

آماده کردن ترکیب آمیلوز در برگهای Arabidopsis

مکانیسم ترکیب آمیلوز را در برگ های Arabidopsis با استفاده از تکنیک های برچسب زنی C بررسی کردیم. در ابتدا این فرضیه را امتحان کردیم که ممکن است - malto oligosaccharides (MOS) به عنوان چاشنی (آستر) برای سنتاز ۱ نشاسته ای که دارای دانه های محدود است عمل کند. متوجه شدیم ترکیب افزوده شده آمیلوز در دانه ها جدا شده نشاسته با گلوکز ADP تهیه می شود و MOS تهیه می شود و MOS که با دانه ها مقایسه شده با گلوکز ADP تهیه می گردد. علاوه بر این، با استفاده از گیاهان تغییر پذیر (Matant) جمع آوری کننده MOS متوجه شدیم که نسبت به نوع وحشی آمیلوز بیشتری ترکیب گردید که به مقدار MOS در Vivo ارتباط دارد. زمانی که گیاهان تغییر پذیر و نوع وحشی در موقعیت هایی که هر دو خطوط دارای محتوی مشابه MOS هستند، آزمایش گردیدند، هیچ تفاوتی در ترکیب آمیلوز مشاهده نشده همچنین فرضیه ای را آزمایش کردیم که ممکن است شاخه های آمیلو پکتین به عنوان چاشنی برای سنتاز ۱ نشاسته ای که دارای دانه های محدود است عمل کند. در این مدل شاخه های کشیده آمیلو پکتین برای شکل دادن آمیلوز پشت سر هم شکافته می شوند. آزمایشات تعقیب پالس (ضربه) را انجام دادیم پالس گلوکز ADP برای دانه های جدا شده نشاسته یا CO₂ را برای گیاهان سالم به کار بردیم، و با دوره تعقیب در اشکال فرعی بدون برچسب دنبال شد. هیچ انتقال برچسب را از قسمتی از آمیلو پکتین به بخش آمیلوز نشاسته در دانه های جدا شده نشاسته و برگ های سالم با وجود تنوع دوره زمانی

تجارب و با استفاده از مسیر تغییر پذیری که نشاسته با مقدار بالایی آمیلوز در آن ترکیب می شود، کشف نکردیم. بنابراین هیچ مدرکی در ترکیب آمیلوز آستر شده Arabidopsis در Arabidopsis وجود ندارد. در نظر می گیریم که MOS آسترهایی برای ترکیب آمیلوز در برگ های Arabidopsis هستند.

نشاسته از دو پلیمر گلوکان (glucan): آمیلو پکتین و آمیلوز تشکیل شده است. ۷۰٪ یا بیشتر نشاسته گیاهان نوع وحشی، آمیلوپکتین است. آن مولکول بزرگی است که به اندازه زیادی شاخه بندی شده در حالی که آمیلوز کوچکتر بوده و زیاد شاخه بندی نشده است. مولکول های آمیلو پکتین برای شکل دادن ماتریکس نیمه بلوری سازماندهی شده اند و مولکول های آمیلوز در حالت نامنظمی در این ماتریکس قرار دارند. آمیلوز و آمیلو پکتین به طور همزمان در طور بیوستنز دانه نشاسته ترکیب می شوند. بررسی ضد حسی و جهشی نشان داده که ستیاز نشاسته دانه محدود آنزیم ۱ منحصر مسئول ترکیب آمیلوز است. ایزو فرم های ستیاز نشاسته که مسئول ترکیب آمیلو پکتین هستند اساساً به همراه بخشی از این پروتئین هایی که در ماتریکس دانه گنجانده شده اند در شکل قابل حل Plastid جای گرفته اند. بنابراین، حتی زمانی که دانه ها محدود هستند این ایزوفرم ها آمیلوز را ترکیب نمی کنند.

