

بررسی برخی تغییرات بیوشیمیایی مسیر فنیل پروپانوئیدی اندام‌های گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum*) طی مراحل نمو

مریم کلاهی^{۱*}، محمدرضا تابنده^۲، محمود شمیلی^۳ و محمود هاشمی تبار^۴
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۲ گروه بیوشیمی و سلولی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۳ بخش به زراعی مؤسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر خوزستان، اهواز، ایران
^۴ مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکیده

فنیل پروپانوئیدها به عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهان طی مراحل نمو و در پاسخ به شرایط تنش‌زا سنتز می‌شوند. ترکیبات فنیل پروپانوئیدی گیاهان در ساختار رنگزه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات محافظت‌کننده یافت می‌شوند و در رشد، مورفوزن و پاسخ به تنش‌ها نقش تنظیمی دارند. در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری از پهنک برگ، غلاف برگ، ساقه و ریشه گیاه نیشکر *Saccharum officinarum* واریته CP69-1062 در چهار مرحله نمو: جوانه‌زنی، پنجه‌زنی، رشد طولی و بلوغ انجام گردید و نمونه‌ها از لحاظ فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فلاونول جهت تعیین تغییرات بیوشیمیایی مسیر فنیل پروپانوئیدی طی مراحل نمو بررسی شد. بررسی روند تغییرات فعالیت آنزیم در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو، بیانگر فعالیت بالای آنزیم PAL در برگ در تمام مراحل نمو و در غلاف برگ طی مرحله پنجه‌زنی است. فعالیت آنزیم در ساقه، طی مرحله رشد طولی و در ریشه طی مرحله جوانه‌زنی افزایش یافت. در روند تغییرات میزان فنل کل، بیشترین میزان فنل کل در برگ طی مراحل جوانه‌زنی و بلوغ، در غلاف برگ طی مرحله جوانه‌زنی، در ساقه طی مرحله رشد طولی و در ریشه طی مرحله بلوغ بود. بیشترین میزان فلاونوئید و فلاونول در هر چهار مرحله نمو به طور معنی‌داری در برگ‌ها مشاهده شد. علت تفاوت میزان این ترکیب‌ها در سطح اندام‌های مختلف را می‌توان به دلیل وجود هتروژنیته در بافت‌های مختلف و ویژگی‌های شیمیایی و بیوشیمیایی این ترکیب‌ها نسبت داد. PAL به‌عنوان یک آنزیم مسیر فنیل پروپانوئیدی، نقش اساسی در نمو نیشکر به‌ویژه بافت‌های چوبی شده دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، فلاونوئید، فلاونول، فنل کل، نمو، نیشکر

مقدمه

نخستین گیاهان خشکی که در حدود ۵۰۰ میلیون سال پیش از روبرو شدند. پیدایش مسیر فنیل پروپانوئیدی از شاخص‌ترین سازگاری‌هایی است که باعث بقای گیاهان تحت شرایط محیط خشکی شده است. ترکیبات فنیل پروپانوئید در مقایسه با سایر گروه‌های ترکیبات فنلی سنتز شده توسط گیاهان، عملکردهای متعددی در رشد، نمو و حفاظت گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا و اشعه فرابنفش دارند. همچنین، به عنوان تنظیم‌کننده‌های اجداد جلبک‌های سبز کنونی به وجود آمدند با شرایط محیط خشکی شامل: خشکی، اشعه فرابنفش و عوامل بیماری‌زا مولکولی در هدایت سیگنال و ارتباط گیاه با دیگر موجودات زنده نقش دارند. این ترکیبات شامل: چوب، مولکول‌های ضروری گیاه، فلاونوئیدها، فلاونولها، رنگیزه‌ها، پیش‌ساز رنگیزه‌های شاخص گل‌ها و فیتوآلکسین‌ها هستند که به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شوند. چوب به‌عنوان یکی از مشتقات فنیل پروپانوئیدها و ترکیب ساختاری دیواره پسین سلولی در سیستم آوندی گیاه برای استحکام و هدایت آب، مواد معدنی و فرآورده‌های فتوسنتزی گیاه ضروری است (Hyun et al., 2011؛ Huang et al., 2010). آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا (PAL, EC4.3.1.5) نخستین بار در سال ۱۹۶۱ توسط Conn و Koukol در جوانه جو شناسایی شد. این آنزیم به‌طور وسیعی از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها خالص‌سازی و شناسایی شده است (Hyun et al., 2011). ژن‌های PAL از تعدادی گونه‌های گیاهی شامل تک‌لپه‌ای‌ها، دولپه‌ای‌های علفی و چوبی جداسازی و تعیین توالی شده است. در بیشتر گونه‌های گیاهی ژن‌های PAL در خانواده‌های ژنی

کوچکی از ۲ تا ۶ عضو واقع شده‌اند. گیاهان بازدانه‌ای نظیر کاج و ژینک‌گو با تک ژن PAL استثنا هستند (Butland and Ellis, 1998؛ Feng et al., 2008). ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در اندام‌ها و گیاهان مختلف وجود دارد که آنزیم‌های مختلفی در سنتز این ترکیبات نقش دارند. مهم‌ترین مرحله در بیوسنتز فنل‌ها، دامینه شدن فنیل آلانین و تولید سینامیک اسید است (Chen et al., 2006). افزایش فعالیت PAL و دیگر آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی به افزایش ترکیبات فنلی منجر می‌شود، این واکنش از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش است (Ali et al., 2007؛ Huang et al., 2010). آنزیم PAL نخستین واکنش در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها را کاتالیز می‌کند و L- فنیل آلانین را به صورت غیراکسیداتیو دامینه می‌کند و طی آن ترانس سینامیک اسید و یون آمونیوم شکل می‌گیرد که ترانس سینامیک اسید به کوماریک اسید که پیش‌ساز چوب است تبدیل می‌شود. کوماریک اسید با فعالیت آنزیم‌های مختلف به کونفیریل‌الکل، سیناپیل‌الکل و کوماریل تبدیل می‌گردد. این ترکیبات زیر واحدهای سازنده انواع لیگنان‌ها و لیگنین هستند (Goldson, 2012). در گیاهان پیشرفته، ترانس سینامیک اسید پیش‌ساز طیف وسیعی از مشتقات فنیل پروپانوئیدها از قبیل فلاونوئید، فلاونول، استیل‌بن‌ها، کومارین‌ها، چوب‌ها، چوب‌پنبه‌ها، سایر ترکیبات فنلی دیواره، استرها و آمیدهای محلول و برخی از آلکالوئیدها است (Dixon and Pavia, 1995). از آنزیم PAL در تولید موادی با کاربرد متنوع تجاری شامل فتورزیست‌ها (photoresists)، فتولیتوگرافی (photolithography) و نیمه‌رساناها استفاده می‌شود (Flanagin et al., 1999).

Saccharum officinarum واریته CP69-1062 در چهار مرحله نموی: جوانه‌زنی (germination phase)، پنجه‌زنی (tillering phase)، به ساقه رفتن (grand growth phase) و بلوغ ساقه (maturation and ripening phase) در زمان‌های مشخص از مزرعه تحقیقاتی شرکت توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان در چهار تکرار جمع‌آوری شد. گیاهان در زمان جمع‌آوری در مرحله جوانه زنی سه ماه سن، در مرحله پنجه زنی هفت ماه سن، در مرحله به ساقه رفتن یازده ماه سن و در مرحله بلوغ ساقه پانزده ماه سن داشتند (Bull, 2000). بخش‌های مختلف گیاه شامل: پهنک برگ، غلاف برگ، ساقه و ریشه در چهار مرحله نمو (جوانه‌زنی، پنجه‌زنی، به ساقه رفتن و بلوغ ساقه) در زمان‌های مشخص جمع‌آوری شد. شایان ذکر است که در مرحله جوانه‌زنی به دلیل عدم شکل‌گیری ساقه، سایر اندام‌های گیاه به غیر از ساقه در مزرعه جدا و با آب شستشو داده شد. نمونه‌ها پس از تمیز شدن بلافاصله به تانک نیتروژن مایع منتقل شد و به صورت تازه در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد برای بررسی‌های بیوشیمیایی نگهداری شدند.

