

## تغییر در ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلیاز و تیروزین آمونیلیاز توسط پیش تیمار اتانول آمین در گیاه *Nicotiana rustica* تحت شرایط تنش شوری کشت در شیشه

سمیه رجاییان، علی اکبر احسانپور\* و محمد امین طغیانی  
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین عواملی است که رشد و تولید گیاه را در سراسر جهان به مخاطره می‌اندازد. بدیهی است که کارگیری ترکیباتی که مقاومت به شوری را در گیاهان افزایش می‌دهد از اهمیت زیادی در کاهش ضررهای اقتصادی ناشی از این تنش برخوردار است. یکی از این ترکیبات، اتانول آمین است و هدف از مطالعه حاضر درک بیشتر چگونگی عملکرد این ترکیب در ایجاد مقاومت به تنش شوری است. بدین منظور، گیاهچه‌های چهار هفته‌ای *Nicotiana rustica* که در محیط MS رشد یافته بودند ابتدا به مدت دو روز با اتانول آمین (۰، ۷۰، ۱۳۰، ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرومولار) پیش تیمار شد، سپس به محیط کشت MS حاوی غلظت بهینه شده (۲۰۰ میلی‌مولار) نمک سدیم کلرید منتقل شدند. پس از سه هفته نتایج نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید، فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز کاهش و مقدار آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم تیروزین آمونیلیاز افزایش یافته است. در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که پیش تیمار اتانول آمین موجب تغییر در محتوای ترکیبات فنلی از جمله افزایش آنتوسیانین‌ها شده است و می‌توان چنین استنباط نمود که این تغییرات احتمالاً راهکاری برای مقابله با تنش شوری به شمار می‌رود.

**واژه‌های کلیدی:** *Nicotiana rustica*، اتانول آمین، فنل، تیروزین آمونیلیاز، فنیل آلانین آمونیلیاز، تنش شوری

### مقدمه

می‌شود و باعث کاهش قابلیت دسترسی به آب، تجمع یون سدیم و عدم توازن یونی شده، به مهار رشد گیاه و در نهایت به آسیب سلولی و مولکولی گیاه منجر

تنش شوری به عنوان عامل اصلی محدود کننده نمو و محصول دهی گیاه به ویژه گیاهان زراعی قلمداد

\* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ehsanpou@sci.ui.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰

خواهد شد. فعالیت TAL در بین گیاهان دو لپه به خوبی شناخته نشده است با وجود این، Beudoin-Eagan و Thorpe در سال ۱۹۸۵ فعالیت این آنزیم را طی القای نوساقه از کالوس تنباکو به وضوح نشان دادند. همچنین آنها تفاوت فعالیت آنزیم TAL و PAL را در گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum*) اثبات نمودند.

در گیاهان چندین آمین بیوژنیک مهم وجود دارد که از نظر ریخت‌زایی و تنش-فیزیولوژی دارای اهمیت هستند. اتانول آمین یکی از این ترکیبات است که در جنین‌زایی، رشد و نمو اندام‌ها و تشکیل غشاهای درون سلولی نقش مهمی ایفا می‌نماید (Mascher *et al.*, 2005a). به خوبی مشخص شده است هنگامی که گیاه در معرض تنش (مانند خشکی، شوری، فلزات سنگین، پاراکوات و نظایر آن) قرار می‌گیرد غشاهای زیستی سلول آسیب می‌بیند و در نتیجه فسفولیپیدهای غشا شکسته شده و اتانول آمین از آنها آزاد می‌شود. افزایش سطح آمین‌ها به علت قرار گرفتن در معرض تنش واکنش هشدار دهنده‌ای را القا می‌نماید تا سازوکارهای مقابله با تنش فعال شوند. پیشنهاد شده است که اتانول آمین با منشأ خارجی می‌تواند نقش سیگنالی برای راه‌اندازی مقاومت به تنش و نیز پایدارکننده غشا داشته باشد (Mascher *et al.*, 2005a). در آلمان غربی مطالعات متعددی در مزرعه با شرایط اقلیمی و در خاک‌های مختلف روی اثر اتانول آمین بر میزان کیفیت محصول جو، گندم، جو دوسر و سیب‌زمینی انجام گرفته است. نتایج این مطالعات نشان داد که در شرایط تنش محیطی میزان محصول تا ۲۰ درصد افزایش می‌یابد (Mascher *et al.*, 2005a). همچنین، Rajaeian و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که در گیاه ذرت تحت تنش پاراکوات افزایش فعالیت

