

## فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی تحت تنش ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های کلزا

فهیمة توکلی زانیانی<sup>۱</sup>، لیلا شبانی<sup>۲</sup>\* و رؤیا رضوی‌زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران

### چکیده

در پژوهش حاضر، فرضیه القای پاسخ‌های دفاعی در برگ‌های کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش ایزوتیوسیانات بررسی شد. تأثیر متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات در غلظت‌های صفر، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار بر تجمع پراکسید هیدروژن، محتوای ترکیبات فنولیک کل، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز در گیاهچه‌های کلزا ارزیابی شد. افزایش درصد نشت یونی و تجمع پراکسید هیدروژن وجود تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های کلزا تحت تیمار ایزوتیوسیانات‌ها را نشان داد. نتایج همبستگی میان فعالیت آنزیم PAL با مقدار ترکیبات فنولیک کل در گیاهچه‌های کلزا تحت تیمار را نشان داد. در این مطالعه، القای فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز در پاسخ به غلظت یک میلی‌مولار متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های کلزا مشاهده شد. نتایج حاصل پیشنهاد می‌کند که تولید آنتی‌اکسیدان‌ها (ترکیبات فنولیک) تنها مکانیسم سم‌زدایی در گیاه کلزا نبوده، کاندیوگاسیون گلوکاتایون نیز در دفاع گیاه علیه ایزوتیوسیانات‌ها دخالت دارد.

**واژه‌های کلیدی:** ایزوتیوسیانات، فنیل آلانین آمونیلایز، کلزا، گلوکاتایون اس-ترانسفراز

### مقدمه

سوم ارتقا یافته است (Al-Barrak, 2006).

ایزوتیوسیانات‌ها ترکیبات حاوی سولفور هستند که توسط بسیاری از اعضا خانواده Brassicaceae تولید می‌شوند. مشخص شده است که این ترکیبات از گلوکوزینولات‌ها توسط واکنش آنزیمی کاتالیز شده با میروزیناز تولید می‌شوند و دارای طیف وسیعی از

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که در سطح دنیا برای استخراج روغن کشت می‌شود. آمارها نشان دهنده آن است که رشد سالانه تولید کلزا نسبت به سویا، پنبه، آفتابگردان و بادام‌زمینی بیشتر بوده، تولید جهانی آن از رتبه پنجم به

به نقش کلیدی GST در مقابله با تنش اکسیداتیو و خنثی‌سازی مواد سمی آلی، می‌توان افزایش فعالیت این آنزیم را به عنوان احتمال بروز تنش اکسیداتیو در سلول در نظر گرفت.

ایزوتیوسیانات‌ها در سلول‌های جانوری برای جلوگیری از پیشرفت تومور، مرگ سلول‌های سرطانی را القاء می‌کنند در حالی که در سلول‌های گیاهی عملکرد فیزیولوژیک آنها مشخص نشده است. با وجود چندین گزارش اندک روی این ترکیبات مکانیسم فیزیولوژیک گیاه در برابر انواع این ترکیبات به طور کامل مشخص نیست. استفاده از ایزوتیوسیانات‌ها در غلظت‌های بالا در آراییدوپسیس تأثیر علف‌گشی داشته، در حالی که در غلظت‌های پایین این ترکیبات القا بیان ژن گلوتاتیون اس-ترانسفراز دیده شده است (Hara *et al.*, 2010). همچنین، مشخص شده است که در آراییدوپسیس، آلیل ایزوتیوسیانات از طریق تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، نیتریک اکسید و افزایش کلسیم درون سلولی، بسته شدن روزنه‌ها را القا کرده است (Khokon *et al.*, 2011). با روشن شدن مکانیسم‌های پاسخ به ایزوتیوسیانات در گیاهان نقش‌های سیستم گلوکوزینولات-میروزیناز مشخص خواهد شد. برای بررسی نقش ایزوتیوسیانات‌ها در فعالیت‌های سم‌زدایی در گیاهان تولید کننده ایزوتیوسیانات، تأثیر متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات بر تولید ترکیبات فنولیک، آنتوسیانین، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و فعالیت آنزیم GST در گیاهچه‌های کلزا بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

بذرهای کلزا رقم اکاپی پس از ضدعفونی در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه و پرلیت (نسبت ۱:۱)

فعالیت‌های زیستی شامل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، ضد نماتود و ضد حشره هستند (Yan and Chen, 2007). در چند دهه گذشته، اهمیت این متابولیت‌های ثانویه حاوی سولفور و نیتروژن در گیاهان، به دلیل خاصیت بازدارندگی از سرطان، محافظت محصولات زراعی و مواد ضد عفونی کننده زیستی در کشاورزی افزایش یافته است. علاوه بر اهمیت این ترکیبات برای بشر، به عنوان سیستم دفاعی مهم در گیاهان نیز عمل می‌کنند.