سنجش میزان فعالیت آنزیم: اصول اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL بر تولید ترکیب ترانس سینامیک اسید و تغییر جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر است. مقدار ترانس سینامیک اسید تولید شده بر حسب ماکرومولار در لیتر در دقیقه در ۱۰۰ میلی‌گرم بافت گیاهی در نظر گرفته شد. ابتدا، نمونه‌های گیاهی با هاون در نیتروژن مایع همگن شد و در بافر استخراجی حاوی تریس-هیدروکلرید، EDTA، ۲ مرکاپتواتانول و پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (PVPP) W/V به نسبت

گیاه نیشکر (*Saccharum officinarum*) جنس طایفه Andropogoneae از تیره گندمیان و جزو گیاهان C4 است و به طور وسیع در کشورهای مختلف، در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشت می‌شود. نیشکر به‌عنوان منبع شکر و بسیاری فرآورده‌های مهم اقتصادی است و در مقایسه با سایر محصولات کشاورزی از نظر بازده تثبیت انرژی در واحد سطح در درجه اول اهمیت قرار دارد. نیشکر حدود ۴۵ تن وزن خشک و ۲۲ تن شکر در هکتار در سال تولید می‌کند (Selman-Housein *et al.*, 1999). بررسی‌های بسیاری نشان می‌دهد که آنزیم PAL پاسخگوی طیف متنوعی از محرک‌های محیطی از جمله: عوامل بیماری‌زا، زخم، فقر مواد غذایی، اشعه فرابنفش، دماهای بالا و سایر موارد تنش‌زا است. به منظور مطالعه عملکرد این خانواده ژنی بررسی‌های مولکولی و ژنتیکی از جمله خاموش کردن یا آسیب دیدن این ژن انجام شده است که نقش این ژن را در پدیده‌های رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی مشخص می‌سازد (Huang *et al.*, 2010). تاکنون میزان فعالیت آنزیم PAL در گیاه نیشکر مطالعه نشده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی فعالیت آنزیم PAL به عنوان یک آنزیم اساسی در مسیر فنیل پروپانوئیدها، تعیین میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، ارتباط احتمالی بین میزان برخی متابولیت‌های ثانویه این مسیر و میزان فعالیت آنزیم PAL در اندام‌های مختلف گیاه *Saccharum officinarum* طی مراحل نموی مختلف است.

مواد و روش‌ها

به منظور تهیه ماده گیاهی، گیاه کامل نیشکر

۵ میلی لیتر به دست آید. سپس، به محلول حاصل ۳۰ میلی لیتر نیتريت سدیم ۵ درصد و پس از ۲ دقیقه، ۶۰ میلی لیتر $AlCl_3$ ۱۰ درصد اضافه گردید و در نهایت، ۲ میلی لیتر NaOH ۱ مولار و ۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد (Zhishen *et al.*, 1999).

سنجش مقدار فلاونول کل: مقدار فلاونول کل با استفاده از آلومینیوم کلرید انجام شد و فلاونول کل بر اساس کوئرستین سنجیده شد (Ying and Wan, 2012). به ۲ میلی لیتر از عصاره متانولی، ۲ میلی لیتر از محلول آلومینیوم کلرید ۲ درصد، ۶ میلی لیتر از محلول سدیم استات ۵ درصد اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۰ میلی لیتر رسید. جذب هر یک از نمونه‌ها پس از ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۴۵ نانومتر سنجیده شد (Zhishen *et al.*, 1999).

سنجش میزان ترکیب‌های فنلی کل: سنجش فنل کل با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو به این صورت انجام شد: ۰/۱ گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد عصاره‌گیری و عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس به محلول حاصل ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۵ میلی لیتر فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد. شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیب‌های فنلی از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده شد (Dos Santos *et al.*, 2009).

۱:۲ (وزن تر نمونه: بافر) حل شدند. پس از همگن‌سازی، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به ۴۰۰ میکرولیتر از بافر واکنش (تریس-هیدروکلراید) و ۲۰۰ میکرولیتر از سوپسترا (فیل آلانین و تریس-هیدروکلراید) افزوده شد و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۸ درجه سانتیگراد قرار گرفت. تری کلرو استیک اسید برای پایان دادن به واکنش اضافه شده است، نمونه در ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و برای تعیین میزان ترانس سینامیک اسید، جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل U-2800، شرکت Hitachi، ژاپن) خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد ارزیابی شد (Goldson *et al.*, 2008). به منظور اندازه‌گیری میزان پروتئین کل از روش Bradford (۱۹۷۹) استفاده شد. بر پایه این روش، محلول Bradford ۲۰ درصد و محلول‌های استاندارد با استفاده از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت‌های: ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در ۱ میلی لیتر تهیه شد به طوری که ضریب پیوستگی تمام منحنی‌های استاندارد در طول آزمایش‌ها بالای ۹۹ بود و میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل با روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم از نمونه‌های گیاهی در ۱۰ میلی لیتر متانول عصاره‌گیری شد (Toor and Savage, 2005). به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره حاصل، آب مقطر اضافه شد تا حجم

نتایج بررسی ترکیب‌های فنلی در اندام‌های

مختلف گیاه نیشکر طی مراحل مختلف نموی:

نتایج نشان داد که میزان فنل کل در برگ طی مراحل نمو گیاه متفاوت بود. به طوری که این ترکیب‌ها در اندام برگ در مرحله جوانه‌زنی و بلوغ گیاه بالاتر از سایر اندام‌ها بود. این در حالی است که بین میزان فنل کل در مراحل پنجه‌زنی و رشد طولی اختلاف معنی‌داری دیده نشد (شکل ۲-۱). میزان فنل کل طی مراحل نمو در غلاف برگ، در مرحله جوانه‌زنی و پنجه‌زنی به طور معنی‌داری بیش از مراحل نموی رشد طولی و بلوغ بود (شکل ۲-۲). میزان فنل کل طی مراحل نموی طی ساقه، در مرحله پنجه‌زنی به طور معنی‌داری بیش از سایر مراحل نمو بود. اختلاف معنی‌داری بین میزان فنل کل در ساقه طی مراحل نموی رشد طولی و بلوغ دیده نشد (شکل ۲-۳). نتایج نشان داد که میزان فنل کل در ریشه طی مراحل نمو گیاه متفاوت بود. به طوری که این ترکیب در ریشه طی مرحله بلوغ گیاه بالاتر از سایر مراحل بود. این در حالی است که میزان فنل کل در مرحله پنجه‌زنی بیش از میزان فنل در مرحله جوانه‌زنی و رشد طولی بود ($P < 0/05$) (شکل ۲-۴).