می‌شود (Silva-Ortega *et al.*, 2008). مقاومت به شوری در گیاه صفتی پیچیده است و سازوکارهای بسیاری را در بر می‌گیرد که درک آنها برای ایجاد راهکارهای مناسب جهت مهندسی ژنتیک گیاهان زراعی مفید خواهد بود. ثابت شده است که تنش‌های محیطی به کاهش یا افزایش مقدار ترکیبات فنلی که گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند، منجر می‌شود (Król *et al.*, 2014). این ترکیبات می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را خنثی نموده، با فلزاتی که واکنش‌های اکسیژناسیون را کاتالیز می‌کنند ترکیباتی را تشکیل دهند و از فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده جلوگیری نمایند. فنل‌ها گروه بزرگی از ترکیبات را تشکیل می‌دهند که می‌توان آنها را به پنج زیرگروه شامل: کومارین‌ها، لیگنین‌ها، فلاونوئیدها، فنولیک اسیدها و تانن‌ها تقسیم‌بندی نمود (Gumul *et al.*, 2007). فلاونوئیدها فراوان‌ترین ترکیب از پلی‌فنل‌ها در رژیم غذایی انسان است که ساختار پایه‌ای آنها از هسته فلاون با ۱۵ اتم کربن که در سه حلقه نظم یافته‌اند، تشکیل شده است (Dai and Mumper, 2010). آنتوسیانین‌ها در فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها شرکت می‌کنند و به گسترده‌گی در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند (Lapidot *et al.*, 1999). در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی، دو آنزیم: فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و تیروزین آمونیا لیاز (TAL) جزو مهم‌ترین آنزیم‌ها شناخته می‌شوند (Beudoin-Eagan and Thorpe, 1985) و Hoagland و Duke (۱۹۸۱) گزارش دادند که این آنزیم‌ها از طریق دامیناسیون فنیل آلانین و تیروزین به ترتیب برای تولید t-سینامیک اسید و P-کوماریک اسید و با آزاد کردن آمونیوم عمل می‌کنند و از این طریق پیش‌ساز ترکیبات فنلی تولید

پس از چهار هفته به محیط کشت حاوی گیاهچه‌های رشد یافته محلول اتانول آمین افزوده شد به نحوی که غلظت‌های صفر، ۷۰، ۱۳۰، ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرومولار اتانول آمین حاصل شد. این گیاهچه‌ها پس از دو روز به محیط کشت بهینه شده با غلظت نمک (NaCl) یعنی ۲۰۰ میلی‌مولار منتقل شدند. کلیه کشت‌ها در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با اختلاف ۱ تا ۲ درجه، فتوپریود نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور حدود ۳۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه رشد داده شدند. پس از ۳ هفته میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید (MDA): میزان

پراکسیداسیون لیپیدهای سلول با اندازه‌گیری MDA تعیین شد. تقریباً ۱ گرم برگ تازه گیاه در محلول ۱۰ درصد حجمی TCA (تری کلرو استیک اسید) همگن و به مدت ۲۰ دقیقه با نیروی ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی ۱ میلی‌لیتر از محلول تیوباربتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد در TCA ۲۰ درصد افزوده شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت، سپس به سرعت روی یخ سرد گردید. جذب این محلول پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. غلظت MDA بر اساس روش Health و Packer (۱۹۶۸) با ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه گردید.

#### اندازه‌گیری فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید با

روش رنگ‌سنجی با استفاده از کلرید آلومینیوم صورت

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در پاسخ به پیش‌تیمار اتانول آمین به سمیت‌زدایی بهتر ROS منجر می‌گردد. در مطالعه‌ای دیگر، Rajaeian و Ehsanpour (۲۰۱۵) نشان دادند که در گیاه تنباکو پیش‌تیمار شده با اتانول آمین که در معرض تنش شوری قرار داشت، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و نیز مقدار کاروتنوئید همگی به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه منجر شد. همان‌طور که گفته شد اگر چه اثر مثبت اتانول آمین بر افزایش مقاومت در برابر برخی تنش‌ها پیش از این گزارش شده است، با وجود این، دامنه اطلاعات در این زمینه بسیار محدود است و هدف از پژوهش حاضر نیز مطالعه اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر برخی از ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL به عنوان مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستز این ترکیبات در شرایط کشت در شیشه است. داده‌های پژوهش حاضر می‌تواند در درک بهتر نحوه عملکرد اتانول آمین در گیاه برای مقابله با تنش شوری از طریق تغییرات مسیر ترکیبات فنلی دارای اهمیت باشد.

#### مواد و روش‌ها

بذر گیاه تنباکو (*Nicotiana rustica*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا بذرها به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد حجمی، سپس به مدت ۳ دقیقه با محلول اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی و در پایان، با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شدند. در مرحله بعد، بذرها استریل روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند.

کلریدریک اسید نرمال متوقف شد (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985).

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL:** ۱۰۰ میلی گرم بافت تازه برگ با ۲ میلی لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی مولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸/۵) حاوی ۱۵ میلی مولار بتا-مرکاپتو اتانول همگن شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با نیروی ۴۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. در نهایت، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL از محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. برای تخمین فعالیت آنزیم ۱ میلی لیتر محلول واکنش شامل بافر واکنش (۵۰۰ میکرومولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸) حاوی ۶ میکرومول فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۱ میلی لیتر تهیه شد. سپس، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در نهایت، به این محلول مقدار ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید با غلظت ۵ نرمال اضافه شد تا واکنش تولید سینامیک اسید از فنیل آلانین متوقف شود. در پایان، فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس میزان تولید سینامیک اسید بر حسب نانومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین گزارش گردید (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985).

