

تأثیر آلومینیوم و فسفر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوای لیگنین و برخی از پارامترهای فیزیولوژیک گیاه *Eustoma grandiflora* L.

مهسا نوریه، فائزه فناتی*

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس.

E-mail: ghangia@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۰

چکیده

سمیت آلومینیوم یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان در خاک‌های اسیدی است. بین سمیت آلومینیوم و کمبود فسفر در خاک‌های اسیدی ارتباط مستقیمی وجود دارد و به نظر می‌رسد که در گیاهان تیمار شده با فسفر کافی، مقاومت به آلومینیوم افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر تأثیر آلومینیوم و فسفر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز و لیگنیفیکاسیون در گیاهچه‌های جوان لیسینتوس (*Eustoma grandiflora* L.) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های جوان به مدت ۱۰ روز در کشت هیدروپونیک با محلول غذایی هوگلند ۱/۴ قرار گرفته و در چهار گروه کنترل (بدون آلومینیوم و فسفر اضافی)، Al (300 μ M)، Al+P و P (3 mM) تیمار شدند. به دنبال این مراحل مقدار جذب آلومینیوم و فسفر، فعالیت آنزیم پراکسیداز (محلول، یونی و کووالانی) در ریشه و چوبی شدن و برخی دیگر از پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه بررسی شد. تیمار گیاهچه‌ها با آلومینیوم کاهش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول، یونی و کووالانی در ریشه و تیمار با فسفر، افزایش معنی دار فعالیت پراکسیدازهای محلول و کووالانی و تیمار توأم این دو، کاهش معنی دار پراکسیدازهای محلول و یونی را نسبت به گروه شاهد به همراه داشت. در هر سه گروه از گیاهان تیمار شده، تغییر معنی داری در پراکسیداسیون لیپید غشا مشاهده نشد. در گیاهان تحت تیمار آلومینیوم، کاهش لیگنیفیکاسیون رخ داد که نشان دهنده اثر تحریک کننده آلومینیوم در رشد و اثر مثبت آن در تعدیل سمیت فسفر زیاد می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: آلومینیوم، پراکسیداز، فسفر، لیسینتوس، لیگنین

مقدمه

ضعیف به شکل اکسید یا آلومینوسیلیکات غیر قابل حل وجود دارد. با کاهش pH خاک (کمتر از ۵)، انحلال پذیری فرم‌های سمی آلومینیوم (Al^{3+}) افزایش یافته و باعث ایجاد سمیت در گیاه می‌شود. غلظت آلومینیوم در محلول خاک‌های معدنی در pH بالاتر از

آلومینیوم بعد از اکسیژن و سیلیکون، سومین عنصر فراوان موجود در پوسته زمین می‌باشد. Al^{3+} یون پیچیده‌ای است که فرم شیمیایی و عملکرد زیستی پیچیده‌ای دارد و در خاک‌های خنثی یا با اسیدیته

آلومینیوم به منظور کاهش اثر سمیت آن در ریشه، نشان می‌دهند [۱۶].

در آزمایش دیگری که بر روی گیاه برنج انجام شد ابتدا تعدادی از گیاهچه‌های برنج در محیط کشت حاوی فسفر (+P) و تعدادی دیگر در محیط بدون فسفر (-P) کشت شدند. سپس گیاهچه‌ها به محیط دارای آلومینیوم و فاقد آن منتقل شدند. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های (-P) نسبت به سمیت آلومینیوم، مقاومت نشان داده و تجمع آلومینیوم در این ارقام کمتر بود [۱۸].

گیاه لیسیانتوس گیاهی زینتی و متعلق به خانواده‌ی Gentianaceae است که به دلیل داشتن ساقه‌های طویل، گل‌های درشت، تنوع در رنگ گلبرگ‌ها و عمر طولانی پس از برداشت از اهمیت ویژه‌ای در بازارهای جهانی برخوردار است [۱۷]. همچنین این گیاه قادر به تحمل آلومینیوم می‌باشد [۲]. هدف از تحقیق حاضر بررسی نقش فسفر در افزایش مقاومت گیاه لیسیانتوس در مقابل سمیت آلومینیوم و تاثیر بر هم کنش آنها بر برخی از پارامترهای فیزیولوژیکی این گیاه لیسیانتوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های جوان لیسیانتوس از بازار گل و گیاه شهرستان‌های اصفهان و ورامین تهیه شد. گیاهچه‌ها با آب جاری شسته و به مدت ۳ دقیقه در محلول پرمنگنات پتاسیم ضدعفونی سطحی شدند. سپس به محلول غذایی تغییر یافته‌ی هوگلند ۱/۴ (pH 6) با فرمول زیر منتقل و هوادهی شدند:

(عناصر بر مصرف برحسب میلی مول):