نتایج بررسی میزان فلاونوئید در اندام‌های

مختلف گیاه نیشکر طی مراحل مختلف نمو: میزان

فلاونوئید برگ در مراحل جوانه‌زنی و بلوغ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین میزان فلاونوئید برگ در مرحله پنجه‌زنی کمترین مقدار را نشان داد (شکل ۳-۱). میزان فلاونوئید در برگ طی مرحله پنجه‌زنی با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و کمترین میزان فلاونوئید طی مرحله بلوغ بود (شکل

تحلیل داده‌ها: تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار

SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. اختلاف آماری بین میانگین‌ها شاخص‌های مختلف با آزمون چند دامنه‌ای دانکن بررسی شد. ارتباط عوامل مورد مطالعه در هر گروه به وسیله آزمون همبستگی دو متغیره پیرسون انجام شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

نتایج بررسی میزان فعالیت آنزیم PAL در

اندام‌های مختلف گیاه نیشکر طی مراحل مختلف

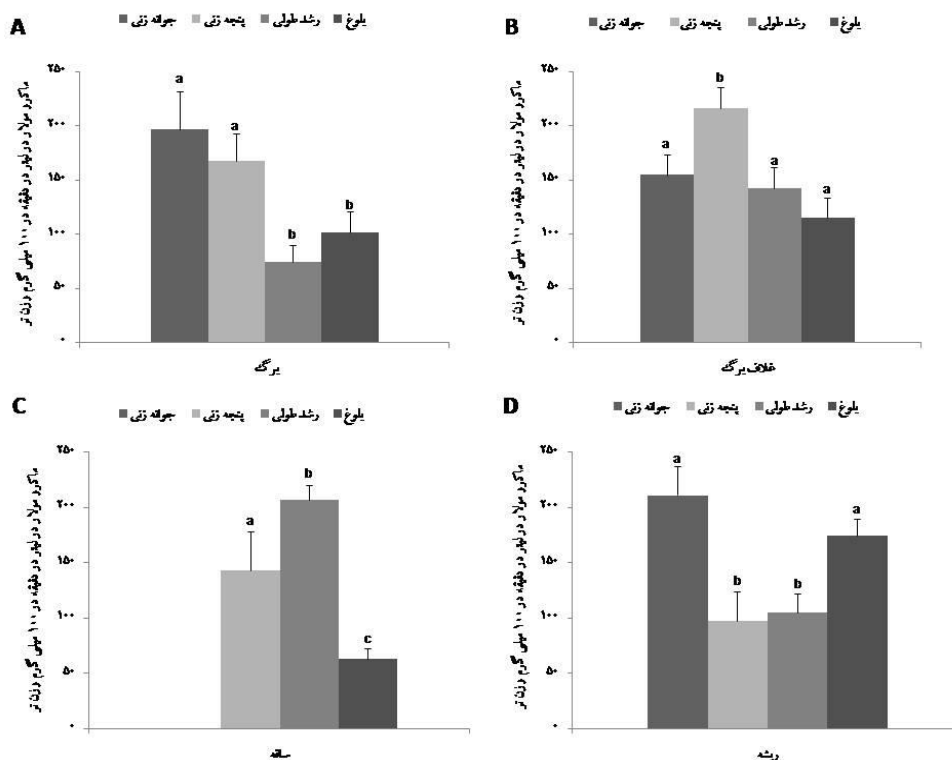
نمو: میزان فعالیت آنزیم برگ در مراحل جوانه‌زنی و پنجه‌زنی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین، میزان فعالیت آنزیم برگ در مرحله رشد طولی کمترین مقدار را نشان داد و با مرحله بلوغ اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱-۱). میزان فعالیت آنزیم در غلاف برگ در مرحله پنجه‌زنی با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و کمترین میزان فعالیت آنزیم در مرحله جوانه‌زنی، رشد طولی و بلوغ دیده نشد (شکل ۱-۲). میزان فعالیت آنزیم در ساقه طی مرحله رشد طولی با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و کمترین میزان فعالیت آنزیم در مرحله پنجه‌زنی بود (شکل ۱-۳). میزان فعالیت آنزیم در ریشه طی مرحله جوانه‌زنی با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و کمترین میزان فعالیت آنزیم طی مرحله بلوغ بود. اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم طی مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی دیده نشد ($P < 0/05$) (شکل ۱-۴).

طولی و بلوغ اختلاف معنی‌داری دیده نشد (شکل ۴-۴). میزان فلاونول طی مراحل نمو در غلاف برگ، همانند برگ در مرحله جوانه‌زنی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر مراحل نمو بود (شکل ۴-۳). میزان فلاونول در ساقه طی مرحله رشد طولی به طور معنی‌داری بیش از سایر مراحل نمو بود. اختلاف معنی‌داری بین میزان فلاونول در ساقه طی مراحل نمو جوانه‌زنی و بلوغ دیده نشد (شکل ۴-۳). میزان فلاونول در ریشه طی مراحل نمو بلوغ گیاه بالاتر از بقیه مراحل مشاهده شد. این در حالی است که بین میزان فلاونول طی مرحله جوانه‌زنی، پنجه‌زنی و رشد طولی اختلاف معنی‌داری دیده نشد (شکل ۴-۳).

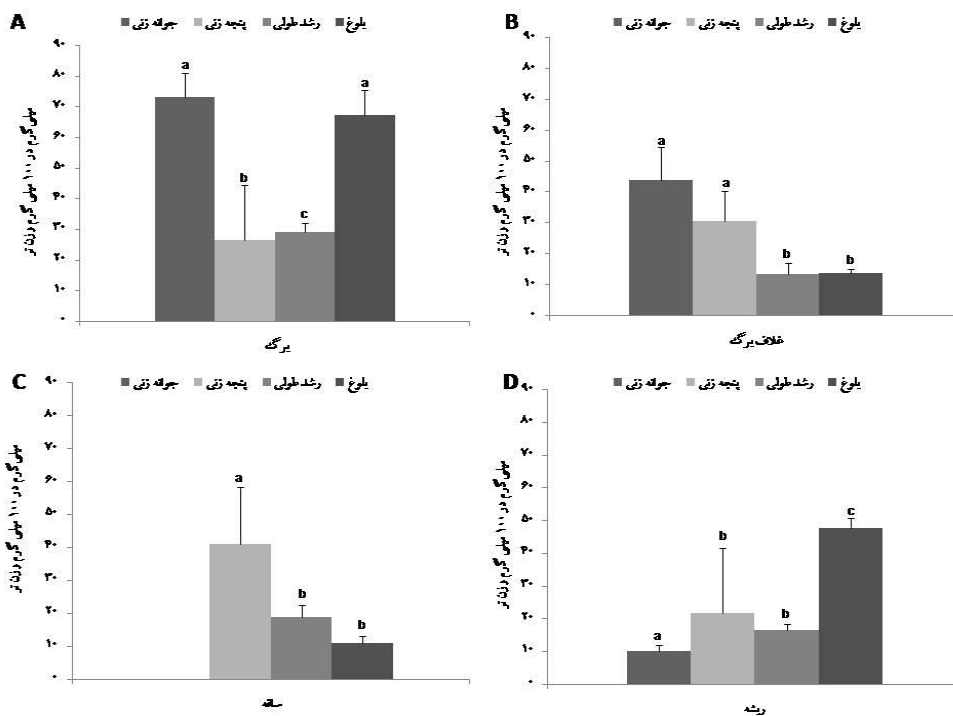
۳-۳). میزان فلاونوئید در ساقه طی مرحله رشد طولی با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و کمترین میزان فلاونوئید مربوط به مرحله بلوغ بود (شکل ۳-۳). میزان فلاونوئید در ریشه طی مرحله بلوغ با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و کمترین میزان فلاونوئید در مرحله جوانه‌زنی بود (شکل ۳-۳) ($P < 0.05$).

