زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره شانزدهم، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۸۱-۹۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۱۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۳/۱۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۵/۱۲

فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی تحت تنش ایزوتیوسیانات در گیاهچه‌های کلزا

فهیمه توکلی زانیانی [۱]، لیلا شبانی [۲]* و رؤیا رضوی‌زاده [۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۳] 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 آمونیالیاز و آنزیم گلوتاتیون 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 تحت تیمار را نشان داد. در این مطالعه، القای فعالیت آنزیم گلوتاتیون 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 سمّ‌زدایی در گیاه کلزا نبوده، کانجوگاسیون گلوتاتیون نیز در دفاع گیاه علیه ایزوتیوسیانات‌ها دخالت دارد.

واژه‌های کلیدی: ایزوتیوسیانات، فنیل آلانین آمونیالیاز، کلزا، گلوتاتیون اس-ترانسفراز

مقدمه
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 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

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: shabani-l@sci.sku.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۸۱۴۴۲۴۴۰۵

Archive of SID
www.SID.ir

فعالیت‌های زیستی شامل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، ضد نماتود و ضد حشره هستند (Yan and Chen, 2007). در چند دهه گذشته، اهمیّت 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 اهمیّت 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 آمونیالیاز (PAL) نخستین مرحله از بیوسنتز فنیل پروپانوئید 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 سمّ‌زدایی ترکیبات خارجی زیستی نقش دارد (Schröder, 2001). گلوتاتیون اس-ترانسفراز آنزیمی دایمر و چند عملکردی است که در سمّ‌زدایی مواد داخلی (متابولیت‌های درون سلول) و خارجی (داروها، حشره‌کش‌ها و سایر آلوده‌کننده‌ها) از طریق تشکیل کانجوگه (هم یوغ) گلوتاتیون دخالت دارد (Hayes and Pulford, 1995). بنابراین، با توجه به نقش کلیدی GST در مقابله با تنش اکسیداتیو و خنثی‌سازی مواد سمّی 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 آرابیدوپسیس تأثیر علف‌کُشی 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 آرابیدوپسیس، 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 سمّ‌زدایی در گیاهان تولید کننده ایزوتیوسیانات، تأثیر متیل و پروپیل ایزوتیوسیانات بر تولید ترکیبات فنولیک، آنتوسیانین، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز 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)

Archive of SID

www.SID.ir

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 میلی‌مولار روی گلدان‌ها افشانه 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 رنگ‌آمیزی دی‌آمینوبنزیدین (Thordal-Christensen *et al.*, 1997) با اندکی تغییر انجام شد. گیاهچه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق در محلول دی‌آمینوبنزیدین 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 درپوش‌دار محتوی ۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر قرار داده شد. این لوله‌ها به مدت ۱/۵ 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 g ۱۵۰۰ در دمای اتاق سانتریفیوژ 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 گلوتاتیون اس ترانسفراز

تعیین فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز بر اساس روش Carmagnol و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌ها در بافر پتاسیم فسفات (۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷) همراه با PVP یک درصد و EDTA یک میلی‌مولار روی یخ ساییده شد و در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. در یک لوله آزمایش مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، ۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش (۰/۱ مولار PBS با اسیدیته ۶/۲۵) حاوی ۳۰ میلی‌مولار GSH و کلرو دی نیتروبنزن (به عنوان گوهرمایه یا سوبسترا) ریخته شد. تشکیل محصول واکنش یعنی دی‌نیترو کلرو بنزن کانجوگه با گلوتاتیون 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 میلی‌گرم از بافت برگ‌ها در ۱/۵

Archive of SID

www.SID.ir

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 میلی گرم 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 فنیل آلانین آمونیالیاز

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 فنیل آلانین به عنوان سوبسترا ریخته شد. در سری دوم لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر Tris-Hcl (۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۵) فاقد فنیل 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 ($9000\ M\ ml^{-1}$)، C: غلظت و L: طول مسیر (cm) است).

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

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.

