زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و ششم، زمستان ۱۳۹۴، صفحه ۱-۱۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۴/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۰۵/۲۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۶/۰۹

تغییر در ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز توسط پیش‌تیمار 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 به 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) پیش‌تیمار 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 آمونیالیاز کاهش ومقدار آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم تیروزین آمونیالیاز افزایش یافته است. در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که پیش‌تیمار اتانول امین 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 آمونیالیاز، فنیل آلانین آمونیالیاز، تنش شوری

مقدمه

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

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

Copyright©2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

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 گستردگی در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند (Lapidot *et al*., 1999). در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی، دو آنزیم: فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL) جزو مهم‌ترین آنزیم‌ها شناخته می‌شوند (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985). Hoagland و Duke (۱۹۸۱) گزارش دادند که این آنزیم‌ها از طریق دآمیناسیون 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 خواهد شد. فعالیت TAL در بین گیاهان دو لپه به خوبی شناخته نشده است با وجود این، Beaudoin-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 می‌بینند 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 و 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 پاراکوآت افزایش فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در پاسخ به پیش‌تیمار اتانول آمین به سمّیت‌زدایی 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. همان طور 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 TAL و PAL به عنوان مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز 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 ضدعفونی و در پایان، با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شدند. در مرحله بعد، بذرهای استریل روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. 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.

اندازه گیری مالون دی آلدهید (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 g ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی ۱ میلی‌لیتر از محلول تیوباربیتوریک 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 g ۱۰۰۰۰ 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

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت (Chang *et al*., 2002). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی (۱ گرم بافت برگ در ۱۰ میلی‌لیتر متانول) با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۱ مولار استات پتاسیم و ۲/۸ میلی‌لیتر 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:

$$\text{واحد نسبی آنتوسیانین بر گرم وزن تر بافت} = \frac{\text{حجم عصاره (میلی‌لیتر)} \times (\text{OD 530} - (0.25 \times \text{OD 657}))}{\text{وزن بافت (گرم)}}$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAL: حدود ۱ گرم بافت تازه برگ تنباکو در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۳ میلی‌لیتر بافر تریس (۰/۰۵ مولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸/۴) حاوی ۱۵ میلی‌مولار ۲- مرکاپتو اتانول به صورت همگن درآمد. 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 میکرو مولار بافر تریس با اسیدیته برابر ۸/۱ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی برگ در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر بود. پس از ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد واکنش تبدیل تیروزین به کوماریک اسید با اضافه نمودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر ۵ کلریدریک اسید نرمال متوقف شد (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL: ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تازه برگ با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸/۵) حاوی ۱۵ میلی‌مولار بتا-مرکاپتو اتانول همگن شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با نیروی g ۴۰۰۰ 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985).

اندازه‌گیری فنل کل: برای اندازه‌گیری فنل کل، ۵۰۰ میلی‌گرم پودر خشک ساییده شده برگ در یک لوله آزمایش ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر 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 g ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. عصاره‌گیری از مواد گیاهی دو بار انجام شد. میزان فنل کل عصاره با استفاده از فولین-سیوکالتیو

Archive of SID

www.SID.ir

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

اثر اتانول آمین بر میزان فلاونوئید: نتایج نشان داد که پیش‌تیمار 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 غیراز ۱۳۰ میکرومولار افزایش داد. نتایج همچنین نشان داد که در گیاه بدون پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار شده‌اند به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان تحت تنش شوری است که با اتانول آمین پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار 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) پیش‌تیمار شده‌اند، در مقایسه با گیاهان شاهد بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین افزایش داشته است.

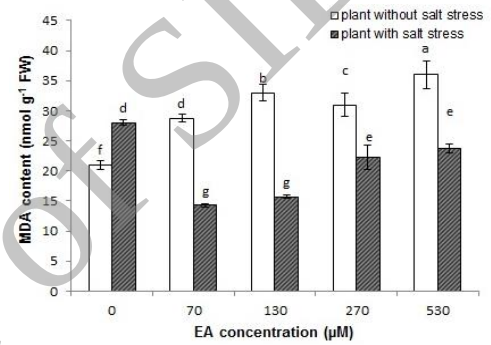
اثر اتانول آمین بر فعالیت آنزیم PAL: نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL (شکل ۵) نشان داد که در گیاه تنباکو بدون تیمار نمک، پیش‌تیمار با اتانول آمین تغییر معنی‌داری از نظر فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد. در حالی که اعمال پیش‌تیمار اتانول آمین در حضور تنش نمک (۲۰۰ میلی‌مولار) در غلظت‌های ۲۷۰ و ۵۳۰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

Archive of SID

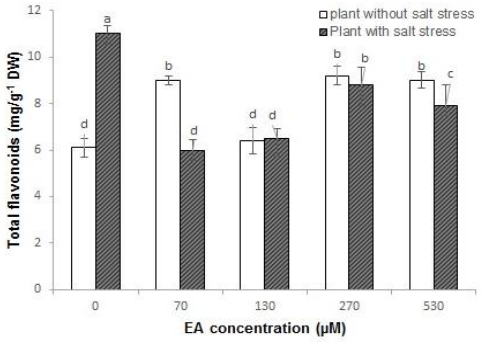
www.SID.ir

با گیاه شاهد است.