نتایج بررسی میزان فلاونول در اندام‌های

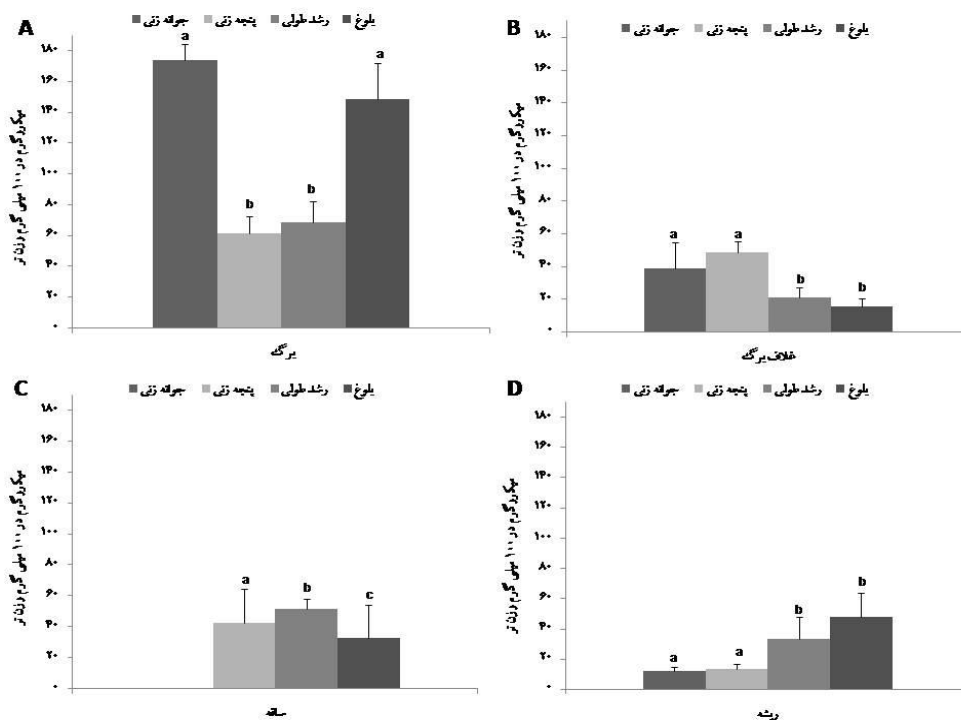
مختلف گیاه نیشکر طی مراحل مختلف نمو: نتایج نشان داد که میزان فلاونول در برگ، طی مرحله جوانه‌زنی گیاه بالاتر از سایر اندام‌ها بود. این در حالی است که بین میزان فلاونول در مرحله پنجه‌زنی، رشد



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم PAL (ماکرومولار در لیتر در دقیقه در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن تر) در برگ (A)، غلاف برگ (B)، ساقه (C) و ریشه (D) طی مراحل مختلف نمو. مقادیر میانگین ۳ بار تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.



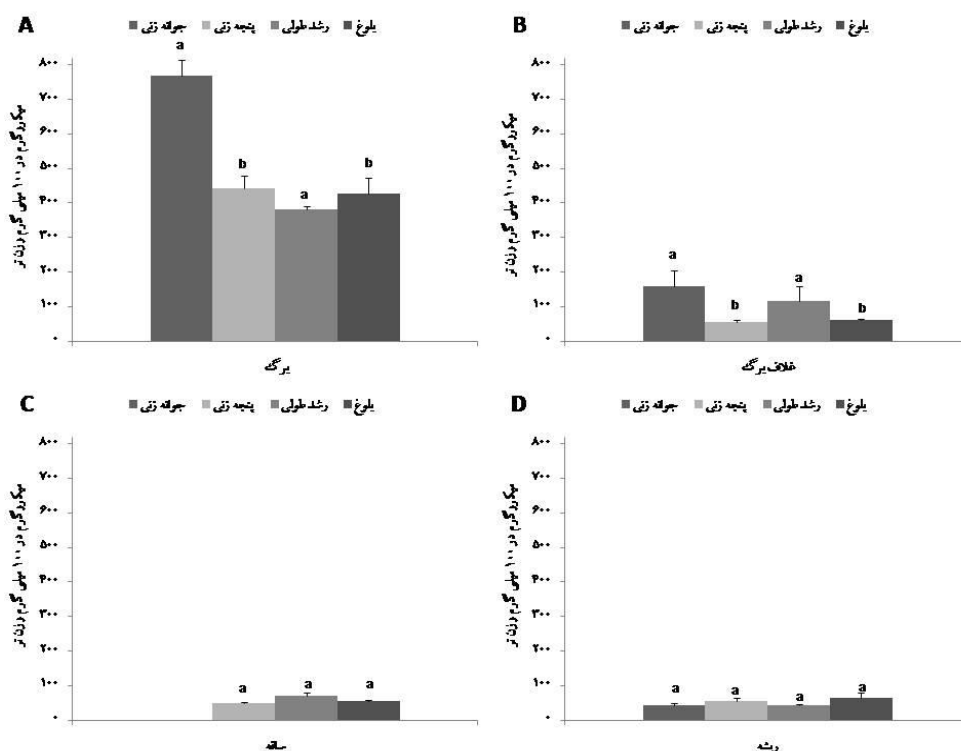
شکل ۲- میزان فنل کل (میلی گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن تر) در برگ (A)، غلاف برگ (B)، ساقه (C) و ریشه (D) طی مراحل مختلف نمو. مقادیر میانگین ۳ بار تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.



شکل ۳- میزان فلاونوئید (میکروگرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن تر) در برگ (A)، غلاف برگ (B)، ساقه (C) و ریشه (D) طی مراحل مختلف نمو. مقادیر میانگین ۳ بار تکرار \pm SE است. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.

بررسی ضریب همبستگی پیرسون بین فعالیت آنزیم PAL و میزان فنل کل، فلاونوئید و فلاونول در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو: بررسی ضریب همبستگی بین فعالیت آنزیم PAL و میزان فنل کل در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو بیانگر این بود که دو متغیر با یکدیگر در ارتباط بودند و ضریب همبستگی پیرسون برابر با $r=0/377$ بود ($P<0/05$). ضریب همبستگی بین فعالیت آنزیم PAL و میزان

فلاونوئید در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو نشان‌دهنده این بود که دو متغیر با هم ارتباطی ندارند و ضریب همبستگی پیرسون $r=0/279$ بود ($P<0/05$). بررسی ضریب همبستگی بین فعالیت آنزیم PAL و میزان فلاونول در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو بیانگر این بود که دو متغیر با هم ارتباطی ندارند و ضریب همبستگی پیرسون برابر با $r=0/317$ بود ($P<0/05$).



شکل ۴- میزان فلاونول (میکروگرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن تر) در برگ (A)، غلاف برگ (B)، ساقه (C) و ریشه (D) طی مراحل مختلف نمو. مقادیر میانگین ۳ بار تکرار $\pm SE$ است. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0/05$ است.

