فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱-۱ تنش اکسیداتیو و سیستم آنتی‌اکسیدان در گیاهان

انفجار تنفسی (Oxidative burst, Respiratory burst) به معنی رها شدن سریع گونه‌های اکسیژن فعال است و پاسخ شایع سلول‌های گیاهی به تنش‌های زیستی (نظیر قارچ، باکتری و ویروس) و یا غیرزیستی (مثل شوری، یخزدگی، پرتو فرابنفش، فلزات سنگین، ازون و سایر آلاینده‌ها) می‌باشد (Dordas and Brown 2005).

رادیکال‌های آزاد و از جمله آنها، گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) ، کلیه مولکول‌هایی با یک یا چند الکترون جفت نشده در اربیتال هستند که به دلیل داشتن این ویژگی، تمایل زیادی به واکنش با سایر مولکول‌ها دارند (Bhattacharjee 2005) و در نهایت باعث آپوپتوزیس و مرگ سلول‌ها می‌شوند (Dordas and Brown 2005).

اکسیژن عنصری ضروری در مسیرهای متابولیکی هوازی است که دارای پتانسیل احیایی می‌باشد و ۱٪ از آن در حین احیا شدن به آب، گونه‌های فعال بسیار سمی تولید می‌کند. تجمع این گونه‌های فعال در طول متابولیسم طبیعی و یا تنش‌های محیطی گاه منجر به اکسیداسیون مولکول‌های زیستی می گردد که با وارد آمدن خسارات شدید به سلول همراه است. همه انواع ROS قادرند با DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها واکنش دهند (Dat *et al.* 2000). در واقع می‌توان گفت از عوامل داخلی آسیب رسان به مولکول‌های زیستی (که اغلب غیر رادیکال بوده و دارای جفت الکترون هستند)، آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشند که طی

فرایندی به نام تنش اکسیداتیو، بیشترین آسیب را با تبدیل مولکول غیر رادیکال به رادیکال و ایجاد گونـه های بسیار فعال و پایدار وارد می‌کنند.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مولکول‌های کوچک و بسیار فعال دارای اکسیژن هستند. این گونه‌ها به دلیل ساختار ناپایدار خود می‌توانند با سایر مولکول‌ها، اتم‌ها و یا حتی الکترون‌های منفرد واکنش داده و ترکیب پایدار ایجاد نمایند. در طی این مرحله گونه‌های فعال متفاوتی به عنوان تولیدات حدواسط تشکیل می‌شوند. مهمترین گونه‌های فعال اکسیژن، رادیکال آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) هستند (Franco *et al*. 2008).

احیای اکسیژن مولکولی طی چهار مرحله صورت می‌پذیرد و بنابراین چندین گونه فعال O_2 تولید می شود :

$$O_2 \rightarrow (H)\, O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + H_2O \rightarrow 2\, H_2O$$

رادیکال سوپراکسید، کوتاه‌زی، ناپایدار و غیرقابل انتشار بوده و یک اکسیدکننده ضعیف محسوب مـی شود که باعث تسهیل واکنش Fenton می‌گردد. واکنش‌های Fenton و Haber-Weiss (Olcum 2003):

	$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$
Fenton Reaction	$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{\bullet}$
Haber-Weiss Reaction	$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + HO^{\bullet} + HO^{\bullet} + Fe^{3+}$
	$HO^{\bullet} + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2^{\bullet-} + H^+$

این رادیکال در محیط‌های آب‌گریز (مانند غشاهای داخلی) فعال است و نیمه عمری معادل ۲-۴ µs دارد (Bhattacharjee 2005)، درحالیکه H_2O_2 یا پراکسید هیدروژن، گونه پایدارتر با نیمه عمری طولانی‌تر درحدود ۱ms است و از آنجا که از قابلیت انتشار بالایی برخوردار است، مسبب بسیاری از واکنش‌های خطرناک از طریق میانکنش‌های Fenton می‌باشد. این گونه محصول فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و

چندین اکسیداز پراکسیزومی است (Agarwal and Shaheen 2007). لازم به ذکر است که H_2O_2 با پلیمریزه کردن پیش‌ساز چوب، در چوبی‌شدن دیواره نقش دارد و همچنین بعنوان پیامبر ثانویه در مسیرهای انتقال سیگنال عمل کرده و منجر به سازگاری در برابر تنش‌ها می‌گردد.

رادیکال هیدروکسیل یا $OH^{\cdot -}$ آخرین گونه احیا شده است که بسیار ناپایدار بوده ونیمه عمر کمتر از ۱μs دارد و در مکان تولید، تمایل زیادی به مولکول‌های زیستی از خود نشان می‌دهد (Olcum 2003, Anderson and Padhye 2004).

لازم به ذکر است که انتقال علامت بواسطه ROS تنها در صورتی پیشرفت می‌کند که این رادیکال‌ها از روند تخریبی بوسیله سیستم آنتی‌اکسیدان بگریزند. گیاه نیز با استفاده از سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی از خود در قبال ROS حفاظت می‌کند (Agarwal and Shaheen 2007).

