مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به سرکار خانم دکتر فائزه قناتی و سرکار خانم دکتر عذرا صبورا که زحمت داوری این رساله را به عهده داشتند ابراز می دارم. از دگر اساتید محترم ، دکتر رضانژاد، دکتر عسکری، دکتر پیردشتی ،دکتر فیاض، دکتر علی نژاد، دکتر دانشمند، دکتر مظفری و دوستانم در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان ، دکتر دهستانی، دکتر پاک دین، مهندس علوی، شاهین،هاشمی، شکری، نصیری، قاسمی ،رضایی، حسین پور، اصغرزاده و همکارانم در گروه زیست شناسی دانشگاه مازندران و سایر دوستان و دوست خوبم خانم لیلا حقیقی که بی شک بدون یاری و همراهی ایشان انجام این امر میسر نبود تقدیر و تشکر می کنم.

از پدرم، معلم ایستادگی و مقاومت و مادرم، نازنینی که سراسر زندگی اش درس ایثار و فداکاری است بسیار سپاسگزارم.

از همسر مهربانم، همو که حس تعهد و مسئولیت را در زندگی مان تلالویی خدایی داده است و از فرزند دلبندم، دختر منطقی ام ، فاطمه جانم که صبورانه من را همراهی نموده است تشکر می کنم.

خدایا چنان کن که پایان کار تو خشنود باشی و ما رستگار

چکیده

رسوب لیگنین در دیواره های سلولی یکی از پاسخ های مشترک گیاهان به انواع مختلف تنش های زیستی و غیر زیستی است. در پژوهش حاضر تغییرات در آناتومی، فعالیت برخی از آنزیمهای موثردر بیوسنتز لیگنین و بیان ژن های آنها به همراه تغییرات در مقدار و ترکیب لیگنین تحت تنش شوری در هالوفیت *Aeluropus littoralis* Parl. طی بلوغ و تکوین میانگره ها مطالعه شد. مطالعات هیستوشیمی لیگنین به کمک روش های رنگ آمیزی با فلوروگلوسینول و واکنش Maule، فعالیت آنزیم ها به روش اسپکتوفتومتری و بیان ژن آنها با تکنیک Real Time PCR انجام شد. همچنین برای تعیین محتوی لیگنین از روش استیل برماید و به منظور شناسایی مونومرهای لیگنین از روش تیواسیدولیز و آنالیز GC-MS استفاده شد. در *Aeluropus littoralis* Parl. تنش شوری موجب کاهش شاخص های رشد ساقه گردید. تحت تنش شوری و در موقعیت های مختلف میانگره ای تغییرات آناتومیکی در سطح مقطع عرضی ، تعداد دستجات آوندی، ضخامت پوست، ضخامت اندودرم، قطر عناصر گزیلمی و وسعت بافت فلوئمی درمیانگره ها مشاهده شد. در مطالعات هیستوشیمی لیگنین هر دو روش رنگ آمیزی با فلوروگلوسینول و واکنش Maule الگوی تقریبا یکسانی از کلیات رسوب لیگنین تحت تنش شوری و طی بلوغ میانگره ای را نشان دادند. براساس هر دو روش افزایش رسوب لیگنین با افزایش غاظت نمک و با افزایش سن میانگره ها مشاهده شد. نتایج حاصل از واکنش Maule نشان دادکه لیگنین G در میانگره های راسی رسوب می کند درحالیکه رسوب لیگنین S با پیشرفت مراحل بلوغ میانگره ها افزایش می یابد. تنش شوری سبب افزایش مشخصی در میزان پروتئین کل در میانگره های الروپوس لیتورالیس گردید در حالیکه بلوغ میانگره ها منجر به کاهش غلظت پروتئین کل شد. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) در گیاهان الروپوس لیتورالیس تیمار شده با NaCl افزایش یافت. بالاترین سطح فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در میانگره های راسی و پایین ترین آن در میانگره های قاعده ای یافت شد در حالیکه فعالیت آنزیم سینامیل الکل دهیدروژناز در میانگره های میانی به بالاترین سطح خود رسید. در این مطالعه افزایش شدید بیان ژن PAL تحت تنش شوری در هر سه موقعیت میانگره ای قابل توجه بود. اما افزایش بیان ژن CAD تحت تنش شوری در مقایسه با ژن PAL چندان قابل توجه نبود. نتایج این پژوهش همچنین نشان می دهد که بیان ژن های PAL و CAD تحت تاثیر بلوغ میانگره ها تغییر می کند. سطح بیان ژن PAL به طور مشخص در طول ساقه از راس به قاعده کاهش یافت. اما سطح mRNA ی CAD در بخش میانی و تاحدی تحتانی بیشتر از بخش های راسی

