

اثر سمیت آلومینیوم بر القای آپوپتوزیس در کشت سوسپانسیون سلولی برنج (*Oryza sativa*) ارقام خزر و طارماعظم نعمت اللهی^۱، M.Sc.، مجید مهدیه^۲، Ph.D.*، مجتبی یزدانی^۳، M.Sc.، محمدرضا امیرجانی^۴ Ph.D.

۱- دانش آموخته کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۷۳۴۹

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آشتیان، گروه زیست شناسی، آشتیان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۳

چکیده

هدف: در این پژوهش اثر سمیت کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) بر القا آپوپتوزیس در سوسپانسیون سلولی دو رقم برنج (*Oryza sativa*) خزر و طارم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های سوسپانسیون سلولی از دو رقم خزر و طارم به مدت ۳ هفته در محیط MS (Murashig and Skoog) مایع کشت داده شدند. سپس سلول‌های دو رقم با غلظت‌های مختلف (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار) کلرید آلومینیوم به مدت ۵۶ ساعت تیمار شدند. تغییرات بیوشیمیایی آپوپتوزیس DNA سلول‌ها توسط الکتروفورز ژل و تست تانل و تغییرات ریخت شناسی آپوپتوزیس سلول‌ها با رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم یدید مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از الکتروفورز ژل و تست تانل، آسیب DNA و ایجاد قطعات ۱۸۰ تا ۲۰۰ جفت بازی را در دو رقم نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم یدید تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها شامل متراکم شدن هسته‌ها، تخریب غشا و چروکیدگی سیتوپلاسم را با افزایش غلظت به‌ویژه تحت غلظت ۱۲۰ میکرومولار و در رقم طارم نشان دادند.

نتیجه‌گیری: سمیت $AlCl_3$ باعث تخریب DNA و تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها در دو رقم برنج به‌ویژه رقم طارم پس از ۵۶ ساعت تیمار و با افزایش غلظت شد.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، آلومینیوم، برنج (*Oryza sativa*)، سمیت، کشت سلولی

مقدمه

بنابراین تحمل گیاهان به آلومینیوم ممکن است وابسته به فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی گیاه باشد (۱۹-۱۵). ROS های (گونه‌های فعال اکسیژن) تولید شده در اثر سمیت آلومینیوم به مولکول‌های بیولوژیکی از جمله DNA، RNA، پروتئین و لیپید به واسطه پراکسیداسیون لیپید آسیب می‌رساند (۲۰). ROS تولیدی در نهایت می‌تواند باعث القا مرگ برنامه ریزی شده سلول و یا آپوپتوزیس در گیاهان شود (۲۱).

برنج در تمام قاره‌ها رشد می‌کند. این گونه گیاهی علاوه بر اینکه یک گیاه مدل برای مطالعات مولکولی می‌باشد دارای اهمیت اقتصادی و اجتماعی فراوان نیز می‌باشد (۲۲ و ۲۳). بنابراین بررسی آپوپتوزیس ناشی از تنش‌های محیطی با هدف به دست آوردن دانش بیشتر در مورد مکانیسم‌های تحمل به اهمیت اقتصادی و اجتماعی این گونه گیاهی کمک می‌کند. با توجه به اینکه تاکنون اثر سمی آلومینیوم بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت شناسی سوسپانسیون سلولی برنج بررسی نشده در این تحقیق ویژگی‌های بیوشیمیایی از جمله طرح نردبانی DNA، آشکار سازی انتهای ۳'OH DNA آسیب دیده در طی آپوپتوزیس و ویژگی‌های ریخت شناسی مانند تراکم هسته و تخریب غشا روی سلول‌های رشد یافته در محیط حاوی آلومینیوم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بر روی سوسپانسیون سلولی دو رقم برنج (*Oryza sativa*) خزر و طارم رشد یافته در محیط کشت Murashig and Skoog (MS) مایع حاوی ۲/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-Dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) انجام گردید (۲۴). محیط کشت MS هر ۵ روز با محیط کشت جدید تعویض شد. پس از ۱۵ روز، سوسپانسیون سلولی در شرایط استریل به لوله فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و سانتریفوژ گردید. محلول غذایی قبلی خارج و محلول جدید حاوی غلظت‌های مختلف (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار) کلرید آلومینیوم (pH=۴/۲) اضافه گردید.