۱-۱-۱ منابع داخلی تولید ROS

قدرتمندترین منبع تولید ROS در گیاه کلروپلاست است که بخصوص در شرایط کاهش تثبیت CO_2 و نیز طی فتولیز آب، در فتوسیستم‌های I و II و طی انتقال الکترون، در مرکز Fe-S ، تیوردوکسین احیایی و فردوکسین در شرایط کاهش دسترسی به $NADP^+$ در چرخه کالوین، رادیکال آزاد تولید می‌کند. علاوه بر این اندامک، پراکسیزوم (با ایجاد فسفوگلیکولات در طی تنفس نوری)، میتوکندری (درپی فسفریلاسیون اکسیداتیو، فعالیت NADPH دهیدروژناز مولد $O_2^{\bullet -}$ و مهار مسیر جایگزین اکسیداز مقاوم به سیانید)، شبکه آندوپلاسمی (از طریق آنزیم‌های اکسیژنازی که از NADPH به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند و فعال شدن سیتوکروم p450 درون این اندامک از طریق مکانیسم‌های چرخه‌ای اکسیداسیون- احیا)، غشا پلاسمایی به واسطه داشتن NADPH اکسیداز (NOX) و دیواره سلولی (به دلیل حضور فنیل‌پروپانوئید اسیدهای پیش‌ساز لیگنین و پراکسیدازها)، از دیگر مکان‌های تولید ROS محسوب می‌شوند (Del Rio *et al*. 2002).

از مهمترین منابع خارجی تولید ROS، می‌توان به زنوبیوتیک‌های (Xesenobiotic) مختلف، مواد کلردار (Chlotinated Compound) و پرتوهای مانند اشعه فرا بنفش، آلودگی هوا و دود سیگار، اشاره کرد (Franco *et al*. 2008).

چنانکه ذکر شد گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش‌های متفاوت و متناقضی بوده و گاه باعث تشدید خسارت به گیاه می‌شوند و یا بالعکس در مواقعی باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ سلولی و بروز پاسخ-های دفاعی می‌گردند. در هر صورت ROS اکسیدکننده است و می‌تواند واکنش‌های زنجیره‌ای را ایجاد کند که قادر به تغییر سریع اعمال یا ساختارهای مولکولی هستند. بنابراین نوع و غلظت آنها عامل کلیدی و تعیین کننده مفید و یا مضر بودن آنها محسوب می‌شود. بدیهی است که چنین عملکرد دوگانه‌ای به کنترل دقیق منابع متعدد مولد ROS و سیستم‌های جاروب کننده آنها در سطح سلول بستگی دارد (Dat *et al.* 2000).

بنابراین می‌توان گفت تنش اکسیداتیو توصیف‌کننده میانکنش‌های اکسیژن مولکولی (O_2) یا مشتقات فعال آن با مولکول‌های زیستی است و از عدم تعادل بین نیروهای آنتی‌اکسیدان (آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی‌اکسیداتیوها) و گونه‌های فعال اکسیژن، در سلول حاصل می‌شود که قادر به تغییر غیر قابل برگشت اجزا سلول هستند.

در انسان نیز تنش اکسیداتیو با تولید ROS در میتوکندری همراه است که زمینه را برای بروز بیماری‌های با منشا پاتوژن، انواع سرطان، سالخوردگی و مرگ سلول مناسب می‌کند (Franco *et al.* 2008).

۱-۱-۲ معرفی سیستم آنتی‌اکسیدان با تاکید بر نقش کاتالاز

یکی از عوامل اصلی در موفقیت فرایندهای متابولیکی در کلیه موجودات هوازی از جمله گیاهان، مکانیسم های دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی آن است که سطح تجمع ROS را به حداقل می‌رساند و لازمه رشد و بقای گیاه محسوب می‌شود. سیستم دفاعی آنتی اکسیدان شامل آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز CAT (EC

(1.11.1.6، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD (EC 1.15.1.1، پراکسیداز (PO (EC 1.11.1.7 و آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل فلاونوئیدها، فنل‌ها، آسکوربات، آلفا توکوفرول و بتاکاروتن و غیره می‌باشد (Karabal *et al*. 2003, Dat *et al.* 2000, Yang and Poovaiah 2004).

کاتالاز آنزیم معرف پراکسیزوم‌ها و گلی‌اکسیزوم‌ها می‌باشد که در حالت فعال خود بصورت تترامر (معمولا هوموتترامر) و محتوی هم (Heme) است. این آنزیم در کلیه موجودات هوازی موجود بوده و در جاروب کردن H_2O_2 نقش دارد. ایزوفرم‌های کاتالاز در بسیاری از گونه‌ها نظیر *Nicotiana plumbaginifolia*، *Cucurbita pepo*، *Arabidopsis thaliana* شناخته شده است. کاتالاز در تجزیه رادیکال پراکسید هیدروژن نقش دارد که محصول جانبی و مضر بسیاری از فعالیت‌های متابولیسم طبیعی مثل تنفس نوری است (Dat *et al.* 2000). بعلاوه اهمیت کاتالاز در *Capsicum annuum* نیز به اثبات رسیده است. در این گیاه کاتالاز در اکسیداسیون 5-epi-aristolochene به capsidiol در شرایط هوازی نقش دارد و در نتیجه به مکانیسم‌های دفاعی در آن کمک شایانی می‌نماید (Yamada *et al.* 1998).

