DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2015.12610

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۱، صفحه ۶۲-۵۲ (۱۳۹۴)

محتوای ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های PAL و PPO گیاه ریحان سبز (*Ocimum basilicum* L.) با پیش‌تیمار کروناتین تحت سمّیت آرسنیک (As)

سعید زارع ده‌آبادی[1*]، زهرا اسرار[2]، عبدالحمید نمکی شوشتری[3] و میترا مهربانی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

پست الکترونیک: Bioscholar_85@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۲

چکیده

افزایش ذخیره آنتی‌اکسیدانی به‌خصوص تجمع محتوای ترکیب‌های فنلی یکی از مهمترین راهکارهای غیرآنزیمی گیاهان برای مقابله در برابر تنش‌های محیطی می‌باشد. در این پژوهش نمونه‌های ریحان سبز (*Ocimum basilicum* L.) در شرایط گلخانه‌ای تحت تیمار غلظت‌های مختلف کروناتین (۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) به‌عنوان پیش‌تیمار و فلز سنگین آرسنیک (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) رشد داده شدند. سپس شاخص‌های مورد نظر در نمونه‌های تیمار شده اندازه‌گیری شد. افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی غشاء و تجمع بالای پراکسید هیدروژن در برگ‌های ریحان از علائم سمّیت آرسنات بود که در اثر استفاده از پیش‌تیمار کروناتین به‌طور معنی‌داری از مقدار آنها کاسته شد. تجمع ترکیب‌های فنلی، آنتوسیانین‌ها، فلاونوییدها و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) توسط کروناتین در نمونه‌های تحت سمّیت آرسنیک نشان می‌دهد که شاید کروناتین به‌عنوان یک ترکیب مشابه با جاسمونات‌ها از طریق افزایش ذخیره آنتی‌اکسیدانی گیاه ریحان مقاومت آن را در برابر سمّیت فلز آرسنیک بهبود بخشیده است.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک، کروناتین، ترکیب‌های فنلی، PAL، PPO.

مقدمه

آرسنیک یکی از آلوده‌کننده‌های مهم و بسیار خسارت‌بار در اتمسفر و محیط‌های آبی و کشاورزی می‌باشد که معمولاً از طریق صنایع و معادن، مصرف سوخت و آلودگی آبهای زیرزمینی وارد محیط می‌گردد (Gupta *et al.*, 2009). مطالعات زیادی نشان می‌دهند که آرسنیک موجب القای سمّیت در گیاه، مهار رشد ریشه و در نهایت مرگ گیاه می‌گردد (Gupta *et al.*, 2009؛ Garg & Singla, 2011). خسارت‌های گیاهی زمانی اتفاق می‌افتند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مکانیسم‌های سمّیت‌زدایی گیاه کمتر از رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط فلز سنگین باشد (Michalak, 2006). بنابراین مکانیسم‌هایی که منجر به

افزایش ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان گیاه ازجمله ترکیب‌های فنلی گردند می‌توانند موجب بهبود مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها شوند. تجمع ترکیب‌های فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی مانند UV، دمای پایین، جراحت، کاهش تغذیه، حمله پاتوژن‌ها و خشکی گزارش شده‌است (Chu *et al*., 2000؛ Michalak, 2006). ترکیب‌های فنلی به‌عنوان یکی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به‌عنوان گهرمایه آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیب‌ها همچنین با اهدای سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها ممانعت می‌کنند (Kovacik & Backor, 2007). فلاونوییدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی‌سینامیک استرها و لیگنین‌ها ازجمله ترکیب‌های فنلی و جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به فراوانی یافت می‌شوند (Singh *et al*., 2009). تغییر فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزکننده یا تجزیه‌کننده این ترکیب‌ها بر محتوای درون سلولی آنها تأثیر می‌گذارد (Dixon & Paiva, 1995؛ Solecka, 1997).

ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. به‌عنوان یکی از بزرگترین جنس‌های خانواده نعناع، گیاهیست علفی، یکساله، معطر و دارای ساقه‌های منشعب به ارتفاع ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر که در اغلب نواحی پرورش می‌یابد. ریحان به‌عنوان گیاه دارویی، ادویه‌ای و سبزی تازه مورد استفاده قرار می‌گیرد. مواد مؤثره این گیاه اشتهاآور است و برای درمان نفخ و تقویت دستگاه گوارش استفاده می‌شود. از این گیاه برای معالجه برخی ناراحتی‌های قلبی و همچنین مداوای بزرگی طحال می‌توان استفاده کرد. در طب سنتی از آن به‌عنوان خلط‌آور، مدر، ضدنفخ، تسکین درد معده و محرک استفاده می‌شود (Kim *et al*., 2006). ترکیب‌های فنلی فراوان (فلاونوییدها و آنتوسیانین‌ها)، رزمارینیک اسید، سینامیک اسید، اسانس‌های روغنی، تانن‌ها، گلوکوزیدها و ساپونین‌ها از مهمترین ترکیب‌های بخش‌های مختلف گیاه ریحان می‌باشند. استراگول، لینالول، ژرانیول، سینئول و اوژنول از مهمترین ترکیب‌های اسانس این گیاه می‌باشند (Ozcan & Calchat, 2002).