**اندازه‌گیری فنل کل:** برای اندازه‌گیری فنل کل، ۵۰۰ میلی گرم پودر خشک ساییده شده برگ در یک لوله آزمایش ریخته و ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به آن افزوده شد، سپس سوسپانسیون حاصل به آرامی مخلوط شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه سونیکیت و به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ شد. عصاره‌گیری از مواد گیاهی دو بار انجام شد. میزان فنل کل عصاره با استفاده از فولین-سیوکالتیو

گرفت (Chang *et al.*, 2002). ۰/۵ میلی لیتر از عصاره گیاهی (۱ گرم بافت برگ در ۱۰ میلی لیتر متانول) با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم، ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۱ مولار استات پتاسیم و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن، جذب آن در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

**اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها:** ابتدا از برگ‌های تنباکو عصاره متانولی تهیه شد (نسبت ۹۹ به ۱ متانول و کلریدریک اسید در ۴ درجه سانتیگراد). سپس، جذب نمونه‌ها در ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر خوانده و میزان آنتوسیانین‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد (Laby *et al.*, 2000).  
رابطه ۱:

حجم عصاره (میلی لیتر) × (0.25 × OD 530 - 0.657 × OD 657) واحد نسبی آنتوسیانین بر گرم وزن تر بافت (وزن بافت (گرم))

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAL:** حدود ۱ گرم بافت تازه برگ تنباکو در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۳ میلی لیتر بافر تریس (۰/۰۵ مولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸/۴) حاوی ۱۵ میلی مولار ۲-مرکاپتو اتانول به صورت همگن در آمد. میزان پروتئین عصاره با استفاده از کوماسی بلو با روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم TAL با تشکیل p-coumarate توسط اسپکتروفتومتر (مدل UV-160A، شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۳۳۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل: ۵/۵ میکرومولار L-تیروزین، ۵۰۰ میکرومولار بافر تریس با اسیدیته برابر ۸/۱ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی برگ در حجم نهایی ۱ میلی لیتر بود. پس از ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد واکنش تبدیل تیروزین به کوماریک اسید با اضافه نمودن ۰/۰۵ میلی لیتر ۵

در گیاه بدون پیش تیمار اتانول آمین، تنش شوری به افزایش مقدار فلاونوئید منجر می‌شود (شکل ۲).

#### اثر اتانول آمین بر میزان آنتوسیانین‌ها: تغییرات

مقدار آنتوسیانین‌ها در برگ‌های تنباکو که تحت تنش شوری و پیش تیمار با اتانول آمین قرار داشتند در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مقدار آنتوسیانین‌ها در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش تیمار شده‌اند به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان تحت تنش شوری است که با اتانول آمین پیش تیمار نشده‌اند، این افزایش به ویژه در غلظت ۲۷۰ میکرومولار اتانول آمین به طور چشمگیری قابل مشاهده بود. همچنین، مشاهده گردید که مقدار آنتوسیانین‌ها در گیاهان بدون پیش تیمار با اتانول آمین با قرار گرفتن در معرض تنش شوری افزایش یافت. نتایج همچنین نشان می‌دهد که مقدار آنتوسیانین‌ها گیاهان شاهد (گیاهان بدون تنش شوری) که با اتانول آمین (در همه غلظت‌های به کار برده شده ۷۰، ۱۳۰، ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرومولار) پیش تیمار شده‌اند، در مقایسه با گیاهان شاهد بدون پیش تیمار با اتانول آمین افزایش داشته است.

#### اثر اتانول آمین بر فعالیت آنزیم PAL: نتایج

حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL (شکل ۵) نشان داد که در گیاه تنباکو بدون تیمار نمک، پیش تیمار با اتانول آمین تغییر معنی‌داری از نظر فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد. در حالی که اعمال پیش تیمار اتانول آمین در حضور تنش نمک (۲۰۰ میلی‌مولار) در غلظت‌های ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرو مولار اتانول آمین نسبت به گیاه بدون پیش تیمار کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم PAL را به همراه داشت. همچنین، نتایج نشانگر افزایش فعالیت این آنزیم در گیاه تحت تنش شوری در مقایسه

اندازه‌گیری شد (Singleton et al., 1999). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیو-کالتیو و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن افزوده شد. محتویات لوله آزمایش مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد، سپس جذب عصاره در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فنل کل به صورت هم ارزهای تانیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نشان داده شد.

#### تحلیل آماری: کلیه آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار

انجام و داده‌ها با آزمون Two-way ANOVA تحلیل و میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  مقایسه شد.