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاه شامل ترکیبات فنولیک و آنتوسیانین‌ها هستند (Wang and Lin, 2000). این ترکیبات در میوه‌ها و سبزیجات آثار مفیدی برای پاک‌روبی رادیکال‌های آزاد دارند (Chun *et al.*, 2003). ترکیبات فنولیک سلول‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو ایجاد شده حفاظت می‌کنند (Wada and Ou, 2002). آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) نخستین مرحله از بیوسنتز فنیل پروپانویید که نقطه انشعابی میان متابولیسم اولیه و ثانویه است را کاتالیز می‌کند. این آنزیم همچنین نقش مهمی در بیوسنتز فلاونوئیدها، لیگنین‌ها و بسیاری از ترکیبات دیگر ایفا می‌کند. یکی از سیستم‌های دفاعی در برابر آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو در گیاهان آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) است که خانواده‌ای از آنزیم‌های فاز II است که در سم‌زدایی ترکیبات خارجی زیستی نقش دارد (Schröder, 2001). گلوتاتیون اس-ترانسفراز آنزیمی دایمر و چند عملکردی است که در سم‌زدایی مواد داخلی (متابولیت‌های درون سلول) و خارجی (داروها، حشره کش‌ها و سایر آلوده کننده‌ها) از طریق تشکیل کانسوجوگه (هم یوغ) گلوتاتیون دخالت دارد (Hayes and Pulford, 1995). بنابراین، با توجه

ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. هدایت الکتریکی آنها با EC متر (CONSORT C933) اندازه‌گیری شد. سپس، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. نمونه‌های سرد شده به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۵۰۰ g در دمای اتاق سانتیفریوژ شدند و مجدداً هدایت الکتریکی آنها اندازه‌گیری شد. درصد هدایت الکتریکی مطابق رابطه زیر محاسبه شد.  $EC_1$  و  $EC_2$  هدایت الکتریکی محلول‌ها به ترتیب پیش و پس از جوشیدن هستند (Hara et al., 2010).

$$\%EC = \left( \frac{EC_1}{EC_2} \right) \times 10$$

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز**  
تعیین فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس-ترانسفراز بر اساس روش Carmagnol و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌ها در بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷) همراه با PVP یک درصد و EDTA یک میلی مولار روی یخ ساییده شد و در دور ۱۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتیفریوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. در یک لوله آزمایش مقدار ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی، ۲ میلی لیتر مخلوط واکنش (۰/۱ مولار PBS با اسیدیته ۶/۲۵) حاوی ۳۰ میلی مولار GSH و کلرو دی نیتروبنزن (به عنوان گوهرمایه یا سوبسترا) ریخته شد. تشکیل محصول واکنش یعنی دی‌نیتر و کلرو بنزن کانونجک با گلوکوتایون در طول موج ۳۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Ultrospec 3100 pro) اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک کل

میزان ترکیبات فنولیک کل اندام هوایی گیاهچه‌ها با روش Singleton و Rossi (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۱۰۰ میلی گرم از بافت برگ‌ها در ۱/۵

کشت داده شدند. در هر گلدان تعداد ۲۰ عدد بذر قرار داده شد. گلدان‌ها در گلخانه با شرایط کنترل شده به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. در طول هفته اول پس از کاشت، آبیاری با آب مقطر به طور روزانه انجام شد. پس از یک هفته از رشد، از محلول کامل غذایی هوگلند برای آبیاری استفاده شد. پیش از تیمار ایزوتیوسیانات‌ها، دهانه هر گلدان به طور کامل با یک پلاستیک محدود شد و گلدان‌ها در این شرایط برای ۴ روز نگهداری شدند. پس از سازگاری گیاهچه‌ها با این شرایط، امولسیون آبی ایزوتیوسیانات‌ها (متیل و پروپیل) در غلظت‌های صفر، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی مولار روی گلدان‌ها افزاشانه شد. گلدان‌های تیمار شده با ایزوتیوسیانات‌ها فوراً با پلاستیک پوشانده، به مدت ۳ روز در شرایط گلخانه نگهداری شدند. از اندام هوایی گیاهچه‌های ۲۸ روزه برای سنجش همه شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک استفاده شد.

#### آشکارسازی پراکسید هیدروژن

تجمع پراکسید هیدروژن در بخش‌های هوایی گیاهچه‌ها با استفاده از روش رنگ آمیزی دی‌آمینوبنزیلین (Thordal-Christensen et al., 1997) با اندکی تغییر انجام شد. گیاهچه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق در محلول دی‌آمینوبنزیلین قرار داده شدند. سپس، گیاهچه‌ها در اتانول ۹۵ درصد قرار گرفتند و پس از حرارت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد رنگ‌زدایی شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر، از گیاهچه‌ها عکس‌برداری شد.