براساس مطالعات انجام گرفته بر روی آرابیدوپسیس مشخص شد که ایزوفرم‌های کاتالاز از ۳ ژن منشا می‌گیرند. در واقع این سه ژن به اشکال متفاوتی بیان شده و قادرند شش ایزوزیم متفاوت تشکیل دهند. در این بین CAT1 و CAT2 دارای ۴۹۲ آمینواسید بوده و وزن آنها حدود ۵۴ و۵۶ KDa است (Verslues et al. 2007). در آرابیدوپسیس CAT1 به میزان محدود در بافت‌های رویشی سبز و به میزان بیشتری در دانه‌ها بیان شد. بیشترین بیان در بافت‌های رویشی متعلق به CAT2 است که در ریتم‌های شبانه‌روزی نیز نقش مهمی در سمیت‌زدایی از H_2O_2 بر عهده دارد. جالب اینجاست که CAT3 نیز بصورت شبانه‌روزی تنظیم می‌شود ولی درست بر خلاف CAT2 تحت تاثیر طول دوره تاریکی قرار می‌گیرد و این بیانگر عملکرد متفاوت این ژن از دیدگاه مولکولی در جاروب کردن رادیکال پراکسید هیدروژن است (Verslues *et al.* 2007).

در سالهای اخیر در انسان و جانوران نیز توجه زیادی به کاتالاز معطوف شده است که به دلیل ارتباط آن با انواع سرطان‌ها، دیابت و سالخوردگی می‌باشد (Akyilmaz and Kozgus 2009).

۱-۲ معرفی بورون و نقش‌های فیزیولوژیکی آن در گیاه

۱-۲-۱ اهمیت بورون در موجودات زنده

بورون یکی از هشت ریزمغذی (Micronutrient) ضروری برای گیاه است که تنها غیرفلز در بین آنها محسوب می‌شود. بورون برخلاف سایر ریز مغذی‌ها در خاکی با pH خنثی به شکل غیریونی یعنی بوریک اسید (H_3BO_3) موجود است و در pH بالاتر بصورت $B(OH)_4^-$ وجود دارد (Yang *et al* 2004). پس جذب B از خاک‌های خنثی یا کمی اسیدی عمدتاً به صورت بوریک‌اسید است (Hu and brown 1997) که مولکولی کوچک و فاقد بار می‌باشد. طبق معادله زیر فعالیت اسیدی بوریک‌اسید بیشتر به دریافت OH^- بوسیله آن مربوط می‌شود، تا دادن H^+ ؛

$$B(OH)^-_4 + H_3O^+ \rightarrow B(OH)_3 + 2H_2O$$

اصلی‌ترین نقش بورون در گیاهان، تثبیت شبکه پکتینی دیواره سلولی و حفظ تمامیت غشا و عملکرد آن است. علاوه بر این B در متابولیسم نوکلئیک اسیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، ایندول استیک اسید و فنل‌ها نقش داشته و در لگوم نیز در گرهک‌سازی و تثبیت نیتروژن تاثیر قابل توجهی دارد (Tanaka and Fujiwara 2007, Zehirov and Georgiev 2006, Kakegawa 2005). اهمیت B بعنوان عامل تنظیم کننده رشد لوله گرده با تاثیر بر میزان تجمع کالوز و پکتین اسیدی، محتوای فنولیک و کربوکسیلیک اسیدها و نیز محتوای استرهای اشباع موجود در لوله گرده گزارش شده است. همچنین بورون در مراحل رویشی (مثل طویل شدن ریشه) و زایشی (مثل تولید گل و دانه) نقش کلیدی و تنظیم کننده دارد. کاهش B منجر به کاهش درصد جوانه زنی و افزایش رشد طولی لوله گرده می‌شود (درویش ۱۳۸۴).

یکی از خصوصیات مهم بوریک اسید توانایی تشکیل کمپلکس‌های سیس دی‌ال با بسیاری از مولکول‌های آلی است.

اسید بوریک + قندالکل = کمپلکس[بورون - قند الکل]

$H_3BO_3 + 2C_6O_6H_{14} = [(C_6O_6H_{12})B(C_6O_6H_{12})] + H_3O^+ + 2H_2$

ترکیبات زیستی که می‌توانند با بورون کمپلکس ایجاد نمایند، هم در سیتوپلاسم و هم در دیواره سلولی وجود دارند. این ترکیبات شامل قندها، مشتقات آنها (قندالکل‌ها)، فنل‌ها، اسیدهای آلی و برخی پلیمرها می‌باشند (Ghanati *et al.* 2002). همچنین سوربیتول، مانیتول، گلیسرول، ریبوز، آپیوز، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید NAD و فروکتوز نیز این امکان را دارند. کمپلکس‌های بورون با مانوز، سوربیتول، و فروکتوز اخیراً جداسازی و شناسایی شده‌اند که وزن مولکولی کمی دارند (Tanaka and Fujiwara 2007, Zehirov and Georgiev 2006).

غلظت بورون در گیاه در درجه اول تابع مرحله رشد و میزان نیاز اندام مورد نظر است. اما آنچه در مورد این عنصر همواره از اهمیت برخوردار بوده، وجود دامنه‌ای باریک بین سطح سمیت (B-toxicity) و سطح کفایت (B-sufficient) یا کمبود (B-deficient) است که بر این اساس افزایش یا کاهش مقادیر جزئی از عنصر اثرات چشمگیری بر ویژگی‌های آناتومیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه، میزان جذب و انتقال سایر عناصر و نیز فعالیت سیستم آنتی اکسیدان دارد (Gupta 2007).