کروناتین یک فیتوتوکسین با میزبان غیراختصاصی، وزن مولکولی کم و القاکننده کلروز در گیاهان است که به‌وسیله چندین گونه از باکتری سودوموناس سیرینگا تولید می‌شود (Tamogami & Kodama, 2000). از نظر ساختار بیوشیمیایی می‌توان کروناتین را ترکیبی از دو تنظیم‌کننده رشد اتیلن و جاسمونات (JA) دانست، به‌طوری‌که کروناتین از دو بخش مولکولی با منشأ متفاوت تشکیل شده که توسط یک باند آمیدی به هم اتصال یافته‌اند. نیمی از آن یک آمینواسید کمیاب به‌نام کرونامیک اسید (Coronamic acid, CMA) است که از اسیدآمینه L–ایزولوسین مشتق شده‌است و نیمه دیگر آن پلی‌کیتید کرونافاسیک اسید (Coronafacic acid, CFA) بوده که از نظر ساختاری مشابه با هورمون جاسمونات می‌باشد (Mithofer *et al*., 2005). اثر کروناتین بر ایجاد مقاومت در گیاهان در مقابله با تنش‌ها از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تشابه عملکردی این ترکیب با جاسمونات را نشان می‌دهد. غلظت بیولوژی کروناتین مسیرهای سیگنالینگ جاسمونات را فعال می‌کند (Wang *et al*., 2008). طبق گزارش‌های موجود غلظت بهینه کروناتین رشد، بیوماس، پروتئین‌های محلول و محتوای آب برگ را در گندم و ذرت بهبود می‌بخشد، در حالی‌که در غلظت‌های بالا، اثرات مهارکنندگی بر رشد گیاه دارد (Li *et al*., 2007؛ Wang *et al*., 2008). کروناتین به‌وسیله فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و هضم و نابودی رادیکال‌های آزاد از پراکسیداسیون غشاء و دناتوره شدن مولکول‌های زیستی جلوگیری می‌کند (Li *et al*., 2007؛ Wang *et al*., 2009). همچنین گزارش‌هایی وجود دارد که کروناتین موجب افزایش فعالیت آنزیم PAL و محتوای ترکیب‌های ثانویه در برخی گیاهان دارویی می‌گردد. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز آغازگر مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌باشد که L–فنیل‌آلانین را با دآمیناسیون به ترانس‌سینامیک‌اسید

تبدیل می‌کند (Brooks *et al*., 2005). بنابراین تنظیم فعالیت آنزیم PAL و PPO در مسیر سنتز ترکیب‌های فنلی یکی از مهمترین مراحل پاسخ به تنش در گیاهان در مواجهه با شرایط نامساعد محیطی بوده و عواملی که فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهند، در افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌ها بسیار مؤثر خواهند بود. هدف از این پژوهش نیز مطالعه یکی از مکانیسم‌های احتمالی است که کروناتین از طریق آن بیشینه بردباری گیاه ریحان در برابر آسیب‌های ناشی از سمّیت آرسنیک را افزایش می‌دهد.

مواد و روشها

کشت گلدانی

بذرهای ریحان (*O. basilicum* L.) برای ایجاد دانه‌رست در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ترکیب پرلیت در فاصله ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری از سطح، کشت گردیدند. نمونه‌ها در اتاق رشد با شرایط مناسب قرار گرفته و از هفته دوم کشت گلدانی به‌منظور تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاه از محلول غذایی هوگلند با اسیدیته (۰/۱±۵/۷) استفاده شد. گیاهچه‌ها پس از دو تا سه برگی شدن با غلظت‌های مختلف ترکیب کروناتین (۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) به مدت ۳ روز محلول‌پاشی شدند. براساس آزمایش فاکتوریل پس از اتمام دوره پیش‌تیمار از آرسنات‌هیدروژن دی‌سدیم (Na_2HAsO_4) در سه سطح ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار برای اعمال تنش استفاده شد. غلظت‌های بکاررفته از کروناتین و آرسنات در این تحقیق براساس آزمایش‌های اولیه با دامنه وسیعی از غلظت‌ها تعیین گردید. چهارده روز پس از تیمار آرسنات، نمونه‌ها برای سنجش شاخص‌های مورد نظر جمع‌آوری گردیدند.