## نتایج

#### اثر اتانول آمین بر میزان مالون‌دی‌آلدئید

(MDA): در پژوهش حاضر، تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار نمک) موجب افزایش میزان MDA بدون پیش تیمار با اتانول آمین در گیاه تنباکو داد (شکل ۱). در مقابل، کاهش میزان MDA بر اثر پیش تیمار با اتانول آمین در گیاه تحت تنش شوری مشاهده گردید. نتایج همچنین نشانگر افزایش میزان MDA در گیاه شاهد (بدون تنش شوری) در اثر پیش تیمار با اتانول آمین بود.

#### اثر اتانول آمین بر میزان فلاونوئید: نتایج نشان

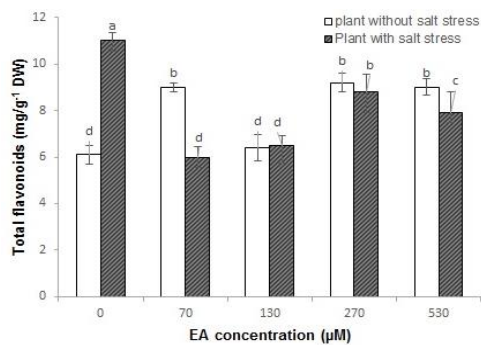
داد که پیش تیمار با اتانول آمین، مقدار فلاونوئید کل را در گیاهان تیمار شده با نمک کاهش می‌دهد، در حالی که در گیاه بدون تیمار نمک، اتانول آمین مقدار فلاونوئید کل را در تمام غلظت‌های اتانول آمین به غیر از ۱۳۰ میکرومولار افزایش داد. نتایج همچنین نشان داد که

با گیاه شاهد است.

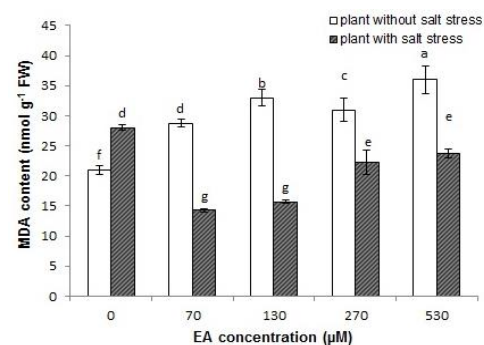
### اثر اتانول آمین بر فعالیت آنزیم TAL: سنجش

فعالیت TAL نشان داد که پیش تیمار با اتانول آمین (در همه غلظت‌های به کار برده شده) به افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان تحت تنش شوری منجر می‌شود. همان طور که شکل ۶ نشان می‌دهد در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش تیمار شده‌اند میزان فعالیت آنزیم TAL در مقایسه با گیاهان تحت تنش

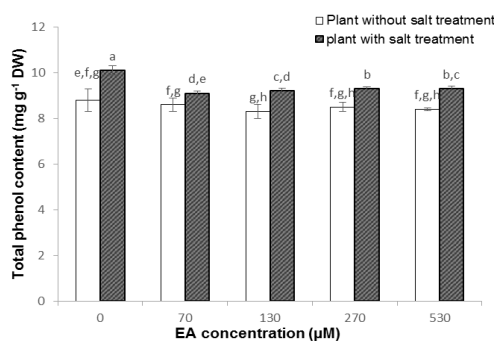
شوری که با اتانول آمین پیش تیمار نشده‌اند به طور معنی‌داری بیشتر است. نتایج همچنین نشان داد که در گیاهان شاهد (گیاهان بدون تیمار نمک) اتانول آمین در همه غلظت‌های به کار برده شده به غیر از غلظت ۲۷۰ میکرومولار، تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم TAL نداشته است. شکل ۶ همچنین نشان می‌دهد که در گیاهان بدون پیش تیمار با اتانول آمین میزان فعالیت آنزیم TAL تحت تأثیر تنش شوری، افزایش نشان داد.



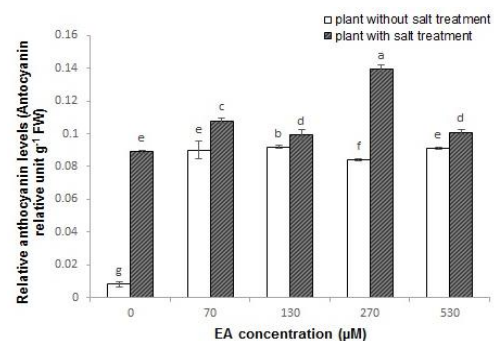
شکل ۲- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان فلاونوئید کل در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



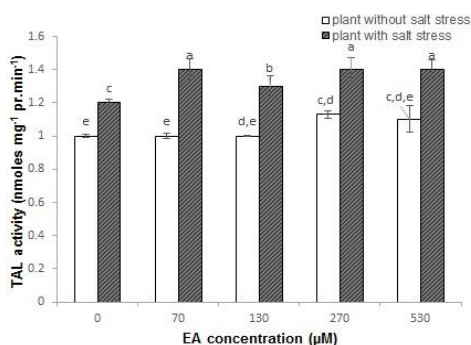
شکل ۱- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان MDA در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