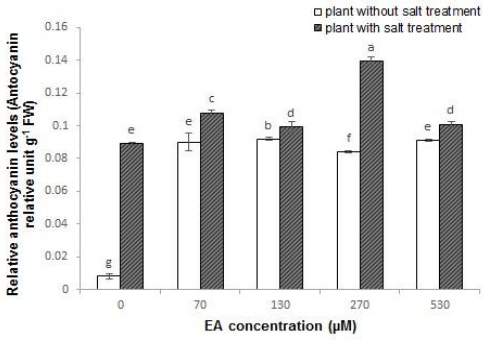
اثر اتانول آمین بر فعالیت آنزیم TAL: سنجش فعالیت TAL نشان داد که پیش‌تیمار با اتانول آمین (در همه غلظت‌های به کار برده شده) به افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان تحت تنش شوری منجر می‌شود. همان طور که شکل ۶ نشان می‌دهد در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش‌تیمار شده‌اند میزان فعالیت آنزیم TAL در مقایسه با گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش‌تیمار 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 غیراز غلظت ۲۷۰ میکرومولار، تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم TAL نداشته است. شکل ۶ همچنین نشان می‌دهد که در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین میزان فعالیت آنزیم TAL تحت تأثیر تنش شوری، افزایش نشان داد.



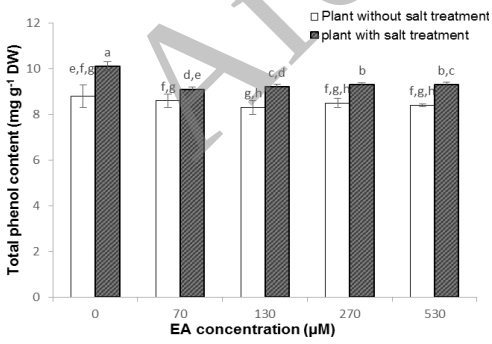
شکل ۱- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر میزان MDA در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($P<0.05$).



شکل ۲- اثر پیش‌تیمار 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 ($P<0.05$).



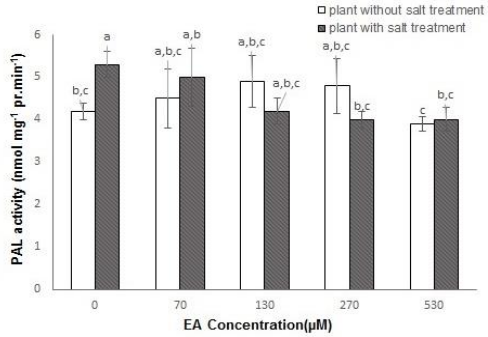
شکل ۳- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر میزان آنتوسیانین‌ها در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($P<0.05$).



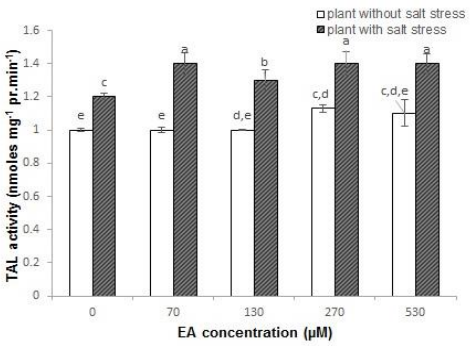
شکل ۴- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر میزان فنل کل در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($P<0.05$).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر فعالیت آنزیم PAL 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 ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ($P<0.05$).