Ca (NO₃)₂.4H₂O, 2/5; KNO₃, 2/5;
MgSO₄.7H₂O, 1; KH₂PO₄, 0/5

۵ کمتر از یک میلی گرم بر لیتر است ولی با کاهش pH این غلظت به شدت افزایش می‌یابد [۱]. علاوه بر pH محیط، غلظت آلومینیوم، دما و غلظت سایر کاتیون‌ها و آنیون‌ها در محیط، از عوامل موثر در سمیت آلومینیوم می‌باشند [۲]. سمیت آلومینیوم به عنوان عامل محدود کننده پتانسیل رشد برای گیاهان رشد یافته در خاک‌های اسیدی در بخش‌های مختلف جهان به شمار می‌رود [۶،۷،۸]. از آنجا که میزان آلومینیوم در هر گرم بافت خشک گیاه (۱۰^{-۵} - ۱۰^{-۹}) گرم می‌باشد، مقادیر زیاد آن در خاک، سبب ایجاد سمیت و اختلال در بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی گیاه می‌شود. فسفر بعد از نیتروژن، مهم‌ترین عنصر غذایی ضروری و پرمصرف گیاه بوده و به دو شکل آلی (اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپید، اینوزیتول فسفات و قندهای فسفوری) و معدنی (عمدتاً فسفات کلسیم، منیزیم، آهن و آلومینیوم) در خاک یافت شده و تقریباً ۵ درصد از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد. فسفر به شکل‌های H₂PO₄⁻ و HPO₄⁻ از خاک جذب می‌شود. از آنجا که فسفر جزئی از ساختار نوکلئیک اسید است، در تنظیم سنتز پروتئین نیز نقش دارد. همچنین اهمیت این عنصر در فتوسنتز، تقسیم سلولی، تکوین بافت جدید، انتقال نشاسته و قند، در ساختار غشای سلول و کمپلکس‌های انرژی مانند ATP شناخته شده است [۲۱]. در آزمایشی که بر روی دانه‌ی سویا انجام گرفت مشخص شد که بین سمیت آلومینیوم و کمبود فسفر در خاک‌های اسیدی ارتباط مستقیمی وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از این آزمایش بیان کننده‌ی آن بود که ارقام تیمار شده با فسفر کافی، احتمالاً افزایش مقاومت به آلومینیوم را نه تنها از طریق برهم‌کنش مستقیم (AI-P)، بلکه از طریق تعامل غیرمستقیم در ارتباط با تحریک ترشح اسیدهای آلی همبند با

رسانده شد. عصاره کلروفیل در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر خوانده شد [۱۱].

مقدار کلروفیل a,b نمونه‌ها مطابق معادله‌های زیر محاسبه گردید:

$$\text{میلی} = \{12/7(D663) - 2/69(D645)\} V/1000W$$

گرم کلروفیل a در هر گرم وزن تر نمونه

$$\text{میلی} = \{22/9(D645) - 4/68(D663)\} V/1000W$$

گرم کلروفیل b در هر گرم وزن تر نمونه

در معادلات فوق D نمایانگر جذب عصاره‌ی کلروفیل در طول موج ویژه‌ی مذکور، V حجم نهایی عصاره‌ی کلروفیل و W وزن تر بافت برگ بر حسب گرم می‌باشد.

اندازه‌گیری قند محلول کل

۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها در آب مقطر ساییده شده و پس از صاف کردن، محلول حاصل جهت سنجش قند کل استفاده شد. به لوله‌های آزمایش محتوی ۰/۵ میلی لیتر محلول قندی، ۰/۵ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد. لوله‌ها به مدت ده دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و پس از خنک شدن لوله‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد [۵].

سنجش شدت پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

۲۰۰ میلی‌گرم از ریشه نمونه‌های گیاهی در ۳ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد (حجم / وزن) تری کلر و استیک اسید ساییده شد. سپس نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۱ میلی لیتر از بخش بررو شناور حاصل، ۱ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد افزوده شد. مخلوط حاصل در دمای

(عناصر کم مصرف بر حسب ppm):

Fe-EDTA, 3; H₃BO₃, 0/5; Mn (MnCl₂), 0/5; Zn (ZnCl₂), 0/05;

Cu (CuCl₂.2H₂O), 0/02; Mo (Na₂MoO₄), 0/02

گیاهچه‌ها به مدت ۱۴ روز در این محیط قرار داشته و هر ۳-۵ روز یکبار محیط تعویض می‌شد تا ضمن سازگاری گیاهان با شرایط هیدروپونیک مواد جذب شده‌ی قبلی از خاک، از گیاه خارج شود. رشد گیاهان در اتاق رشد با $27 \pm 3^\circ\text{C}$ و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دانسیته‌ی نوری فتوسنتزی $5 \mu\text{M S}^{-1} \text{m}^2$ انجام شد. گیاهچه‌های ۵ ماهه‌ی لیسپانتوس تحت تیمار آلومینیوم (به شکل AlCl_3) در غلظت ۳۰۰ میکرومولار یا NaH_2PO_4 در غلظت ۳ میلی‌مولار و تیمار توام هر دو یون در بازه‌ی زمانی ۱۴ روز قرار گرفتند. پس از گذشت مدت زمان تیمار، نمونه‌های شاهد و تیمار شده (هر یک سه تکرار) برداشت شدند. پس از شستشو با آب مقطر، ساقه و ریشه‌ی گیاهچه‌ها از محل یقه جدا شده و پس از انجماد با نیتروژن مایع، تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر با دمای -80°C نگهداری شدند. آنالیزهای بعدی بر روی نمونه‌ها نیز در سه تکرار مستقل صورت گرفت.

سنجش محتوای کلروفیل بافت برگ

۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها با ۳ میلی لیتر استون ۸۰ درصد به طور کامل ساییده شد. عصاره حاصل با قیف حاوی کاغذ صافی در بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری صاف شد. به منظور جمع‌آوری کامل کلروفیل نمونه، کاغذ صافی با استون ۸۰ درصد چندین بار شستشو داده شد و سپس محتوای بالن با استون به حجم ۲۵ میلی لیتر

باقیمانده در ۳ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۰۵ مولار حل شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد سینامیک اسید تعیین شد [۲۰].

