



**UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA**

**ASIMILASI NITROGEN AMPAIAN SEL KACANG TANAH  
YANG SENSITIF DAN TOLERAN KEPADA ALUMINUM  
DAN PENGATURANNYA 01 BAWAH TEGASAN ALUMINUM**

**MOHD PUAD ABDULLAH**

**FSAS 1994 4**

**ASIMILASI NITROGEN AMPAIAN SEL KACANG TANAH  
YANG SENSITIF DAN TOLERAN KEPADA ALUMINUM  
DAN PENGATURANNYA DI BAWAH TEGASAN ALUMINUM**

Oleh

**MOHD PUAD ABDULLAH**

**Tesis yang diSerahkan sebagai Memenuhi Keperluan  
untuk Memperolehi Ijazah Master Sains di  
Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar  
Universiti Pertanian Malaysia**

**Mei 1994**



## PENGHARGAAN

Penghargaan dan ucapan terima kasih yang tidak terhingga dirakamkan buat Prof. Madya Dr. Mohd Arif Syed dan Prof. Madya Dr. Marziah Mahmood selaku penyelia dan penyelia bersama penyelidikan ini. Dengan bimbingan profesional dan tunjukajar teknikal keduanya projek ini dapat dijayakan.

Sokongan dan bantuan rakan-rakan pelajar lepasan ijazah di Makmal Kultur Tisu/Biokimia Tumbuhan, En. Saeed Khattak, Puan Zamilah dan En. Kow Cheong Wei juga tidak dilupakan dan sekalung penghargaan dan ucapan terima kasih untuk mereka. Terimakasih juga untuk semua pensyarah, kakitangan makmal dan pejabat Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi, UPM yang telah memberikan kerjasama, sokongan dan bantuan dalam bidang masing-masing samada secara langsung atau tidak ke arah menjayakan penyelidikan ini.



## JADUAL KANDUNGAN

	<b>Mukasurat</b>
PENGHARGAAN .....	ii
SENARAI JADUAL.....	x
SENARAI RAJAH .....	xiv
SENARAI PLAT .....	xvi
SENARAI ABBRERIASI .....	xvii
ABSTRAK .....	xviii
ABSTRACT .....	xxi
 <b>BAB</b>	
I    PENGENALAN .....	1
II    SOROTAN LITERATUR .....	6
Metabolisme Nitrogen dalam Kultur Tisu Tumbuhan .....	6
Sumber-Sumber Nitrogen dalam Medium Kultur Tisu Tumbuhan .....	7
Kesan Penggunaan Sumber Nitrogen Berbeza ke atas Pertumbuhan Kultur Sel Tumbuhan .....	8
Enzim-Enzim yang Terlibat dalam Asimilasi Nitrogen .....	9
Nitrat Reduktase .....	10
Glutamin Sinthetase .....	11
Glutamat Sinthase .....	13
Glutamat Dehidrogenase .....	14



Pengaturan Enzim Nitrat Reduktase dalam Kultur Tisu Tumbuhan .....	15
Pengaturan Enzim Glutamat Dehidrogenase dalam Kultur Ampaian Sel Tumbuhan .....	17
Pengaturan Tapakjalan GOGAT/GS dalam Kultur Tisu Tumbuhan .....	21
Mekanisme Toleransi Sel Terhadap Aluminum dan Hubungannya dengan Metabolisme Nitrogen .....	22
Kesan Fitotoksik Aluminum ke atas Metabolisme Nitrogen .....	25
Kesan Fitotoksik Aluminum ke atas Sel Tumbuhan .....	26
Skema Penyaringan Sel yang Toleran kepada Aluminum .....	28
<b>III BAHAN DAN KAEDAH .....</b>	<b>32</b>
Penyediaan Kultur Ampaian Sel Kacang Tanah .....	32
Pengsterilan Bijibenih .....	32
Penyediaan Media Kultur .....	33
Penyambahan Bijibenih .....	34
Penyediaan Eksplan .....	34
Inisiasi Kalus .....	34
Induksi Ampaian Sel Kacang Tanah .....	35
Pengukuran Parameter Pertumbuhan .....	36
Isipadu Mendap Sel .....	36
Berat Basah .....	36