تعیین محتوای آب برگ و نشت یونی غشاء

برای محاسبه درصد نسبی آب بافت (Relative Water Content, RWC)، وزن تر (FW) اندام هوایی گیاهان اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در آب دیونیزه قرار گرفته و وزن حالت تورگر (TW) آنها نیز اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰°C خشک شده و بعد وزن خشک (DW) نمونه‌ها اندازه‌گیری و RWC با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Turkan *et al*., 2005):

$$RWC\ (\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$$

برای مطالعه وضعیت تمامیت غشای سلول‌ها و احتمال آسیب وارد شده به آن، میزان نشت یونی (Electrolyte Leakage, EL) سلول‌های برگ در گیاهان تیمار شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Ben Hamed *et al*., 2007).

اندازه‌گیری مالون‌دآلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای سنجش غلظت مالون‌دآلدئید، ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک‌اسید (TCA) ۰/۱٪ ساییده شد. سپس عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰٪ حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک‌اسید (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آبگرم حرارت داده شده، سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی ۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری برحسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Heath & Pacher, 1968). مقدار پراکسیدهیدروژن نیز براساس واکنش آن با یدید پتاسیم (KI) تعیین گردید. نمونه‌های گیاهی در حمام یخ با TCA ۰/۱٪ ساییده شدند. عصاره در سانتریفوژ یخچال‌دار (Centrifuge 5804R, Germany از شرکت Eppendorf) در ۱۰۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس

۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید و جذب محلول در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسیدهیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $0/28\ M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید (Alexieva *et al*., 2001).

سنجش محتوای کل ترکیب‌های فنلی، فلاونوییدها و آنتوسیانین‌ها

برای سنجش محتوای کل ترکیب‌های فنلی، ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ ساییده و پس از ۷۲-۲۴ ساعت به ۱ میلی لیتر محلول رویی، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه گردید و با آب دوبار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ و ۱ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۵٪ به آن اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی و جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت ترکیب های فنلی برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Gao *et al*., 2000). تعیین مقدار آنتوسیانین‌ها براساس واکنش با متانول اسیدی (Wanger, 1979) و مطالعه فلاونوییدها با روش مقایسه جذبی انجام شد (Krizek *et al*., 1998).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL

برای تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با ۶/۵ میلی لیتر بافر حاوی بتامرکاپتواتانول (۱۵ میلی مولار) در هاون سرد ساییده شد. سپس عصاره حاصل با دور ۵۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. آنگاه محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه می‌باشد (Tanaka *et al*., 1974).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PPO

برای تهیه عصاره آنزیمی ۱ گرم بافت تر در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۲) حاوی اتیلن دی‌آمین تترااستیک‌اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، فنیل‌متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۱٪ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر تریس ۰/۲ مولار (pH=۷/۶) و پیروگالول ۰/۰۲ مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره شروع شد. فعالیت آنزیم PPO براساس میزان تبدیل پیروگالول به پورپوروگالین و با استفاده از ضریب خاموشی $6/2 mMol^{-1}cm^{-1}$ بدست آمد (Kar & Mishra, 1976).

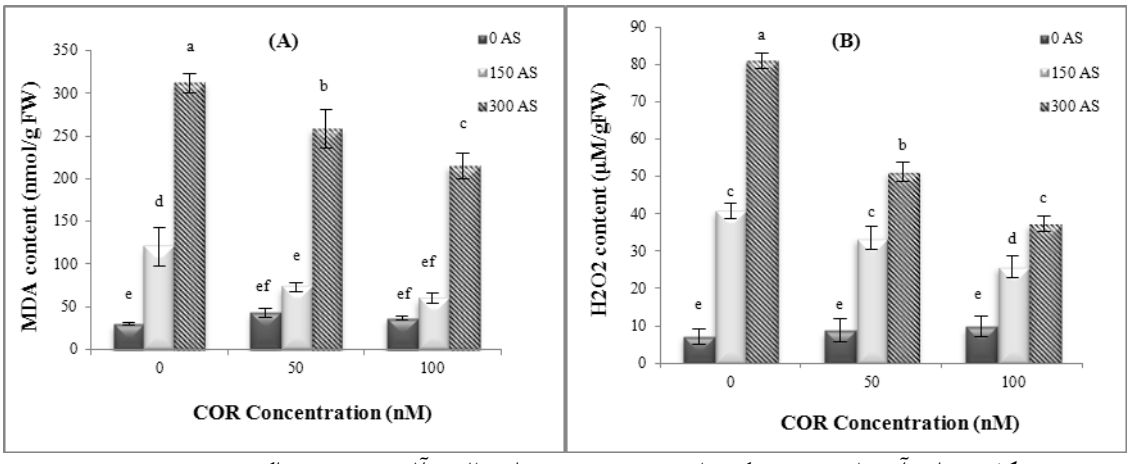
تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب یک طرح کامل تصادفی انجام شد. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ($p\leq0.05$) انجام شد.