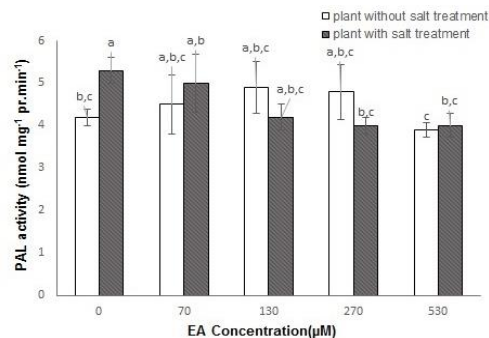
شکل ۴- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان فنل کل در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان آنتوسیانین‌ها در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۶- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر فعالیت آنزیم TAL در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۳ انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر فعالیت آنزیم PAL در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۳ انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).

(Rajaeian and Ehsanpour, 2015). این مشاهدات نشان دهنده این است که اتانول آمین به عنوان نوعی عامل تنش‌زای خفیف در گیاه عمل می‌نماید. گزارش‌های دیگری نیز ویژگی القای تنش توسط اتانول آمین در گیاه شاهد را مورد توجه قرار داده‌اند (Mascher, 2005 a,b). از آنجا که تجمع اتانول آمین تحت شرایط عادی در گیاه رخ نمی‌دهد هنگامی که این ترکیب به صورت خارجی (exogene) استفاده می‌شود، می‌تواند به تجمع غیرمعمول آن در فضای خارج سلولی منجر شود، بنابراین این مقدار اضافی اتانول آمین می‌تواند سیگنال هشداردهنده‌ای برای سلول‌های گیاه باشد (Mascher, 2005b). از سوی دیگر، نتایج ما نشان داد که پیش‌تیمار گیاه با اتانول آمین در راستای نقش حفاظتی خود با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، میزان این ترکیب (MDA) را در گیاه تحت تنش شوری کاهش می‌دهد. این نتیجه در راستای نتایج مطالعات پیشین در این زمینه بوده (Rajaeian et al., 2011؛ Mascher, 2005 a,b) و تأییدی بر تأثیر مثبت اتانول آمین به عنوان یک

## بحث

نتایج پژوهش حاضر در زمینه گروهی از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی به نام ترکیبات فنلی و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آنها به روشنی نشان می‌دهد که پیش‌تیمار اتانول آمین در گیاه *Nicotiana rustica* پاسخ این گیاه در مقابل تنش شوری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر، ابتدا میزان MDA که شاخصی از آسیب اکسیداتیو ناشی از اعمال تنش است (Kunert and Ederer, 1985) ارزیابی شد و مطابق انتظار، نتایج نشان داد که تنش شوری میزان MDA را در گیاه افزایش می‌دهد. مشابه با نتایج حاضر، Hong و همکاران (۲۰۰۰) نیز افزایش میزان MDA در گیاه تحت تنش شوری را نشان دادند. پژوهش حاضر همچنین نشان داد که در گیاه شاهد (گیاهی که تحت تنش شوری قرار ندارد) میزان MDA توسط پیش‌تیمار با اتانول آمین افزایش می‌یابد. مطالعه قبلی ما نیز نتایج مشابهی را در گیاه ذرت نشان داد (Rajaeian et al., 2011). همچنین مشاهده شد که میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاه شاهد با پیش‌تیمار با اتانول آمین افزایش می‌یابد

نتایج گزارش شده توسط Neves و همکاران (۲۰۱۰) و Frary و همکاران (۲۰۱۰) هماهنگی دارد. گزارش شده است که تنش‌های محیطی مختلف تجمع فلاونوئیدها از جمله آنتوسیانین‌ها و همچنین ترکیبات فنولیک را تحریک می‌نماید (Mo et al., 1992). همچنین، نتایج موجود نشان می‌دهد که تیمارهای تنشی به طور قابل ملاحظه‌ای ترکیبات فنلی را در شاخه‌های گیاهان *Zea mays* و *Vigna sinensis* افزایش می‌دهد (Nemat Alla et al., 2002). همچنین، پژوهش حاضر کاهش مقدار فنل کل در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش‌تیمار شده‌اند را نشان داد. کاهش مقدار فنل می‌تواند به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر تولید آن باشد. از این رو، میزان فعالیت دو آنزیم PAL و TAL که در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی آنزیم‌های اصلی هستند، مورد سنجش قرار گرفت. Mehta و همکاران (۱۹۹۳) گزارش نمودند که محتوای ترکیبات فنلی به طور کلی در گیاه نخود با افزایش نمک‌های کلرید و سولفات افزایش می‌یابد. تجمع ترکیبات فنولیک و آنتوسیانین‌ها در گیاهان تحت تنش، با تحریک فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL همراه است. این نتایج، تأثیرات تنظیم‌کنندگی این آنزیم‌ها تشکیل آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها از طریق تولید فیل پروپانویید که فلاونوئیدها از آن سنتز می‌شوند را تأیید می‌نماید. بنابراین، هر تغییری در فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در تغییر شکل متابولیسم این فرآورده‌های ثانویه دخالت خواهد داشت.