Berat Kering .....	36
Penentuan Kandungan Protein Larut .....	37
Penentuan Lengkok dan Kadar Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah .....	38
Penentuan Sumber Nitrogen yang Sesuai bagi Ampaian Sel Kacang Tanah .....	39
Penentuan Sumber Nitrogen Terbaik bagi Ampaian Sel Kacang Tanah .....	39
Penentuan Keadaan Optimum untuk Asai Sistem Enzim Tapakjalan Metabolisme Nitrogen .....	39
Nitrat Reduktase .....	40
Glutamat Dehidrogenase .....	41
Glutamat Sintase .....	42
Glutamin Sintetase .....	43
Penentuan Profil Aktiviti Enzim dalam Tapakjalan metabolisme Nitrogen .....	44
Penyediaan Ekstrak Enzim .....	44
Asai Enzim .....	45
Kesan Perubahan Amonium dan Nitrat di dalam Medium L6 ke atas Aktiviti Enzim dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen .....	45
Pengambilan Amonium pada Ampaian Sel Kacang Tanah .....	46
Penentuan Kandungan Amonium dalam Sel .....	46
Kesan Ketoksikan Aluminium ke atas Pertumbuhan Sel Kacang Tanah .....	47

Penyediaan Larutan Stok Al <sup>3+</sup> .....	47
Penentuan Kepekatan Maut (LD <sub>50</sub> ) Al .....	47
Kajian Elektroforesis Protein Sel di bawah Tegasan Aluminium .....	48
Penyediaan Sampel Sel .....	48
Penyediaan Ekstrak Kasar Sel .....	49
Penyediaan Sampel Elektroforesis .....	49
Penyediaan Gel Poliakrilamida Natif.....	50
Kadar Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah di bawah Tegasan Aluminium .....	50
Penyaringan Sel-Sel yang Toleran kepada Aluminium .....	51
Kesan Aluminium ke atas Enzim-Enzim dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen Ampaian Sel Kacang Tanah yang Toleran kepada Aluminium .....	52
Kesan <i>in vitro</i> Aluminium ke atas Aktiviti Enzim-Enzim dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen .....	53
Pengambilan Amonium pada Ampaian Sel Kacang Tanah yang Toleran kepada Aluminium .....	53
IV KEPUTUSAN .....	54
Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah .....	52
Kesan Penggunaan Media yang Berbeza .....	53
Keperluan Optimum Nitrat dan Amonium pada Ampaian Sel kacang Tanah .....	54

Kinetik Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah .....	60
Metabolisme Nitrogen pada Ampaian Sel Kacang Tanah .....	63
Keperluan Optimum untuk Tindakbalas Enzim .....	63
Profil Aktiviti Enzim-Enzim Asimilasi Nitrat dan Amonium pada Ampaian Sel Kacang Tanah .....	66
Kesan Perubahan Kepekatan $\text{NH}_4^+$ ke atas Aktiviti Enzim NR, GDH, GOGAT dan GS .....	71
Kesan Perubahan Kepekatan $\text{NO}_3^-$ ke atas Aktiviti Enzim GS, GOGAT, GDH dan NR .....	71
Kesan Ketoksikan Aluminum ke atas Pertumbuhan Ampaian Sel kacang Tanah .....	74
Respons Sel Terhadap Perbezaan Tegasan Aluminum .....	74
Metabolisme Nitrogen pada Ampaian Sel Kacang Tanah di bawah Tegasan Al .....	78
Perubahan Aktiviti Enzim-Enzim Utama Tapakjalan Asimilasi Nitrogen .....	78
Kesan <i>in vitro</i> Aluminum ke atas Aktiviti Enzim-Enzim NR, GDH, GOGAT dan GS .....	87
Penyaringan Ampaian Sel Kacang Tanah yang Toleran kepada $400 \mu\text{M}$ Al.....	87
Teknik Penyaringan Berperingkat .....	87
Metabolisme Nitrogen Ampaian Sel Toleran di bawah Tegasan Aluminum .....	92