بود. در میانگره های الروپوس لیتورالیس تیمار شده با نمک محتوی لیگنین کل در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان داد و همچنین طی بلوغ میانگره ها تجمع لیگنین از راس به سمت قاعده افزایش یافت. آنالیز GC-MS نشان داد که تنش شوری و افزایش سن میانگره ها به طور مشخص سبب افزایش مونومر سیرنژیل (S) در ترکیب لیگنین شد. همچنین تنش شوری موجب افزایش مونومر G نیز شد اما همراه با افزایش تنش شوری به طور هماهنگ درصد مونومر G افزایش نیافت. نتایج هماهنگ حاصل از بررسی های مورفولوژیکی، هیستوشیمیایی و متابولیکی بیانگر اثر تنش شوری در لیگنینی شدن و فرایندهای مرتبط با آن در الروپوس لیتورالیس است. نتایج پژوهش حاضر ضمن ارائه اطلاعات پایه ای از فرایند لیگنینی شدن در هالوفیت الروپوس لیتورالیس بیان می کند که به احتمال این هالوفیت با کاهش رشد، تغییرات ساختاری، افزایش فعالیت آنزیم ها و بیان ژن های موثر در بیوسنتز لیگنین و به دنبال آن افزایش در مقدار و تغییر در ترکیب لیگنین قادر به تحمل بهتر شرایط شور می باشد.

کلمات کلیدی: الروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*)، تنش شوری ، لیگنین، میانگره.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه ۱
۱- ۱- اهمیت لیگنین برای گیاه ۱
۱-۱-۱- لیگنین عاملی برای تکامل گیاهان خشکی زی ۱
۱-۱-۲- نقش های هدایتی و استحکامی لیگنین ۲
۱-۱-۳- لیگنین عامل مقاومت و سدی در برابر تنش ها ۳
۱-۲- معضلات لیگنین برای انسان ۳
۱-۳- ویژگی های ساختاری عمومی لیگنین ۴
۱-۴- تمایز یک عنصر چوبی گزیلوژنز ۷
۱-۴-۱- تقسیم سلول های مریستمی ۷
۱-۴-۲- طویل شدن سلول ۷
۱-۴- ۳- تشکیل دیواره ثانویه ۸
۱-۴-۴- مرگ برنامه ریزی شده سلول ۹
۱-۴-۵- سیگنال های هورمونی کنترل کننده تمایز عناصر گزیلمی ۱۰
۱-۴-۶- ژن های کنترل کننده تمایز عناصر گزیلمی ۱۱
۱-۴-۶-۱- کنترل ژنی تقسیم سلولی ۱۱
۱-۴-۶-۲- کنترل ژنی مرحله طویل شدن ۱۲
۱-۴-۶-۳- ژن های موثر در بیوسنتز ترکیبات اصلی دیواره ثانویه ۱۳
۱-۴- ۶-۴- کنترل ژنی مرحله مرگ برنامه ریزی شده سلولی ۱۴
۱-۵- بیوسنتز لیگنین ۱۴
۱-۵-۱- تحولات یاخته ای همراه با بیوسنتز لیگنین ۱۴
۱-۵-۲- تشکیل مونومرها در سیتوپلاسم ۱۵
۱-۵-۳- انتقال مونولیگنین ها و رسوب لیگنین در دیواره ۱۶
۱-۶- آنزیم فنیل آلانین امونیالیاز ۲۱
۱-۷- آنزیم سینامیل الکل دهیدروژناز ۲۴
۱-۸- لیگنین در گراسه ها ۲۷