GPSS انتقال باقیمانده گلوکزی یک ADP-GIC را در انتهای کاهش ناپذیر آستر گلوکان کاتالیز میکند، اما نوع این آستر در Vivo مشخص نیست. در ابتدا، ممکن است MOS قابل حل به عنوان آستر برای ترکیب آمیلوز عمل کند. زمانی که با دانه های مجزای

نشاسته نخود فرنگی، سیب زمینی و جلبک سبز غیر سلولی *Chlamydomonas*

reinhardtii تهیه می شود، MOS بین دو و هفت واحد گلوکز در طول برای شکل دادن

آمیروز در حدود ماتریکس دانه از طریق افزودن گلوکز از گلوکز ADP کشیده می شوند دوما

ممکن است شاخه های آمیلو پکتین در حدود ماتریکس از طریق GBSS کشیده و سپس برای

شکل دادن آمیروز شکافته شوند. کار اخیر با دانه های نشاسته که از *C. reinhardtii* جدا

شده این ایده را تضمین کرده است. Vandewal و همکارانش دریافتند که گلوکز [C]

گلوکز ADP داخل بخشی از آمیلو پکتین ادغام می شود اما در طول رشد نهفته دانه ها، [C]

به بخش آمیروز انتقال می یابد. در طی این رشد نهفته نیز محتوی آمیروز در دانه ها افزایش می

یابد. این نتایج مطابق ایده ای است که آمیلو پکتین برای GBSS آستر است و آمیروز از طریق

شکافتن زنجیره طولنی توسط فعل و انفعال آنزیمی نامشخص شکل می یابد.

GBSS در حدود دانه های نشاسته ای که از سیب زمینی، سیب زمینی شیرین و

embryos نخود فرنگی جدا شده نیز می تواند گلوکز از گلوکز ADP به شاخه های آمیلو

پکتین انتقال دهد. بنابراین برای این گونه هایی که شاخه ها برای شکل دادن آمیروز شکافته می

شوند مدرکی وجود ندارد.

هر دو مدل براچیدن برگ و ترکیب آمیروز براساس آزمایشاتی است که در *Uitro*

(مایع زجاجیه) انجام شده اگر چه با فراهم آوردن سرخ های حیاتی، چنین آزمایشاتی نمی

تواند نوع آستر را برای ترکیب آمیروز در *Vivo* آنزیم های قابل حل ترکیب نشاسته سایر

اجزای Plastid شسته شده و ترکیبات آمیلوز در آنزواروی می دهد. این ممکن است شامل فاکتورهایی نشود که بر ترکیب آمیلوز در Vivo برگ های Arabidopsis را به کار بردیم. به خاطر این که نشاسته برگ مستقیماً از کربنی که از طریق فتو سنتز جذب گردیده ساخته شده ترکیباتش می تواند با تهیه $^{14}\text{CO}_2$ در طول دوره نور مورد بررسی قرار گیرد.

آزمایش کردیم که آیا ممکن است ترکیبات آمیلوز آستر شده MOS با استفاده از مسیر تغییر Arabidopsis که MOS را جمع آوری می کند روی می دهد. این مسیر تغییر پذیر فاقد آنزیم نامناسبی است که در طول افت نشاسته در گیر متابولیسم MOS شود متعاقباً MOS تا ۱۵ بار در طول به حرکت در آوردن نشاسته در شب برگ های نوع وحشی را جمع آوری می کند و سپس در طول ۴ ساعت اول روز بعد به سطح نوع وحشی افت می کند MOS کوتاه که در طول افت نشاسته تولید شده برای فراهم آوردن MOS بزرگتر به عنوان اشکال فرعی برای سایر آنزیم های کاهش دهنده نشاسته توسط آنزیم نامناسبی دگرگون می شود بنابراین سطح MOS در سرتاسر چرخه روزانه کم است. گیاه تغییر پذیر ۱ dpe نشاسته را با محتوی آمیلوز بیشتری نسبت به نشاسته ای که در برگ های نوع وحشی تولید شده، تولید می کند. اگر MOS به عنوان آستر برای ترکیب آمیلوز عمل کند، ممکن است این مقدار بالای آمیلوز از طریق MOS زیاد موجود در برگ تغییر پذیر در چند ساعت اول روز محاسبه شود. پالس $^{14}\text{CO}_2$ را برای گیاهان تغییر پذیر تحت شرایطی که آن ها MOS کم یا زیاد داشتند فراهم کردیم و ادغام $^{14}\text{CO}_2$ داخل آمیلوز در این گیاهان و در گیاهان وحشی تحت شرایط