نتایج

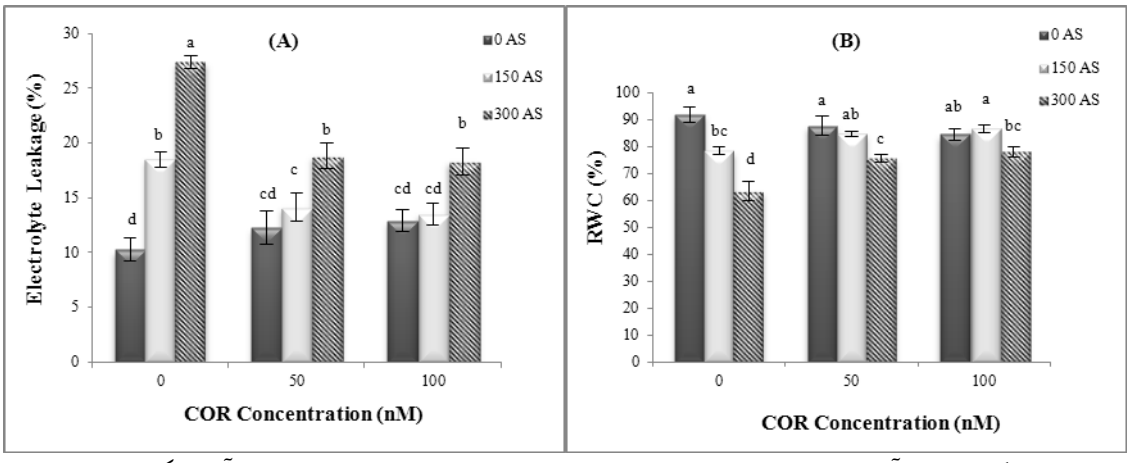
افزایش محتوای مالون‌دآلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها، تجمع بالای H_2O_2 و افزایش نشت یونی غشای سلولی در برگ ریحان شاخصه‌های القای سمّیت توسط آرسنیک بودند که کروناتین به‌خصوص در غلظت ۱۰۰ نانومولار موجب تخفیف این سمّیت در گیاه شد (شکل ۱ و ۲). نتایج مربوط به محتوای آب برگ نشان می‌دهد که آرسنیک به‌ویژه در غلظت بالای آن محتوای آب برگ‌ها را بشدت کاهش می‌دهد ولی نمونه‌های پیش‌تیمار شده با کروناتین به‌طور معنی‌داری محتوای آب برگی خود را حفظ کردند (شکل B-۲). در این پژوهش میزان ترکیب‌های فنلی، فلاونوییدها و آنتوسیانین‌ها در برگ گیاه در غلظت پایین آرسنیک تغییر معنی‌داری نداشت و حتی در برخی موارد افزایش نیز داشت، ولی غلظت‌های بالای آرسنیک

میزان این ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۳ و ۴). این با نتایج حاصل از تغییرات فعالیت آنزیم PAL در برگ‌های ریحان نیز مطابقت نشان می‌دهد (شکل ۵). پیش تیمار نمونه‌ها با کروناتین اثر معنی‌داری در افزایش محتوای ترکیب‌های فنلی کل در برگ گیاه داشت. میزان آنتوسیانین‌ها و جذب فلاونوییدهای برگ نیز در اثر استفاده از کروناتین افزایش قابل‌توجهی نشان داد (شکل ۳ و ۴). افزایش فعالیت آنزیم PAL در غلظت پایین As و COR معنی‌دار نبود، در حالی‌که این افزایش در غلظت بالای این دو ترکیب کاملاً معنی‌دار بود. نتایج مربوط به فعالیت آنزیم PPO نیز حکایت از کاهش فعالیت آنزیم در اثر آرسنیک دارد ولی نمونه‌های پیش‌تیمار شده با کروناتین در مواجهه با آرسنیک فعالیت خود را حتی بالاتر از گیاه کنترل افزایش می‌دهند (شکل ۵).