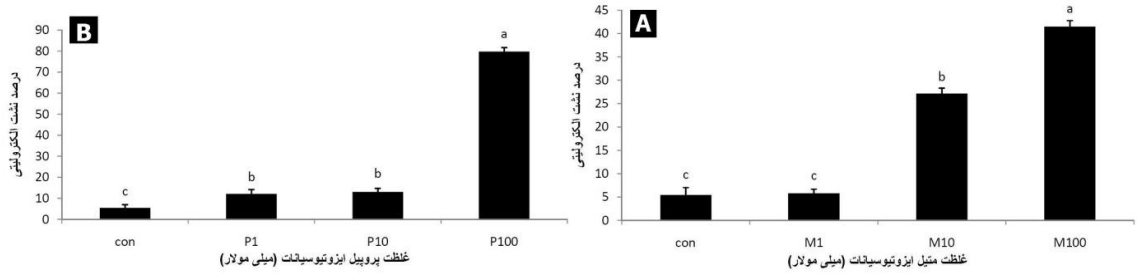
نتایج

تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر نشت الکتریکی غشا و تجمع پراکسید هیدروژن

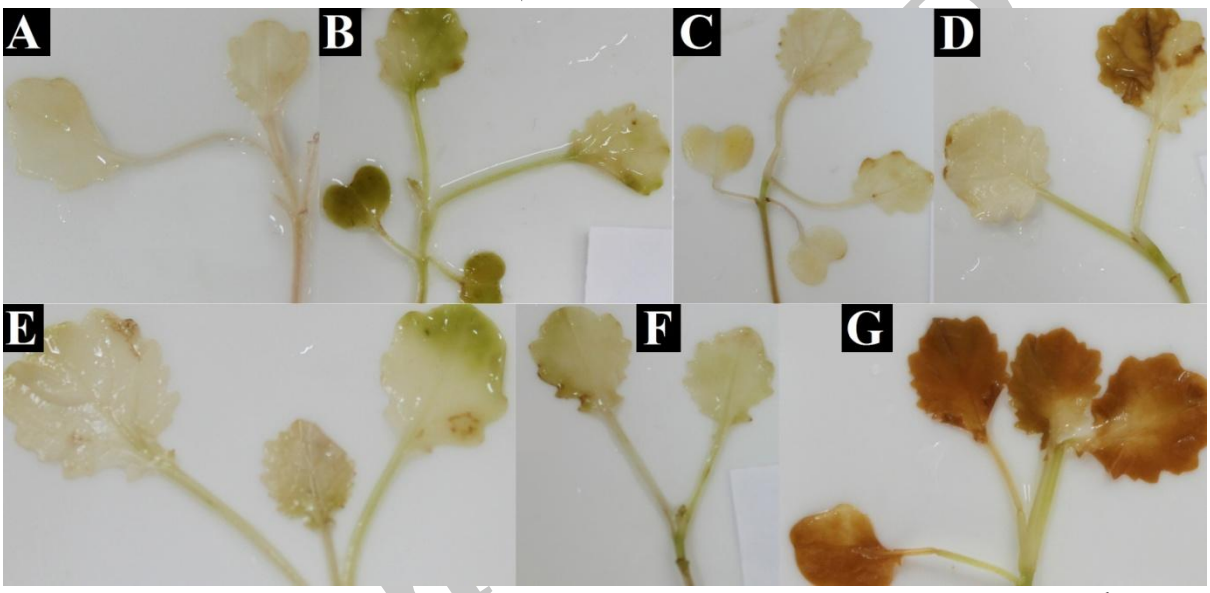
آسیب غشا به طور غیرمستقیم با اندازه‌گیری هدایت الکتریکی نشت نمک‌ها از سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود. استفاده از متیل ایزوتیوسیانات (۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و پروپیل ایزوتیوسیانات (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) نشت الکتریکی غشا را در بافت‌های برگ کلزا افزایش داد (شکل ۱). افزایش نشت در پروپیل ایزوتیوسیانات در مقایسه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

Archive of SID

www.SID.ir



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 الکتریکی غشا درگیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است.