۱-۹- هیستوشیمی لیگنین ۲۹
۱-۱۰- محتوی لیگنین کل ۳۰
۱-۱۱ – ترکیب لیگنین ۳۱
۱-۱۲- تنش شوری و اثر آن بر روی رشد ونمو گیاه ۳۳
۱-۱۳- هالوفیت ها ۳۵
۱-۱۳-۱- سازوکارهای ساختاری مقاومت در هالوفیت ها ۳۷
۱-۱۴- الروپوس لیتورالیس ۴۱
۱-۱۴-۱- مشخصات گیاه شناسی الروپوس لیتورالیس ۴۱
۱-۱۴-۲- الروپوس لیتورالیس به عنوان یک منبع ژنتیکی قوی ۴۲
۱-۱۴-۳- الروپوس لیتورالیس علوفه با ارزش ۴۴
۱-۱۴-۴- الروپوس لیتورالیس گونه ای برای اصلاح اراضی شور ۴۴
۱-۱۴-۵- الروپوس لیتورالیس کاندیدی برای تولید سوخت های زیستی ۴۵
۱-۱۵- اهداف پژوهش ۴۶

فصل دوم: مواد و روش ها

۲- مواد و روش‌ها ۴۹
۲-۱- کاشت گیاهان و اعمال تیمار ۴۹
۲-۱- ۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای کاشت گیاهان و اعمال تیمار ۴۹
۲-۱- ۲- روش کاشت گیاهان و اعمال تیمار ۵۰
۲-۲- برداشت و ذخیره سازی نمونه ها ۵۱
۲-۲-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای برداشت و ذخیره سازی نمونه ها ۵۱
۲-۲-۲- روش برداشت و ذخیره سازی نمونه ها ۵۲
۲-۳- اندازه گیری و شاخص های رشد ۵۳
۲-۳-۱- تجهیزات لازم برای اندازه گیری شاخص های رشد ۵۳
۲- ۳-۲- روش اندازه گیری شاخص های رشد ۵۳
۲-۴- مطالعات آناتومی ۵۴
۲-۴-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای مطالعات آناتومی ۵۴
۲-۴-۲- روش مطالعات آناتومی ۵۴
۲-۵- سنجش پروتئین کل ۵۵
۲-۵-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای سنجش پروتئین کل ۵۵

۲-۵- ۲- روش استخراج پروتئین و سنجش آن ۵۵
۲-۶- سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز ۵۷
۲-۶-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز ۵۷
۲-۶-۲- روش سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز ۵۷
۲-۷- سنجش فعالیت سینامیل الکل دهیدروژناز ۵۹
۲-۷-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای سنجش فعالیت سینامیل الکل دهیدروژناز ۵۹
۲-۷-۲- روش سنجش فعالیت سینامیل الکل دهیدروژناز ۵۹
۲-۸- مطالعه الگوی بیان ژن ۶۰
۲-۸-۱- تکنیک Real Time PCR ۶۰
۲-۸-۲- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای بررسی الگوی بیان ژن ۶۲
۲-۸- ۳- طراحی آغازگر ۶۳
۲-۸-۴- استخراج RNA ۶۳
۲-۸- ۵- حذف DNA ژنومی ۶۶
۲-۸-۶- سنتز cDNA ۶۶
۲-۸-۷- تست آغازگرهای ژن های PAL و CAD ۶۷
۲-۸-۸- واکنش Real Time PCR ۶۸
۲-۹- سنجش لیگنین کل ۷۱
۲-۹-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای استخراج دیواره سلولی ۷۱
۲-۹-۲- روش استخراج دیواره سلولی ۷۱
۲-۹-۳- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای سنجش لیگنین کل ۷۲
۲-۹-۴- روش سنجش لیگنین کل ۷۲
۲-۱۰- تعیین ترکیب لیگنین ۷۳
۲-۱۰-۱- تجهیزات و مواد مورد نیاز برای تعیین ترکیب لیگنین ۷۳
۲-۱۰-۲- روش تیواسیدولیز ۷۴
۲-۱۱- آنالیز آماری ۷۷