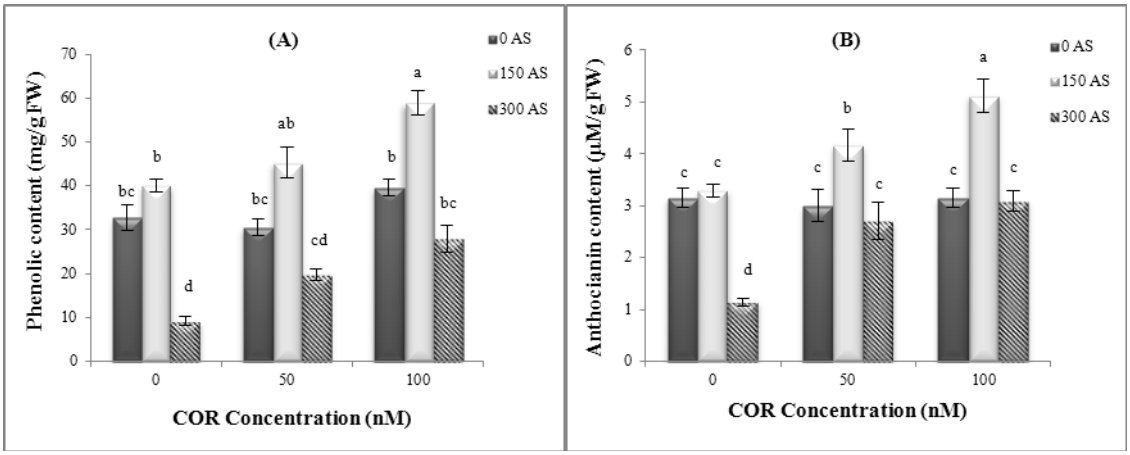
شکل ۱- اثر آرسنات (As) و کروناتین (COR) بر میزان مالون‌دآلدئید (A) و پراکسیدهیدروژن (B) در گیاه ریحان (*O. basilicum*)

براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) می‌باشند.



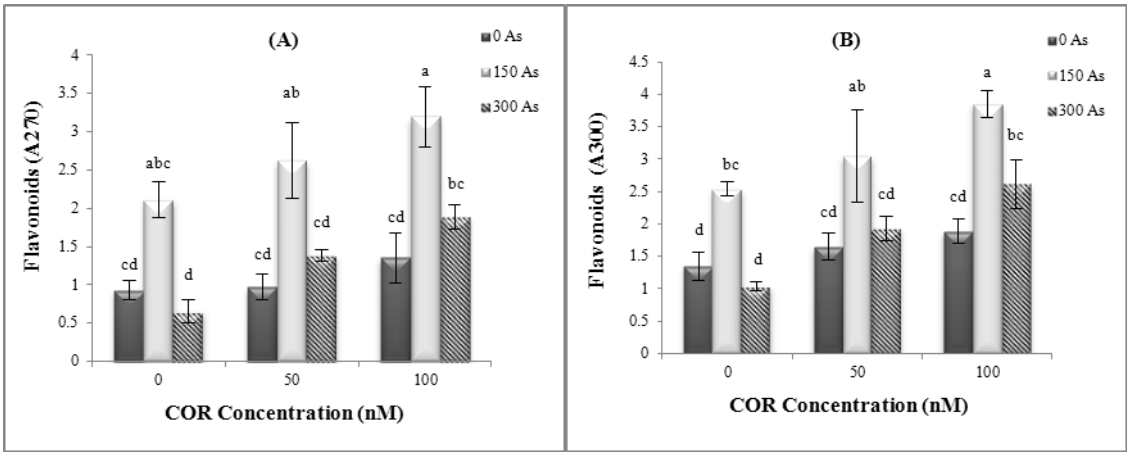
شکل ۲- اثر آرسنات (As) و کروناتین (COR) بر نشت یونی غشاء (A) و محتوای آب برگ (B) در گیاه ریحان (*O. basilicum*)

براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) می‌باشند.



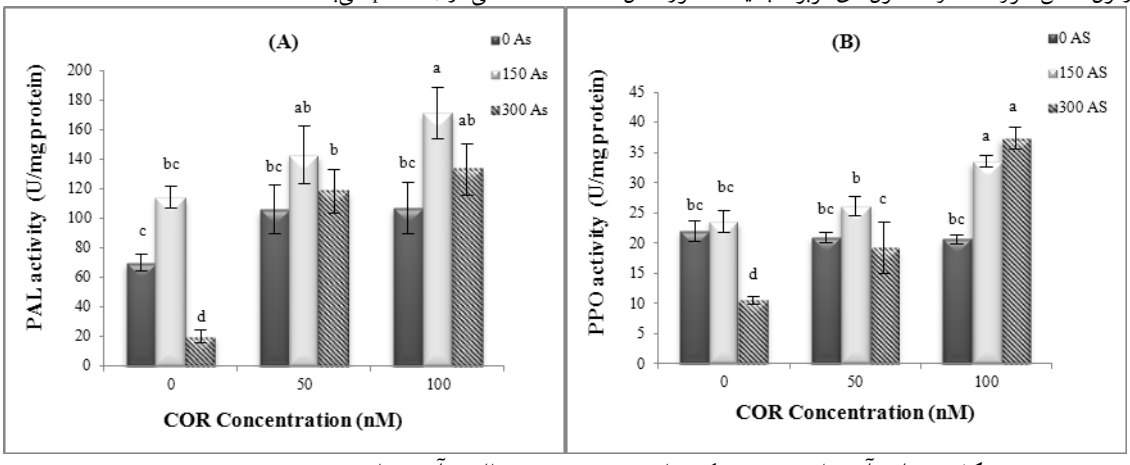
شکل ۳- اثر آرسنات (As) و کروناتین (COR) بر محتوای ترکیب‌های فنلی (A) و آنتوسیانین‌ها (B) در گیاه ریحان

براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) می‌باشند.



شکل ۴- اثر آرسنات (As) و کروناتین (COR) بر جذب فلاونوییدها در طول موج‌های ۲۷۰ (A) و ۳۰۰ (B) نانومتر در گیاه ریحان (*O. basilicum*)

براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) می‌باشند.



شکل ۵- اثر آرسنات (As) و کروناتین (COR) بر فعالیت آنزیم‌های PAL (A) و PPO (B) در گیاه ریحان (*O. basilicum*)

براساس آزمون دانکن حروف متفاوت ستون‌های مربوط به یک فاکتور نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p\leq0.05$) می‌باشند.

بحث

بسیاری از محققان به این نتیجه رسیده‌اند که آرسنیک با اثر متقابل با گروه‌های سولفیدریل در ساختار ماکروملکول‌های زیستی و جابجایی گروه‌های فسفات در ساختار ATP موجب اختلال در بیشتر فرایندهای متابولیکی (ازجمله فتوسنتز و تنفس) در گیاهان می‌شود (Shri *et al.*, 2009؛ Garg & Singla, 2011). مطابق با نتایج، برخی فاکتورهای شاخص تنش ازجمله پراکسیداسیون لیپیدها، محتوای پراکسیدهیدروژن و نشت یونی غشاء در پاسخ به آرسنیک افزایش معنی‌داری نشان می‌دهند و این دلیلی بر این مطلب است که آرسنیک به‌خصوص در غلظت بالای آن موجب القای تنش اکسیداتیو در ریحان شده‌است. محققان عامل اصلی اثرات سمّی آرسنیک در گیاه را افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌دانند که در نتیجه تخریب ساختار غشاء و تحریک پراکسیداسیون لیپیدها را به دنبال دارد. غشاهای زیستی هدف اصلی آسیب‌پذیر در خسارتهای سلولی القایی توسط آرسنیک می‌باشند، به‌طوری که میزان آسیب وارد شده به غشاء را شاخص اصلی تحمل یا حساسیت در برابر تنش‌ها می‌دانند. آسیب غشایی موجب بهم‌ریختگی وضعیت جذب مواد ضروری از خاک، نقصان هدایت روزنه‌ای و در نهایت کاهش محتوای آب درون سلول‌ها می‌گردد (Li *et al.*, 2006؛ Gupta *et al.*, 2009). افزایش معنی‌دار مقدار مالون‌دآلدئید، افزایش نشت یونی از غشاء به‌همراه کاهش معنی‌دار محتوای آب درون سلولی در نمونه‌های ریحان تحت سمّیت آرسنیک در این پژوهش از آسیب غشای سلول‌های گیاه توسط آرسنیک خبر می‌دهند. آسیب سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه در غلظت‌های بالای آرسنیک نیز می‌تواند دلیل دیگری بر این مطلب باشد. به‌هرحال استفاده از پیش‌تیمار کروناتین در محلول غذایی موجب بهبود وضعیت تنش اکسیداتیو در ریحان شده است. نتایج حاصل از تغییرات نشت یونی غشاء نشان می‌دهند که شاید کروناتین از طریق افزایش وضعیت ثبات و تمامیّت غشای سلولی موجب بهبود رشد گیاهچه‌های در معرض آرسنیک شده‌است.