شکل ۲- رنگ‌آمیزی دی‌آمینوبنزیدین 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

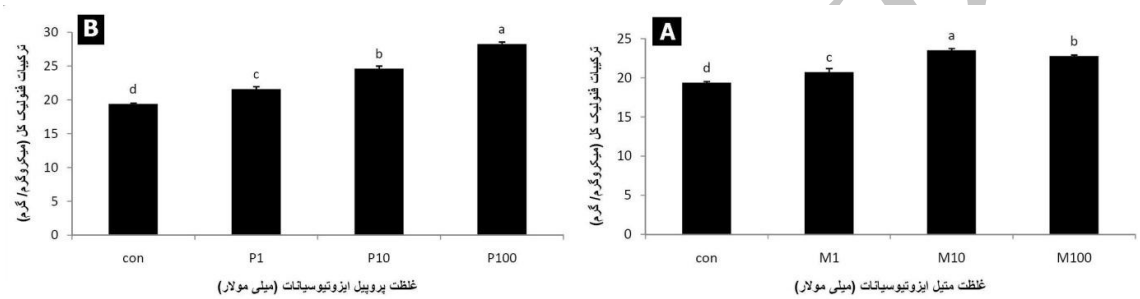
Archive of SID

www.SID.ir

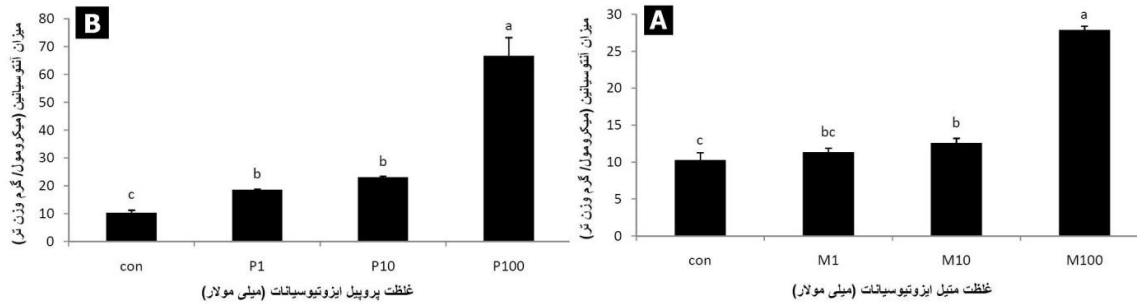
افزایش میزان آنتوسیانین به ترتیب به میزان ۲/۱، ۲/۲ و ۶/۴ برابر در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد شده است. افزایش چشمگیری در میزان آنتوسیانین تحت تیمار با پروپیل ایزوتیوسیانات در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد مشاهده شد.

تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

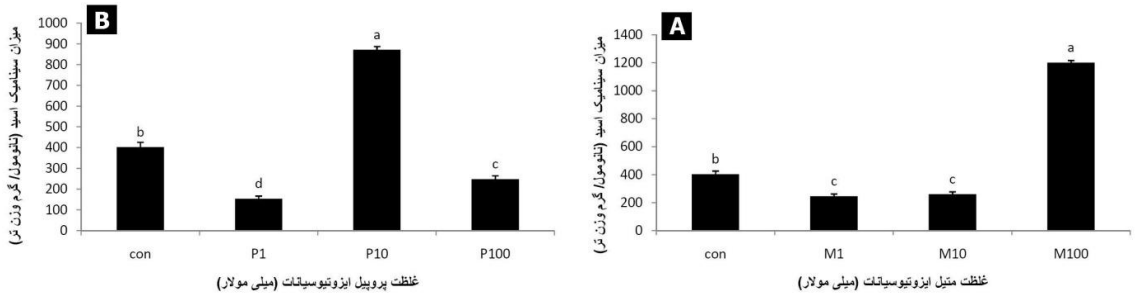
در بررسی تأثیر متیل ایزوتیوسیانات غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، میزان سینامیک اسید به میزان ۳ برابر نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری در میزان سینامیک اسید بین تیمارهای ۱ و ۱۰ میلی‌مولار مشاهده نشد. در بررسی اثر پروپیل ایزوتیوسیانات، غلظت ۱۰ میلی‌مولار باعث افزایش میزان سینامیک اسید به میزان 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).