سنجش محتوای ترکیبات فنلی کل، آنتوسیانین و فلاونوئید

۱۰۰ میلی‌گرم از ساقه و ریشه نمونه‌های گیاهی شاهد و تیمار با ۳ میلی‌لیتر محلول متانول اسیدی (به نسبت ۱/۹۹ متانول در HCl) همگن شده و به مدت یک شب در مکانی تاریک قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها، سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه) شدند. محتوای کل ترکیبات فنلی با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و به کمک استاندارد گالیک اسید، تعیین شد.

به منظور سنجش آنتوسیانین به مایع بر رو شناور حاصل از مرحله قبل ۱۰۰ میلی‌گرم PVP (Polyvinylpyrrolidone) اضافه شده و پس از یک دقیقه، مقدار جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر تعیین شد.

۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر محلول اتانل اسیدی (به نسبت ۹۹/۱ اتانل در استیک اسید) همگن شد. سپس نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از این مراحل در حمام آب‌گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه قرار گرفته و جذب آن در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۵].

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

پس از استخراج آنزیم، فعالیت آن در سه حالت محلول، یونی و کووالانی متصل به دیواره مورد بررسی

۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر تعیین شد [۴].

سنجش محتوای پراکسید هیدروژن

به منظور سنجش مقدار H_2O_2 ۱۰۰ میلی‌گرم از هریک از نمونه‌های ریشه و برگ گیاه لیسینتوس در ۳ میلی لیتر بافر TCA ۰/۱ درصد (وزن/حجم) ساییده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند (۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) سپس به ۱ میلی‌لیتر از مایع بر روشناور حاصل ۱ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات و ۲ میلی لیتر پتاسیم یدید (KI) ۱ مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر تعیین شد [۱۴].

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)

به‌منظور استخراج PAL، ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl (۵۰ میلی مولار، pH ۸/۲)، حاوی بتا-مرکاپتواتانول (۱۵ میلی مولار) در هاون روی یخ ساییده شد. سپس نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ rpm) به مدت ۳۰ دقیقه) شدند و مایع بر رو شناور حاصل برای سنجش فعالیت PAL مورد استفاده قرار گرفت. به منظور سنجش فعالیت این آنزیم، مخلوط واکنش شامل یک میلی لیتر بافر استخراج، ۰/۵ میلی لیتر از L- فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره آنزیم به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار گرفت. واکنش با افزودن ۰/۱ میلی لیتر HCl ۶ مولار متوقف شد و فرآورده‌ی آن به کمک اتیل استات استخراج شد. اتیل استات مورد تبخیر قرار گرفت و

۳۰ دقیقه شستشو داده شد و پس از هر بار شستشو با استفاده از خلاء، روی قیف بوختر، کاغذ صافی و نایلونمش صاف شد. رسوب حاصل یک شب در ۱۰ حجم کلروفرم - متانول (۲:۱) قرار گرفت و پس از صاف کردن، رسوب با ۱۰ حجم استون شسته و خشک شد. ماده خشک دیواره حاصل ساییده و از الک ۱۵۰ میکرومتری رد شد. پودر حاصل به منظور تعیین محتوای لیگنین با روش استیل بروماید همراه با سیلیکاژل در دسیکاتور نگهداری شد [۱۳]. به ۶ میلی گرم پودر ساییده شده‌ی دیواره سلولی، ۲/۵ میلی لیتر مخلوط استیل بروماید ۲۵ درصد در استیک اسید و ۰/۱ میلی لیتر اسیدپرکلریک ۷۰ درصد افزوده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آبگرم با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و در فواصل ۱۰ دقیقه ای تکان داده شد. مخلوط لوله‌ها پس از سرد شدن در یخ به بالن ژوژه های ۲۵ میلی لیتر حاوی ۵ میلی لیتر هیدروکسیدسدیم (NaOH) ۲ نرمال و ۶ میلی لیتر استیک اسید اضافه شده و با استیک اسید به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. محتوای لیگنین با اندازه‌گیری جذب در ۲۸۰ نانومتر و ضریب جذب مخصوص معادل $20 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ تعیین شد.

سنجش محتوای آلومینیوم و فسفر

۲۰۰ میلی گرم از ساقه و ریشه نمونه‌های گیاهی شاهد و تیمار شده در کروزه‌های چینی وزن شد و در داخل کوره ابتدا ۲ ساعت در دمای ۳۵۰ و سپس به مدت ۲ ساعت در ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد خاکستر شدند. پس از سرد شدن به نمونه‌ها، یک میلی لیتر از مخلوط آب مقطر - HCl غلیظ (۱:۱) اضافه شد. سپس نمونه‌ها در حمام شن در دمای ۱۱۰ درجه قرار گرفته و پس از خشک شدن، ۵ میلی لیتر HCl یک نرمال به

قرار گرفت. نمونه‌های منجمد شده (۴۰۰ میلی‌گرم وزن تر) در ۳ میلی‌لیتر بافر (Tris-maleat) ۵۰ میلی‌مول (pH ۶) ساییده و با دور $12000 \times \text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش بر رو شناور حاصل برای سنجش پراکسیداز محلول (SPO) و رسوب آن برای سنجش پراکسیداز یونی و کووالانی استفاده شد.