استخراج DNA و الکتروفورز ژل: لوله فالكون‌های محتوی سوسپانسیون سلولی در دور ۱۲۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس رسوب سلولی حاصل برای استخراج DNA بر طبق روش Doyl and Doyl (۲۵) مورد استفاده قرار گرفت. بافر استخراجی DNA شامل Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار،

آلومینیوم سومین عنصر فراوان بعد از اکسیژن و سیلیس که بیش از ۸ درصد سطح زمین را اشغال می‌کند (۱). آلومینیوم در خاک، آب‌ها و زنجیره غذایی وجود داشته که باعث ایجاد بیماری در انسان و همچنین کاهش محصولات کشاورزی می‌شود. منابع آلومینیوم شامل معادن، کارخانه‌های ذوب فلزات حاوی هیدروکسید آلومینیوم، ظروف آشپزخانه، وسایل آرایشی و پزشکی (۲ و ۳) و باران‌های اسیدی می‌باشد (۴). در خاک‌های اسیدی آلومینیوم، باعث مهار تقسیم و طویل شدن سلول‌های راس ریشه شده که در نهایت باعث کاهش جذب آب و مواد غذایی می‌شود (۵ و ۶). این عنصر می‌تواند به مکان‌هایی در سلول از جمله دیواره سلولی، غشا پلاسمایی، اسکلت سلولی و هسته‌ها متصل شده و در نتیجه باعث ایجاد اثراتی گردد که نشان دهنده سمیت آلومینیوم می‌باشد (۸-۶). آلومینیوم همچنین بر روی مکانیسم‌های کنترلی سازماندهی میکروتوبول اسکلت سلولی، پلی‌مریزاسیون توبولین تثیر و همچنین باعث بی‌نظمی در حرکات کروموزوم به واسطه رشته‌های میتوزی و تاخیر در سر هم‌بندی میکروتوبول‌ها در طی میتوز می‌شود (۹).

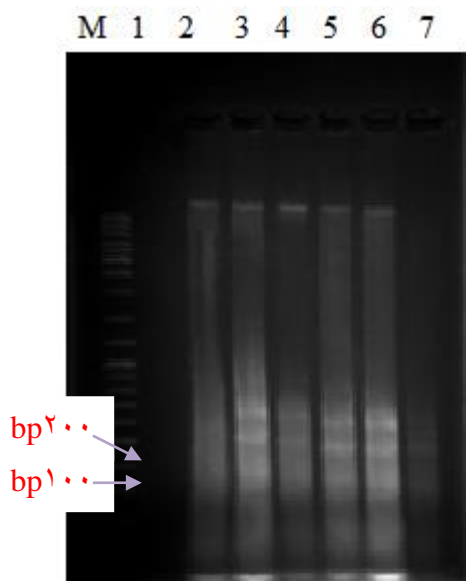
مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Programmed Cell Death or PCD) و یا آپوپتوزیس روندی است که باعث حذف و یا آسیب به سلول‌های مضر در چرخه زندگی موجودات پر سلولی می‌گردد. مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، نقش مهمی در طی چرخه تکاملی و ریخت‌زایی موجودات از طریق حذف سلول‌های ناخواسته و یا اضافی ایفا می‌کند. در سلول‌های جانوری مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با یک سری ویژگی‌های ریخت‌شناسی همراه می‌باشد (۹) از جمله این ویژگی‌ها تراکم هسته و سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA هسته‌ای (طرح نردبانی DNA)، ایجاد برآمدگی‌هایی در سطح سلول و ظهور اجسام آپوپتیک می‌باشد. در سلول‌های گیاهی مشابه جانوران مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش ویژه‌ای در رشد و تکامل موجودات، پاسخ گیاه علیه عوامل بیماری‌زا (۱۰)، استرس‌های زیستی و غیرزیستی مانند ازن، اشعه ماوراء بنفش و یک سری از مواد شیمیایی سمی از جمله فلزات سنگین ایفا می‌کند (۱۱-۱۳). خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئاز به نام کاسپازها نقش مهمی در ایجاد ویژگی‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ایفا می‌کنند (۱۴). محققان بیان کردند که بخشی از سمیت آلومینیوم به دلیل استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط این یون می‌باشد

OLYMPUS, DP71, Japan) مشاهده شدند. همچنین برای تمایز سلول‌های مرده از زنده (۲۶) به ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها ۸ میکرولیتر رنگ فلورسنت PI $1 \mu\text{g/ml}$ در شرایط تاریکی اضافه و پس ۲۰ ثانیه این سلول‌ها نیز جداگانه توسط میکروسکوپ (OLYMPUS, DP71, Japan) عکس‌برداری شدند.

نتایج

بررسی تغییرات بیوشیمیایی آپوپتوزیس

در این بررسی به دنبال القای آپوپتوزیس و فعال شدن نوکلئازها، DNA به قطعات ۱۸۰ تا ۲۰۰ جفت بازی شکسته شده به طوری که DNA سلول‌های تیمار یافته با غلظت‌های ۸۰، ۴۰ و ۱۲۰ میکرومولار بر روی ژل الکتروفورز ایجاد طرح نردبانی کردند (شکل ۱).