	Perubahan Aktiviti Enzim-Enzim Asimilasi Nitrogen .....	92
V	PERBINCANGAN .....	100
	Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah .....	100
	Penyaringan Sumber dan Kepekatan Optimum Nitrogen bagi Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah .....	101
	Profil Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah .....	103
	Metabolisme Nitrogen dalam Ampaian Sel Kacang Tanah .....	105
	Profil Enzim-Enzim Utama dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen .....	105
	Kesan Amonium ke atas Enzim- Enzim Utama dalam Tapakjalan Asimilasi Nitrogen .....	110
	Kesan Perubahan Kepekatan Nitrat ke atas Aktiviti Enzim-Enzim Utama dalam Tapakjalan Asimilasi Nitrogen .....	112
	Kesan Ketoksikan Aluminum ke atas Ampaian Sel Tacang Tanah .....	114
	Kesan Aluminum ke atas Pertumbuhan Sel .....	114
	Kesan Aluminum ke atas Metabolisme Nitrogen .....	116
	Penyaringan Ampaian Sel yang Toleran kepada Aluminum .....	119
	Metabolisme Nitrogen Ampaian Sel yang Toleran kepada Aluminum .....	120



VI	RINGKASAN DAN KESIMPULAN .....	122
	BIBLIOGRAFI .....	126
	LAMPIRAN	
	A .....	142
	B .....	149
	C .....	156
	D .....	162
	BIOGRAFI .....	170



## SENARAI JADUAL

1.	Kadar Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah dalam Media Berbeza.....	56
2.	Kombinasi Nitrat dan Amonium untuk Pertumbuhan Optimum Ampaian Sel Kacang Tanah .....	61
3.	Kadar Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah di dalam Medium yang Mengandungi 30 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> dan 10 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Berbanding Medium L6 .....	64
4.	Kesan Perubahan Kepekatan Amonium ke atas Aktiviti Enzim-Enzim Utama dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen Ampaian Sel Kacang Tanah .....	72
5.	Kesan Perubahan Kepekatan Nitrat ke atas Aktiviti Enzim-Enzim utama dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen Ampaian Sel Kacang Tanah .....	73
6.	Kadar Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah di bawah Tegasan 400 μM Al .....	80
7.	Kesan Penggunaan Sumber Nitrogen Berbeza ke atas Darjah Ketoksikan Aluminium pada Ampaian Sel Kacang Tanah .....	81
8.	Kesan Al ke atas Aktiviti <i>in vitro</i> Enzim-Enzim Utama dalam Tapakjalan Metabolisme Nitrogen .....	89
9.	Kadar Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah Toleran kepada Al di bawah Tegasan 400 μM Al .....	93
10.	Kesan Al ke atas Aktiviti NR pada Sel Normal dan Sel Toleran kepada Al dalam Empat Fasa Pertumbuhan .....	94

11.	Kesan Al ke atas Aktiviti GS pada Sel Normal dan Toleran kepada Al dalam Empat Fasa Pertumbuhan .....	95
12.	Kesan Al ke atas Aktiviti GDH pada Sel Normal dan Sel Toleran kepada Al dalam Empat Fasa Pertumbuhan .....	96
13.	Kesan Al ke atas Aktiviti GOGAT pada Sel Normal dan Sel Toleran kepada Al dalam Empat Fasa Pertumbuhan .....	98
14.	Kandungan $\text{NH}_4^+$ Ampaian Sel Kacang Tanah pada Sel Normal dan Sel Toleran kepada Al dalam Empat Fasa Pertumbuhan .....	99.
15.	Aktiviti NR dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan Penimbal Tris-HCl yang Berbeza .....	143
16.	Aktiviti NR dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan NADH Berbeza .....	144
17.	Aktiviti NR dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan $\text{KNO}_3$ Berbeza .....	145
18.	Aktiviti NR dalam Sistem Asai yang Menggunakan Penimbal Berbeza .....	146
19.	Aktiviti NR dalam Sistem Asai dengan pH yang Berbeza .....	147
20.	Kesan Suhu Berbeza ke atas Aktiviti NR .....	148
21.	Aktiviti NADH-GDH dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan Penimbal Fosfat yang Berbeza .....	150
22.	Aktiviti NADH-GDH dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan NADH yang Berbeza .....	151
23.	Aktiviti NADH-GDH dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan $\text{NH}_4^+$ yang Berbeza .....	152