پراکسیداز محلول (SPO)

۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی‌مول (pH ۶/۱)، ۲۸ میلی مول گایا کولو ۵ میلی مول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تهیه شد و جذب نوری آن در ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

پراکسیداز یونی (IPO) و کووالانی (CPO)

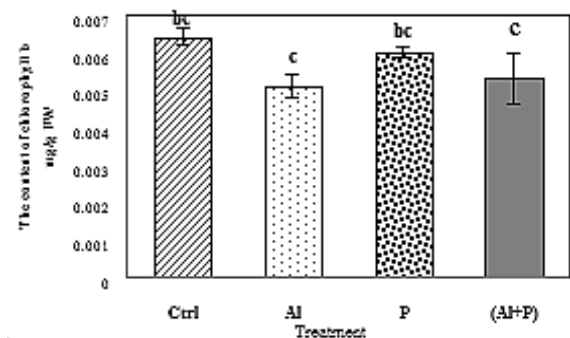
۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی: بافر سدیم فسفات ۶۰ میلی مولار با (pH ۶)، ۴۱/۶ نانو مول سیرین‌گالدازین و ۱۶ میلی‌مول پراکسید هیدروژن و عصاره آنزیمی تهیه شد و جذب آن در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد [۱۰].

محتوای پروتئین با متد برادفورد تعیین شد که در آن از BSA^1 با غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر به عنوان استاندارد استفاده شد.

تعیین محتوای لیگنین

برای تعیین محتوای لیگنین ابتدا دیواره‌ی سلولی، استخراج شد، به این منظور، ریشه و برگ نمونه‌های منجمد شده (یک گرم) در آب مقطر ساییده و سپس با دور $10000 \times \text{g}$ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل ۲ بار با اتانول مطلق و هر بار به مدت

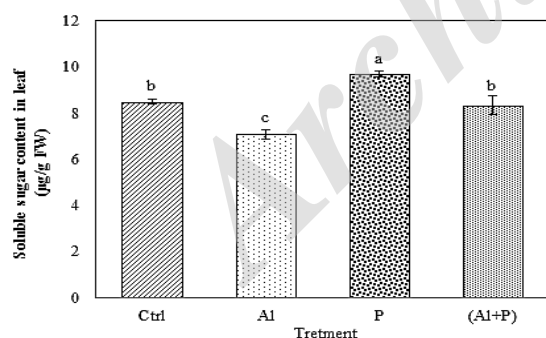
¹ Bovin Serum Albomin



شکل ۲. تاثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای کلروفیل b در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

محتوای قند محلول کل

محتوای قند کل ریشه در تیمار آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر و محتوای قند کل برگ در تیمار فسفر نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت. اما تغییرات آن در تیمار توأم آلومینیوم و فسفر و تیمار مجزای آنها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (شکل ۳ و ۴).



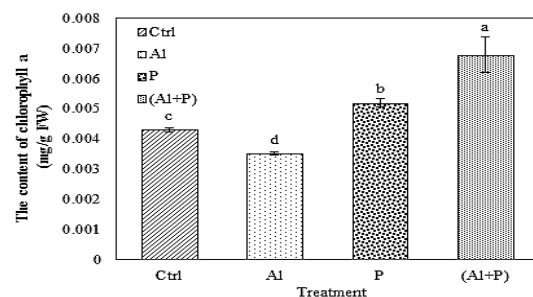
شکل ۳. تاثیر تیمار Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای قند کل محلول اندام هوایی در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

آن‌ها افزوده شد. سنجش محتوای آلومینیوم نمونه‌ها با دستگاه جذب اتمی (-JapanAA V8, Shimadzu, 670/G) و با استفاده از استاندارد آلومینیوم ($AlCl_3$) در غلظت‌های (۵۰-۵۰۰) میکرو مولار انجام شد [۹].
برای سنجش فسفر به محلول اسیدی حاصل از هضم خاکستر از هریک از محلول‌های ۱ و ۲ و ۳ به مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر اضافه شد. محلول ۱ شامل HNO_3 و H_2O با نسبت ۲:۱ و محلول ۲ شامل NH_4NO_3 و HNO_3 و محلول ۳ شامل آمونیوم مولیبدات بود. با افزودن آب دیونیزه به نمونه‌ها، حجم نهایی به ۲۵ میلی‌لیتر رسید. پس از مدت ۵ دقیقه، محتوای فسفر نمونه‌ها با اندازه‌گیری جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر، تعیین شد.

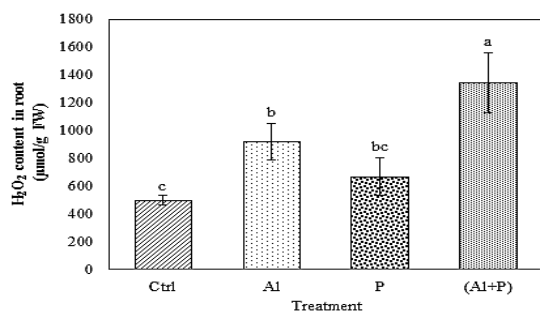
نتایج

محتوای کلروفیل بافت برگ

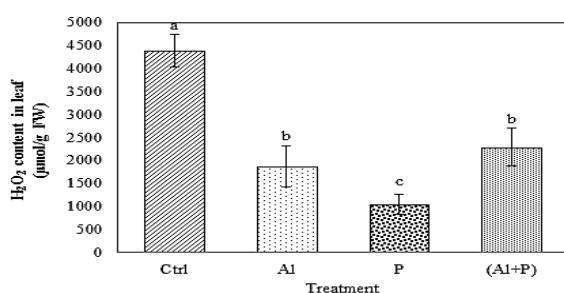
در گیاهان تیمار شده با فسفر و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر نسبت به گروه شاهد، مقدار کلروفیل برگ افزایش معنی‌داری داشت. محتوای کلروفیل b برگ در تیمارهای توأم و مجزای آلومینیوم و فسفر در مقایسه با گیاهان شاهد، از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. تاثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای کلروفیل a در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است.