مشابه مقایسه شد. همچنین بررسی کردیم آیا ممکن است ترکیب آمیلوز آستر شده آمیلوپکتین با استفاده از آزمایشات تعقیب پالس برای جستجوی انتقال برچسب از آمیلوپکتین به آمیلوز روی دهد.

نتایج مان مطابق این عقیده است که MOS می تواند به عنوان آستر برای ترکیب آمیلوز عمل کند اما هیچ مدرکی برای ترکیب آمیلوز آستر شده آمیلوپکتین در برگ های Arabidopsis فراهم نمی کند.

نتایج

ترکیب آمیلوز در دانه های مجزای نشاسته

در آزمایشات اولیه، بررسی کردیم آیا دانه های نشاسته از Arabidopsis که ترکیب گزارش شده آمیلوز آستر شده آمیلوپکتین یا آستر شده MOS را برای دانه های سایر گونه ها نمایش داده، جدا شده اند. در ابتدا مشخص کردیم که آیا فعل و انفعال GBSS در نشاسته Arabidopsis استخراج شده ثابت است. دانه ها از برگ های تغییر پذیر گیاهان وحشی، نیمه راه از طریق دوره عکس ۶ ساعته، جدا می شوند و حداکثر تا ۲۴ ساعت در محیط کشت آزمایش قرار می گیرند. در ۶ ساعت اول، فقدان فعل و انفعال GBSS وجود ندارد اما بعد از ۲۴ ساعت، ۳۰٪ فعل و انفعالات اولیه GBSS باقی می ماند. آزمایشات بعدی تعقیب پالس در ۶ ساعت یا کمتر انجام شد.

برای تعیین این که آیا ترکیب آمیلوز توسط MOS تحریک می شود، دانه های به همراه MOS یا بدون آن که در محیط کشتی که حاوی Imm ADP است خوابیده شدند. بعد از یک ساعت دانه های نشاسته کشف شده و با استفاده از کروماتوگرافی سفاروز CLZB داخل آمیلوز و آمیلوپکتین جدا شدند. نتایج نشان می دهد که در حضور مالتوتریوس (maltotrios) اتصال برچسب از گلوکز ADP افزایش یافته و نسبت به فقدان مالتوتریوس مقدار بیشتری در بخش های آمیلوز M_2 پایین وجود دارد.

برای تعیین این که آیا ترکیب آستر شده آمیلوپکتین اتفاق افتاده است دانه های نشاسته

از برگ ها جدا شده و برای ۳۰ دقیقه با گلوکز C ADP تهیه می شوند سپس با گلوکز C از برگ برداشته شده و برای پیگیری ۲ یا ۶ ساعت گلوکز ADP بدون برچسب جایگزین می شود. نمونه های دانه های نشاسته برچسب زده شده بعد از پالس و در انتهای دوره پیگیری گرفته می شوند. نشاسته داخل آمیلوز و آمیلوپکتین جدا می شود. نتایج نشان می دهد که اکثر برچسب ها داخل بخش هایی که حاوی آمیلوپکتین M_r بالا هستند ادغام می شوند در طول دوره پیگیری حرکت مشهود برچسب از بخش آمیلوپکتین به بخشی که دارای آمیلوز پایین M_r است وجود نداشت.