24.	Aktiviti NADH-GDH dalam Sistem Asai yang Menggunakan Penimbang Berbeza .....	153
25.	Aktiviti NADH-GDH dalam Sistem Asai dengan pH yang Berbeza .....	154
26.	Aktiviti NADH-GDH dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan $\alpha$ -ketoglutarat yang Berbeza .....	155
27.	Aktiviti NADH-GOGAT dalam Sistem yang Mengandungi Kepekatan Penimbang Fosfat Berbeza .....	157
28.	Aktiviti NADH-GOGAT dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan NADH Berbeza .....	158
29.	Aktiviti NADH-GOGAT dalam Sistem Asai yang Menggunakan Penimbang yang Berbeza.....	159
30.	Aktiviti NADH-GOGAT dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan $\beta$ -ketoglutarat yang Berbeza .....	160
31.	Aktiviti NADH-GOGAT dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan L-Glutamin yang Berbeza .....	161
32.	Aktiviti GS dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan Penimbang Imidazol yang Berbeza .....	163
33.	Aktiviti GS dalam Sistem Asai yang Menggunakan Penimbang Berbeza .....	164
34.	Kesan Suhu ke atas Aktiviti <i>In vitro</i> GS .....	165
35.	Aktiviti GS dalam Sistem Asai dengan pH yang Berbeza Menggunakan Sistem Penimbang Fosfat .....	166
36.	Aktiviti GS dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan K-Hidroksilamina yang Berbeza .....	167



37.	Aktiviti GS dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan L-Glutamin yang Berbeza .....	168
38.	Aktiviti GS dalam Sistem Asai yang Mengandungi Kepekatan ADP yang Berbeza .....	169



## SENARAI RAJAH

1.	Lengkuk Pertumbuhan Ampaian Sel Kacang Tanah dalam Media yang Berlainan .....	55
2.	Keperluan Nitrat Ampaian Sel Kacang Tanah .....	58
3.	Keperluan Amonium Ampaian Sel Kacang Tanah .....	59
4.	Lengkuk Pertumbuhan Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	62
5.	Profil Aktiviti NR Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	67
6.	Profil Aktiviti GOGAT Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	68
7.	Profil Aktiviti GS Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	69
8.	Profil Aktiviti GDH Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	70
9.	Kesan Toksik Al ke atas Isipadu Padat Sel dan pH Medium pada Ampaian Sel Kacang Tanah .....	75
10.	Pertumbuhan Relatif Ampaian Sel Kacang Tanah di bawah Tegasan Al Berbeza .....	79
11.	Kesan Toksik Al ke atas Aktiviti Enzim GDH Ampaian Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	82

12.	Kesan Toksik Al ke atas Aktiviti Enzim GOGAT Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	84
13.	Kesan Toksik Al ke atas Aktiviti Enzim GS Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	85
14.	Kesan Toksik Al ke atas Aktiviti Enzim NR Sel Kacang Tanah dalam Medium L6 yang Mengandungi 30 mM Nitrat dan 10 mM Amonium .....	86
15.	Peringkat-Peringkat Penyaringan Sel Toleran kepada 400 $\mu$ M Al .....	91





## SENARAI PLAT

1. Morfologi Mikroskopi Ampaian Sel Kacang Tanah pada Fasa Pertumbuhan Eksponen Sel Tanpa Tegasan Al.....	65
2. Morfologi Mikroskopi Ampaian Sel Kacang Tanah pada Fasa Pertumbuhan Eksponen Sel di bawah Tegasan 600 $\mu$ M Al.....	76
3. Morfologi Mikroskopi Ampaian Sel Kacang Tanah pada Fasa Pertumbuhan Eksponen Sel di bawah Tegasan 800 $\mu$ M Al.....	77
4. Profil Jalur Protein Ampaian Sel Kacang Tanah di bawah Tegasan Al yang Berbeza 0 - 1200 $\mu$ M .....	88



## ABBRERIASI

ADP	Adenosine diphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
Fe-EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ferric-Sodium Salt)
Fd	Ferridoxin
GDH	Glutamate dehydrogenase
GOGAT	Glutamate synthase
GS	Glutamine synthetase
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
IgG	Immunoglobulin G
KPa	Kilo Paskal
mM	milli Molar
MS	Murashige and Skoog
nM	nano Molar
NiR	Nitrite Reductase
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NR	Nitrate Reductase
uM	micro Molar
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
SCA	Sattled Cell Volume



Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti  
Pertanian Malaysia sebagai memenuhi syarat  
untuk mendapat Ijazah Master Sains.