شکل ۱: DNA ladder در سوسپانسیون سلولی برنج پس از ۵۶ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف کلرید آلومینیوم. M مارکر Lane شاهد، Lane‌های ۲، ۳ و ۴ مربوط به رقم طارم به ترتیب تحت تیمار با غلظت‌های ۱۲۰ و ۸۰، ۴۰ میکرومولار و Lane‌های ۵، ۶ و ۷ مربوط به رقم خزر به ترتیب تحت تیمار با غلظت‌های ۱۲۰ و ۸۰، ۴۰ میکرومولار. (ایجاد طرح نردبانی در دو رقم و بویژه طارم تحت غلظت ۱۲۰ میکرومولار Lane 4). رنگ آمیزی ژل ۱/۸ درصد آگارز توسط اتیدیم بروماید.

از تست تانل نیز برای مشخص نمودن آپوپتوزیس استفاده گردید. در این روش DNA سلول‌های تیمار یافته با غلظت‌های ۸۰، ۴۰ و ۱۲۰ میکرومولار کلرید آلومینیوم نشان‌دار شده و در

۲۰ میلی‌مولار Na_2EDTA (pH=۸)، NaCl ۱/۴ میلی‌مولار و ۲ CTAB درصد (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) بود. پس از اضافه کردن حجم مساوی از کلروفرم/ایزواامیل الکل (۱:۲۴) به رسوب موجود، اتانول ۷۰ درصد اضافه و سپس محلول رویی دور ریخته شده و پس از آن DNA در دمای اتاق خشک و در نهایت ۵۰ میکرولیتر بافر TE به رسوب اضافه گردید. در نهایت ۲ میکروگرم DNA برای انجام الکتروفورز ژل ۱/۸ درصد مورد استفاده قرار گرفت. ژل توسط اتیدیم بروماید رنگ آمیزی و سپس با ولتاژ ۸۵ ولت و مدت زمان ۴۵ دقیقه الکتروفورز و سپس توسط دستگاه Gel documentation عکس‌برداری گردید.

تست تانل: به منظور آشکار سازی انتهای $3'\text{OH}$ DNA آسیب دیده از تست تانل استفاده گردید. برای انجام این تست ابتدا سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس گردیدند. سپس یک قطره از سوسپانسیون سلولی روی لام ریخته و به مدت چند دقیقه در معرض دمای محیط قرار گرفت. از کیت تانل-TdT (terminal deoxy-uracil nick end labeling) mediated deoxy-uracil nick end labeling (Apoptosis Detection. Takara, Japan Kit) به منظور آشکار سازی DNA قطعه قطعه شده به واسطه برچسب دار کردن انتهای $3'\text{OH}$ رشته DNA شکسته شده استفاده شد. اساس این روش اتصال TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) به انتهای $3'\text{OH}$ رشته DNA شکسته شده می‌باشد. برچسب دار شدن انتهای شکسته DNA در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و طبق دستورالعمل کیت تانل انجام گردید. در آخر به منظور افتراق سلول‌های مرده از زنده، سلول‌ها با DAB (3,3'-diaminobenzidine) و سبز متیل رنگ آمیزی و پس از شستشو با آب مقطر، سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده و عکس‌برداری شدند.

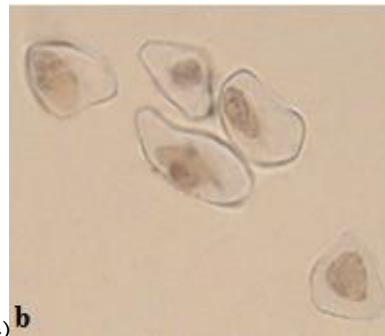
رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم یدید (PI): به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی هسته در طی تنش آلومینیوم، سلول‌های حاصله از سوسپانسیون پس از سانتریفوژ و شستشو با بافر PBS (Phosphat buffer salin) با هوخست (Hochest) و PI (Propidium Iodide) رنگ آمیزی شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های محیط کشت با ۵۰ میکرولیتر رنگ هوخست $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ به مدت ۲ دقیقه در تاریکی انکوبه و پس از آن سلول‌های سوسپانسیون در زیر میکروسکوپ فلورسسنس

حاصل از الکتروفورز ژل و تست تانل در سوسپانسیون سلولی نشان داد که غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و به‌ویژه غلظت ۱۲۰ میکرومولار $AlCl_3$ در هر دو رقم خزر و بویژه رقم طارم باعث القا آپتوزیس پس از ۵۶ ساعت تیمار گردیدند که این نتایج نشان دهنده حساس‌تر بودن رقم طارم با افزایش غلظت می‌باشد.