بورون یکی از پنج عنصر شیمیایی مهم در صنعت داروسازی محسوب می‌شود که بطور گسترده برای درمان کمبود بورون، سرطان، آرتریت روماتوئید، کمبود ویتامین D ، کلسترول زیاد و لوسمی بکار می‌رود. مکمل‌های بورون نقش فعالی در به تاخیر انداختن روند سالخوردگی و افزایش طول عمر دارند. در واقع بورون با جلوگیری از پوکی استخوان سالخوردگی را به تاخیر می‌اندازد، چراکه در استخوان‌ها بصورت ترکیبات محلول به میزان زیاد وجود دارد.

جالب اینجاست که مکمل‌های بورون اغلب برای افرادی که بطور منظم از آنتی‌اسید استفاده می‌کنند، توصیه می‌شود. بعلاوه این عنصر نقش محوری در مسیرهای بیوشیمیایی موجود در انسان دارد و با تشدید ترکیبات آلی متنوع نظیر کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها و پروتئین‌ها و نیز خصوصیات آنتی‌اکسیدانی قوی که باعث کاهش اثرات مضر رادیکال‌های آزاد می‌گردند از بروز بیماری‌های مختلف نظیر سرطان جلوگیری می‌کند (Anonymous 2009). همچنین بورون از خسارت ناشی از تابش نوترونی و شکست زنجیره‌های

DNA که منجر به مرگ نورون‌ها شده و ریسک از دست دادن حافظه را افزایش می‌دهند، ممانعت می‌کند (Watt 2000).

از سوی دیگر مصرف غلظت‌های بالای بورون منجر به بروز خارش‌های پوستی، ریزش مو، سردرد، افت فشار خون و بی‌خوابی می‌گردد (Sullivan 2002).

۱-۲-۲ تاثیر کمبود بورون بر گیاه

کمبود بورون یکی از شایع‌ترین کاستی‌ها در عناصر ریزمغذی محسوب می شود و بر میزان تولید محصولات تاثیرگذار است (Tanaka and Fujiwara 2007، Gupta 2007). کمبود بورون با تاثیر بر مراحل رویشی و زایشی باعث مهار رشد، مرگ مریستم‌های در حال رشد، مهار تکوین غلاف آوندی و کاهش فتوسنتز می‌گردد. در مرحله زایشی کمبود بورون باعث مهار تکوین گل، نر عقیمی، تشکیل دانه و جنین ناقص و میوه‌های بد شکل می‌شود. این نشانه‌های کمبود، نمایانگر دو ویژگی فیزیولوژیکی مهم بورون هستند؛ نخست نقش ساختاری بورون در رشد دیواره سلولی، حفظ تمامیت غشا و عملکرد آن و نیز تعدیل و تنظیم فعالیت‌های آنزیمی مثل فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و دوم تولید متابولیت‌های گیاهی نظیر فنولیک‌ها، آسکوربات وگلوتاتیون (Dordas and Brown 2005).

حذف بورون از محلول غذایی باعث بروز تغییرات منفی سریع در روند رشد و نقل و انتقالات غشایی در سلول‌ها شده و در نهایت به از بین رفتن پایداری غشا (Cell membrane Stability) و نشت مواد محلول به درون آپوپلاست منجر می‌گردد (Zehirov and Georgiev 2006).

عموماً گیاهان تک‌لپه‌ای، نسبت به دولپه‌ای‌ها نیاز کمتری به بورون دارند، بنابراین برخی تیره‌های دولپه نسبت به مقادیر اضافی بورون متحمل‌ترند. مطالعات نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای یکی از اصلی‌ترین علل تفاوت گونه‌ها در جذب غلظت‌های مختلف بورون می‌باشد (Yang *et al;* 2004).

۱-۲-۳ تاثیر مقادیر اضافی بورون بر گیاه

بورون بر بسیاری از فرآیند های متابولیکی مختلف مثل فتوسنتز، تنفس و سنتز پروتئین تاثیرگذار است. دو جنبه مختلف سمیت بورون عبارتند از مهار تقسیم و توسعه سلول؛ که در غلظت‌هایی با مقادیر کمتر بورون رخ می دهد و مرگ بافت‌های بالغ؛ که در غلظت‌های بالاتر اتفاق می‌افتد. سمیت بورون در سطح سلول همراه است با کاهش ضریب میتوزی (mitotic index) در مریستم ریشه که باعث قطعه قطعه شدن کروموزوم و چسبندگی کروموزوم می‌شود (Choi *et al.* 2007).