**ASIMILASI NITROGEN AMPAIAN SEL KACANG TANAH  
YANG SENSITIF DAN TOLERAN KEPADA ALUMINUM  
DAN PENGATURANNYA DI BAWAH TEGASAN ALUMINUM**

Oleh

**Mohd. Puad Bin Hj. Abdullah**

Mei, 1994

Penyelia : Prof. Madya Mohd Arif Syed, PhD

Fakulti : Sains dan Pengajian Alam Sekitar

Ampaian sel kacang tanah (*Arachis hypogaeae* L.) telah diperolehi daripada kalus dengan pengampaian di dalam medium L6 yang mengandungi 0.5 mg/l kinetin dan 2.0 mg/l 2,4-D. Aktiviti enzim-enzim utama dalam tapakjalan metabolisme nitrogen, nitrat reduktase (EC 1.6.6.1: NR); glutamat dehidrogenase (EC 1.4.1.2: NADH-GDH); glutamat sinthase (EC 1.4.1.16: NADH-GOGAT) dan glutamin sinthetase (EC 6.3.1.2: GS) pada ampaiian sel ini telah dikaji. Enzim utama asimilasi nitrat, NR didapati berfungsi dengan aktiviti yang tinggi di awal fasa pertumbuhan sebelum menurun pada hari ke 6 hingga ke akhir fasa pertumbuhan. Kedua-dua tapakjalan asimilasi amonium, GDH dan GS/GOGAT juga berfungsi pada ampaiian sel kacang



tanah. Aktiviti NADH-GDH adalah tinggi pada awal fasa pertumbuhan sel manakala aktiviti enzim GS dan GOGAT meningkat di akhir fasa pertumbuhan.

Di bawah tegasan Aluminium (Al), kadar pertumbuhan dan morfologi sel berubah bergantung kepada kepekatan Al yang digunakan. Pada kepekatan 400  $\mu\text{M}$  Al, kadar pertumbuhan sel yang diukur berdasarkan isipadu mendap sel didapati susut sehingga 22%. Kehadiran Al juga didapati merencat aktiviti enzim GS dan NR, manakala aktiviti enzim NADH-GDH meningkat dan NADH-GOGAT tidak menunjukkan perubahan ketara di awal fasa tetapi menurun di akhir fasa pertumbuhan. Secara *in vitro* Al tidak menyebabkan perubahan ketara kepada aktiviti enzim ini, menunjukkan kesan toksik Al tidak secara langsung kepada enzim berkenaan tetapi kemungkinan kepada bahan-bahan perantara yang terlibat dalam tapakjalan berkenaan. Kepekatan amonium dalam sel didapati tinggi menunjukkan berlaku pengumpulan akibat kesan toksik Al. Dengan menggunakan kultur ampai sel kacang tanah ini, teknik penyaringan sel-sel yang toleran kepada Al telah diperolehi. Melalui teknik ini, penyaringan sel-sel yang toleran dibuat dengan mendedahkan ampai sel bersaiz 500  $\mu\text{m}$  kepada kepekatan Al daripada 50 - 400  $\mu\text{M}$  secara berperingkat-peringkat. Setelah melalui langkah-langkah seperti pengsubkulturan, pengasingan dan pemulihan sel yang dapat mengubahsui kepada tegasan Al, sel-sel toleran diperolehi. Profil serta aktiviti enzim-enzim utama dalam tapakjalan asimilasi nitrat dan amonium pada sel toleran ini juga berfungsi sebagaimana sel normal. Di



bawah tegasan AI, aktiviti enzim NR dan GS pada sel-sel toleran ini didapati meningkat terutamanya pada fasa awal pertumbuhan sel. Aktiviti-aktiviti enzim NADH-GDH dan NADH-GOGAT pula tidak menunjukkan perubahan ketara pada sel-sel yang toleran ini di bawah tegasan AI. Kajian ke atas profil protein secara elektroforesis menunjukkan terdapat satu protein yang diaruh di bawah tegasan AI, kemungkinan terlibat dalam mekanisme toleransi sel kepada tegasan AI.

Abstract of thesis submitted to the Senate of  
Universiti Pertanian Malaysia in fulfilment of the requirements  
for the degree of Master of Science.