نتیجه هسته سلول‌های آسیب دیده به رنگ قهوه‌ای مشاهده شدند که موید تانل مثبت و در نتیجه آپتوزیس می‌باشد. نشان‌دار نشدن سلول‌ها ناشی از آسیب ندیدن DNA و در نتیجه عدم وقوع آپتوزیس در آن‌ها می‌باشد و در نتیجه هسته سلول‌های شاهد به رنگ سبز مشاهده گردیدند (شکل ۲). نتایج



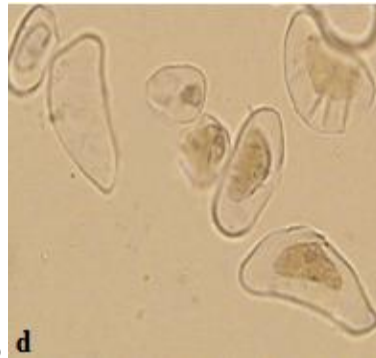
a (شاهد)



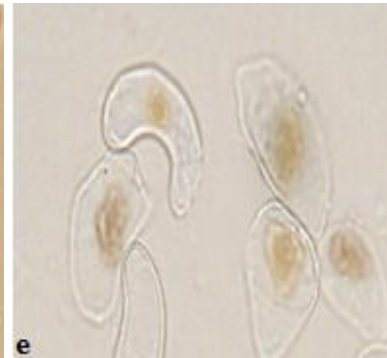
b (غلظت ۴۰ میکرومولار)



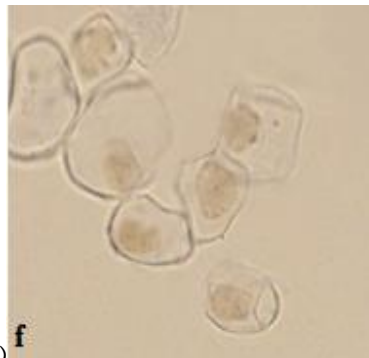
c



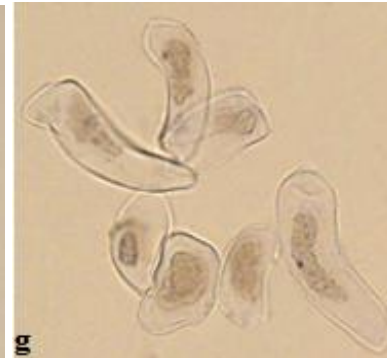
d (غلظت ۸۰ میکرومولار)



e



f (غلظت ۱۲۰ میکرومولار)