تست آمیلوز آستر شده MOS در Vivo

برای تعیین این که آیا ممکن است MOS به عنوان آسترهایی برای ترکیب آمیلوز در Vivo عمل کند، گیاهان وحشی را با گیاهان مسیر تغییر پذیر ۱ dpe مقایسه کردیم به خاطر

این که این گیاهان تغییر پذیر دارای سطوح بالای MOS در شروع روز هستند اما در زمان نور دارای سطوح نرم هستند، با دلیل ثابت کردیم که آن می توانست برای کشف تاثیر MOS افزوده در ترکیب آمیلوز استفاده شود.

به گیاهان ۱ dpe و نوع وحشی برای ۶ ساعت اول دوره عکس اجازه فتوسنتز شدن داده می شود سپس نیمی از گیاهان برای ۴ ساعت به محل تاریکی منتقل می شد، در حالی که آزمایش در نور باقی می ماند. نمونه بندی گیاهان در این مرحله نشان داد که محتوی MOS در گیاهان موجود در نور و در گیاهان وحشی موجود در تاریکی پایین است. این به خاطر افزایش مالتو تریوس است. سپس گیاهان موجود در تاریکی به نور برگردانده می شوند و بعد از

۱۵ دقیقه تمام گیاهان برای ۳۰ دقیقه بعد در معرض $^{14}\text{CO}_2$ قرار می گیرند سپس گیاهان برداشت شده و در مایع N_2 منجمد می شوند. نشاسته از گیاهان استخراج شده و آمیلوز و آمیلو پکتین از طریق کروماتوگرافی سفاروز CL2B جدا می گردند در صد برچسب ادغام شده در آمیلوز در گیاهان ۱ dpe و گیاهان وحشی که در نور عمل کرده اند مشابه بود. بنابراین در گیاهانی که در تاریکی عمل کردند ادغام بیشتر بر چسب داخل بخش های آمیلوز نشاسته ۱ dpe نسبت به داخل همان بخش های نشاسته نوع وحشی وجود دارد. آنالیزهای بعدی نشان داد که هیچ تفاوت مهمی بین برچسب ادغام شده در آمیلوز موجود در نوع وحشی بدون توجه به طرز عمل نور و تاریکی ندارد، اما در گیاهان تغییر پذیر محل تاریک افزایش برچسب در زمانی که با گیاهان تغییر پذیر در محل نورانی مقایسه می شود، مهم است بنابراین فقط در گیاهان ۱

dpe محل تاریک که محتوی MOS زیاد است، همچنین ترکیب افزایش یافته آمیلوز وجود دارد.

دومین آزمایش تعیین کننده در مقایسه با گیاهان تغییر پذیر و گیاهان وحشی که در

تاریکی عمل کرده اند نتایج مشابهی داد علاوه بر این، نمونه های کپی شده برای تعیین این که آیا مقدار برچسب ادغام شده در داخل نشاسته متفاوت از گیاهان تغییر پذیر و گیاهان وحشی که در تاریکی عمل کرده است به کار بردیم. دریافتیم که در هر دو همان مقدار برچسب داخل نشاسته ترکیب شد.

برای تایید این که مواد برچسب زده شده که در ۱ dpe بعد از طرز عمل در تاریکی

ترکیب شده و مشخص شد که آمولیز بیشتر از بخش عقبی آلوده کننده آمیلو پکتین بوده، بخش ها ۱۲ تا ۲۴ ساعت از سفاروز CL2B در همان ستون، ترکیب، خشک و دو مرتبه کروماتوگراف شدند. اکثر مواد برچسب زده شده از گیاهان نوع وحشی (۸۵٪) و تغییر پذیر (۹۸٪) در بخش های ۱۲ تا ۲۴ ساعت از ستون CL2B دوباره شست شدند. برای تعیین این که آیا مواد خطی هستند، نمونه های مشخص یا ایزو آمیلاز وارد عمل شده و در ستون سفاروز CL4B جدا شدند.