از سوی دیگر بورون از اجزای مهم دیواره اولیه محسوب می‌شود و مقادیر اضافی آن می‌تواند باعث اختلال در رشد با دخالت در سنتز دیواره سلولی گردد. Dannel و همکاران در ۱۹۹۸ با مطالعه بر روی آفتابگردان دریافتند که محتوای بورون دیواره سلولی در حضور غلظت‌های زیاد بورون نظیر مقدار آن در زمانی است که بورون در سطح کفایت وجود دارد. این نتایج نشان می‌دهد که ظرفیت اتصال بورون به دیواره سلولی ثابت است و مقادیر اضافی بورون از دیواره سلول به داخل محیط می‌روند. از طرف دیگر Ghanati و همکاران نیز در ۲۰۰۲ نشان دادند که سطح سوبرین و لیگنین در سلول‌های توتون کشت شده در معرض ۱۰ mM بورون، افزایش یافت و منجر به عدم انعطاف پذیری ماتریکس دیواره سلولی گردید. پس افزایش بورون علاوه بر تاثیر در سطح گیاه کامل و سلول با افزایش مواد فنولی به عنوان متابولیت ثانویه همراه است که نوعی پاسخ دفاعی از جانب گیاه محسوب شده و به جاروب کردن رادیکال-های آزاد می‌انجامد. در واقع غلظت‌های بالاتر بورون در بسیاری از گونه‌ها منجر به وارد آمدن خسارات اکسیداتیو در اندام‌های مختلف شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش می‌دهد (Cervilla and Blasco 2007).

همانطور که قبلا نیز اشاره شد، هدف احتمالی دیگر برای بورون، غشای پلاسمایی است که دارای بقایای هیدروکسیل در گلیکوپروتئین، گلیکولیپیدها و پروتئین‌های غشایی می‌باشد (Reid *et al.* 2004). این در حالیست که افزایش غلظت بورون باعث مهار H^+-pump وابسته به ATP در وزیکول‌های

میکروزومی می‌شود. H^+-ATPase نقش کلیدی در انتقال مواد غذایی از غشا دارد و با پمپ پروتون باعث حفظ تورژسانس می‌شود (Reid *et al.* 2004).

در مبحث فیزیولوژی مکانیسم‌های خارجی تحمل سمیت بورون (مکانیسم‌های خروج یا راه ندادن آن) باید گفت درگونه‌های مختلف، غلظت بورون در برگ‌ها و ساقه‌ها معمولا رابطه‌ای با تحمل بورون ندارد. اگرچه در ژنوتیپ‌های مستعد سمیت بورون نسبت به ژنوتیپ‌های متحمل معمولا غلظت‌های بالاتری از بورون در برگ و ساقه‌ها وجود دارد (Nable *et al.* 1997).

۱-۳ معرفی آلومینیوم و تقابل آن با سیستم آنتی اکسیدان گیاه

۱-۳-۱ دلایل اهمیت آلومینیوم و پیامدهای حضور آن در موجود زنده

آلومینیوم فلزی سه ظرفیتی است که با توجه به فراوانی آن در پوسته زمین (بعنوان سومین عنصر فراوان پس از اکسیژن و سیلیکون) ، یکی از معضلات عمده در میزان تولید محصول در خاک‌های اسیدی محسوب می شود. در واقع از آنجا که ٪۴۰ از خاک‌های جهان را، خاک‌های اسیدی در بر می‌گیرد، آلومینیوم محلول تحت چنین شرایطی (pH اسیدی کمتر از ۵) بصورت یونهای Al^{3+} در می‌آید که سمی ترین حالت آنست و تولید محصولات زراعی را با خطر جدی مواجه می‌گرداند (Taiz and Zeiger 2002, Wang *et al*. 2006). از سوی دیگر استفاده از کودهای آمونیومی، تجمع مواد آلی، رشد لگوم‌ها و نیز باران‌های اسیدی به اسیدی شدن خاک و در نتیجه افزایش مشکلات در بخش کشاورزی و اکوسیستم‌های طبیعی می‌انجامد (Wang *et al*. 2006، Miayasaka 2007). البته این فلز در خاکی با pH خنثی بصورت سیلیکاته یا اکسید وجود دارد که هر دو فرم آن غیر سمی هستند (Tahara and Yamanoshita 2008).

هر چند با افزودن آهک به خاک اسیدی می‌توان از میزان تولید محصول حفاظت کرد، ولی اثرات و آلودگی‌های ناشی از پسماندها بسیار نامطلوب هستند. همچنین استفاده از آهک به دلیل حرکت کند آن در لایه‌های عمیق خاک‌های زیرین باعث کاهش دسترسی به عناصر غذایی می‌شود.

اولین پاسخ گیاه به سمیت Al، مهار رشد ریشه است و برخی علائم ظاهری آن عبارتند از بی‌رنگ شدن ریشه، واکوئلی شدن و turnover دانه‌های نشاسته درون سلول‌های کلاهک، تخریب دیکتیوزوم‌ها و عملکرد ترشحی آنها. اصلی‌ترین علائم تجمع آلومینیوم در نوک ریشه که منجر به مهار رشد آن می‌شود نیز رسوب کالوز و لیگنین است (Tahara and Yamanoshita 2008 و Rout *et al.* 2001).