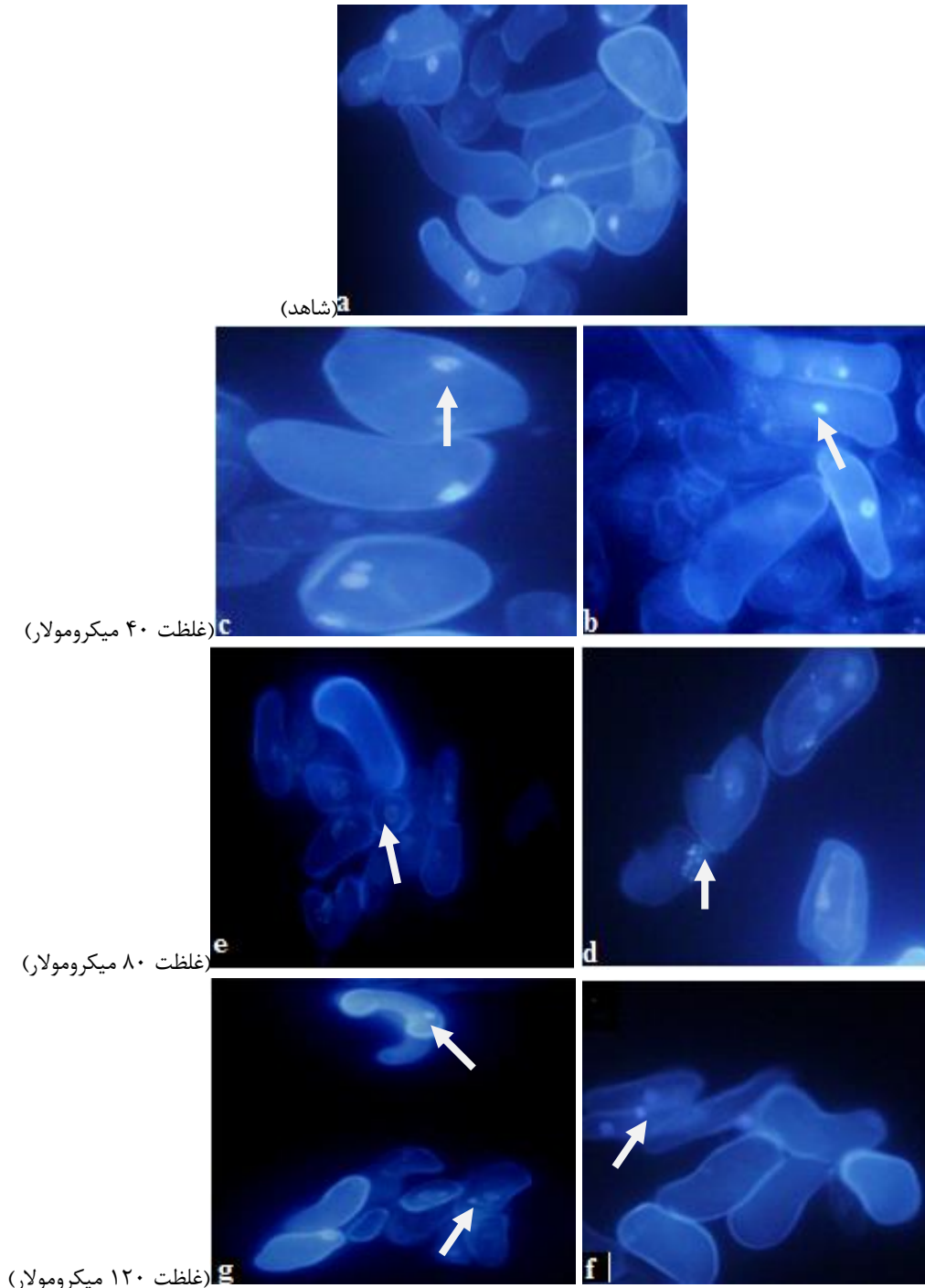
g

شکل ۲: نتایج تست تانل در سوسپانسیون سلولی ارقام طارم و خزر. **a** سلول شاهد - **b**، **d** و **f** مربوط به رقم خزر تحت تیمار ۵۶ ساعته با کلرید آلومینیوم به ترتیب با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار - **c**، **e** و **g** مربوط به رقم طارم تحت تیمار ۵۶ ساعته با کلرید آلومینیوم به ترتیب با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار (بزرگنمایی $\times 100$). هسته سلول‌های شاهد به رنگ سبز (تانل منفی) و هسته سلول‌های آپتوتیک به رنگ قهوه‌ای (تانل مثبت) قابل مشاهده است.

بررسی تغییرات ریخت شناسی آپوتوزیس

تغییرات ریخت شناسی سلول‌ها پس از ۵۶ ساعت تیمار با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار $AlCl_3$ با رنگ فلورسنت هوخست شامل: متراکم شدن و تغییر شکل هسته در مقایسه با شاهد بود. به طوری که سلول شاهد دارای هسته کروی و واضح

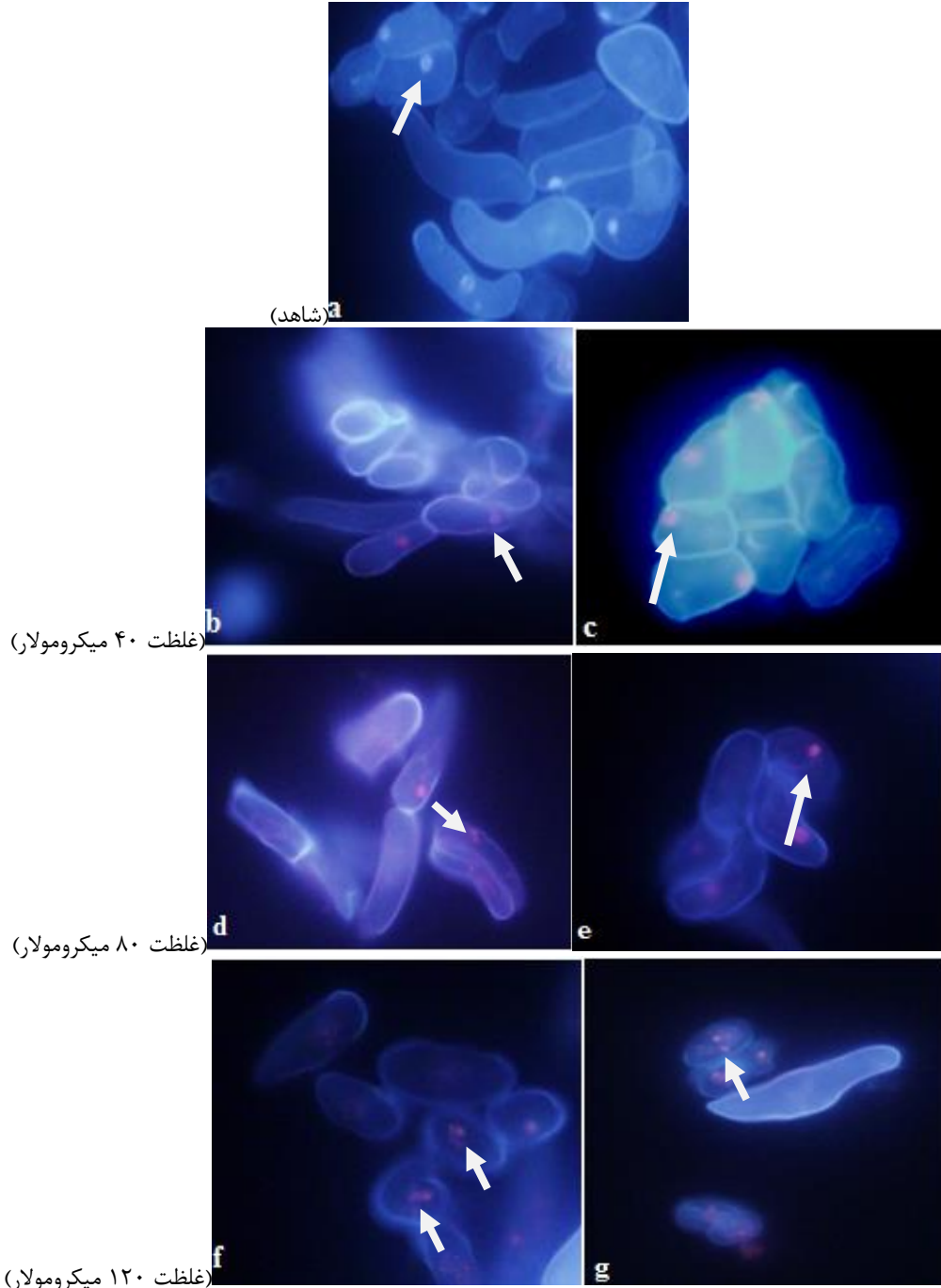
می‌باشد (شکل ۳a). در حالی که هسته سلول‌های تیمار یافته با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار دچار تراکم و تغییر شکل شدند (شکل ۳b-g). سلول‌های تیمار یافته با غلظت ۱۲۰ میکرومولار حداکثر فشردگی و تغییر شکل را نسبت به شاهد به‌ویژه در رقم طارم نشان دادند (شکل ۳g).