**NITROGEN ASSIMILATION OF ALUMINUM SENSITIVE AND  
TOLERANT CELLS AND ITS REGULATION UNDER  
THE ALUMINUM STRESS IN GROUNDNUT CELL  
SUSPENSION CULTURES**

By

**Mohd. Puad bin Hj. Abdullah**

Mei, 1994

Supervisor : Assoc. Prof. Mohd Arif bin Syed, PhD

Faculty : Science and Environmental Studies

Cell suspension cultures from groundnuts (*Arachis hypogaeae* L.) were obtained from callus using L6 medium containing 0.5 mg/l kinetin and 2.0 mg/l 2,4-D. Key enzymes in the nitrogen metabolic pathways, viz. nitrate reductase (EC 1.6.6.1: NR); glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2: NADH-GDH); glutamate synthase (EC 1.4.1.16: NADH-GOGAT) and glutamine synthetase (EC 6.3.1.2: GS) from the cell suspension were studied. Nitrate reductase is a key enzyme in nitrate assimilation. High enzyme activity was obtained during the early phase of growth. The activity was reduced after 6 days and dropped further until the last phase of growth. GDH and GS/GOGAT which were involved in the assimilation of ammonium were also



active. High NADH-GDH activities were obtained during the early phase of cell growth while the GS and GOGAT activities were active during the later part of the growth phase.

Under Aluminum (Al) stress, the rate of cell growth decreased. The cell morphology also changed, the extent of which was dependent on the concentration Al used. At 400  $\mu\text{M}$  Al concentration, the cell growth rate measured as satellite cell volume (SCV) decreased by 22%. The presence of Al also inhibited GS and NR activities, while NADH-GDH activities increased. No changes in NADH-GOGAT enzyme activities were observed during the initial stage of cell growth but decreased during the later. *In vitro* studies showed that Al did not cause significant changes in enzyme activities indicating that the toxic effects of Al were probably manifested through the effects on the intermediates involved in the metabolic pathways. Under Al stress, the cell ammonium concentration was also elevated, suggesting that its accumulation was due to the toxic effects of Al.

Using groundnut cells in suspension cultures, a screening technique for the selection of Al tolerant cell has been developed. Screening of the cells was carried out by gradually exposing the cells, measuring more than 500  $\mu\text{m}$  to varying concentrations of Al (from 50 to 400  $\mu\text{M}$ ). After a series of steps which included subculturing and isolation of the cells, cells which were tolerant to Al were obtained. The activities of the enzymes involved in nitrate and ammonium assimilations in the tolerant cells were similar to normal cells. When the same cells were subjected to Al stress, NR and GS activities



increased. NADH-GDH and NADH-GOGAT enzymes showed no apparent changes in activity in the tolerant cells. Electrophoretic studies also showed a new protein band being induced under AI stress, suggesting that it was probably involved in the AI stress mechanism.





## BAB I

### PENGENALAN

Kesan fitotoksik aluminium (Al) adalah merupakan faktor penghad utama kepada pertumbuhan tanam-tanaman di kawasan tanah berasid di seluruh dunia (Foy, 1988). Untuk mengatasi masalah ini beberapa kaedah telah diperkenalkan. Salah satu daripada kaedah tersebut ialah penggunaan bahan tanaman toleran yang terbukti berkesan dan murah (Foy, 1988).

Keupayaan tumbuhan mengubahsuai kepada kesan toksik Al adalah berbeza dari satu spesies ke satu spesies yang lain (Foy, 1988), menggambarkan perbezaan tahap toleransi kepada Al. Kefahaman tentang mekanisme ketoksikan dan toleransi terhadap Al merupakan keperluan utama sebelum usaha penyaringan bahan tanaman yang toleran dapat dibuat.

Beberapa hipotesis mengenai mekanisme toleransi tumbuhan kepada Al telah dihurai Bennet dan Breen (1991) serta Taylor (1991). Salah satu hipotesis yang dicadangkan ialah pembentukan halangan pH di bahagian rizosfera akar tumbuhan (Taylor, 1991). Hipotesis ini adalah berdasarkan kepada penurunan kelarutan Al apabila pH sesuatu medium pertumbuhan meningkat. Kelarutan Al akan berkurangan pada julat pH 4 hingga 5 (Blamey *et al.*, 1983; Fageria *et al.*, 1988), Ini bermakna tumbuhan yang berupaya mengekalkan paras pH yang tinggi di dalam medium atau di kawasan