پیامد حضور آلومینیوم در گیاه، کاهش جذب مواد غذایی و آب و در نتیجه کاهش رشد گیاه است. همچنین تاثیر Al در ساختار و عملکرد اسکلت سلولی با تاثیر بر سنتز لیگنین و ترکیبات فنولی باند شده به دیواره، دپلاریزه کردن غشا پلاسمایی، اثر بر تمامیت و یکپارچگی غشا از طریق اتصال به لیپیدها و پراکسیداسیون آنها و پروتئین‌های موجود و در نتیجه افزایش نفوذپذیری غشا تحت تاثیر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، دخالت در هومئوستازی کلسیم و متابولیسم فسفر، به اثبات رسیده است (Ghanati *et al.* 2005، Ogawa 2000، Miayasaka 2007، Wang *et al.* 2006). همچنین این کاتیون فلزی با کاهش فعالیت K-Mg ATPase در غشا پلاسمایی، اختلال در سنتز DNA و طویل شدن سلول، و در نهایت مرگ سلول‌ها در گیاه اثرات منفی برجای می‌گذارد (Yamamoto *et al.* 1994، Ogawa *et al.* 2000، Ezaki *et al.* 2000). همچنین آلومینیوم بر مکانیسم‌های کنترل کننده سازماندهی میکروتوبول‌های اسکلت سلولی مثل پلیمریزاسیون توبولین و به تاخیر افتادن تخریب یا جدایی میکروتوبول‌ها در حین میتوز اثر داشته و از این جهت باعث اختلال در تقسیمات سلولی می‌گردد (Rout *et al.* 2001).

آلومینیوم در آب، هوا و خاک اطراف ما وجود دارد و تحقیقات نشان دهنده جذب و انباشت آن در بدن است. مصرف آلومینیوم بصورت آنتی اسید و داروهای دارای هیدروکسید آلومینیوم ، حضور آن در آب آشامیدنی و مصرف غذایی آن بصورت بکینگ پودر یا انواع پنیر بسیار رایج است و از طرفی بسیاری از نشانه‌های مسمومیت با Al مشابه بیماری‌هایی مثل آلزایمر، پوکی استخوان، فقر کلسیم، بیماری‌های حاد

عصبی، کم خونی، سردرد، کاهش عملکرد کلیه و مثانه ، اختلال در تکلم و از دست دادن حافظه می‌باشد (Perl 2005). بنابراین راه‌های کنترل سمیت آلومینیوم بوسیله مکمل‌های غذایی دارای کلسیم و بورون، مولتی ویتامین‌ها و کمپلکس‌های ویتامین B میسر می‌شود که با برهم زدن تعادل سموم فلزی به دفع آنها از روده کمک می‌کنند.

۱-۳-۲ مقابله گیاه با حضور آلومینیوم با تاکید بر نقش سیستم آنتی اکسیدان

بیشترین تحقیقات انجام شده تاکنون بر مکانیسم‌های ممانعت از ورود آلومینیوم به سیم‌پلاست متمرکز شده و این در حالیست که تحقیقات کمتری بر روی مکانیسم‌های تحمل آلومینیوم انجام گرفته است.

چنانچه قبلا نیز ذکر شد، ریشه اولین اندامی است که تحت تاثیر سمیت آلومینیوم قرار می‌گیرد. بنابراین گیاه با اعمال یکسری مکانیسم‌ها قادر است از خود در قبال اثرات سمی ناشی از حضور فلز دفاع کند. این مکانیسم‌های تحمل شامل دو گروه عمده می‌باشند:

۱- مکانیسم مقاومت خارجی شامل غیر متحرک کردن آلومینیوم و تجمع آن در دیواره و کاهش ظرفیت تبادل کاتیون، نفوذپذیری انتخابی غشا پلاسمایی و تغییر در پروتئین‌های غشایی، ایجاد سد دفاعی با تغییر pH ریزوسفر یا آپوپلاست ریشه، خروج لیگاندهای همبند شده (کلیت) با آلومینیوم.

۲- مکانیسم‌های داخلی تحمل که اساس آن سمیت‌زدایی و غیر متحرک کردن یون سمی است و شامل همبند شدن آلومینیوم درسیتوزول، کده‌بندی آن در واکوئل و افزایش قدرت تحمل در فعالیت‌های آنزیمی می‌باشد (Dong *et al.* 2002, Wang *et al.* 2006).

تراوش اسیدهای آلی دی و تری‌کربوکسیلیک نظیر سیتریک‌اسید و مالیک‌اسید که قادر به ایجاد کمپلکس قوی با آلومینیوم هستند، روشی دفاعی در برابر Al محسوب می‌شود و از ورود آن به ریشه جلوگیری می‌کند. در واقع ارتباط منفی بین تجمع آلومینیوم در سلول و رها شدن سیترات و مالات در محیط وجود دارد (Wang *et al.* 2006).

یون‌های Al به کندی وارد بخش‌های بالاتر گیاه می‌شوند. در ارتباط با سمیت آلومینیوم، گیاهان پاسخ‌های مختلفی داشته و به صورت متحمل، مقاوم و حساس دسته‌بندی می‌شوند. برخی گیاهان قادرند بیش از ۱۰ برابر گیاه معمول، آلومینیوم را در خود جمع نمایند؛ بدون اینکه خطری آنها را تهدید نماید. گیاه چای یکی از عمده‌ترین تجمع دهندگان آلومینیوم محسوب می‌شود. بررسی‌های انجام شده بر روی کشت سلول و گیاه کامل چای، عدم سمیت آلومینیوم و نیز تحریک رشد در آن را به تاثیر مثبت این یون در افزایش کارایی سیستم ایمنی و فعالیت سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدان نسبت داد (Ghanati *et al.* 2005).