شکل ۳: رنگ آمیزی هوخست در سوسپانسیون سلولی (a) سلول شاهد، b، d و f مربوط به رقم خزر c و e و g مربوط به رقم طارم پس از ۵۶ ساعت تیمار با کلرید آلومینیوم. (بزرگنمایی $40\times$). هسته نمونه شاهد سالم و گرد و کروی می‌باشد (a). سلول‌های تیمار یافته دچار آسیب شده‌اند که هسته‌ها متراکم و تغییر شکل داده‌اند. حداکثر متراکم شدن و تغییر شکل تحت غلظت ۱۲۰ میکرومولار رقم طارم مشاهده گردید (g).

غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار) اجازه ورود PI را به‌درون سلول‌های خود داده و در نتیجه هسته سلول‌های آسیب دیده به‌رنگ قرمز مشاهده شدند (شکل g-f). همان‌طور که شکل نشان می‌دهد سلول‌های تیمار یافته با غلظت ۱۲۰ میکرومولار رقم طارم بیشتر دچار آسیب شده‌اند (شکل g f).

رنگ آمیزی سلول‌های تیمار یافته با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار توسط رنگ پروپیدیم یدید افزایش تخریب غشا و مرگ سلول‌ها در مقایسه با شاهد را نشان داد. سلول‌های شاهد دارای غشا پلاسمایی سالم بوده و به رنگ فلورسنت PI غیر قابل نفوذ بوده و در نتیجه رنگ فلورسنت PI نمی‌تواند وارد سلول‌ها شود (شکل Fa) ولی سلول‌های آسیب دیده (تیمار یافته با



شکل ۴: رنگ آمیزی همزمان همزمان پروپیدیم یدید در سوسپانسیون سلولی (a) سلول شاهد - (b و d f) مربوط به رقم خزر - (c و e و g) مربوط به رقم طارم پس از ۵۶ ساعت تیمار با کلرید آلومینیوم. (بزرگنمایی ۴۰×). سلول‌های شاهد دارای غشا پلاسمایی سالم بوده و به رنگ فلورسنت PI غیر قابل نفوذ بوده و در نتیجه رنگ فلورسنت PI نمی‌تواند وارد سلول‌ها شود (a). ولی سلول‌های آسیب دیده اجازه ورود PI را به درون سلول‌های خود داده و در نتیجه سلول‌های آسیب دیده به رنگ قرمز مشاهده شدند (b-g).

بحث

یکپارچگی غشا را از بین برده و منجر به افزایش نفوذپذیری غشا پلاسما می‌شود (۳۶) و در نتیجه سلول‌هایی که غشا پلاسما می‌خورد را از دست داده‌اند اجازه ورود رنگ PI را داده و در نتیجه هسته سلول‌های مرده به رنگ قرمز در حالی که سلول‌های سالم به رنگ آبی می‌باشد.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان بیان نمود که غلظت‌های مختلف آلومینیوم و به‌ویژه غلظت ۱۲۰ میکرومولار باعث القای آپوپتوزیس و در نتیجه ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی در سوسپانسیون سلولی دو رقم برنج و به‌ویژه رقم طارم گردید که این نتایج نشان دهنده حساس‌تر بودن رقم طارم می‌باشد. با توجه به اهمیت این موضوع پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری برای بررسی اثرات مختلف این یون صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Qin R, Jiao Y, Zhang S, Jiang, et al. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells and selected physiological and biochemical characters in *Allium cepa* var *agrogarum* L. BMC Plant Biology. 2010; 10: 225-236.
2. Barabasz WD, Albinska M, Lipiec J. Ecotoxicology of aluminium. Journal Environmental Study. 2002; 11: 199-203.
3. Krewski D, Yokel R, Nieboer E, Borchelt D. Human health risk assessment for aluminium boxide, and aluminium hydroxide. Journal of Toxicology Environmental Health B. 2010; 10: 1-269.
4. Von Uexkull HR, Murtert E. Global extent, development and economic impact of acid soil. In: Date R.A., Grundon N.J., Raymet G.E., Probert M.E., eds. Plant-soil interaction at low pH. 1995; 5-19.
5. Samac D, Tesfaye M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils-a review. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2003; 75: 189-207.