#### درصد نشت الکترولیتی غشا

مقدار ۰/۱ گرم از بافت برگ از هر تکرار به دقت شسته، در لوله آزمایش درپوش دار محتوی ۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر قرار داده شد. این لوله‌ها به مدت ۱/۵

۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۵) فاقد فیل آلانین به عنوان نمونه‌های شاهد تهیه شد. افزایش در جذب به واسطه فعالیت آنزیم پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت شد. غلظت سینامیک اسید با استفاده از رابطه ۱ (قانون بیر-لمبرت) محاسبه شد. A: شدت جذب، q: ضریب خاموشی سینامیک اسید (9000 M ml<sup>-1</sup>)، C: غلظت و L: طول مسیر (cm) است.

$$A=q \times C \times L \quad \text{رابطه ۱}$$

### تحلیل داده‌ها

طرح آزمایشی به کار رفته طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار به ازای هر تیمار انجام شد. نتایج با نرم‌افزار SAS و تجزیه واریانس یک‌طرفه با آزمون دانکن تحلیل شده است.

### نتایج

#### تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر نشت الکتریکی غشا و تجمع پراکسید هیدروژن

آسیب غشا به طور غیرمستقیم با اندازه‌گیری هدایت الکتریکی نشت نمک‌ها از سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود. استفاده از متیل ایزوتیوسیانات (۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و پروپیل ایزوتیوسیانات (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) نشت الکتریکی غشا را در بافت‌های برگ کلزا افزایش داد (شکل ۱). افزایش نشت در پروپیل ایزوتیوسیانات در مقایسه با متیل ایزوتیوسیانات بیشتر بود. رنگ آمیزی دی‌آمینو بنزیدین نشان داد که تیمار گیاهچه‌ها با هر دو نوع ایزوتیوسیانات تجمع پراکسید هیدروژن را در برگ‌های کلزا افزایش داده‌اند (شکل ۲).

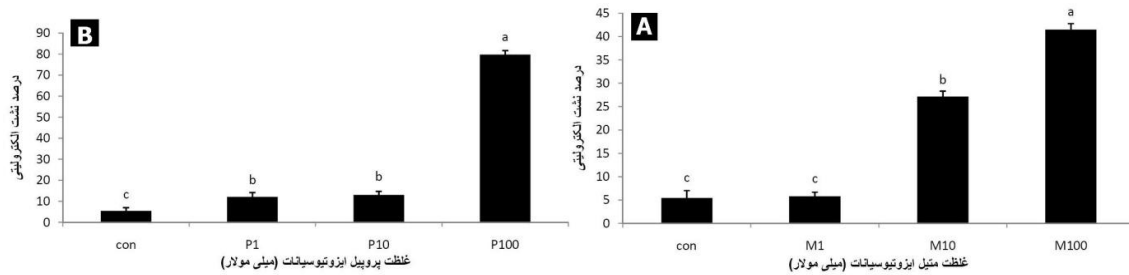
میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده شد و در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای اندازه‌گیری غلظت فنولیک کل موجود در عصاره‌های تهیه شده، ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها با ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم و ۱/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ترکیب شده، در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت شد. مقدار ترکیبات فنولیک کل در ریشه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمد.

### سنجش آنتوسیانین

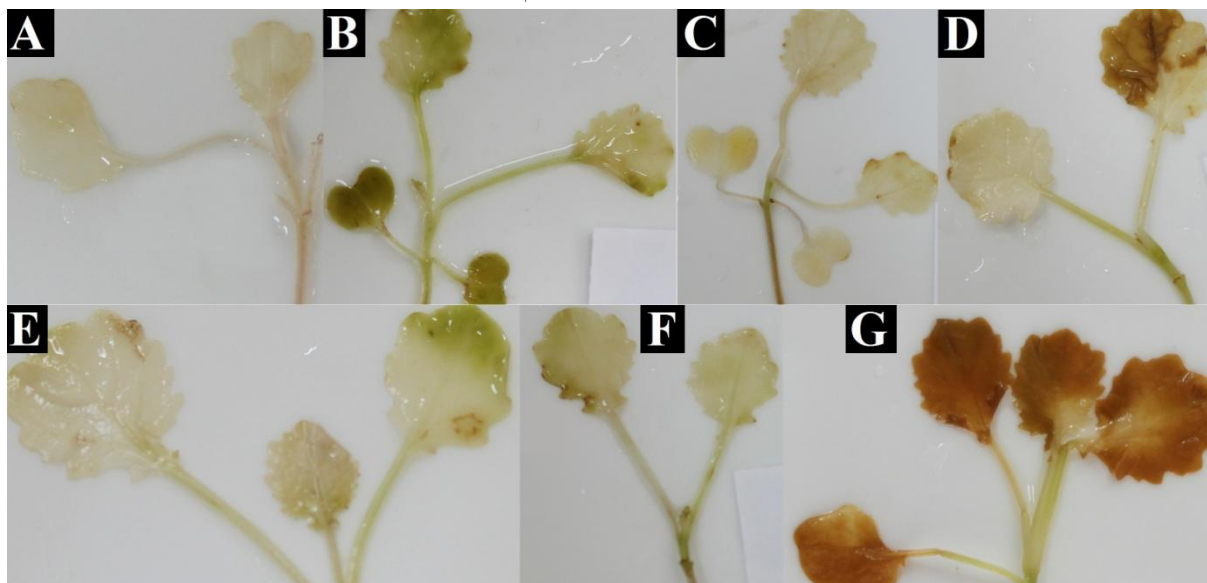
مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌های تازه گیاهچه‌ها در ۲ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۰/۱ نرمال ساییده شد و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. عصاره‌های حاصل به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و جذب محلول رویی در طول موج ۵۱۱ نانومتر قرائت شد. میزان آنتوسیانین بر اساس ضریب خاموشی مولی رافانوزین (۳۱۷۶۰ میکرومول بر سانتی‌متر) محاسبه شد (Bonfill et al., 2003).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیل آلانین آمونیا لیا