آمیلوز متشکل از زنجیره خطی بزرگ یا منشعب شده ای است که به مقدار زیاد تحت

تاثیر ایزو آمیلاز قرار نمی گیرد. هر ماده منشعب شده که دارای M_r کم است برای ایجاد زنجیره های خیلی کوتاهی است که از طریق عمل ایزو آمیلاز رها شده است. فقط ۳۱٪ موادی که قبلا

شسته شده نشان دهنده زنجیره طولانی هستند. بنابراین در گیاهان تغییر پذیر فقط ۳۸٪ مواد برچسب زده شده - به همراه ۶۲٪ موادی که در اول شست شده اند - در آخر شسته می شوند. این نتایج نشان می دهد که ماده اضافی که حاوی M_r کمی است و در حضور ۱ dpe MOS ترکیب شده آمیلوز بوده است.

تست ترکیب آمیلوز آستر شده آمیلو پکتین در Vivo

برای تعیین این که آیا ترکیب آمیلوز آستر شده آمیلو پکتین در Vivo اتفاق می افتد، آزمایشات برچسب زنی پیگیری پالس را انجام دادیم، که برای فتوسنتز برگ های گیاهان سالم $^{14}CO_2$ را تهیه کردیم و سپس اجازه می دهیم فتوسنتز در CO_2 بدون برچسب ادامه یابد. انتقال برچسب از آمیلوپکتین به آمیلوز در طول پیگیری اشاره بر این دارد که GBSS زنجیره های آمولو پکتین را باریک و کشیده می کند که برای شکل دادن آمیلوز شکافته می شوند مسیر تغییر پذیر مقدار نشاسته بالای Sex4 و نوع وحشی را به کار بردیم. این مسیر تغییر پذیر به خاطر این که نشاسته را به همراه محتوی آمیلوز بیشتر از نوع وحشی جمع آوری می کند به کار گرفته شد. این شاید به خاطر فعل و انفعال افزایش یافته GBSS نسبت به سنتاز نشاسته قابل حل در این مسیر است. برگ های Sex4 مانند برگ های نوع وحشی دارای همان مقدار MOS است.

آزمایشات پیگیری و پالس را در دوره انجام دادیم در مرحله اول آزمایشات، گیاهان برای ۱۵ دقیقه در معرض $^{14}CO_2$ قرار گرفتند سپس $^{14}CO_2$ برداشته و فتوسنتز برای ۴۵ دقیقه

بعدی در هوا ادامه یافت. در مرحله دوم آزمایشات، پالس ۱ ساعتی از طریق پیگیری ۵ ساعته دنبال شد این دوره زمانی متفاوت برای قادر ساختن کشف انتقال برچسب در چارچوب های زمانی مختلف استفاده می شد. نمونه ها در پایان پالس و در پایان پیگیری برداشته شده و در مایع N_2 منجمد شدند. نشاسته از نمونه ها استخراج شد و ترکیب برچسب در داخل آمولیز و آمیلو پکتین با استفاده از کروماتوگرافی سفاروز CL2B تعیین شد.

نتایج پالس ۱۵ دقیقه ای و پیگیری ۴۵ دقیقه ای در شکل ۵ نشان داده می شود در گیاهان وحشی، کاهش برجسته اما اندکی در خاصیت برچسب موجود بخش آمیلوز پایین M_r در طول پیگیری وجود دارد. در مسیر تغییر پذیر Sex4 خاصیت برچسب در بخش های حاوی آمیلوز خیلی بیشتر از آن در گیاهان وحشی است در این مورد هیچ تغییر چشمگیری در طول پیگیری در خاصیت برچسب موجود در آمولند وجود ندارد. در آزمایشات پیگیری - پالس بزرگتر، هیچ تغییرات چشمگیری در طول پیگیری در خاصیت برچسب آمولیز در هر مسیر وجود ندارد. خاصیت  که داخل آمیلوپکتین و آمولیز در این آزمایشات وسیع تر ترکیب شده مشابه خاصیت هایی است که در آزمایشات کوتاه تر دیده شده است.