بحث

Xu et al., 2012؛ Jeong et al., 2012؛ al., 2011؛ Kolahi et al., 2013). ترکیبات فنلی در گیاهان به ویژه در گیاهان دارویی شناسایی شده است. همچنین، این ترکیبات در اندام‌های مختلف گیاهان یافت شده

آنزیم PAL به طور وسیع، از گیاهان، قارچ‌ها و میکروارگانسیم‌ها خالص‌سازی و شناسایی شده است (Hyun et al؛ Feng et al., 2008؛ Rosler et al., 1997)

PAL و آنزیم‌های به دنبال آن در مسیر فنیل پروپانوئید طبق برنامه نمو سلول به طور مستقیم مقادیر خاصی از کربن را به انواع محصولات نهایی متابولیک پیش می‌برند. برای نمونه، در چوب ثانویه گیاهان چوبی ۱۵ تا ۳۶ کربن به سمت بیوستز لیگنین می‌رود و در بافت‌های علفی، کسر زیادی از شارش کربن به سمت فلاونوئید محلول یا دیگر مشتقات فنیل پروپانوئید از قبیل سیناپیل ملات در آراییدوپسیس و کلروژنیک اسید در تنباکو است که در این بافت‌ها تجمع بالایی دارند. تنظیم فیدبکی (feed back) ترانس سینامیک اسید موجب ممانعت فعالیت آنزیم PAL به واسطه ممانعت نسخه برداری ژن‌های PAL در *in vivo* می‌شود (Ro and Douglas, 2004). در مطالعه انجام شده تفاوت در میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه و همچنین تغییر فعالیت آنزیم PAL در بافت‌های مختلف طی مراحل نمو گیاه نیشکر مشاهده شد. پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که در برخی گیاهان، PAL کمپلکس چند آنزیمی MECs (Multi Enzyme Complexes) شامل آنزیم‌های پایین دست را شکل می‌دهد که شارش کربن به مسیرهای مختلف فنیل پروپانوئیدی را تسهیل می‌کند (Schuster and Rétey, 1995; Ro and Douglas, 2004; MacDonal and D'Cunha, 2007). همچنین، مشخص شده است که متابولیت‌های توسط آوندهای آبکش از سلول‌های منبع به سلول‌های همسایه یا از بافتی به بافت دیگر یا از اندامی به اندام دیگر منتقل شوند (Yazaki, 2005). ژن‌های مسؤو بیوستز متابولیت‌های ثانویه ممکن است در همان اندامی که تجمع می‌یابد به میزان زیادی بیان شود، اگر چه انتقال این متابولیت‌ها از اندامی به اندام دیگر نیز اتفاق می‌افتد و این موضوع بیان

است. در گیاه *Salvia glutinosa* بیشترین میزان این ترکیبات در بخش‌های هوایی شناسایی شده است (Ebrahimzadeh and Bekhradnia, 2008). بررسی‌های نشان می‌دهد در روند نمو گیاه نیشکر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، میزان فنل کل، فلاونوئید و فلاونول در اندام‌های مختلف، متفاوت است. مطالعات پیشین در مورد ترکیبات فلاونوئیدی در گیاهان دیگر نتایج مطالعه را تأیید می‌کند. بررسی موقعیت فلاونوئید گلیکون در آفتابگردان نشان می‌دهد که فلاونوئیدهای خاصی در گُرک‌های غده روی سلول‌های اپیدرمی برگ‌ها در تمایز و عملکرد سلول‌ها نقش دارند. این مطالعات نشان‌دهنده نقش ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در سازوکار تنظیمی، نسخه برداری و نقش آنها در پاسخ‌های فیزیولوژیک و تدافعی گیاهان است (Riesebergo *et al.*, 1987).

تفاوت ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در اندام‌های مختلف در گیاهان می‌تواند به ماهیت، وظیفه، عملکرد بافت، نقش در مسیرهای تمایزی، نموی و حفاظتی این ترکیبات و برهمکنش گیاه و پاتوژن‌ها مربوط باشد (Carolyn *et al.*, 1996). به واسطه عملکرد این ترکیبات و نقش آنها در نمو بافت‌ها، فعالیت PAL و فعال سازی آن تحت شرایط نمو بخشی از سازوکار تمایز بیوشیمیایی گیاه است. افزایش فعالیت PAL یک نشانگر بیوشیمیایی برای سنتز فنل‌های ضروری برای مقاومت گیاه است (Campos *et al.*, 2003). بررسی متابولیت‌های ثانویه اندازه گیری شده در مطالعه حاضر، بیانگر تغییرات معنی دار در بافت‌های مختلف طی مراحل نمو گیاه نیشکر بود که با مطالعات Ro و Douglas (۲۰۰۴) همخوانی دارد. پژوهش‌های پیشین نشان داد که

مقاومت در ساقه است، در حالی که در این مرحله تبدیل قندهای ساده به سوکروز و ذخیره شکر در ساقه آغاز شده است. در این مرحله تغییرات اغلب از نوع کیفی است و در نهایت، رشد متوقف می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده است که افزایش PAL برون‌زاد باعث شکل‌گیری گره‌های آوندی حاوی آوند چوب و آبکش در محیط کشت و خاک می‌شود. در ساقه‌های چوبی، PAL در تمایز چوب و اشعه پاراننشیمی فعالیت اساسی دارد. فعالیت PAL نشانه خوبی از تمایز عناصر چوبی است (Sato *et al.*, 2009). بیشترین فعالیت آنزیم PAL در دانه‌رُست‌های گندم طی روند رشد گندم مشاهده شده است (Goldson *et al.*, 2008). در ساقه گیاه *Melilotus alba* بیشترین فعالیت آنزیم در برگ‌های جوان گزارش شده است (Kleinhofs *et al.*, 1966).

وجود همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم و فنل کل در اندام‌های مختلف طی مراحل نموی بیانگر این است که آنزیم PAL عملکردی چندجانبه دارد و سرسلسله بسیاری از واکنش‌ها در گیاه است. در اندام‌هایی مانند برگ و غلاف برگ، علیرغم فعالیت بالای آنزیم PAL شدت چوبی شدن کم است، اما میزان فنل کل بالاست که بیانگر فعالیت آنزیم در سایر مسیرهای بیوسنتزی فنیل پروپانوییدی غیر از بیوسنتز لیگنین است که به سنتز ترکیباتی با نقش تدافعی در سلول گیاهی یا ترکیباتی از قبیل فلاونوئید و فلاونول منجر می‌شوند که غلظت بالای آنها در اندام برگ مشاهده شد (Rieseberdgo *et al.*, 1987). در برخی اندام‌ها بین فعالیت آنزیم و میزان فنل کل هماهنگی مشاهده نشد، چنانچه در ریشه علیرغم فعالیت آنزیمی نسبتاً بالا، شاهد کاهش میزان فنل کل به

کننده این موضوع است که حضور یک متابولیت خاص در اندامی الزاماً نشانه بیان ژن‌های مسؤول یا فعالیت آنزیم مربوطه در آن اندام نیست (Tsubasa *et al.*, 2000؛ Hashemitabar *et al.*, 2014). پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت بالای آنزیم PAL در برگ گیاه نیشکر جوان تا حدی برای چوبی شدن دسته‌های آوندی برگ و ایجاد مقاومت در برگ ضروری است. زیرا انتخاب نمونه برگ بدین نحو بود که از برگ‌هایی با فعالیت متابولیسمی و عملکردی بالا نمونه‌گیری شد که مرحله رشد در آنها تمام نشده بود و با توجه به این که برگ نیشکر در مراحل انتهایی رشد به بیش از یک متر می‌رسد، وجود ساختارهای چوبی جهت استحکام ساختمان برگ ضروری است. بررسی میزان تجمع آنزیم PAL بیانگر مقادیر مختلف این آنزیم در اندام‌های مختلف است. تجمع بالای پروتئین PAL با روش وسترن بلات در برگ *Phyllostachys edulis* از خانواده گندمیان شناسایی شده است (Gao *et al.*, 2012). از سوی دیگر، در برگ‌ها متابولیسم بالایی برقرار است و سلول‌های برگ‌های جوان برای پاسخ به محیط نیاز به ساخت ترکیبات مقاوم‌کننده یا رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS, Reactive oxygen species) دارند که در اثر شدت تنش بالا در برگ آزاد می‌شوند. آنزیم PAL با به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد از طریق ترکیبات فنلی (به عنوان دهنده الکترون) در نقش یک آنزیم آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (Tsubasa *et al.*, 2000؛ Singh *et al.*, 2009؛ Eichholz *et al.*, 2012؛ Hao *et al.*, 2012؛ Jeong *et al.*, 2012).