مقدار ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاهچه‌ها در بافر Tris-HCl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۶) همراه با ۰/۵ درصد PVP روی یخ ساییده شد و در دور g ۲۵۲۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. تعیین فعالیت آنزیم با روش Abell و Shen (۱۹۸۷) انجام شد. در یک سری لوله آزمایش مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۵) حاوی ۱۲ میلی‌مولار فیل آلانین به عنوان سوبسترا ریخته شد. در سری دوم لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و



شکل ۱- A) تأثیر متیل ایزوتیوسیانات (Con: شاهد؛ M1: ۱ میلی‌مولار؛ M10: ۱۰ میلی‌مولار؛ M100: ۱۰۰ میلی‌مولار) و B) پروپیل ایزوتیوسیانات (Con: شاهد؛ P1: ۱ میلی‌مولار؛ P10: ۱۰ میلی‌مولار؛ P100: ۱۰۰ میلی‌مولار) بر درصد نشت الکتريکی غشا در گیاهچه‌های کلزا. مقادير میانگين ۳ تکرار  $\pm$  خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ( $P < 0.05$ ) است.



شکل ۲- رنگ آمیزی دی‌آمینوبنزیلین برای آشکارسازی پراکسید هیدروژن. متیل ایزوتیوسیانات و پروپیل ایزوتیوسیانات در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار در گیاهچه‌های کلزا به کار رفته است. لکه‌های قهوه‌ای‌رنگ وجود پراکسید هیدروژن را نشان می‌دهد. A) شاهد؛ B) متیل ایزوتیوسیانات ۱ میلی‌مولار؛ C) متیل ایزوتیوسیانات ۱۰ میلی‌مولار؛ D) متیل ایزوتیوسیانات ۱۰۰ میلی‌مولار؛ E) پروپیل ایزوتیوسیانات ۱ میلی‌مولار؛ F) پروپیل ایزوتیوسیانات ۱۰ میلی‌مولار؛ G) پروپیل ایزوتیوسیانات ۱۰۰ میلی‌مولار.

### تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر میزان ترکیبات فنولیک کل

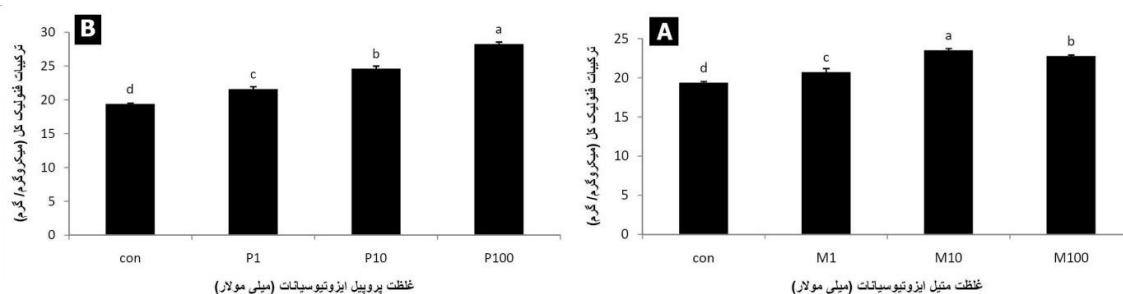
نتایج حاصل از تعیین محتوای ترکیبات فنولیک گویای افزایش این ترکیبات در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با هر دو نوع ایزوتیوسیانات بود. بیشترین میزان ترکیبات فنولیک کل در غلظت‌های متیل ایزوتیوسیانات (۱۰ میلی‌مولار) و پروپیل ایزوتیوسیانات (۱۰۰ میلی‌مولار) به ترتیب ۱/۲ و ۱/۵ برابر حاصل شد (شکل ۳).

### تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر میزان رنگیزه آنتوسیانین

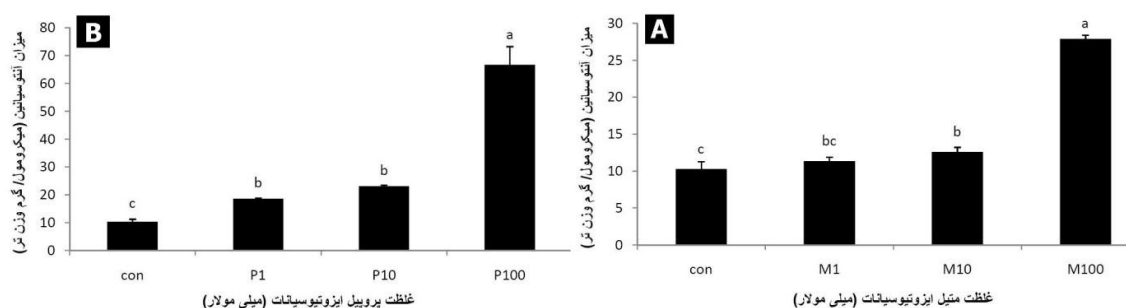
در بررسی تأثیر متیل ایزوتیوسیانات و پروپیل ایزوتیوسیانات (شکل ۴) مشاهده شد که میزان رنگیزه آنتوسیانین در اندام هوایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش یافته است. متیل ایزوتیوسیانات در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار مقدار آنتوسیانین را تا ۲/۶ برابر در مقایسه با شاهد افزایش داده است. در بررسی اثر پروپیل ایزوتیوسیانات، غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار باعث

گیاهچه‌های شاهد افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری در میزان سینامیک اسید بین تیمارهای ۱ و ۱۰ میلی‌مولار مشاهده نشد. در بررسی اثر پروپیل ایزوتیوسیانات، غلظت ۱۰ میلی‌مولار باعث افزایش میزان سینامیک اسید به میزان ۲/۱ برابر در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد شده است. افزایشی در میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای ۱ و ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده نشد (شکل ۵).

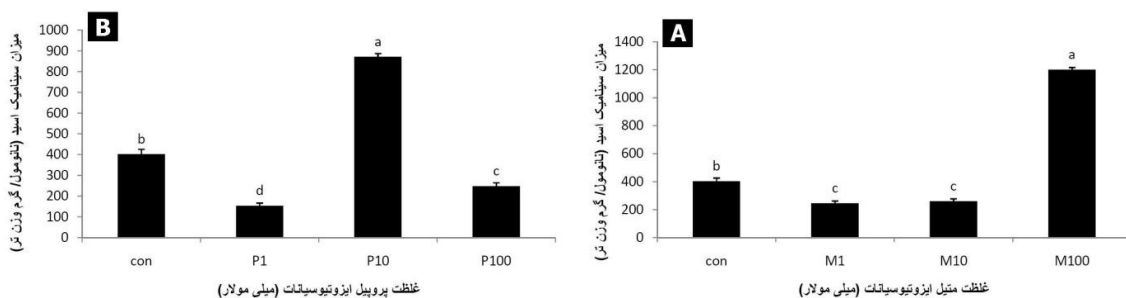
افزایش میزان آنتوسیانین به ترتیب به میزان ۲/۱، ۲/۲ و ۶/۴ برابر در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد شده است. افزایش چشمگیری در میزان آنتوسیانین تحت تیمار با پروپیل ایزوتیوسیانات در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد مشاهده شد. **تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز** در بررسی تأثیر متیل ایزوتیوسیانات غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، میزان سینامیک اسید به میزان ۳ برابر نسبت به



شکل ۳- A) تأثیر متیل ایزوتیوسیانات و B) پروپیل ایزوتیوسیانات بر محتوای ترکیبات فنولیک کل در گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین  $\pm$  تکرار  $\pm$  خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ( $P < 0.05$ ) است.



شکل ۴- A) تأثیر متیل ایزوتیوسیانات و B) پروپیل ایزوتیوسیانات بر میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین  $\pm$  تکرار  $\pm$  خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ( $P < 0.05$ ) است.



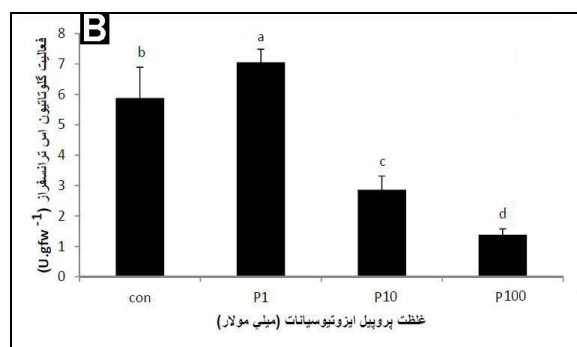
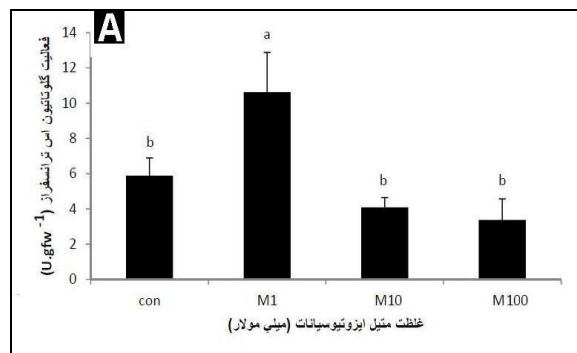
شکل ۵- A) تأثیر متیل ایزوتیوسیانات و B) پروپیل ایزوتیوسیانات بر میزان سینامیک اسید در گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین  $\pm$  تکرار  $\pm$  خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ( $P < 0.05$ ) است.