فصل سوم : نتایج

۳- نتایج ۷۸
۳-۱- شاخص های رشد ۷۸
۳-۲- مطالعات آناتومی ۸۱

۳-۲-۱- تشریح ساقه ۸۱
۳-۲-۲- تغییرات ساختاری میانگره ها تحت تنش شوری و طی بلوغ ۸۱
۳-۲- ۳- هیستوشیمی لیگنین ۹۳
۳-۲- ۳-۱- رنگ آمیزی با فلوروگلوسینول ۹۳
۳-۲- ۳-۲- واکنش Maule ۹۴
۳-۳- سنجش پروتئین کل ۹۸
۳-۴- فعالیت آنزیم فنیل الانین آمونیالیاز..... ۹۹
۳-۵- فعالیت آنزیم سینامیل الکل دهیدروژناز..... ۹۹
۳-۶- مطالعات مولکولی ۱۰۰
۳-۷- محتوی لیگنین کل..... ۱۰۸
۳-۸ – مونومرهای لیگنین ۱۰۹

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴- بحث و نتیجه گیری ۱۱۴
۴-۱- شاخص های رشد ۱۱۴
۴-۲- مطالعات آناتومی..... ۱۱۷
۴-۲- ۱- تغییرات ساختاری میانگره ها..... ۱۱۷
۴-۲- ۲- هیستوشیمی لیگنین ۱۲۲
۴-۳- پروتئین ۱۲۴
۴-۴- آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، سینامیل الکل دهیدروژناز و محتوی لیگنین کل ۱۲۶
۴-۴-۱- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز ۱۲۶
۴-۴-۲- فعالیت آنزیم سینامیل الکل دهیدروژناز ۱۲۷
۴-۴-۳- محتوی لیگنین کل ۱۲۸
۴-۴- ۴- ارتباط بین فعالیت آنزیم ها و لیگنین کل..... ۱۳۱
۴-۵- الگوی بیان ژن های PAL و CAD تحت تنش شوری و طی بلوغ ۱۳۲
۴-۶- ترکیب لیگنین تحت تنش شوری و طی بلوغ ۱۳۶
۴-۷- نتیجه گیری نهایی ۱۳۹
۴-۸- پیشنهادات ۱۴۱

فصل پنجم : منابع

۵- منابع .....

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- اهمیت لیگنین برای گیاهان

۱-۱-۱- لیگنین عاملی برای تکامل گیاهان خشکی زی

لیگنین واژه ای عمومی برای گروه بزرگی از پلیمرهای آروماتیک است که به طور عمده در دیواره ثانویه سلول های گیاهی رسوب کرده تا آنها را سخت و غیر قابل نفوذ سازد. ایده عمومی بر این است که لیگنین طی سازگاری گیاهان با زندگی خشکی، متحول شده تا حمایت ساختاری لازم برای رشد قائم آنها را فراهم سازد. مطالعات مقایسه ای ژنومیکس بر اساس ژنوم گیاهان قابل دسترسی نشان داد که مسیر بیوسنتز لیگنین ابتدا در خزه(*Physcomitrella*) هویدا شد اما در جلبک های سبز دیده نشد(Vanholme et al. 2010). جلبک های دریایی و برخی گیاهان آبزی که درون آب رشد می کنند فشار هیدروستاتیک یکنواختی پیکر آنها را از تمام جهات حمایت می کند و تفاوت زیادی بین دانسیته سلول های این گیاهان و محیط آبی اطراف آن وجود ندارد. بنابراین چنین گیاهانی به بافت های استحکامی قوی نیاز ندارند و در دیواره سلولی آنها فقط پلی ساکاریدها یافت می شود. اما گیاهانی که روی زمین رشد می کنند در پیرامون آنها محیطی با دانسیته پایین تر یعنی هوا وجود دارد و بدین ترتیب پیکر آنها در معرض بسیاری از فشارهای مکانیکی چون باران، برف و بادهای شدید قرار دارد (Harkin. 1969). در حدود ۴۳۰ میلیون سال قبل، در دوره سیلیورین گیاهان مجهز به سیستم آوندی شدند تا قادر به گسترش در سطح خشکی باشند. این واقعه یکی از مهمترین مراحل تکامل بود که منجر به تشکیل گیاهان آوندی یا تراکئوفیتا شد. توانایی سنتز لیگنین و الحاق آن به دیواره سلول ها برای انتقال آب و استحکام به گیاهان اجازه داد تا به طور قائم رشدکرده و به ارتفاع بیشتر دسترسی پیدا کنند به دنبال آن با دریافت نور بیشتر بازده