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

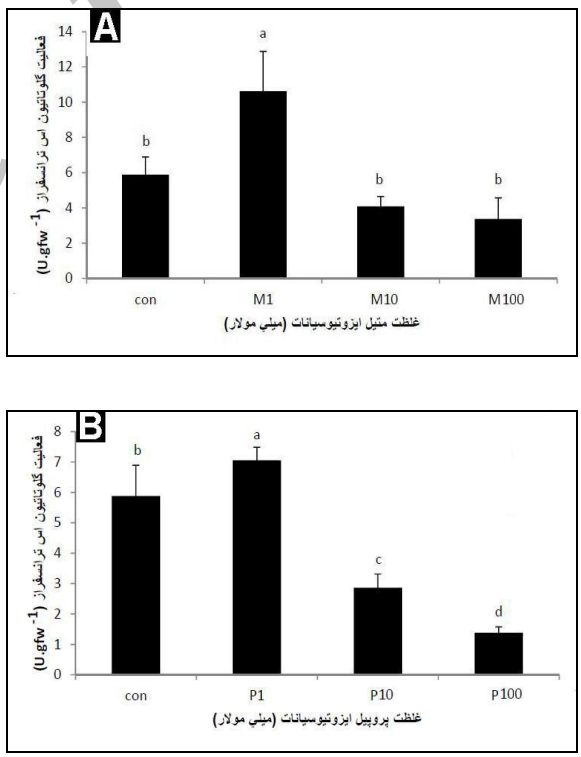


شکل ۵- A) تأثیر متیل ایزوتیوسیانات و B) پروپیل ایزوتیوسیانات بر میزان سینامیک اسید در گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن ($P<0.05$) است.

www.SID.ir

تأثیر ایزوتیوسیانات‌ها بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز

نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت ۱ میلی‌مولار متیل ایزوتیوسیانات و پروپیل ایزوتیوسیانات میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز را در برگ گیاهچه‌های کلزا نسبت به شاهد افزایش داشته است. در گیاهچه‌های تیمار شده با متیل ایزوتیوسیانات اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون 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 گلوتاتیون ترانسفراز در گیاهچه‌های کلزا. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± 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 آرابیدوپسیس 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 آبشار 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

Archive of SID

www.SID.ir

ایزوتیوسیانات درصد نشت الکترولیتی را در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس افزایش می‌دهند. افزایش نشت 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 دربردارنده صدها مکانیسم و ماده مختلف است که می‌توانند از آسیب سلول و بافت جلوگیری کنند. همچنین، می‌تواند 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 Wang و Chen (۲۰۱۰) آمده است که آلیل 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 و کوئرسیتن بود. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز 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 آمونیالیاز 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 گلوتاتیون-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 گلوتاتیون اس-ترانسفرازهای گیاهی کانجوگاسیون ایزوتیوسیانات‌ها را کاتالیز می‌کنند (Cummins *et al*., 1997; Dixon *et al*., 1998). ایزوتیوسیانات‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

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 فعال کننده 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 آرابیدوپسیس 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 آرابیدوپسیس 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 پروپانوئیدی در کشت گلخانه‌ای کلزا می‌شوند.

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

Archive of SID

www.SID.ir

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*. Toxicon 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., Dempseya, 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_2O_2 in plants. H_2O_2 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 caneberries. 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

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir

Activation of defense responses under isothiocyanate stress in oilseed rape plantlets

Fahimeh Tavakoli Zanyani [1], Leila Shabani [2]* and Roya Razavizadeh [3]

[1] Biology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
[3] Biology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

Archive of SID

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 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

www.SID.ir