بنابراین باید گفت اگر چه آلومینیوم بعنوان ماده غذایی ضروری محسوب نمی‌شود ولی غلظت‌های نسبی آن می‌تواند باعث افزایش رشد در برخی گیاهان شود (Ghanati *et al.* 2005، Rout *et al.* 2001) که این بهبود رشد ناشی از عملکرد مثبت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی یا غیرآنزیمی در جهت جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن است.

۱-۴ معرفی گیاه لیسیانتوس

گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflora* L.) متعلق به تیره Gentianaceae است که بر اساس سیستم II APG در گروه asterid از dicotyledons قرار می‌گیرد. این گیاه زینتی بومی مناطق گرمسیری آمریکای جنوبی است و به دلیل تنوع رنگی، سایز و شکل گل، همواره مورد توجه مردم می‌باشد. همچنین بدلیل وجود ترکیبات آنتوسیانینی فراوان، آنزیم‌های کلیدی مسیر سنتز آنتوسیانین شامل Chalcone Synthase ، Chalcone Isomerase ، Flavone 3 Hydroxylas ، در آن مورد دست‌ورزی‌های مکرر قرار گرفته‌اند (Ledger 1997). مقاومت به شرایط اسیدی خاک و تحمل گرما، و نیز مقاومت به پاتوژن (بویژه fusarium) و در نتیجه افزایش ماندگاری گلدانی، نیز باعث تمرکز بیشتر پژوهش‌های جدید بر این گیاه شده و از دیدگاه مهندسی ژنتیک، بیوشیمی و فیزیولوژی، بیش از پیش آنرا مورد توجه قرار داده است (Harbugh 2007).

۱-۵ اهداف پژوهش

براساس تحقیقات قبلی مشخص شد که آلومینیوم با کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه لیسیانتوس و کاهش لیگنینی شدن و بدنبال آن تاخیر در استحکام دیواره و پیری سلول‌ها در ریشه و برگ، بر رشد این گیاه اثر تحریکی دارد (نعمتی ۱۳۸۷). از سوی دیگر گزارشات اخیر حاکی از تاثیر بورون بر سمیت آلومینیوم است و مشخص شده است که کاهش بورون نشانه‌هایی مشابه سمیت آلومینیوم دارد و در عین حال در بسیاری از موارد، حضور بورون از سمیت آلومینیوم می‌کاهد. بیشترین تحقیقات انجام شده تاکنون بر مکانیسم‌های ممانعت از ورود آلومینیوم به سیم‌پلاست متمرکز شده و تحقیقات کمتری بر روی مکانیسم‌های تحمل آلومینیوم صورت گرفته‌است. در عین حال تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تاثیر غلظت-های مختلف بورون بر گیاه متحمل آلومینیوم انجام نشده است.

با توجه به تاثیر آلومینیوم و غلظت‌های مختلف عنصر بورون بر سیستم آنتی‌اکسیدان و نیز از آنجا که Al به شکل $Al(OH)_3$ وارد گیاه می‌شود و شباهت ساختاری زیادی به شکل موجود از بورون در گیاه یعنی $B(OH)_3$ دارد، مکانیسم عمل این دو عنصر بر سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه و در نتیجه رشد آن در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مطالعات قبلی (Ghanati *et al.* 2005 ، نعمتی ۱۳۸۷)، پیشنهاد کرده بود که در بین آنزیم‌های جاروب کننده ROS که در حالتی هماهنگ و سینرژیک برای حفظ حیات سلول عمل می‌کنند، کاتالاز آنزیمی کلیدی است که فعالیت سایر جاروب کننده‌های پراکسید هیدوژن نظیر APX و PO را تنظیم می‌کند . از این رو پی بردن به میزان بیان ژن کاتالاز نیز مد نظر قرار گرفت.

از سوی دیگر درصد جوانه زنی بذرها در گیاه لیسیانتوس بسیار پایین است (حدود ٪۱۱) و تکثیر طبیعی آن بواسطه بذر مشکل است و دانه‌رست‌های حاصل، از قدرت رویشی بالایی برخوردار نیستند. لذا یافتن محیطی مناسب به منظور کشت بافت گیاه مذکور با هدف تکثیر و باززایی آن نیز قسمتی از تحقیق حاضر است.

فصل دوم

مواد و روشها

۲-۱ کشت بافت گیاه لیسیانتوس

۲-۱-۱ آماده کردن گیاه جهت کشت بافت

گیاه لیسیانتوس بصورت قلمه‌های ریشه‌دار شده یکساله از بازار گل تهران تهیه و به منظور بررسی-های بیوشیمیایی در شرایط تاریکی و رطوبت به آزمایشگاه انتقال یافت.