میزان فعالیت آنزیم PAL با مقدار فنل کل به دست آمده نوعی هماهنگی را نشان داد. به این معنی که در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین میزان فعالیت PAL تحت تأثیر تنش شوری افزایش یافته بود که در

پیش‌تیمار القاکننده مقاومت به تنش شوری در گیاه است. شاید بتوان چنین فرض نمود که پیش‌تیمار گیاه به مدت دو روز می‌تواند مشابه تزریق واکسن در افزایش توان سیستم ایمنی جانوری عمل نماید. به بیان دیگر، استفاده از اتانول آمین می‌تواند از طریق القای سازوکارهای مقاومتی از جمله پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه را برای سازگاری با شرایط سخت تنشی بعدی آماده نماید (Mascher, 2005 a,b; Rajaeian et al., 2011; Rajaeian and Ehsanpour, 2015). در حقیقت، مطابق با نتایج پیشین و داده‌های حاضر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله: آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز (Rajaeian and Ehsanpour, 2015) و ترکیبات غیر آنزیمی از جمله آنتوسیانین‌ها توان محافظت از غشا در مقابل آسیب اکسیداتیو ROS را دارند و می‌تواند به کاهش مقدار MDA منجر گردد. با وجود این، سازوکار دقیقی که اتانول آمین از طریق آن، مقاومت به تنش را القا می‌نماید هنوز به خوبی درک نشده است.

چنانچه به روشنی اثبات شده است تنش شوری می‌تواند به تولید ROS اضافی منجر گردد. برخی از گیاهان به منظور سازگاری با این شرایط مضر محیطی سنتز متابولیت‌های ثانویه گوناگون از جمله ترکیبات فنلی را القا می‌نمایند. در این راستا، به منظور آزمودن اثر پیش‌تیمار اتانول آمین روی گونه *Nicotiana rustica*، پاسخ‌های گیاهی، فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین‌ها پس از پیش‌تیمار با اتانول آمین تحت تنش شوری، بررسی و ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تنش شوری موجب افزایش مقدار فنل کل در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین می‌گردد. این نتیجه قابل پیش‌بینی است و با



تأثیر زیادی بر مقدار فنل کل ندارد و افزایش فعالیت آن لزوماً با افزایش مقدار فنل‌ها همراه نیست. در مطالعه حاضر، از میان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و در بین فلاونوئیدها آنتوسیانین‌ها بررسی شدند تا به این پرسش، پاسخ داده شود که آیا علت کاهش فنل‌ها، کاهش مقدار این دو گروه آنتی‌اکسیدان قوی است یا خیر؟ نتایج نشان داد که تنش شوری به افزایش مقدار فلاونوئیدها در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین منجر می‌گردد. داده‌های حاضر در مورد اثر تنش شوری بر افزایش مقدار فلاونوئید با نتایج Frary و همکاران (۲۰۱۰) که نشان دادند مقدار فلاونوئیدها در *Solanum pennelli* پس از تنش شوری افزایش می‌یابد و نتایج Mahmoudi و همکاران (۲۰۱۰) که نیز نشان دادند فلاونوئیدهای romaine lettuce پس از تیمار NaCl افزایش می‌یابد هماهنگی دارد. نتایج حاضر همچنین نشان داد که تنش شوری به افزایش مقدار آنتوسیانین‌ها در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین منجر می‌گردد. مقدار آنتوسیانین‌ها در توت‌فرنگی تحت شرایط تنش شوری نیز توسط Keutgen و Pawelzik (۲۰۰۸) بررسی شده است و اثبات شد که غلظت آنتوسیانین‌ها در این گیاهان پس از تیمار NaCl افزایش می‌یابد که در هماهنگی با نتایج حاضر در گیاه تنباکو است. Kaliamoorthy و Rao در سال ۱۹۹۴ افزایش ۴۰ درصدی تجمع آنتوسیانین‌ها در ذرت پس از تیمار با NaCl و KCl را گزارش دادند. نتایج حاضر نشان داد که پیش‌تیمار با اتانول آمین به افزایش مقدار آنتوسیانین‌ها و فلاونوئید در گیاه شاهد (گیاه بدون تنش شوری) منجر می‌گردد. در این رابطه، Ali و Ashraf (۲۰۱۱) گزارش دادند که استعمال خارجی گلايسين