فتوسنتزی و کارایی اندام ها افزایش یافت. بنابراین به نظر می رسد به خاطر نقش اساسی لیگنین در حمایت ساختاری و انتقال آب ، گیاهان آوندی به محیط خشکی دسترسی یافته و تکامل و تنوع یافتند (Legay. 2008). در بین تمام تراکئوفیتا درختان به علت پیکر بزرگ به هر دو عامل حمایت ساختاری و انتقال آب بسیار نیازمند هستند و مطابق با آن میزان زیادی از لیگنین را در چوب خود می سازند، ۱۵ تا ٪۳۶ از وزن خشک چوب درختان را لیگنین تشکیل می دهد. از اینرو لیگنین یکی از فراوان ترین پلیمرهای طبیعی جهان بعد از سلولز (Whetten Sederoff. 2000).

۱-۱-۲- نقش های هدایتی و استحکامی لیگنین

لیگنینی شدن دیواره سلول های گیاهی با دو هدف استحکامی و هدایتی صورت می گیرد تا عناصر استحکامی یعنی اسکلرانشیم و عناصر هدایتی یعنی عناصر آوندی چوبی تشکیل شوند. عناصر اسکلرانشیمی شامل دو نوع فیبر و اسکلرید است که به ویژه در اندام های هوایی گسترش داشته و در ایجاد مقاومت و حمایت مکانیکی دخالت دارند. عناصر آوندی چوبی شامل دو نوع تراکئید و آوند چوبی است که در انتقال آب و املاح از یک بخش گیاه به بخش دیگر دخالت دارند. گرچه به طور متداول، عناصر اسکلرانشیمی و آوندی با داشتن دیواره های چوبی مشخص می شوند اما یاخته های چوبی شده دیگری نیز وجود دارند از جمله یاخته های پارانشیمی مغز ساقه و اندودرم ریشه ها. تشکیل کاه در غلات نتیجه چوبی شدن عمومی دیواره های سلولی ساقه ها و برگ ها است. یاخته هایی که به طور معمول چوبی نمی شوند تحت تاثیر شرایط خاص چوبی شده، از طرفی چوبی شدن عناصر اسکلرانشیمی و آوندی هم در شرایط خاص بسیار کند شده و کاهش می یابد (مجد و قربانلی ۱۳۷۶).

۱-۱-۳- لیگنین عامل مقاومت و سد دفاعی در برابر انواع تنش ها

علاوه بر دخالت لیگنین در رشد و نمو گیاهان، مقاومت در برابر انواع تنش های زیستی و غیر زیستی نیز از اعمال مهم لیگنین در گیاهان شناخته شده است. انواع مختلف تنش های غیر زیستی نظیر خشکی، شوری، دماهای پایین، فلزات سنگین، کمبود مواد معدنی، اشعه ماورا بنفش و همچنین تنش های زیستی مانند عفونت های قارچی، باکتریایی و ویروسی سبب تغییرات در محتوی لیگنین گیاهان می شوند (Moura et al. 2010). وجود لیگنین به همراه سایر ترکیبات فنلی در دیواره موجب مقاومت سلول های گیاهی در برابر فرایند هضم شده و مانع از تغذیه آنها در برابر چرای دام و حملات شدید پرندگان می شوند. لیگنین، سلول های گیاهی را در برابر آسیب های مکانیکی حفظ کرده و یک سد فیزیکی را در دیواره سلول های گیاه میزبان در برابر هجوم قارچ های بیماریزا تشکیل می دهد (Santiago et al. 2013).