در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیب‌های فیتوفنولیک به‌خصوص پلی‌فنل‌ها در سم‌زدایی پراکسیدهیدروژن بسیار کارا عمل کرده و به‌عنوان پشتیبان چرخه آسکوربات–گلوتاتیون در دفع رادیکال‌ها شرکت می‌کنند (Sakihama *et al.*, 2002). برخی محققان معتقدند کروناتین موجب افزایش تجمع آنتوسیانین‌ها و برخی ترکیب‌های فنلی در گیاهان می‌شود (Xie *et al.*, 2008؛ Feys *et al.*, 1994). بنابراین به‌نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش تنش اکسیداتیو، مقدار H_2O_2 و نشت یونی تحت تأثیر پیش‌تیمار کروناتین، اثر این پیش‌تیمار بر افزایش فعالیت آنزیم PAL و افزایش ترکیب‌های مختلف فنلی (به‌عنوان یک جزء آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی) در گیاه باشد. معمولاً به‌عنوان نتیجه تنش‌های محیطی، افزایش فعالیت PAL و افزایش تجمع بسیاری از ترکیب‌های فنلی گزارش شده‌است (Wen *et al.*, 2008؛ Solecka, 1997). نتایج بررسی اثر کروناتین در افزایش تحمل به یخزدگی در خیار حکایت از این مطلب دارد که ترکیب کروناتین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد جدید با فعالیتی مشابه با جاسمونات و آبسزیک اسید (ABA) از طریق تغییر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ازجمله کاتالاز، پراکسیداز، PAL و آسکوربات پراکسیداز مقاومت خیار به آسیب‌های ناشی از یخزدگی در گیاه را افزایش می‌دهد (Wang *et al.*, 2009). در اثر افزایش فعالیت و بیان PAL، ترکیب‌های فنلی نظیر فنلیک اسیدها، فلاونوییدها و آنتوسیانین‌ها در بافت‌های تحت تنش تجمع می‌یابند و گیاهان را علیه تنش‌های زیستی و غیرزیستی محافظت می‌نمایند (Dixon & Paiva, 1995). گزارش‌های زیادی وجود دارد که جاسمونیک اسید موجب افزایش فعالیت آنزیم PAL و PPO به‌عنوان دو آنزیم اصلی در مسیر متابولیسم ترکیب‌های فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌ها می‌گردد (Li *et al.*, 2007؛ Xu & Dong, 2005). محققان معتقدند ترکیب کروناتین به‌دلیل تشابه ساختاری و عملکردی بالا با جاسمونات نه تنها عملکردهای جاسمونات را تقلید می‌نماید بلکه چندین برابر از آن فعال‌تر نیز می‌باشد (Tamogami & Kodama, 2000). پلی‌فنل‌ها می‌توانند

به‌عنوان کلات‌کننده فلزات واسطه مانند آهن عمل کنند و در نتیجه از واکنش‌هایی نظیر واکنش فنتون یا هابر ویس به‌عنوان مهمترین منابع تولیدکننده رادیکال‌های آزاد در گیاهان جلوگیری می‌نمایند (Rice-Evans *et al*., 1997؛ Michalak, 2006). محتوای فلاونوییدها در اثر تیمار کروناتین نیز در این مطالعه افزایش معنی‌داری نشان دادند که دلیل دیگری بر تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ریحان توسط کروناتین علیه آرسنات می‌باشد. فلاونوییدها از طریق ممانعت از دسترسی مولکول‌های خسارت‌بار به ناحیه هیدروفوب غشای دولایه‌ای سلول‌ها، ازجمله آنهایی که موجب القای تنش اکسیداتیو و تغییر شکل غشاء می‌شوند، موجب حفاظت از تمامیّت غشاهای زیستی در برابر تنش‌ها می‌شوند. از طرف دیگر فلاونوییدها به‌دلیل خاصیت‌دهندگی پروتون و الکترون می‌توانند به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد خسارت‌بار مانند O_2^- و H_2O_2 را تجزیه نمایند (Khan *et al*., 2000؛ Michalak, 2006). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز یکی از آنزیم‌های مهم در سیستم دفاعی گیاه می‌باشد که در دفاع علیه تنش‌های محیطی نقش دارد. این آنزیم حاوی مس در پلاست، کلروپلاست، دیواره سلولی و سیتوپلاسم وجود دارد. پلی‌فنل‌اکسیداز هیدروکسیلاسیون اورتودی‌هیدروکسی فنل‌ها به اورتودی‌فنل‌ها و اکسیداسیون اورتودی‌فنل‌ها به اورتوکینون‌ها را با مصرف اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. تغییر فعالیت این آنزیم در تنش‌ها بر مقدار ترکیب‌های فنلی در سلول تأثیر می‌گذارد (Saiedian *et al*., 2007). مطالعات متعدد نشان می‌دهند که تنش‌های محیطی بر مقدار ترکیب‌های فنلی، فعالیت آنزیم PAL و PPO تأثیر داشته و با توجه به نوع گیاه موجب کاهش یا افزایش آن می‌شوند (Wen *et al*., 2008؛ Singh *et al*., 2009). گزارش شده‌است که پلی‌فنل‌اکسیداز در کلروپلاست‌های سلول‌های مزوفیل در تنظیم واکنش مهلر (احیای نوری مولکول اکسیژن توسط فتوسیستم ۱) و تنظیم سطح اکسیژن روی غشاء تیلاکوئیدها در پلاستیدها نقش داشته و بین القای فعالیت PPO و میزان اکسیژن رهاشده در کلروپلاست ارتباط وجود دارد (Tolbert, 1973؛ Trebst & Depka, 1995). با این تفاسیر انتظار می‌رود که این آنزیم با مصرف اکسیژن در هنگام اکسید کردن مونو و دی‌فنل‌ها موجب کاهش مقدار اکسیژن در دسترس و کاهش احتمال و خطر تولید گونه‌های فعال اکسیژن گردد (Vaughn & Duke, 1984). به‌طور کلی نتایج ما نشان می‌دهند که گیاه ریحان در غلظت‌های پایین فلز سنگین آرسنیک به‌وسیله ذخیره آنتی‌اکسیدانی خود تا حدی قادر به تحمل تنش می‌باشد، در حالی که غلظت‌های بالای آرسنیک بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه غلبه نموده و موجب القای تنش در این گیاه می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد کروناتین مشابه با جاسمونات‌ها در مسیر ایجاد مقاومت در گیاه ریحان در برابر سمّیت آرسنیک از طریق حفظ ساختار غشای سلولی و افزایش ذخیره آنتی‌اکسیدانی گیاه ازجمله ترکیب‌های فنلی و سایر متابولیت‌های ثانویه عمل می‌نماید. با این تفاوت که کروناتین در این زمینه بسیار فعال‌تر بوده و این کار را در غلظت‌های بسیار پایین‌تر و در حد نانومولار انجام می‌دهد.