فعالیت آنزیمی بالا در ساقه نیشکر در مرحله رشد طولی، ادامه روند چوبی شدن و ایجاد استحکام و

ویژه در مراحل ابتدایی نمو نیشکر بودیم که می‌تواند به دلیل ماهیت فرار بودن ترکیبات فنلی در آن اندام باشد (Hajjibiland and Ebrahimi, 2011). دلیل دیگر این که روش استخراج فنل در پژوهش حاضر فقط فنل‌های محلول را بررسی می‌کند، در حالی که نمی‌توان نقش فعالیت آنزیم PAL در سنتز فنل‌های متصل به دیواره را منتفی دانست. داده‌های زیادی همبستگی بین تجمع فنل و فعالیت آنزیم PAL را نشان می‌دهند (Gallao *et al.*, 2010). در اغلب موارد، فعالیت PAL به افزایش تجمع فنیل پروپانوئیدها منجر می‌شود، اما بیان بالای PAL آراییدوپسیس در ریشه‌های تراریخت گیاه حسن یوسف به بلوکه شدن مسیر فنیل پروپانوئیدی منجر می‌شود. فرآورده آنزیمی PAL یعنی ترانس سینامیک اسید مهارکننده رقابتی پروتئین PAL است و از نسخه‌برداری PAL جلوگیری می‌کند، از سوی دیگر، ترکیبات غیرفعال کننده PAL را القا می‌کند (Blount *et al.*, 2000؛ Bauer and Hrvoje Jelaska, 2011). در بیشتر مطالعات بین میزان فنل و فعالیت آنزیم PAL هماهنگی وجود دارد. فعالیت آنزیم PAL در اندام‌های هوایی عموماً بیشتر از ریشه است و از طرفی در مراحل بلوغ فعالیت آن کاهش می‌یابد و همین روند در ارتباط با ترکیبات فنلی نیز دیده می‌شود یعنی میزان ترکیبات فنلی در بخش‌های هوایی بیشتر است (Kolahi *et al.*, 2013). بین میزان فنل و میزان فلاونوئید، فلاونول و فعالیت آنزیم در برگ ارتباط مستقیم وجود دارد، پس می‌توان گفت فعالیت آنزیم در برگ بیشتر به سمت بیوستت ترکیبات غیرچوبی است (Nadernejad *et al.*, 2013). افزایش فعالیت آنزیم و به دنبال آن چوبی شدن در نقاط تیمار شده در کشت سلول‌های نیشکر گزارش شده است (Gallao *et al.*, 2010). نقش اساسی آنزیم PAL در تغییر مسیر فنیل پروپانوئیدها به سنتز متابولیت ثانویه مختلف بسته به شرایط محیطی و نموی گیاهان به اثبات رسیده است. در تنش با اشعه فرا بنفش، افزایش فعالیت آنزیم PAL همراه با تجمع ترکیبات فلاونوئیدی است (Du *et al.*, 1996؛ Carolyn *et al.*, 2005؛ Yazaki, 2012). از دیگر دلایل قابل ذکر برای مشاهده میزان فعالیت متفاوت آنزیم PAL در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو گیاه نیشکر، شرایط مختلف بافتی و محیطی گیاه است. آنزیم‌ها برای فعالیت کاتالیتیکی به شرایط بهینه نیاز دارند که این شرایط در اندام‌ها و مراحل نموی گیاه متفاوت است و بر فعالیت آنزیم مؤثرند. آمینو ۲- ایندونوفونیک اسید (AIP) به عنوان ممانعت کننده آنزیم PAL در پرتقال گزارش شده است (Panina *et al.*, 2005). آمینو اکسی استیک اسید (AOA) به عنوان ممانعت کننده و L-آمینو اکسی فنیل پروپونیک اسید (AOPP) به عنوان فعال کننده فعالیت PAL در محیط کشت سلول گیاهی شناسایی شده است (Brincat *et al.*, 2002). بررسی نتایج حاصل از سنجش فنل، فلاونول و فلاونوئید بیانگر مقادیر مختلف این مواد در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو است. تغییرات مسیر فنیل پروپانوئیدی سلول‌ها می‌تواند به دلیل حضور، عدم حضور و مقادیر فعال کننده‌ها و ممانعت کننده‌های آنزیم‌های این مسیر متابولیکی در اندام‌ها و بافت‌های مختلف باشد. آنزیم PAL یک متالوآنزیم است و نوکلئوتید آدنین باعث افزایش فعالیت آنزیم در حضور برخی یون‌های دو ظرفیتی مانند منیزیم و منگنز می‌شود (El-Shora, 2002). از سوی دیگر، آنزیم برای تبدیل سوپسترا به فرآورده واکنش بایستی کارآیی مطلوبی

ویژه در مراحل ابتدایی نمو نیشکر بودیم که می‌تواند به دلیل ماهیت فرار بودن ترکیبات فنلی در آن اندام باشد (Hajjibiland and Ebrahimi, 2011). دلیل دیگر این که روش استخراج فنل در پژوهش حاضر فقط فنل‌های محلول را بررسی می‌کند، در حالی که نمی‌توان نقش فعالیت آنزیم PAL در سنتز فنل‌های متصل به دیواره را منتفی دانست. داده‌های زیادی همبستگی بین تجمع فنل و فعالیت آنزیم PAL را نشان می‌دهند (Gallao *et al.*, 2010). در اغلب موارد، فعالیت PAL به افزایش تجمع فنیل پروپانوئیدها منجر می‌شود، اما بیان بالای PAL آراییدوپسیس در ریشه‌های تراریخت گیاه حسن یوسف به بلوکه شدن مسیر فنیل پروپانوئیدی منجر می‌شود. فرآورده آنزیمی PAL یعنی ترانس سینامیک اسید مهارکننده رقابتی پروتئین PAL است و از نسخه‌برداری PAL جلوگیری می‌کند، از سوی دیگر، ترکیبات غیرفعال کننده PAL را القا می‌کند (Blount *et al.*, 2000؛ Bauer and Hrvoje Jelaska, 2011). در بیشتر مطالعات بین میزان فنل و فعالیت آنزیم PAL هماهنگی وجود دارد. فعالیت آنزیم PAL در اندام‌های هوایی عموماً بیشتر از ریشه است و از طرفی در مراحل بلوغ فعالیت آن کاهش می‌یابد و همین روند در ارتباط با ترکیبات فنلی نیز دیده می‌شود یعنی میزان ترکیبات فنلی در بخش‌های هوایی بیشتر است (Kolahi *et al.*, 2013). بین میزان فنل و میزان فلاونوئید، فلاونول و فعالیت آنزیم در برگ ارتباط مستقیم وجود دارد، پس می‌توان گفت فعالیت آنزیم در برگ بیشتر به سمت بیوستت ترکیبات غیرچوبی است (Nadernejad *et al.*, 2013). افزایش فعالیت آنزیم و به دنبال آن چوبی شدن در نقاط تیمار شده در کشت سلول‌های نیشکر گزارش شده است

عمده‌ای از فعالیت آنزیم PAL در مسیر بیوستتزی لیگنین قرار می‌گیرد که به دلیل نوع استخراج فنل کل در مطالعه حاضر، میزان لیگنین در آن محاسبه نشده است. همچنین وجود مقادیر بالای مواد فنلی در یک بافت یا اندام می‌تواند نتیجه انتقال مواد فنلی از اندام‌های دیگر و تجمع و ذخیره آنها در بافت مورد نظر باشد که سبب تمایز و تخصص یافتگی سلول می‌شود. به واسطه عملکرد دفاعی و طبیعی ترکیب‌های فنلی، فعالیت PAL و فعال‌سازی آن تحت شرایط تنشی بخشی از سازوکار دفاعی گیاه است. افزایش فعالیت PAL یک نشانگر بیوشیمیایی برای سنتز فنل‌های ضروری در مقاومت گیاه است. در مجموع، فعالیت PAL در گیاه مربوط به رشد و تولید ترکیب‌های فنلی است.