مسمومیت ناشی از آلومینیوم عامل اصلی محدود کننده تولید محصول در خاک‌های اسیدی از جمله شالیزارهاست (۱۵). از آنجا که مقاومت ارقام مختلف گیاهان نسبت به مسمومیت آلومینیوم متفاوت است (۲) لذا در این تحقیق از دو رقم طارم و خزر برای مقایسه پاسخ آنها در کشت سلولی استفاده شد. سیستم‌های ساده کشت سلولی تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌طور گسترده برای فهم مکانیسم‌های بیولوژیکی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۷ و ۲۸). در گیاهان آپوپتوزیس فرآیندی فیزیولوژیکی و طبیعی است که با یک سری ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی همراه می‌باشد. مشخص‌ترین ویژگی‌های مرگ برنامه ریزی شده سلول: کاهش حجم سیتوپلاسم، تراکم هسته و قطعه قطعه شدن DNA به قطعات ۱۸۰ تا ۲۰۰ جفت بازی می‌باشد (۲۹-۳۱). در این بررسی پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرومولار کلرید آلومینیوم تغییرات بیوشیمیایی شامل تخریب DNA و تغییرات ریخت‌شناسی از قبیل تغییر شکل و تراکم هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم و همچنین افزایش تعداد سلول‌های مرده پس از ۵۶ ساعت تیمار مشاهده شد. در واقع نتایج نشان دادند که تغییرات بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی آپوپتوزیس در سلول‌های رقم طارم و تحت غلظت ۱۲۰ میکرومولار حداکثر بود. نتایج مشابه از مرگ برنامه ریزی شده سلول در سوسپانسیون سلولی گوجه فرنگی در اثر تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار آلومینیوم (۳۲) و همچنین در سوسپانسیون سلولی *Thellungiella halophila* تحت تیمار ۳۰۰ میلی مولار شوری (۳۳) مشاهده شد. مطالعات نشان داده که آلومینیوم باعث تغییر سطح کلسیم سیتوپلاسمی و در نتیجه فعالسازی نوکلئازهای وابسته به کلسیم می‌شود و در نهایت این آنزیم‌ها، DNA را در منطقه بین نوکلئوزومی برش و منجر به قطعه قطعه شدن DNA و ایجاد طرح نردبانی بر روی ژل می‌شوند (۳۲). از آنجایی که آلومینیوم به DNA و هسته متصل می‌شود این عامل می‌تواند دلیل تغییر شکل و متراکم شدن هسته سلول‌های تحت تیمار باشد (۳۴). پس از تیمار سلول‌ها با آلومینیوم بسیاری از سلول‌های سوسپانسیون دو رقم خزر و طارم دچار مرگ شدند که این به دلیل افزایش نفوذپذیری اکثر سلول‌ها به دنبال تیمار با آلومینیوم می‌باشد. در واقع یکی از مناطق اتصال آلومینیوم به سلول، غشا پلاسما می‌باشد (۳۵) که آلومینیوم می‌تواند به گروه‌های فسفات و کربوکسیل غشا متصل و بدین ترتیب