قسمت‌های مختلف گیاه (برگ، ساقه، ریشه، گلبرگ و پرچم) انتخاب، جدا و به منظور تهیه ریز نمونه از آنها، شستشو و ضدعفونی شدند. قطعات بافتی جدا شده بمدت ۳۰ ثانیه در شوینده قرارگرفت و سپس در هیپوکلریت سدیم ٪۵ بمدت ۱۵دقیقه غوطه‌ور شد. مرحله شستشو با آب استریل، سه بار تکرار شد و سپس شستشو با اتانول ٪۷۵ در عرض۳۰ ثانیه صورت گرفت و در نهایت شستشو با آب مقطر بطور سطحی انجام شد تا بافت‌ها کاملا ضدعفونی شوند. سپس قطعات بافتی فوق بوسیله اسکالپل و پنس ضدعفونی شده به قطعات کوچکتر تقسیم و وارد محیط‌های تغییر یافته LS ، B5 و MS (جدول ۲-۱) گردید. لازم به ذکر است که هر سه محیط پس از تنظِیم pH ، با آگار ٪۰/۸ جامد شدند. محیط‌های کشت دارای قطعه بافت به اتاقک‌های رشد با شرایط تاریکی و دمای $^{\circ}C$۱- ±۲۲ منتقل گردید.

جدول ۲-۱ عناصر و غلظت‌های لازم به منظور ساخت سه نوع محیط کشت بافت

Components	Modified LS (mg/L)	Modified MS (mg/L)	Modified B5 (mg/L)
NH_4NO_3	1650	1650	–
KNO_3	1900	1900	2500
$CaCl.2H_2O$	440	440	150
$MgSO_4.7H_2O$	370	370	250
$KH_2.PO_4$	170	170	–
$(NH_4)_2SO_4$	–	–	1340
$NaH_2PO4.H_2O$	–	–	150
$MnSO_4.H_2O$	1680	22.30	1000
$ZnSO4.7H_2O$	1060	8.60	200
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25	O.25	25
$CoCl_2.6H_2O$	2.5	0.025	2.5
KI	83	0.083	75
$CuSO_4.5H_2O$	2.5	0.025	2.5
H_3BO_3	618.3	6.20	600
$FeSO_4.7H_2O$	2780	2780	2780
Na_2EDTA	3730	3730	3730
Thiamine-HCl	1250	0.1	10000
Pyridoxine-HCl	625	0.5	1000
Nicotinic Acid	625	0.5	1000
IAA	300	300	–
NAA	300	300	186.21

BA	–	–	22.53
Glycin	–	2	–
Kinetin	100	–	–
Myoinisitol	100	–	100
Sucrose	30000	30000	20000
pH	5.8	5.8	5.5

۲-۲ آماده سازی قلمه‌های ریشه‌دار گیاه لیسیانتوس به منظور اعمال تیمارهای آلومینیوم و بورون

قلمه‌های ریشه‌دار گیاه لیسیانتوس از خاک به محلول هوگلند ۱/۲ منتقل شدند تا بمدت ۱۰ روز در محلول غذایی مذکور با شرایط جدید سازگار شوند. این سیستم هیدروپونیک بصورت پیوسته هوادهی شد و در دمای ۲±۲۵ و شدت نور 115 $\mu Ms^{-1}m^{2}$ قرار گفت. سپس تیمارهای آلومینیوم و بورون به مدت ۲۴ ساعت در اختیار گیاه قرار گرفت. در ادامه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز) و سایر پارامترهای فیزیولوژیکی (محتوای قند، چوب و آنتوسیانین) بررسی شد. ضمن اینکه از همین نمونه‌ها برای سنجش نیمه کمی بیان ژن استفاده گردید.

۲-۲-۱ تهیه محلول غذایی هوگلند۱/۲

محلول تغییر یافته هوگلند (Hoagland and Arnon 1950) مطابق جدول ۲-۲ تهیه و pH آن توسط هیدروکسیدسدیم (NaOH)، معادل ۶ تنظیم شد. محلول غذایی ۴ روز یکبار تعویض گردید. در پایان

روز دهم و به منظور تیماردهی، به کمک کلریدریک اسید، pH معادل ۴/۵-۴ تنظیم شد (چراکه جذب آلومینیوم وابسته به pH است). سپس تیمارها در سه گروه به مدت ۲۴ ساعت اعمال شدند و یک گروه به عنوان شاهد (دارای غلظت بورون ppm ۰/۵)درنظر گرفته شد؛ این گروه‌ها عبارت بودند از: گروه فاقد بورون (B-deficient) که بصورت B– نمایش داده می‌شود، گروهی با غلظت بورون دو برابر (ppm ۱) که به شکل B+ نشان داده می‌شود و گروه سوم دارای آلومینیوم کلرید ($AlCl_3$) با غلظت (μM ۸۸۰) و حفظ غلظت بورون در حد پایه (ppm ۰/۵) که این گروه نیز به صورت Al+ نشان داده می‌شود. پس از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال تیمارهای مذکور، نمونه‌ها برداشت و ریشه آنها از ناحیه یقه جدا شد و پس از انجماد در نیتروژن مایع برای آنالیزهای بعدی در دمای۷۰- درجه قرار گرفت.

جدول ۲-۲ عناصر و غلظت‌های بکار رفته از آنها در محلول غذایی هوگلند ۱/۲(Hoagland and Arnon 1950)

عناصرماکرو (پر مصرف)	غلظت (mM)
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1
$MgSO_4.7H_2O$	0.5
KH_2PO_4	2.5
KNO_3	2.5
عناصر میکرو (کم مصرف)	غلظت (ppm)
$MnCl_2$	0.5
$CuCl_2.2H_2O$	0.02
$ZnCl_2$	0.05
Na_2MoO_4	0.02
H_3BO_3	0.5
Fe-EDTA	0.03