جمع‌بندی

ترکیبات فنیل پروپانوییدی در اندام‌ها و گیاهان مختلف وجود دارد و آنزیم‌های مختلفی در سنتز این ترکیبات نقش دارند. فنیل آلانین آمونیاک (PAL) که آغازکننده نخستین مرحله از بیوستتزی فنیل پروپانویدها است، پل ارتباطی بین متابولیسم و برخی از متابولیت‌های ثانویه است. فعالیت PAL در اندام‌های مختلف و در کلیه مراحل نمو گیاه نیشکر مشاهده شد. بررسی فعالیت آنزیم PAL در گیاه نیشکر بیانگر فعالیت آنزیمی با اختلاف معنی‌دار در اندام‌های مختلف و طی مراحل نمو بود. مطالعه فنل کل، فلاونوئید و فلاونول در اندام‌های مختلف طی مراحل نمو گیاه نیشکر مقادیر مختلف را نشان داد. ممکن است فعالیت آنزیم‌های مسئول بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه در همان اندامی که تجمع می‌یابند فعالیت بالایی داشته باشد اگر چه انتقال این متابولیت‌ها از

داشته باشد که در مواردی علیرغم شکل‌گیری ساختاری آنزیم، فعالیت عملکردی آن پایین است. همچنین فعالیت آنزیم تحت تأثیر تغییرات آللوستریک و کووالانت تنظیم می‌گردد (Goldson *et al.*, 2008). به نظر می‌رسد که وجود مقادیر بالای محصولات نهایی مسیر فنیل پروپانویید و فعالیت بالای آنزیم PAL به طور همزمان مغایرت دارند اما در واقع، غلظت اندک فرآورده‌های اختصاصی آنزیم موجب فعالیت بالای آنزیم می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که غلظت‌های کم ترانس سینامیک اسید و P-کوماریک اسید باعث افزایش فعالیت PAL می‌شود. برخلاف ریشه، در برگ ارتباط مستقیمی بین افزایش فعالیت PAL و ترکیبات فنلی وجود دارد (Bauer and Hrvoje Jelaska, 2011). افزایش فعالیت PAL از ادامه واکنش‌های متابولیسم فنلی جلوگیری می‌کند. تنظیم‌کننده اصلی این فرآیندها ترانس سینامیک اسید است (Bauer and Hrvoje Jelaska, 2011). غلظت بالای ترانس سینامیک اسید در محیط کشت سلول می‌تواند فعالیت PAL را تا ۵۰ درصد کاهش دهد و با تغییر روند بیوستتزی متابولیت‌های واسطه، مسیر سنتز تاکسان را ممانعت کند و تا ۹۰ درصد به کاهش میزان تاکسول منجر شود (Brincat *et al.*, 2002). تجمع جنسین یکی از ایزوفلاون‌های بدنبال بیان‌بالای PAL در تنباکو اتفاق می‌افتد (Bauer and Hrvoje Jelaska, 2011).

عدم وجود همبستگی بین فعالیت آنزیم و میزان فلاونوئید و فلاونول در اندام‌های مختلف مربوط به نقش چندجانبه آنزیم است علت دیگر این که در مطالعه حاضر، تمامی مسیرهای بیوستتزی فنیل پروپانوییدی ارزیابی نشده است و از طرفی، بخش

بیوشیمیایی برای سنتز فنل‌های ضروری در مقاومت گیاه است.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر تأمین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه شماره ۸۴۶۷۰) و همکاری مسؤلان محترم مؤسسه تحقیقات، آموزش توسعه نیشکر خوزستان و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز قدردانی می‌نمایند.

اندامی به اندام دیگر نیز اتفاق می‌افتد و این موضوع بیان‌کننده این مطلب است که حضور متابولیتی خاص در اندامی لزوماً نشانه میزان فعالیت آن آنزیم در اندام نیست. تفاوت ترکیب فنلی در اندام‌های مختلف در گیاهان می‌تواند مربوط به ماهیت، وظیفه، عملکرد بافت، نقش در مسیرهای تمایزی، نموی و حفاظتی این ترکیبات و برهمکنش گیاه و پاتوژن‌ها باشد. به واسطه عملکرد این ترکیبات و نقش آنها در نمو بافت‌ها، فعالیت PAL و فعال‌سازی آن در شرایط نمو، بخشی از سازوکار تمایز بیوشیمیایی گیاه است. افزایش فعالیت PAL یک نشانگر

منابع

- Ali, M. B., Hahn, E. and Paek, K. J. (2007) Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules* 12: 14-25.
- Bauer, N. F. and Hrvoje Jelaska, S. (2011) Overexpression of phenylalanine ammonia-lyase in transgenic roots of *Coleus blumei* alters growth and rosmarinic acid synthesis. *Food Technology and Biotechnology* 49(1): 24-31.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C. and Dixon, R. A. (2000) Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* 122(1): 107-116.
- Bradford, M. M. (1979) Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Annual Biochemistry* 72: 248-254.
- Brincat, M. C., Gibson, D. M. and Shuler, M. L. (2002) Alterations in taxol production in plant cell culture via manipulation of the phenylalanine ammonia lyase pathway. *Biotechnology Progress* 18(6): 1149-1156.
- Bull, T. (2000) The sugarcane plant. In: *Manual of cane growing* (Eds. Hogarth, M. and Allsopp, P.) 4: 71-83. Growing. Bureau of Sugar Experimental Stations Indooroopilly, Australia.
- Butland, S. L. C. and Ellis, M. L. (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Molecular Biology* 37(1): 15-24.
- Campos, A. G., Ferreira, M., Vozári, H., Irajá, F. A., Nely, B., Expedito, P. S., João Batista da, S. and Vera Algayer, O. (2003) Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15(3): 129-134.
- Carolyn, E., Lister, J. and Lancaster, E. (1996) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(2): 281-287.