6. Vitorello VA, Capaldi F, Stefanuto VA. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005; 17: 129-43.
7. Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Plant Physiology*. 2004; 55: 459-493.
8. Arroyave C, Barcelo J, Poschenrieder C, Tolra R. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011; 105: 1477-1483.
9. Frantzios G, Galatis B, Apostolakis P. Aluminium effects on microtubule organisation in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells. *New Phytologist*. 2000; 145(2): 211-224.
10. Lam E. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 2004; 5: 305-15.
11. Fojtova M, Kovarik A. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant Cell Environment*. 2000; 23(5): 531-7.
12. Danon A, Rotari VI, Gordon A, Mailhac N, et al. Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors. *Journal Biology Chemistry*. 2004; 279: 779-87.
13. Iakimova E, de Jong A, Kapchina-Toteva V, Atanassov A, et al. Involvement of ethylene, oxidative stress and lipid-derived signals in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *BMC Plant Biology*. 2005; 5(1): S19.
14. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407(6805): 770-6.
15. Sharma P, Dubey RS. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*. 2007; 26: 2027-2038.
16. Giannakoula A, Moustakas M, Syros T, Yupsanis T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental Experimental Botany*. 2010; 67: 487-494.
17. Panda SK, Matsumoto H. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum L.*) under Al stress. *BioMetals*. 2010; 23: 753-762.
18. Ma B, Gao L, Zhang H, Cui J, et al. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. *Plant Cell Reports*. 2012; 31(4): 687-696.
19. Xu FJ, Li G, Jin C, Liu J, et al. Aluminum induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. *Biology Plant*. 2012; 56: 89-96.
20. Shah K, Kumar RG, Verma A, Dubey RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*. 2001; 161(6): 1135-1144.
21. Zhang H, Zhang SH, Meng Q, JIN Zou J, et al. Effect of Aluminum on nucleoli in root tip cells, root growth and the antioxidant defense system in *Vicia Faba L.* *Acta biologia cracoviensia Series Botanica*. 2009; 51(2): 99-106.
22. Bennetzen J. The Rice Genome: Opening the door to comparative plant biology. *Science*. 2022; 296: 60-63.
23. Bennetzen J, Freeling M. Grasses as a single genetic system-genome composition, colinearity and compatibility. *Trends Genetics*. 1993; 9(8): 259-261.
24. Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Akatsuka T. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides. *Bioscience Biotechnology. Biochemistry*. 1993; 57(3): 405-409.
25. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990; 12: 13-15.
26. Yuan Y, Zhi-Qiang GE, Jing-Chuan L. Differentiation of apoptotic and necrotic cells in suspension cultures of *Taxus cuspidate* by the combined use of fluorescent dyeing and histochemical staining methods. *Biotechnology Letters*. 2002; 24: 71-76.
27. McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, et al. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant Journal*. 1997; 12: 267-80.
28. Zuppin A, Bugno V, Baldan B. Monitoring programmed cell death triggered by mild heat shock in soybean-cultured cells. *Functional Plant Biology*. 2006; 33: 617-27.
29. Beers EP. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differentiation*. 1997; 4(8): 649-661.
30. Gietl C, Schmid M. Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften*. 2001; 88(2): 49-58.

31. He X, Kermode AR. Nuclease activities and DNA fragmentation during programmed cell death of megagametophyte cells of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Molecular Biology*. 2003; 51(4): 509-521.
32. Yakimova ET, Kapchina-Toteva VM, Woltering EJ. Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology*. 2007; 164(6): 702-708.
33. Wang J, Li X, Liu Y, Zhao X. Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *Journal plant physiology*. 2010; 167(14): 1145-1151.
34. Panda SK, Baluska F, Matsumoto H. Aluminum stress signaling in plants *Plant. Signaling and Behavior*. 2009; 4(7): 592-597.
35. Takabatake R, Shimmen T. Inhibition of electrogenesis by aluminum in characean cells. *Plant Cell Physiology*. 1997; 38: 1264.1271.
36. Gunse B, Poschenrieder CH, Barcelo J. Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiology*. 1997; 113: 595.602.

Effect of Aluminum Toxicity on Inducing of Apoptosis in Cell Suspension of Rice (*Oryza sativa*) Khazar and Tarom Cultivars

Nematollahi A, M.Sc.¹, Mahdiah M, Ph.D.^{2*}, Yazdani M, M.Sc.³, Amirjani M, Ph.D.²

1. M.Sc. Graduated Student in Plant Physiology, Arak University, Arak, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-7349, Iran

3. Department of Biology, Azad Islamic University, Ashtian Branch, Ashtian, Iran

* Email corresponding author: m-mahdiyeh@araku.ac.ir

Received: 13 May. 2013

Accepted: 14 Jan. 2014

Abstract

Aim: In this study the effect of AlCl₃ toxicity on apoptosis in cells suspension of two rice cultivars Khazar, Tarom were investigated.

Material and Methods: In present research cells suspension of two rice cultivars (Khazar and Tarom) grew up in liquid Murashig and Skoog medium within a period of 3 weeks. Then cells were treated with different concentrations (0, 40, 80 and 120 μmol L⁻¹) of AlCl₃ for 56 hours. Biochemical changes of DNA by gel electrophoresis and TUNEL test and morphological changes by Hoechst and propidium iodide (PI) staining were investigated.

Results: Results of gel electrophoresis and TUNEL test showed DNA damage in these cultivars. Results of Hoechst and PI dying also showed morphological changes such as: condensation of nucleus, membrane damage and shrinkage of cytoplasm.

Conclusion: AlCl₃ induced nuclear DNA damage and also morphological change in two cultivars of rice especially Tarom by increasing concentration after 56 hours of treats.

Keywords: Apoptosis, Aluminium, Cell Culture, Rice (*Oryza sativa*), Toxicity