## بحث

نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند که ایزوتیوسیانات‌ها پاسخ‌های مشابه انفجار اکسیداتیوی شامل نشت الکتریکی غشا و تجمع پراکسید هیدروژن را باعث می‌شوند. در بین دو نوع ایزوتیوسیانات به کار رفته، پروپیل ایزوتیوسیانات پاسخ‌های شدیدتری در مقایسه با متیل ایزوتیوسیانات با توجه به آثار سفید شدن برگ‌ها نشان داده است. متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات میزان پراکسید هیدروژن را در برگ‌های کلزا نسبت به شاهد افزایش داده‌اند. این نتایج در راستای نتایج Hara و همکاران (۲۰۱۰) است که آلیل، فنتیل و متیل ایزوتیوسیانات میزان پراکسید هیدروژن را در برگ گیاه آراییدوپسیس افزایش می‌دهند (Hara *et al.*, 2010). همچنین، Wang و Chen (۲۰۱۰) نشان دادند که آلیل ایزوتیوسیانات میزان پراکسید هیدروژن را در میوه بلوبری افزایش می‌دهد. آنها نشان دادند که میزان پراکسید هیدروژن در میوه‌های تحت تیمار با آلیل ایزوتیوسیانات ۲۰ درصد بیش از میوه‌های شاهد است. پراکسید هیدروژن در سطوح متوسط به عنوان یک پیامبر ثانویه برای پیام‌رسانی تنش عمل کرده، به فعال شدن مکانیسم‌های متفاوت منجر می‌شود. بنابراین، تولید پراکسید هیدروژن در جریان تنش‌های غیر زیستی به عنوان بخشی از آبخار پیام‌رسانی به کار رفته است که به محافظت در برابر تنش‌ها منجر می‌شود (Hook *et al.*, 1999). بیشترین درصد نشت الکترولیتی غشا در برگ‌های کلزا در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات مشاهده شد. Hara و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده‌اند که تیمارهای ۱۰۰ میلی‌مولار متیل ایزوتیوسیانات، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار آلیل و فنتیل

## تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز

نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت ۱ میلی‌مولار متیل ایزوتیوسیانات و پروپیل ایزوتیوسیانات میزان فعالیت گلوکاتایون اس-ترانسفراز را در برگ گیاهچه‌های کلزا نسبت به شاهد افزایش داده است. در گیاهچه‌های تیمار شده با متیل ایزوتیوسیانات اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز بین شاهد و غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده نشد. غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار پروپیل ایزوتیوسیانات فعالیت این آنزیم را نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش داد (شکل ۶).



شکل ۶- A) تأثیر متیل ایزوتیوسیانات و B) پروپیل ایزوتیوسیانات بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز در گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین  $\pm$  تکرار  $\pm$  خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ( $P < 0.05$ ) است.

و کوئرستین بود. آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز نقش مهمی در سنتز ترکیبات فنولیک ایفا می‌کند و در گزارش‌های متعدد ارتباط میان افزایش در بیان و فعالیت آنزیم PAL و افزایش در ترکیبات فنولی در پاسخ به محرکات مختلف نشان داده شده است (Boudet, 2007). بنابراین، به نظر می‌رسد تجمع ترکیبات فنولی در گیاهچه‌های کلزا تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار متیل و ۱۰ میلی‌مولار پروپیل ایزوتیوسیانات ممکن است مرتبط با تحریک فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز از طریق تنش ایزوتیوسیانات باشد. در بیشتر گیاهان ترکیبات فنولیک موجود در واکوئل ممکن است که به عنوان گوهرمایه برای پراکسیدازهای واکوئلی در سیستم پاکروبی پراکسیداز/ فنولیک/ آسکوربات عمل کرده، که سلول‌های گیاهی را از آسیب اکسیداتیو القا شده توسط تنش به واسطه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن حفاظت کنند.