- Chen, J. Y. W., Kong, P. F., Pan, W. F., Wan, Q. H. and Huang, W. D. (2006) Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology* 163(2): 115-127.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7(7): 1085-1093.
- Dos Santos, V. L., de Souza Monteiro, A., Braga, D. T. and Santoro, M. M. (2009) Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazard Material* 161: 1413-1420.
- Du, W. X., Breksa, A. P. and McHugh, T. H. (2012) Effect of UV-B light and different cutting styles on antioxidant enhancement of commercial fresh-cut carrot products. *Food Chemistry* 134(4): 1862-1869.
- Ebrahimzadeh, M. A. and Bekhradnia, A. R. (2008) Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7(18): 3188-3192.
- Eichholz, I. R., Gamm, S., Beesk, A., Herppich, N., Kroh, W. B., Ulrichs, L. W., C. and Huyskens-Keil, S. (2012) UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Food Research International* 48(1): 196-201.
- El-Shora, H. M. (2002) Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. *Plant Science* 162(1): 1-7.
- Feng, X., Rong, C., Shuiyuan, C., Hewei, D., Yan, W. and Shuhan, C. (2008) Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. *African Journal of Biotechnology* 7(6): 721-730.
- Flanagin, L. W., Singh, V. and Grant, W. (1999) Molecular model of phenolic polymer dissolution in photolithography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 37: 2103-2112.
- Gallao, M. I., Cortelazzo, A. L., Salema Fevereiro M. P. and Brito, E. S. (2010) Biochemical and morphological responses to abiotic elicitor chitin in suspension-cultured sugarcane cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(2): 8-18.
- Gao, Z. M. W., Peng, X. C., Zheng, Z. H. and Liu, Q. (2012) Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis*. *Plant Cell Reports* 31(7): 1345-1356.
- Goldson, A. M. (2012) Plant screening for tyrosine/phenylalanine ammonia lyase and biochemical characterization, purification and cloning of the tyrosine/phenylalanine ammonia lyase enzyme from *Trichosporon cutaneum*. PhD thesis, The University of British Columbia, Vancouver, Canada.
- Goldson, A., Lam, M., Scaman, C. H., Clemens, S. and Kermod, A. (2008) Screening of phenylalanine ammonia lyase in plant tissues and retention of activity during dehydration. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(4): 619-625.
- Hajibiland, R. and Ebrahimi, N. (2011) Growth, photosynthesis and phenolics metabolism in tobacco plants under salinity and application of polyamines. *Iranian Journal of Plant Biology* 3(8): 13-26 (in Persian).
- Hao, G. P., Ji, H. W., Li, Y. L., Shi, R. J., Wang, J. M., Feng, L. and Huang, L. Q. (2012) Expression patterns of defense genes in resistance of the panicles exerted from the culms and from the tillers to neck blast in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 150-156.
- Hashemitabar, M., Kolahi, M., Tabandeh, M., Jonoubi, P. and Majd, M. (2014) cDNA cloning, Phylogenetic analysis and gene expression pattern of phenylalanine ammonia-lyase in sugarcane (*Saccharum*

- officinarum* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology 57(4): 1-10.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. and Chen, Z. (2010) Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development and response to environmental stress. *Plant Physiology* 153(4): 1526-1538.
- Hyun, M. W. Y., Kim, Y. H. and Kim, J. Y. (2011) Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology* 39(4): 257-265.
- Jeong, M. J. C., Bae, B. S., Shin, D. W., Park, S. C., Lim, S. U., Kim, H. S., Kim, J., Cho, J. B. and Bae, H. (2012) Differential expression of kenaf phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ortholog during developmental stages and in response to abiotic stresses. *Plant Omics* 5(4): 392-399.
- Kleinhofs, A. H., Haskins, F. A. and Gorz, H. J. (1966) Relationship of phenylalanine ammonia-lyase activity to o-hydroxycinnamic acid content in *Melilotus alba*. *Plant Physiology* 41(8): 1267-1271.
- Kolahi, M., Jonoubi, P., Majd, A., Tabandeh, M. and Hashemitabar, M. (2013) Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase in different tissues of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) during development. *BioResources* 8(4): 1-10.
- Koukol, J. and Conn, E. (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biology and Chemistry* 236: 2692-2698.
- MacDonald, M. J. and D'Cunha, G. B. (2007) A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* 85(3): 273-282.
- Nadernejad, N., Ahmadimoghadam, A., Hossyinfard, J. and Poorseyedi, S. (2013) Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 5(15): 95-110 (in Persian).
- Panina, Y. S., Gerasimova, N. G., Chalenko, G. I., Vasyukova, N. I. and Ozeretskoykaya, O. L. (2005) Salicylic acid and phenylalanine ammonia-lyase in potato plants infected with the causal agent of late blight. *Russian Journal of Plant Physiology* 52(4): 511-517.
- Rieseberdgo, L. H., Uglas, S. and Douga Rnold, N. (1987) Variation localization of flavonoid aglycones in *Helianthus annuus* (Compositae). *American Journal of Botany* 74(2): 224-235.
- Ro, D. K. and Douglas, C. J. (2004) Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *Journal of Biology and Chemistry* 279(4): 2600-2607.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N. and Schmid, J. (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiology* 113(1): 175-179.
- Sato, K., Nishikubo, N., Mashino, Y., Yoshitomi, K., Zhou, J. and Kajita, S. (2009) Immunohistochemical localization of enzymes that catalyze the long sequential pathways of lignin biosynthesis during differentiation of secondary xylem tissues of hybrid aspen (*Populus sieboldii* x *Populus grandidentata*). *Tree Physiology* 29(12): 1599-1606.
- Schuster, B. and Rétey, J. (1995) The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(18): 8433-8438.
- Selman-Housein, G., Lopeza, M., Hernandez, D., Civardi, L., Miranda, F., Rigau, J. and Puigdomenech, P. (1999) Molecular cloning of cDNA s coding for three sugarcane enzymes involved in lignification. *Plant Science* 143: 163-172.
- Singh, K., Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A. and Ahuja, P. S. (2009) Phenylalanine ammonia-

- lyase (PAL) and cinnamate 4-hydro xylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Function of Integration Genomics* 9(1): 125-134.
- Toor, R. K. and Savage, G. P. (2005) Antioxidant activities in different fractions of tomato. *Food Research International* 38: 487-494.
- Tsubasa, S., Yasuyuki, Y. and Hashimoto, T. (2000) Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant and Cell Physiology* 41(7): 831-839.
- Xu, F., Deng, G., Cheng, S. Y., Zhang, W., Huang, X. H., Li, L., Cheng, H. and Rong, X. F. (2012) Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*. *Molecules* 17(7): 7810-7823.
- Yazaki, K. (2005) Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology* 8(3): 301-307.
- Ying, C. and Wan, D. (2012) Quantitative determination of total and individual flavonoids in stems and leaves of *Buddleja davidii* and *Buddleja albiflora*. *Pharmacognosy Magazine* 8(32): 273-279.
- Zhishen, J., Mengcjheng, T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.

A study of some biochemistry changes of phenylpropanoid pathway in sugarcane (*Saccharum officinarum*) organs during developmental stages

Maryam Kolahi ^{1*}, Mohamad Reza Tabandeh ², Mahmoud Shomeili ³
and Mahmoud Hashemitabar ⁴

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Department of Agronomy Developments, Sugarcane Research and Training Institute, Ahvaz, Iran

⁴ Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract

Phenylpropanoid compounds as secondary metabolites are synthesized by plants during development and in response to stress. Phenylpropanoids contribute to the compounds of plant pigmentation, antioxidants and protective agents and also play a regulatory role in growth and morphogenesis. In this research, samples of blade and sheath of leaf, stem, and root of *Saccharum officinarum* (cultivar CP69-1062) during the germination, tillering, grand growth, and maturation stages were prepared. In order to studying biochemical changes of phenylpropanoid compounds during development of sugarcane, PAL activity enzyme, phenolic, flavonoids and flavonols component in samples were analyzed. The study of changes of enzyme activity in different tissues during developmental stages showed high enzyme activity of PAL in leaves during all of developmental stages and in sheath during grand growth stage. Enzyme activity was increased in stem during grand growth stage and in root during germination stage. Results indicated that changes of concentration of total phenol and the maximum amount of total phenol were detected in leaf during germination and maturation stages, in sheath during germination stage, in stem during grand growth stage and in root during maturation stage ($P < 0.05$). The maximum amount of flavonoids and flavonols were observed significantly in leaves during all of developmental stages. This variation may originate by the existing heterogeneity in different parts of plants and also chemical and biochemical features of this compound. In conclusion, PAL, as a rate-limiting enzyme of the phenylpropanoid pathway, displays critical role in the development of sugarcane, particularly in lignified tissues.

Key words: Phenylalanine ammonia-lyase enzyme (PAL), Flavonoids, Flavonols, Total phenol, Development, *Saccharum officinarum*

* Corresponding Author: m.kolahi@scu.ac.ir