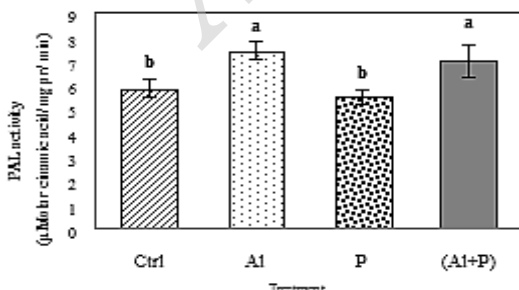
شکل ۶. تاثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای هیدروژن پراکسید ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.



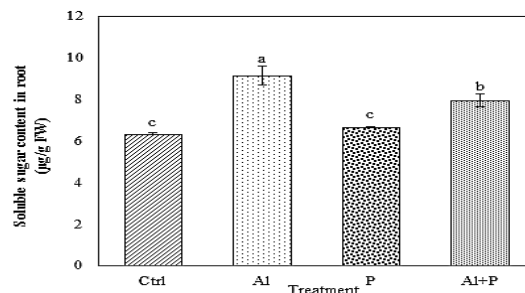
شکل ۷. تاثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای هیدروژن پراکسید اندام هوایی در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

فعالیت فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL)

در تیمار گیاهان لیسینتوس تیمار شده با آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر نسبت به گروه شاهد افزایش داشت، در حالیکه فعالیت این آنزیم تحت تیمار فسفر تغییر معنی داری نداشت (شکل ۸).



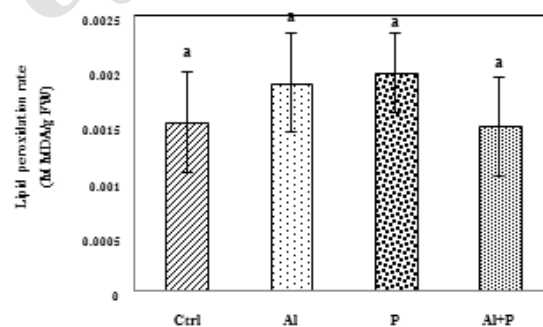
شکل ۸. تاثیر تیمار Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر فعالیت آنزیم PAL در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.



شکل ۴. تاثیر تیمار Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای قند کل محلول ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

پراکسیداسیون لیپدهای غشا و محتوای پراکسید هیدروژن

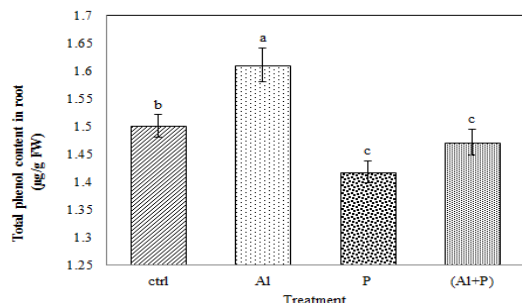
در ریشه گیاهان لیسینتوس تیمار شده با آلومینیوم، فسفر و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر غلظت مالون دآلدید در مقایسه با گیاهان شاهد تغییر معنی داری نشان نداد (شکل ۵).



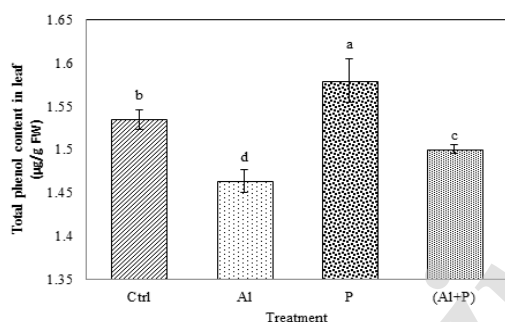
شکل ۵. تاثیر تیمار Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

مقدار هیدروژن پراکسید ریشه در تیمار آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر در مقایسه با گروه شاهد به افزایش داشت و در تیمار فسفر از نظر آماری معنی دار نبود. محتوای H₂O₂ در برگ گیاه لیسینتوس در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تیمار آلومینیوم، فسفر و تیمار توأم این دو، کاهش داشت (شکل ۶ و ۷).

تیمار آلومینیوم و تیمار توأم این دو کاهش معنی دار داشت (شکل ۱۲ و ۱۱).



شکل ۱۱. تأثیر تیمار Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای فنل ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.



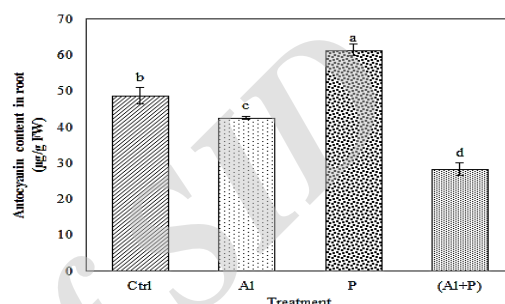
شکل ۱۲. تأثیر تیمار Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای فنل ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.

نتایج حاصل از سنجش محتوای فلاونوئیدهای ریشه در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر، نشان داد که محتوای فلاونوئید در طول موج ۲۷۰ نانومتر در گیاهان تحت تیمار آلومینیوم در مقایسه با گیاهان شاهد و در طول موج ۳۰۰ نانومتر در ریشه گیاهان تیمار شده با آلومینیوم و فسفر نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت.