بحث

نتایج پژوهش حاضر در زمینه گروهی از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی 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 می دهد. 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_2O_2 در گیاه شاهد با پیش‌تیمار با اتانول آمین افزایش می‌یابد (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

Archive of SID

www.SID.ir

پیش‌تیمار القا کننده 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 غیرآنزیمی از جمله آنتوسیانین‌ها توان محافظت از غشا در مقابل آسیب اکسیداتیو ROS را دارند و می‌توانند 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 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 می نماید (Mo *et al.*, 1992). همچنین، نتایج موجود نشان می‌دهد که تیمارهای تنشی به طور قابل ملاحظه‌ای ترکیبات فنلی را در شاخه‌های گیاهان *Vigna sinesis* و *Zea mays* 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 فنیل 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 sinesis* 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 Cassava، TAL در مقایسه با PAL نسبت به الیسیتور سالسیلیک اسید حساس‌تر است. در مطالعه حاضر نیز شاید بتوان چنین فرض کرد که اتانول آمین همانند سالسیلیک 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 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 گلایسین

Archive of SID

www.SID.ir

بتـایین موجـب افـزایش فلاونوئیـدها در گیـاه ذرت در شرایط عادی و تحت تنش خشـکی مـی‌گـردد. از آنجـا که اتانول آمین پیش‌ساز بیوسنتز گلایسـین بتـایین اسـت (Kogan *et al*., 2000)، شاید بتوان چنین نتیجه گرفـت که پیش‌تیمـار گیـاه تنبـاکو بـا اتـانول آمـین بـه افـزایش مقدار گلایسین بتایین منجر شـده و ایـن ترکیـب نیـز بـه نوبه خود مقدار فلاونوئیدها را افزایش داده است. نتـایج همچنین نشان داد که پیش‌تیمـار گیـاه تنبـاکو بـا اتـانول آمین تحت تنش شوری باعث کاهش مقدار فلاونوئید و در عین حال افزایش آنتوسیانین‌ها می‌گردد. با توجـه بـه این شواهد گمان می‌رود در این گیاهان گلایسین بتایین حاصـل از متابولیسـم اتـانول آمـین در مسـیر سـنتز فلاونوئیدها به طور عمده در جهت تولیـد آنتوسـیانین‌هـا وارد شده باشد. همچنـین، از آنجـا کـه نقـش گلایسـین بتایین به عنوان اسـمولیت سـازگار، حفاظـت از سـاختار چهارم آنزیم‌ها و حفـظ تمامیـت غشـا در غلظـت بـالای نمـک اسـت (Chen and Murata, 2002)، مـی‌تـوان چنین فرض نمود که گلایسین بتایین برای غلبه بـر آثـار مخرب تـنش شـوری در گیـاه تنبـاکو بـه جـای افـزایش محتـوای فلاونوئیـد کـل بیشـتر در جهـت ایفـای چنـین نقش‌هایی وارد شده باشد. از سـوی دیگـر، شـاید بتـوان چنین استنباط نمود کـه احتمـالاً کـاهش فلاونوئیـد کـل گیـاه و افـزایش آنتوسـیانین‌هـا در تـنش شـوری تحـت پـیش‌تیمـار بـا اتـانول آمـین مربـوط بـه مجموعـه‌ای از ترکیبات خانواده فلاونوئیدها باشد. بـرای مثـال، بایسـتی در ایـن خـانواده ترکیبـاتی نظیـر: فـلاون، فلاونـول، فلاونون، ایزوفلاون را نیز در نظر داشت و ممکـن اسـت علیرغم افـزایش آنتوسـیانین‌هـا برخـی از ایـن ترکیبـات کاهش یافته باشد.

در مجموع، می‌توان گفت با توجه به داده‌های زیستی و رشد و نموی حاصل از بررسی پـیش‌تیمـار اتـانول امـین (داده‌ها این بخش ارایه نشده است) رشـد گیـاه تنبـاکو در تنش شوری با پیش‌تیمـار اتـانول آمـین بهبـود معنـی‌داری نشان داد و در نتیجه می‌توان گفت احتمالاً بخشـی از ایـن افزایشِ تحمل به شوری در گیاه تنباکو، می‌تواند بـه تغییـر مسیر فنل‌ها به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیـاه مربوط باشد. از آنجا که پژوهش حاضر نخستین گـزارش در زمینـه تـأثیر اتـانول آمـین بـر ترکیبـات فنلـی اسـت، بررسی‌های بیشتر و جامع‌تری به منظور آشکار شدن نحوه عملکرد اتانول آمین روی این گـروه از آنتـی‌اکسـیدان‌هـا لازم به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

نگارنـدگان مقالـه از دانشـگاه اصـفهان و قطـب تنش‌های گیـاهی بـه خـاطر حمایـت از پـژوهش حاضـر سپاسگزاری می‌نمایند.

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

Archive of SID

www.SID.ir

protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical 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 Δ(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

Archive of SID

www.SID.ir

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 Natinal 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. Physiolgia 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Somayeh Rajaeian, Ali Akbar Ehsanpour * and Mohmmad Amin Toghyani
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Archive of SID

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

* Corresponding Author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

www.SID.ir