هماهنگی با افزایش فنل کل در این گروه از گیاهان بود. از سوی دیگر، در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش‌تیمار شده بودند همگام با کاهش مقدار فنل فعالیت آنزیم PAL نیز کاهش یافت که می‌تواند توجیهی برای کاهش مقدار فنل کل تحت این شرایط باشد. نتایج بررسی در مورد میزان فعالیت آنزیم TAL در مسیر سنتز ترکیبات فنلی نشان داد که در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین، تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم TAL می‌گردد. این نتیجه، در راستای افزایش مقدار فنل کل در این شرایط بوده و در این رابطه گزارش‌های متعددی نیز موجود است، برای نمونه، Nemat Alla و همکاران (۲۰۰۲) افزایش فعالیت آنزیم TAL در *Vigna sinensis* و *Zea mays* توسط تنش شوری را گزارش دادند. همچنین، افزایش فعالیت TAL در گیاهان تحت تنش شوری پیش‌تیمار شده با اتانول آمین مشاهده گردید. در این جا، بین کاهش مقدار فنل کل و افزایش فعالیت TAL نوعی تناقض مشاهده می‌شود. Dogbo و همکاران (۲۰۱۲) ثابت کردند که در TAL، Cassava در مقایسه با PAL نسبت به الیسیتور سالیسیلیک اسید حساس‌تر است. در مطالعه حاضر نیز شاید بتوان چنین فرض کرد که اتانول آمین همانند سالیسیلیک اسید به تحریک TAL در شرایط تنشی منجر شده اما بر PAL اثر افزایشی نداشته است. مسلم است که این فرضیه به آزمایش‌های دقیق نیاز دارد تا نحوه عملکرد دقیق اتانول آمین روی این دو آنزیم روشن شود. شاید بتوان چنین تناقضی را به نقش آنزیم TAL در مسیر سنتز ترکیبات فنلی نسبت داد. به بیان دیگر، از آنجا که این آنزیم در مقایسه با PAL، یک آنزیم کمکی است، فعالیت آن

پیش‌تیمار با اتانول آمین مربوط به مجموعه‌ای از ترکیبات خانواده فلاونوئیدها باشد. برای مثال، بایستی در این خانواده ترکیباتی نظیر: فلاون، فلاونول، فلاونون، ایزوفلاون را نیز در نظر داشت و ممکن است علیرغم افزایش آنتوسیانین‌ها برخی از این ترکیبات کاهش یافته باشد.

در مجموع، می‌توان گفت با توجه به داده‌های زیستی و رشد و نمو حاصل از بررسی پیش‌تیمار اتانول آمین (داده‌ها این بخش ارائه نشده است) رشد گیاه تنباکو در تنش شوری با پیش‌تیمار اتانول آمین بهبود معنی‌داری نشان داد و در نتیجه می‌توان گفت احتمالاً بخشی از این افزایش تحمل به شوری در گیاه تنباکو، می‌تواند به تغییر مسیر فل‌ها به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه مربوط باشد. از آنجا که پژوهش حاضر نخستین گزارش در زمینه تأثیر اتانول آمین بر ترکیبات فنلی است، بررسی‌های بیشتر و جامع‌تری به منظور آشکار شدن نحوه عملکرد اتانول آمین روی این گروه از آنتی‌اکسیدان‌ها لازم به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از دانشگاه اصفهان و قطب تنش‌های گیاهی به خاطر حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌نمایند.

بتیین موجب افزایش فلاونوئیدها در گیاه ذرت در شرایط عادی و تحت تنش خشکی می‌گردد. از آنجا که اتانول آمین پیش‌ساز بیوسنتز گلایسین بتیین است (Kogan *et al.*, 2000)، شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که پیش‌تیمار گیاه تنباکو با اتانول آمین به افزایش مقدار گلایسین بتیین منجر شده و این ترکیب نیز به نوبه خود مقدار فلاونوئیدها را افزایش داده است. نتایج همچنین نشان داد که پیش‌تیمار گیاه تنباکو با اتانول آمین تحت تنش شوری باعث کاهش مقدار فلاونوئید و در عین حال افزایش آنتوسیانین‌ها می‌گردد. با توجه به این شواهد گمان می‌رود در این گیاهان گلایسین بتیین حاصل از متابولیسم اتانول آمین در مسیر سنتز فلاونوئیدها به طور عمده در جهت تولید آنتوسیانین‌ها وارد شده باشد. همچنین، از آنجا که نقش گلایسین بتیین به عنوان اسمولیت سازگار، حفاظت از ساختار چهارم آنزیم‌ها و حفظ تمامیت غشا در غلظت بالای نمک است (Chen and Murata, 2002)، می‌توان چنین فرض نمود که گلایسین بتیین برای غلبه بر آثار مخرب تنش شوری در گیاه تنباکو به جای افزایش محتوای فلاونوئید کل بیشتر در جهت ایفای چنین نقش‌هایی وارد شده باشد. از سوی دیگر، شاید بتوان چنین استنباط نمود که احتمالاً کاهش فلاونوئید کل گیاه و افزایش آنتوسیانین‌ها در تنش شوری تحت