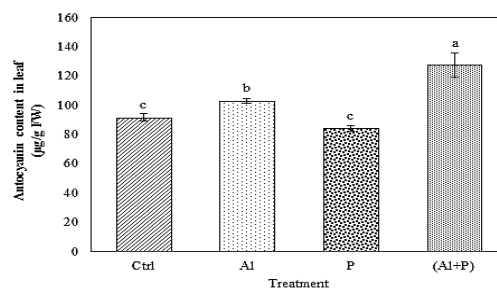
همچنین محتوای فلاونوئید در طول موج ۳۳۰ نانومتر در ریشه گیاهان تیمار شده با آلومینیوم نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت، اما تغییرات آن در تیمار فسفر و توأم آلومینیوم و فسفر از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۱۳).

محتوای آنتوسیانین، ترکیبات فنلی کل و فلاونوئید

محتوای آنتوسیانین ریشه در گیاهان لیسیتوس تیمار شده آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر کاهش و در تیمار فسفر، افزایش معنی دار داشت. همچنین مقدار آنتوسیانین اندام هوایی نسبت به گیاهان شاهد در تیمار آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر افزایش داشت و در تیمار فسفر از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۹ و ۱۰).



شکل ۹. تأثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای آنتوسیانین ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

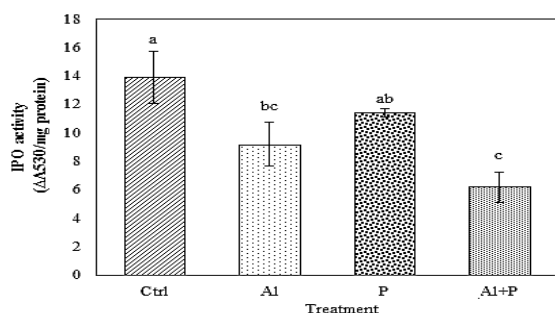


شکل ۱۰. تأثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای آنتوسیانین اندام هوایی در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

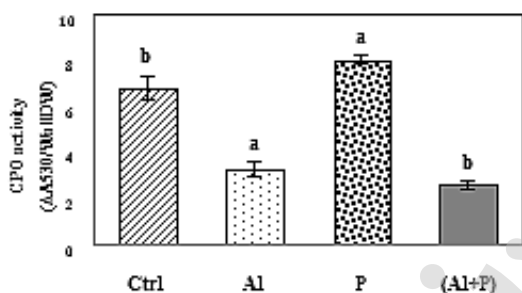
محتوای ترکیبات فنلی محلول ریشه نسبت به گروه شاهد در تیمار با آلومینیوم افزایش و در تیمار فسفر و تیمار توأم این دو، کاهش معنی دار داشت. محتوای ترکیبات فنلی برگ در تیمار فسفر افزایش معنی دار و در

هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهند تفاوت معنی دار در سطح p

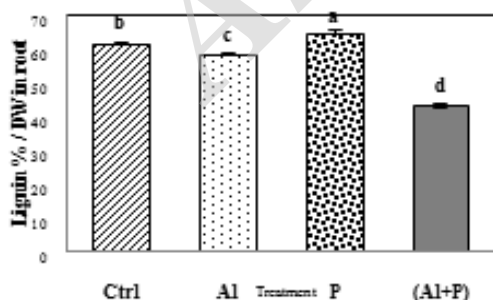
≤ 0.05 می باشد.



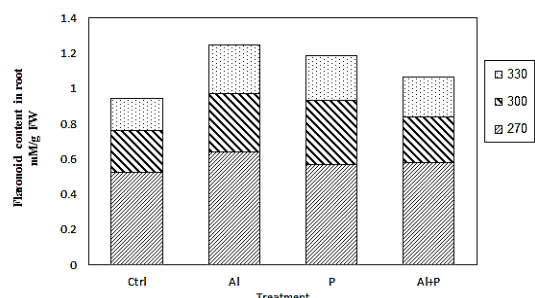
شکل ۱۵. تأثیر تیمار Al ($300 \mu M$) و P ($3 mM$) و $Al+P$ بر فعالیت آنزیم IPO در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهند تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می باشد.



شکل ۱۶. تأثیر تیمار Al ($300 \mu M$) و P ($3 mM$) و $Al+P$ بر فعالیت آنزیم CPO در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهند تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ می باشد.



شکل ۱۷. تأثیر تیمارهای Al ($300 \mu M$) و P ($3 mM$) و $Al+P$ بر چوبی شدن دیواره (محتوای لیگنین) در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

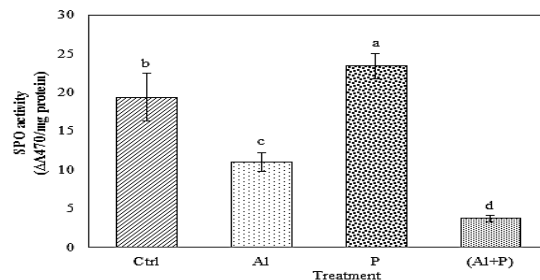


شکل ۱۳. تأثیر تیمار Al ($300 \mu M$)، P ($3 mM$) و $Al+P$ بر محتوای فلاونوئید در مقایسه با گروه شاهد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای لیگنین

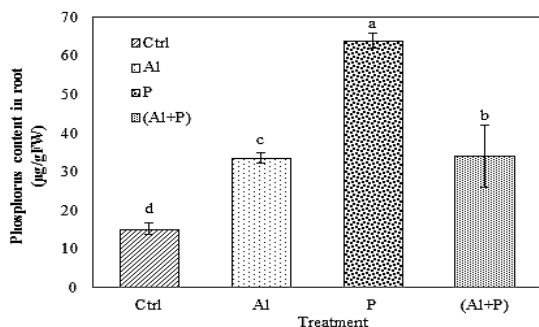
فعالیت پراکسیداز محلول (SPO) و یونی (IPO) در ریشه گیاهان لیسیناتوس تیمار شده با آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافت. در تیمار با فسفر فعالیت SPO در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معنی دار و IPO تغییر معنی داری نداشت (شکل ۱۵ و ۱۴). نتایج حاصل از سنجش فعالیت پراکسیداز کووالانی (CPO) کاهش فعالیت این آنزیم را در تیمار با آلومینیوم و افزایش را در تیمار فسفر نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. تغییرات فعالیت CPO در تیمار توأم آلومینیوم و فسفر معنی دار نبود (شکل ۱۶).