مباحثه

نتایج مان از هر دو در آزمایشات Vivo و Vitro نشان می دهد که مالتو تویس می تواند ترکیب آمیلوز را در Arabidopsis تحریک کند. در دانه های نشاسته مجزای Arabidopsis ترکیب آمیلوز به وسیله حضور 1mm مالتوتریوس تحریک می شود. به

خاطر این که مشاهدات مشابهی در دانه های مجزای نشاسته نخود فرنگی، سیب زمینی و C. reinhardtii دیده شده و احتمال دارد که این پدیده گسترده ای باشد. غلظت نیاز MOS می شود تا ترکیب آمیلوز را در دانه های مجزا که اندک است تحریک کند و مالتوس (جو سمنوی ماده قندی)، مالتوتریوس و مالتوهکماز قادر به افزایش ترکیب آمیلوز هستند. بنابراین اندازه گیری های غلظت MOS در گیاهان زیاد معتبر نیست.

در گسترش embryos نخود فرنگی، محتوی MOS 0.42 mg گلوکز معادل وزن تازه g^{-1} است اما نوع این MOS تعیین نشده است. در برگ های Arabidopsis وحشی مالتوز در طول روز دارای حداکثر MOS است و تقریباً 0.04 میلی گرم وزن تازه g^{-1} است. در بررسی حاضر، مقدار مشاهده شده حتی کمتر از 0.01 میلی گرم وزن تازه g^{-1} است و با در نظر گرفتن این که منحصراً این مالتوز، پلاستیکی است این مشابه غلظت 0.4 تا 0.6 mm است. در آزمایش Vitro غلظت 1 mm از MOS برای افزایش ترکیب آمیلوز کافی بود. بنابراین غلظت MOS در برگ های Arabidopsis وحشی، احتمال دارد که در همان سطحی که برای ارتقاء و افزایش ترکیب آمیلوز در آزمایش در Vitro نیاز می شود باشد.

در گیاهان 1 dpe با محتوی زیاد MOS، نسبت آمیلوز به آمیلو پکتین ترکیب شده بیشتر از آن مقدار در گیاهان 1 dpe که دارای سطوح پایین MOS به عنوان آستر برای ترکیب آمیلوز باشد یا نتیجه MOS که GBSS را بدون فعالیت به عنوان آستر تحریک می کند. نتایج در بررسی های Vitro با استفاده از دانه های نشاسته embryos نخود فرنگی نشان می دهد

که مالتوز برچسب زده شده برای شکل دادن آمیلوز کشیده و باریک می شود و نیز نشان می دهد که آنالوگ های مالتوز که نمی توانند کشیده و باریک شوند ترکیب آمیلوز را تحریک نمیکنند. این نشان می دهد که تاثیر همزمان MOS روی GBSS به خاطر آمادگی افزوده شده مولکول های آمیلوز است. بعدی، سطوح بالای MOS ممکن است اشکال فرعی اضافی برای ستازهای نشاسته قابل حل فراهم کند که از این رو موجب کاهش ترکیب آمیلو پکتین و ارتقاء افزای شمشهود در خاصیت برچسب موجود در آمیلوز گردد. بنابراین آزمایشات برچسب کلی در نشاسته نشان می دهد که هیچ کاهشی در ترکیب داخل نشاسته در گیاهان ۱ dpe که دارای MOS بالا هستند در مقایسه با گیاهان وحشی وجود ندارد. با توجه به این اطلاعات و نتایج و آزمایشات در Vitro احتمال توضیح اول بیشتر است. افزایش MOS در ۱ dpe در بررسی حاضر به خاطر افزایش مالتو تریوس بود و اگر آن پلاستیکی باشد افزایش ۲۰۸ mm وجود دارد و با در نظر گرفتن مقدار پلاستیکی ۸٪ مجموع مقدار سلول.