### منابع

- Ali, Q. and Ashraf, M. (2011) Exogenously applied glycinebetaine enhances seed and seed oil quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 71: 249-259.
- Beaudoin-Eagan, L. D. and Thorpe, T. A. (1985) Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology* 78: 438-441.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chen, T. H. and Murata, N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 250-257.
- Dai, J. and Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- Dogbo, D., Gogbeu, S., N'zue, B., Ya, K., Zohouri, G., Mamyrbekova-Bekro, J. and Bekro, Y. A. (2012) Comparative activities of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase and phenolic compounds accumulated in cassava elicited cell. *African Crop Science Journal* 20: 85-94.
- Frary, A., Göl, D., Keleş, D., Ökmen, B., Pınar, H., Şığva, H. Ö., Yemenicioğlu, A. and Doğanlar, S. (2010) Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology* 10: 58-74
- Gumul, D., Korus, J. and Achremowicz, B. (2007) The influence of extrusion on the content of polyphenols and antioxidant/antiradical activity of rye grains (*Secale cereale* L.). *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia* 6: 103-111.
- Health, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hoagland, R. E. and Duke, S. O. (1981) Effect of herbicides on extractable phenylalanine ammonia lyase activity in light- and dark-grown soybean (*Glycine max*) seedlings. *Weed Science* 29: 433-439.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. and Verma, D. P. S. (2000) Removal of Feedback Inhibition of  $\Delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* 122: 1129-1136.
- Kaliamoorthy, S. and Rao, A. S. (1994) Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize. *Indian Journal of Plant Physiology* 37: 169-170.
- Keutgen, A. J. and Pawelzik, E. (2008) Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chemistry* 107: 1413-1420.
- Kogan, M. J., Kristoff, G., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (2000) Effect of pre-treatment with ethanolamine on the response of *Helianthus annuus* L. to salt stress. *Plant Growth Regulation* 30: 87-94.
- Król, A., Amarowicz, R. and Weidner, S. (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1491-1499.
- Kunert, K. J. and Ederer, M. (1985) Leaf aging and lipid peroxidation: the role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiologia plantarum* 65: 85-88.
- Laby, R. J., Kincaid, M. S., Kim, D. and Gibson, S. I. (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal* 23: 587-596.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R. and Kanner, J. (1999) pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 67-70.
- Mahmoudi, H., Huang, J., Gruber, M. Y., Kaddour, R., Lachaâl, M., Ouerghi, Z. and Hannoufa, A. (2010) The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite

- accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5122-5130.
- Mascher, R., Fischer, S., Scheiding, W., Neagoe, A. and Bergmann, H. (2005b) Exogenous 2-aminoethanol can diminish paraquat induced oxidative stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Growth Regulation* 45: 103-112.
- Mascher, R., Nagy, E., Lippmann, B., Hornlein, S., Fischer, S., Scheiding, W., Neagoe, A. and Bergmann, H. (2005a) Improvement of stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) by 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *Plant Science* 168: 691-6984.
- Mehta, N., Bharti, S. and Datta, K. S. (1993) Effect of chloride and sulphate salinities on the concentration of some important metabolites in chickpea. *Haryana Agricultural University Journal Research* 23: 150-155.
- Mo, Y., Nagel, C. and Taylor, L. P. (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 89: 7213-7217.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Nemat Alla, M., Elbaz Younis, M., El-Shihaby, O. A. and El-Bastawisy, Z. (2002) Kinetin regulation of growth and secondary metabolism in waterlogging and salinity treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *ACTA Physiologiae Plantarum* 24(1): 19-27.
- Neves, G., Marchiosi, R., Ferrarese, M., Siqueira-Soares, R. and Ferrarese-Filho, O. (2010) Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 467-473.
- Rajaeian, S. and Ehsanpour, A. A. (2015) Physiological responses of tobacco plants (*Nicotiana rustica*) pretreated with ethanolamine to salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 62: 246-252.
- Rajaeian, S., Heidari, R. and Ehsanpour, A. (2011) Effect of 2-aminoethanol pretreatment on the antioxidant enzyme activity in *Zea mays* under oxidative stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 45-50.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A. and Jiménez-Bremont, J. F. (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 82-92.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.

## Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of *Nicotiana rustica* triggered by ethanolamine pretreatment under *in vitro* salt stress condition

Somayeh Rajaiean, Ali Akbar Ehsanpour \* and Mohammad Amin Toghiani

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

### Abstract

Salt stress is one of the most important factors that endanger plant growth and production all around the world. Application of compounds which increase plant resistance to salt stress obviously has significant importance in reduction of economic losses. One of these compounds is the biological alcohol called ethanolamine, and the present study aimed to understand the way by which ethanolamine exerts its protecting effect against salt stress. For this purpose, 4-week-old *Nicotiana rustica* plants which had been kept in MS medium were pretreated with ethanolamine and 2 days later they were transferred to MS medium supplemented with 200 mM NaCl for 3 weeks. The our results revealed that *Nicotiana rustica* plants pretreated with exogenous ethanolamine showed elevated level of TAL activity and anthocyanin content whereas PAL activity was decreased, and reduced level of MDA, total flavonoid and phenol content in plants under salt stress condition. According to these results, it can be suggested that ethanolamine exerts its protective effect by anthocyanin content increase.

**Key words:** *Nicotiana rustica*, Ethanolamine, Phenol, Tyrosine ammonia lyase, Phenyle alanin ammonia lyase, salt stress