۱-۲- معضلات لیگنین برای انسان

درحالیکه لیگنین از نظر بیولوژیکی برای گیاهان بسیار مهم است مقدار، ترکیب و پراکنش لیگنین در گیاهان برخی نتایج منفی را برای استفاده بشری به دنبال دارد. حضور لیگنین در محصولات علوفه ای سبب کاهش قابلیت هضم و به دنبال آن کاهش ارزش علوفه ای آنها می شود. لیگنین ها احتمالا تنها اجزاء ساختاری دیواره بوده که در برابر هضم باکتریایی و قارچی دیواره های سلولی در معده مقاوم هستند. برخی از مطالعات به بررسی بیوسنتز و ویژگی های بیوشیمیایی لیگنین و اثر آن در قابلیت هضم دیواره های سلولی به منظور بهبود قابلیت علوفه ای در گراسه های علوفه ای مربوط می شود (Grabber et al. 2004).

از طرفی حضور لیگنین مانع بزرگی در صنعت کاغذ سازی است. تقریبا کلیه خصوصیات لیگنین در کاغذسازی نقش منفی دارند و کاغذهای با کیفیت خوب از الیافی ساخته می شوند

که تقریبا عاری از لیگنین هستند. لیگنین سبب شکننده شدن کاغذ شده و به دلیل اکسایش نوری و تشکیل گروههای رنگی سبب افزایش زردی و تیرگی کاغذ می شود. از اینرو حذف صنعتی لیگنین در مراحل تهیه خمیر کاغذ صرف انرژی و هزینه های زیادی را به دنبال دارد (لکورج و موقرنژاد. ۱۳۸۳).

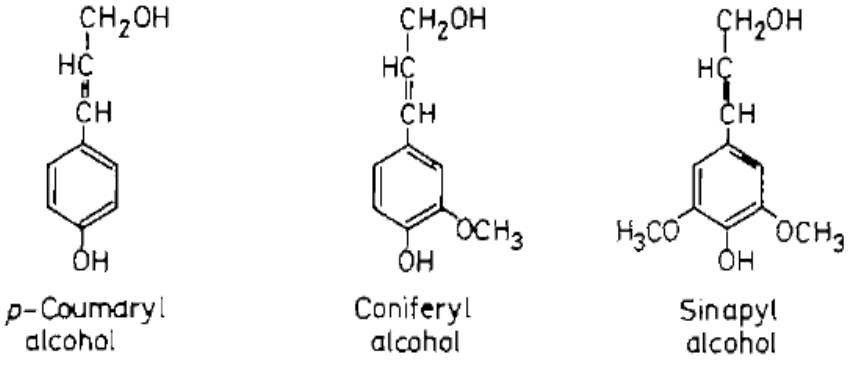
در بین ترکیبات موجود در دیواره های سلول گیاهی، لیگنین به علت ارتباط با اسیدهای فنلی به راحتی قابل تجزیه زیستی نبوده و مانع از آزاد شدن قندها و به دنبال آن تولید اتانول می شود. از اینرو وجود لیگنین در دیواره سلول های گیاهی مانعی برای تولید سوخت های زیستی که اساس آن تولید اتانول است می باشد و تحقیقات بسیاری برای کاهش مقدار لیگنین از طریق تغییرات ژنتیکی در گیاهان مفید برای تولید سوخت های زیستی در حال انجام است (Abhdeen et al. 2011).

۱-۳- ویژگی های عمومی لیگنین

لیگنین به عنوان ماده پلی فنلی بی شکل بوده که از پلیمریزاسیون دهیدروژنازی منومرهای فنیل پروپانوئیدی شامل (۱) کونیفریل[1]، (۲) سیناپیل[2] و (۳) p-کوماریل الکل[3] با دخالت آنزیمی منشاء می گیرد. واحدهای اولیه سازنده این پلیمرها از نوع فنیل پروپان هستند (یک هسته بنزوئیک دارای یک عامل فنلی و یک زنجیر سه کربنی، C_6-C_3) که توسط تعداد متیل اکسیدهای خود از یکدیگر مشخص می شوند. طرز نامگذاری این هسته های حلقوی به این