محتوای لیگنین در ریشه‌ی گیاهان لیسیناتوس تیمار شده با آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر کاهش و در تیمار فسفر افزایش معنی داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (شکل ۱۷).

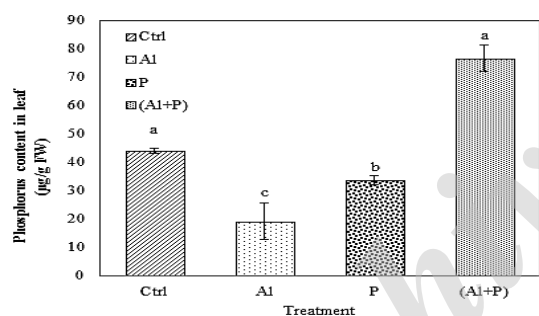


شکل ۱۴. تأثیر تیمار Al ($300 \mu M$) و P ($3 mM$) و $Al+P$ بر فعالیت آنزیم SPO در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در

گیاهان تحت تیمار مجزای آلومینیوم و فسفر در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش داشت. محتوای فسفر اندام هوایی در تیمار توأم آلومینیوم و فسفر نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۲۱ و ۲۰).



شکل ۲۰. تأثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای فسفر ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.



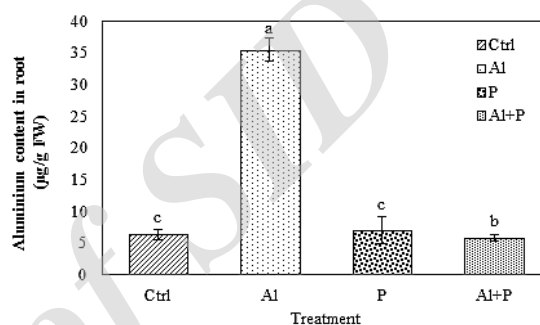
شکل ۲۱. تأثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای فسفر اندام هوایی در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

بحث

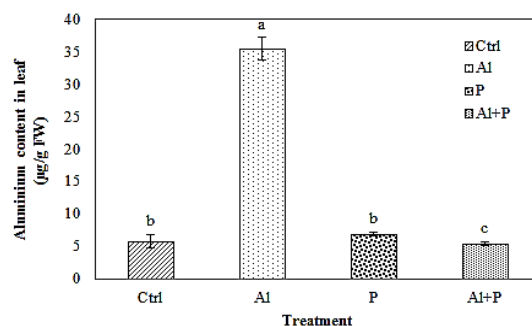
ترکیبات فنلی از آنتی اکسیدان‌های دفاعی در مقابل تنش اکسیداتیو هستند. گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه‌ی آروماتیک فنل از طریق حذف رادیکال‌ها و دیگر مکانیسم‌های دفاعی از آسیب‌های اکسیداتیو به ساختار سلول می‌کاهد. این ترکیبات با قابلیت آنتی اکسیدانی و سمیت‌زدایی رادیکال‌های

مقدار جذب آلومینیوم و فسفر

مقدار جذب آلومینیوم در ریشه و اندام هوایی گیاهان تیمار شده با آلومینیوم افزایش و در تیمار توأم آلومینیوم و فسفر نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی دار داشت. همچنین محتوای آلومینیوم در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با آلومینیوم و فسفر نسبت به شاهد کاهش داشت. محتوای آلومینیوم در ریشه و اندام هوایی گیاهان لیسیناتوس تیمار شده با فسفر معنی دار نبود (شکل ۱۹ و ۱۸).



شکل ۱۸. تأثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای آلومینیوم ریشه در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.



شکل ۱۹. تأثیر تیمارهای Al (300 µM)، P (3 mM) و Al+P بر محتوای آلومینیوم اندام هوایی در مقایسه با گروه شاهد. داده‌ها میانگین سه تکرار و در هر گروه، حروف غیریکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

جذب فسفر ریشه در تیمار مجزای آلومینیوم و فسفر و تیمار توأم این دو در مقایسه با گیاهان شاهد، افزایش داشت. همچنین محتوای فسفر در اندام هوایی

تحقیق حاضر مقدار MDA تغییر معنی‌داری در گیاهان تیمار شده با آلومینیوم و تیمار توأم آلومینیوم و فسفر مشاهده نشده که نشان دهنده‌ی عدم آسیب غشای سلولی است. می‌توان نتیجه گرفت که آلومینیوم نه تنها منجر به ایجاد تنش و آسیب شدید در گیاه لیسینتوس نشده بلکه با تأثیر بر افزایش انعطاف پذیری دیواره، در رشد طولی نیز نقش مثبت دارد. (آلومینیوم با غلظت ۳۰۰ میکرومولار سیستم دفاعی گیاه را به طور محسوسی فعال نکرده و در نتیجه برای گیاه ایجاد تنش و سمیت نکرده است.