در این پژوهش، القا فعالیت آنزیم GST در غلظت‌های پایین ایزوتیوسیانات‌های به کار رفته (یک میلی‌مولار) مشاهده شد. گیاهان، مجهز به پاک‌کننده‌های غیر آنزیمی و آنزیمی ROS برای حفاظت سلول از آسیب اکسیداتیو هستند. علاوه بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شناخته شده نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم‌های چرخه گلوکوتایون-آسکوربات اخیراً نقش آنزیم GST در شرایط تنش‌های مختلف در گیاهان گزارش شده است (Brentner *et al.*, 2008; Valentovicova *et al.*, 2009). مشخص شده است که گلوکوتایون اس-ترانسفرازهای گیاهی کانجوگاسیون ایزوتیوسیانات‌ها را کاتالیز می‌کنند (Cummins *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1998).

ایزوتیوسیانات در صد نشست الکترولیتی را در گیاهچه‌های آراییدوپسیس افزایش می‌دهند. افزایش نشست الکترولیتی غشا ناشی از رادیکال‌های اکسیژن فعال تولید شده در تنش اکسیداتیو است که بر لیپیدهای موجود در غشای سلول و اندامک‌های درون سلولی تأثیر گذاشته، پایداری، تمامیت و پیوستگی غشا را مختل می‌نماید (Horwitz *et al.*, 1998).

طبق نتایج به دست آمده در این بررسی، متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات میزان ترکیبات فنولیک را در اندام هوایی گیاهچه‌های کلزا افزایش داده است. آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ترکیبات فنولیک قادر به انجام عملکردهایی نظیر پاکروبی رادیکال‌های آزاد، تجزیه پراکسیدها و از بین بردن اکسیژن‌های یکتایی هستند (Habtemariam, 2003). سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها در بردارنده صدها مکانیسم و ماده مختلف است که می‌توانند از آسیب سلول و بافت جلوگیری کنند. همچنین، می‌توانند پراکسیداسیون لیپیدها یا دیگر مولکول‌ها را توسط بازداری آغاز یا انتشار اکسیداسیون واکنش‌های زنجیری به تأخیر اندازند یا متوقف کنند. افزایش یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها با افزایش یا کاهش سطح میزان ترکیبات فنولیک و آنتوسیانین منطبق است (Harborne 1994). در گزارش Chen و Wang (2010) آمده است که آلایل ایزوتیوسیانات ابتدا سبب افزایش و سپس کاهش میزان ترکیبات فنولیک در میوه بلوبری (در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد) شده است. Olsson و همکاران (۱۹۹۸) تأثیر تابش UV-B را بر محتوای فلاونوئیدها در دو رقم زراعی از *Brassica napus* بررسی کردند. نتایج آنها گویای افزایش ۱۵۰ درصدی فلاونوئیدهای محلول گلوکوزیدهای کامفرول



آراییدوپسیس تحت تیمار فنتیل ایزوتیوسیانات (غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی مولار) افزایش می‌یابد. Wagner و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که بنزیل ایزوتیوسیانات باعث افزایش بیان ژن گلو‌تاتیون اس-ترانسفراز در گیاهچه‌های آراییدوپسیس می‌شود.

بنابراین، احتمالاً غلظت‌های متوسط ایزوتیوسیانات (بسته به نوع آن) به کار رفته در پژوهش حاضر، قادر به القا پاسخ‌های مشابه انفجار اکسیداتیو و فعال‌سازی سیستم دفاعی کلزا باشد. به نظر می‌رسد ترکیبات ایزوتیوسیانات نقش مؤثری در القای پاسخ‌های دفاعی دارند که به طور غیر مستقیم با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های PAL و GST موجب افزایش میزان ترکیبات فنیل پروپانوییدی در کشت گلخانه‌ای کلزا می‌شوند.

گوهرمایه فیزیولوژیک گلو‌تاتیون اس-ترانسفرازهای گیاهی محسوب می‌شوند. افزایش درصد نشت و تجمع پراکسید هیدروژن، وجود تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های کلزا تحت تیمار ایزوتیوسیانات‌ها را نشان می‌دهد. پراکسید هیدروژن فعال‌کننده قوی پروموتور گلو‌تاتیون ترانسفراز است (Ezaki *et al.*, 2004)، بنابراین، این آنزیم در شرایط مختلف تنش از جمله ایزوتیوسیانات فرا تنظیم می‌شود. ممکن است غلظت‌های زیاد متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات یا از طریق مهار و یا غیرفعال کردن آنزیم GST و فروتنظیمی آن اثر متضاد روی فعالیت این آنزیم دفاعی مشخص داشته باشند. Hara و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده‌اند که میزان بیان چهار ژن گلو‌تاتیون اس-ترانسفراز در گیاهچه‌های