[1] - Coniferyl
[2] - Synapyl
[3] - P-Comaryl alcohol

صورت است که اگر در واحد ساختمانی این منومرها هیچ گروه متیل اکسیدی وجود نداشته باشد آن را حلقه هیدروکسیل بنزوئیل[1] (H) یا کوماریلیک الکل گویند. اگر در واحد ساختمانی این منومرها یک گروه متیل اکسید (روی کربن ۳) وجود داشته باشد آن را حلقه گایاسیل[2] (G) یا کونیفریلیک الکل گویند. اگر دو گروه متیل اکسید (روی کربن های ۳و۵) وجود داشته باشد آن را حلقه سیرنژیل[3] (S) یا سیناپیلیک الکل گویند (شکل۱-۱).[4]



شکل۱-۱- ساختار منومرهای سازنده لیگنین برگرفته از Lin and Dence. 1993

مقدار و ترکیب لیگنین برحسب انواع تاکسون ها، سلول ها و لایه های دیواره سلولی متفاوت بوده و تحت تاثیر عوامل محیطی و مراحل تکوینی تغییر می کند. مقدار الکل کوماریلیک که دارای حلقه (H) و بدون گروه متیل اکسید است به طور معمول کم است (حدود ۵ تا ۱۰ درصد به ویژه تک لپه ایها). نسبت بین منومرهای متیل دار و واجد حلقه های G و S بر حسب گونه ها متغیر است و دارای ارزش شیمیوتاکسونومی است: مقدار درصد بالایی (۸۰ تا ۹۰ درصد) از کونیفریلیک الکل در مخروطیان مثل کاج و سرو وجود دارد. این الکل در گیاهان آوندی ابتدایی یعنی نهانزادان آوندی و نیز در بازدانگان اولیه زیاد است. الکل سیناپیلیک در

[1] - Hydroxy benzoyl
[2] - Guiacyl
[3] -Synapyl

نهاندانگان فراوان است (تا ۵۰ درصد). بر حسب مقدار این الکل ها دو نوع چوب در نظر گرفته می شود: چوب G یا چوب بازدانگان و چوب S یا چوب نهاندانگان (چوب پهن برگان: بلوط، راش، تبریزی و غیره (مجد و قربانلی، ۱۳۷۶). معمولا مقدار لیگنین در تیغه میانی و گوشه های سلول بیشتر از لایه S_2 دیواره ثانویه است با این حال به دلیل اینکه قسمت اعظم دیواره توسط این لایه احاطه می شود بالاترین مقدار لیگنین در دیواره ثانویه دیده می شود. دیواره ثانویه عناصر آوندی معمولا دارای محتوی لیگنین بیشتری نسبت به فیبرها هستند. همچنین لیگنین موجود در دیواره عناصر آوندی معمولا غنی از واحدهای G درحالی که لیگنین موجود در دیواره فیبرها غنی از واحدهای S هستند. نسبت بالایی از واحدهای S نیز در دیواره ثانویه پارانشیم های اشعه دیده می شود (Boerjan et al. 2003).

یک دلیل دیگر ناهمگنی چوبها از تنوع در وضع اتصال منومرهای آنها است. در بیشتر موارد تراکم منومرها با فعال شدن مجدد اتصال های دوتایی زنجیره سه کربنی و عامل فنلی همراه است. از یک چنین وضعی یک ماکرومولکول شبکه مانند در سه بعد ایجاد می شود که بسیار حجیم و نامحلول است. این شبکه مولکولی در فضای دیواره ای گسترش می یابد. ارتباطات بین پلیمرهای فنلی با دیگر مواد زمینه ای دیواره ای (پلی اوزیدهای خنثی یا اسیدی، گلیکوپروتئینهای دیواره ای) می تواند توسط پیوند غیرکووالانسی یا پیوندهای کووالانسی صورت پذیرد. این پیوندها به ویژه نتیجه خواص واکنشی هیدروکسیل ها یا کربوکسیل ها (استری شدن) برقرار می شوند (مجد و قربانلی، ۱۳۷۶).

۱-۴- تمایز یک عنصر چوبی: گزیلوژنز[1]

برای مدت زمان طولانی تشکیل یک عنصر چوبی بر اساس مشاهدات فیزیکی سلول های در حال تمایز توصیف شده بود. این فرایند معمولا به چند مرحله شامل تقسیم سلول های مریستمی، طویل شدن سلول های مادر چوبی، تشکیل دیواره سلولی ثانویه و در نهایت مرگ برنامه ریزی شده سلولی است.