منابع:

- [۱] شکوهی خدیجه، قناتی فائزه، (۱۳۸۶). تأثیر آلومینیوم بر کاهش رشد و تغییر در ترکیبات دیواره سلول‌های توتون، نشریه علوم (دانشگاه خوارزمی) ۸۶۴-۸۵۵.
- [۲] قناتی، ف.، نعمتی، ف. ۱۳۸۹. تأثیر مثبت آلومینیوم در فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسینتوس (*Eustoma grandiflora* L.). زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره دوم، ۴۱-۵۳.
- [3] Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., ... & Huang, W. D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 64-72.
- [4] De Vos C.H.R., Schat H., De Waal M.A.D., Vooijs R., Ernst W.H.O. (1991). Increased resistance to copper-induced damage of root plasma membrane in copper tolerant *Cilene cucubalus*. *Plant Physiology*, 82, 523-528.
- [5] Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Annual Chemistry*, 28, 350-356.
- [6] Fleming, A. L. (1983). Ammonium uptake by wheat varieties differing in Al tolerance. *Agronomy Journal*, 75(5), 726-730.
- [7] Foy, C. D. (1983). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. *Soil acidity and liming, (soilacidityandl)*, 57-97.

اکسیژن، باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شوند. فلاونوئید یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های ترکیبات فنلی با نقش دفاعی در مقابل تنش است. آنتوسیانین از رنگدانه‌های محلول در آب و مسئول رنگ قرمز، بنفش و آبی در بسیاری از گل‌ها، میوه‌ها و دیگر بافت‌های گیاه است. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL)، آنزیم تنظیم کننده کلیدی در بیوسنتز ترکیبات فنلی (مانند فلاونوئید و آنتوسیانین) می‌باشد [۳]. این آنزیم، در تنظیم ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها نقش داشته و سوبسترای لازم برای آنزیم پراکسیداز را نیز فراهم می‌کند [۱۹]. پراکسیدازها از آنزیم‌های مهم در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان هستند. آنزیم پراکسیداز محلول (SPO) در پاسخ به تنش پراکسیدازهای کووالانی (CPO) و یونی (IPO) آنزیم‌های مهم دخیل در فرآیند سخت شدن دیواره سلول هستند که در تشکیل اتصالات کووالان بین کربوهیدرات و پلیمرهای فنلی و پلیمریزاسیون مونومرهای فنلی و تشکیل لیگنین دخالت دارند. در تحقیق حاضر آلومینیوم جذب شده در گیاهان لیسینتوس باعث کاهش درصد چوبی شدن دیواره و در نتیجه افزایش انعطاف پذیری آن می‌شود. در حالیکه فسفر در افزایش درصد چوبی شدن دیواره و در نتیجه افزایش سختی ریشه‌ی گیاهان لیسینتوس تیمار شده با فسفر، نقش دارد. آسیب به اسیدهای چرب غشا می‌تواند منجر به تولید قطعات کوچک هیدروکربن از جمله مالون دی آلدید (MDA) می‌شود. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غیر اشباع سلول می‌باشد. از این رو به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تنش اکسیداتیو در سلول‌های حساس به کار برده شده است [۱۲]. در

- [8] Foy, C. D., Carter Jr, T. E., Duke, J. A., & Devine, T. E. (1993). Correlation of shoot and root growth and its role in selecting for aluminum tolerance in soybean. *Journal of Plant Nutrition*, 16(2), 305-325.
- [9] Ghanati, F., Morita, A., & Yokota, H. (2005). Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and soil*, 276(1-2), 133-141.
- [10] Ghanati, F., Morita, A., & Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Sci. Plant Nur* 48 (3): 357-364.
- [11] Helrich, K. (1990) *Official Method of Analysis of the AOAC*. 15th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Rockville.
- [12] Horst, W. J., Asher, C. J., Cakmak, I., Szulkiewicz, P., & Wissemeier, A. H. (1992). Short-term responses of soybean roots to aluminum. *Journal of Plant Physiology*, 140(2), 174-178.
- [13] Iiyama K. and Wallis A.F.A. (1990). Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure, *Journal of the science of food and agriculture*, 51, 145-161.
- [14] Jana, S., & Choudhuri, M. A. (1982). Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. *Aquatic Botany*, 12, 345-354.
- [15] Krizek, D. T., Britz, S. J., Mirecki, R. M. (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce, *Physiologia Plantarum*, 103, 1-7.
- [16] Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., & Kochian, L. V. (2006). Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. *Exudation of specific* 48 (3): 357-364.
- [17] Liao I.J., Lin Y.H., Huang K.L., Chen W.S. (2001). Vase life of *Eustoma grandiflora* as affected by aluminum.
- [18] Maejima, E., Watanabe, T., Osaki, M., Wagastuma, T. (2014). Phosphorus deficiency enhances Al tolerance of rice (*oryza sativa*) by changing the physiochemical characteristics of root plasma membranes and cell walls. *Plant Physiology*, 171, 9-15.
- [19] MacDonald, M. J., & D'Cunha, G. B. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(3), 273-282.
- [20] Ochoa-Alejo, N., & Gómez-Peralta, J. E. (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 141(2), 147-152.
- [21] Shenoy, V. V., & Kalagudi, G. M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology advances*, 23(7), 501-513.
- [22] Wang, B., Wang, J., Zhao, H., & Zhao, H. (2006). Stress induced plant resistance and enzyme activity varying in cucumber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48(2), 138-142.