## منابع

- Abell, C. W. and Shen, R. S. (1987) Phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Methods in Enzymology* 142: 242-253.
- Al-Barrak, K. M. (2006) Irrigation interval and nitrogen level effects on growth and yield of canola (*Brassica napus* L.). *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* 7: 87-103.
- Bonfill, M., Palazón, J., Cusidó, R. M., Joly, S., Morales, C. And Pinol, M. T. (2003) Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus×media* cells. *Developments in Biological Plant* 41: 91-96.
- Boudet, A. M. (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722-2735.
- Brentner, L. B., Mukherji, S. T., Merchie, K. M., Yoon, J. M., Schnoor, J. L. and Aken, B. V. (2008) Expression of glutathione S-transferases in poplar trees (*Populus trichocarpa*) exposed to 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT). *Chemosphere* 73: 657-662.
- Carmagnol, F., Sinet, P. M., Rapin, J. and Jerome, H. (1981) Glutathione-S-transferase of human red blood cells; assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: hyperbilirubinemia and impaired renal function. *Clinica Chimica Acta* 117: 209-217.
- Chun, O. K., Kim, D. O. and Lee, C. Y. (2003) Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 8067-8072.
- Cummins, I., Cole, D. J. and Edwards, R. (1997) Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from Wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59: 35-49.
- Dixon, D. P., Cole, D. J. and Edwards, R. (1998) Purification, regulation and cloning

- of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant Molecular Biology* 36: 75-87.
- Ezaki, B., Suzuki, M., Motoda, H., Kawamura, M., Nakashima, S. and Matsumoto, H. (2004) Mechanism of gene expression of *Arabidopsis* glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. *Plant Physiology* 134: 1672-1682.
- Habtemariam, S. (2003) Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicol* 41: 723-727.
- Hara, M., Yatsuzuka, Y., Tabata, K. and Kuboi, T. (2010) Exogenously applied isothiocyanates enhance glutathione S-transferase expression in *Arabidopsis* but act as herbicides at higher concentrations. *Journal of Plant Physiology* 167: 643-649.
- Harborne, J. B. (1994) *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London.
- Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30: 521-600.
- Hook, I., Poupatb, Ch., Ahond, A., Gueanard, D., Gueritte, F., Adeline, M. T., Wang, X. P., Dempsey, D., Breuillet, S. and Potie, P. (1999) Seasonal variation of neutral and basic taxoid contents in shoots of European Yew (*Taxus baccata*). *Phytochemistry* 52: 1041-1045.
- Horwitz, S. B., Lothstein, L., Manfredi, J. J., Mellado, W., Parness, J., Roy, S. N., Schiff, P. B., Sorbara, L., and Zeheb, R. (1998) Taxol: mechanisms of action and resistance. *Annals New York Academy of Sciences* 466: 733-744.
- Khokon, M., Jahan, M. D. S., Rahman, T., Hossain, M. A., Muroyama, D., Minami, I., Munemasa, S., Mori, I. C., Nakamura, Y. and Murata, Y. (2011) Allyl isothiocyanate (AITC) induces stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 34: 1900-1906.
- Olsson, L., Veit, M., Weissenböck, G. and Bornman, J. (1998) Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49: 1021-1028.
- Schröder, P. (2000) Metabolism of Organic Xenobiotics in Plants: Conjugating Enzymes and Metabolic Endpoints. In: *Intercost Workshop on Bioremediation, Italy*.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194.
- Valentovicova, K., Huttova, J., Mistrík, I. and Tamas, L. (2009) Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1069-1074.
- Wada, L. and Ou, B. (2002) Antioxidant activity and phenolic content of Oregon canberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3495-3500.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P. and Mauch, F. (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49: 515-532.
- Wang, S. Y. and Chen, C. T. (2010) Effect of allyl isothiocyanate on antioxidant enzyme activities, flavonoids and post-harvest fruit quality of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Duke). *Food Chemistry* 122: 1153-1158.
- Wang, S. Y. and Lin, H. S. (2000) Antioxidant

activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 140-146.

Yan, X. and Chen, S. (2007) Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* 226: 1343-1352.



## Activation of defense responses under isothiocyanate stress in oilseed rape plantlets

Fahimeh Tavakoli Zanyani <sup>1</sup>, Leila Shabani <sup>2\*</sup> and Roya Razavizadeh <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup> Biology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

### Abstract

In this study, the hypothesis that defense response in leaves of the oilseed rape is induced under isothiocyanate stress was investigated. The effects of different concentrations of methyl and propyl isothiocyanates (0, 1, 10 and 100 mM) were evaluated on accumulation of hydrogen peroxide, phenolic compound content and PAL and GST enzymes activities in *Brassica napus* L. Oxidative stress in isothiocyanates treated oilseed rape plantlets was deduced from increment of percentage of electrolyte leakage and from accumulation of hydrogen peroxide. Results showed that the PAL activity was significantly correlated to the contents of phenolic compounds in response to isothiocyanates. Results also showed that GST activity was induced in oilseed rape plantlets in response to exposure to 1mM isothiocyanate. Results suggested that production of total phenolic compound was not the only means of detoxifying in the oilseed rape plantlets and glutathione conjugation was also involved in the defense response to toxification in oilseed rape.

**Key words:** Isothiocyanate, Phenylalanine ammonia-lyase, Oil seed rape, Glutathione S-transferase

---

\* Corresponding Author: shabani-l@sci.sku.ac.ir