۱-۴-۱- تقسیم سلول های مریستمی

سلول های پروکامبیومی و یا کامبیومی با تقسیمات مماسی سلول های مادر چوبی را ایجاد می کنند، میتوز در طول دیواره های طولی سلول اتفاق می افتد و دوک میکروتوبولی کروموزوم های جدا شده را به سمت دیواره های مماسی می کشاند بعد از هدایت ماشین فراگموپلاست به محور مرکزی و استقرار وزیکول هایی غشایی در ناحیه میانی و تشکیل دیواره جداکننده سلول های مادر چوبی تشکیل می شوند (Rensing et al. 2002).

۱-۴-۲- طویل شدن سلول

سلول های مادر چوبی در جهت طولی و عرضی طویل شده تا به اندازه نهایی خود می رسند گسترش سلول های مادر چوبی یکی از شگفت انگیزترین پدیده ها در سلول های گیاهی است که در مورد عناصر آوندی به ۳۰۰۰۰ برابر می رسد. فشار تورگر درون سلول یکی از نیروهای محرک است که دیواره ها را به سمت بیرون می فشارد. در یک لحظه طویل شدن دیواره سلولی باید همراه با اضافه شدن مواد سازنده به دیواره باشد تا از گسیختگی مکانیکی دیواره سلولی نازک جلوگیری شود، طی مرحله طویل شدن سلول آرایش دوباره میکروتوبول ها

1- Xylogenesis

مشاهده می شود که از آرایش کاملا تصادفی به آرایش مارپیچی تغییر یافته و با مکـان رسـوب دیواره ثانویه همخوانی دارد (Chaffey et al.2002).

۱-۴-۳- تشکیل دیواره ثانویه

در مورد انواع عناصر چوبی تمایز، اغلب با تشکیل دیواره سلولی ثانویه بر روی دیواره اولیه به سمت فضای درونی نهایی می شود. هم زمان با اینکه سلول های در حال تمایز به اندازه نهـایی خود می رسند دیواره سلولی اولیه شکل نهایی خـود را یافتـه و رسـوب دیـواره سـلولی ثانویـه صورت می گیرد. تشکیل دیواره ثانویه هم حمایت مکـانیکی (عناصـر آونـدی و فیبرهـا) و هـم مقاومت در برابر فشار آب (عناصر آوندی) را برای این سلول ها فراهم می کند. ۳ لایه مختلـف S1 ، S2 و S3 دیواره ثانویه بر روی دیواره اولیه رسوب مـی کننـد کـه ایـن سـه لایـه از نظـر ضخامت و آرایش میکروفیبریل های سلولزی متفاوت هستند. ترکیب دیواره ثانویه از یک لایـه به لایه دیگر به تدریج تغییر مـی یابـد امـا معمـولا شـامل ۵۰-۴۰ درصـد سـلولز، ۲۵ درصـد همی سلولز، ۳۰-۲۵ درصد لیگنین است (Plomion et al. 2001).

رسوب دیواره سلولی ثانویه به ویژه در عناصر آوندی بسیار سازمان یافته است و بـه صـورت تصادفی نیست بلکه کاملا از یک الگوی مشخص پیروی می کند و حد و مرز تشـکیل صـفحات منفذدار و پیت های آینده را تعیین می کند. میکروتوبول ها حاشیه ای برای قرارگیری درسـت دیواره ثانویه و تعیـین الگـوی آرایـش آن لازم هسـتند. نظـر بـر ایـن اسـت کـه دسـته هـای میکروتوبولی در بین دیواره اولیه و ثانویه تشکیل می شوند تا هم میکروفیبریل هـای حاصـل از کمپلکس سلولز سنتاز و هم وزیکول های گلژی محتوی مـواد دیـواره ای را بـه سـمت دیـواره ثانویه هدایت کنند (Oda and Hasezawa. 2006). از طرفی ایـن عقیـده هـم وجـود دارد کـه