منابع مورد استفاده

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell and Environment, 24(12): 1337-1344.
- Ben Hamed, K., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C., 2007. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. Plant Growth Regulation, 53(3): 185-194.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. and Kunkel, B.N., 2005. The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant Physiology, 6(6): 629-639.
- Chu, Y.H., Chang, C.L. and Hsu, H.F., 2000. Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(5): 561-566.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoide metabolism. The Plant Cell, 7(7): 1085-1097.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and Turner, J.G., 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant

metal stress. Polish Journal of Environmental Studies, 15(4): 523-530.
- Mithofer, A., Maitrejean, M. and Boland, W., 2005. Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. Journal of Plant Growth Regulation, 23(3): 170-178.
- Ozcan, M. and Chalchat, J. C., 2002. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. Czech Journal of Food Sciences, 20(6): 223-228.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganaga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2(4): 152-159.
- Saiedian, S., Keyhani, E. and Keyhani, J., 2007. Polyphenol oxidase activity in dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corn. Acta Physiologia Plantarum, 29: 463-471.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. and Yamasaki, H., 2002. Plant phenolics antioxidant and prooxidant activity: phenolics-induced oxidative damage mediated by metal in plants. Toxicology, 177: 67-80.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D. and Tuli, R., 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(4): 1102-1110.
- Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A. and Ahoja, P.S., 2009. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. Functional and Integrative Genomics, 9(1): 125-134.
- Solecka, D., 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factor. Acta Physiologia Plantarum, 19(3): 257-268.
- Tamogami, S. and Kodama, O., 2000. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. Phytochemistry, 54(7): 689-694.
- Tanaka, Y., Kojima, M. and Uritani, I., 1974. Properties, development and cellular-localization of cinnamic acid 4-hydroxylase in cut injured sweet potato. Plant and Cell Physiology, 15(5): 843-854.
- Tolbert, N.E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. Plant Physiology, 51(2): 234-244.
- Trebst, A. and Depka, B., 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. Photosynthesis Research, 46: 41-44.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolia* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. to a bacterial pathogen. The Plant Cell, 6(5): 751-759.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(5): 1485-1490.
- Garg, N. and Singla, P., 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. Environmental Chemistry Letters, 9(3): 303-321.
- Gupta, M., Sharma, P., Sarin, N.B. and Sinha, A.K., 2009. Differential response of arsenic stress in two varieties of *brassica juncea* L. Chemosphere, 74(9): 1201-1208.
- Heath, R.L. and Pacher, L., 1968. Photo peroxidation in isolated chloroplast: I. kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-190.
- Kar, M. and Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, polyphenol oxidase activities during rice senescence. Plant Physiology, 57(2): 315-319.
- Khan, A.G., Kuek, T.M., Chaudhury, T.M., Khoo, C.S. and Hayes, W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizhae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. Chemosphere, 41: 197-207.
- Kim, H.J., Chen, F., Wang, X. and Rajapakse, N.C., 2006. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural Food Chemistry, 54: 2327-2332.
- Kovacik, J. and Backor, M., 2007. Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. Water, Air, and Soil Pollution, 185: 185-193.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effect of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum, 103: 1-7.
- Li, W.X., Chen, T.B., Huang, Z.C., Lei, M. and Liao, X.Y., 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. Chemosphere, 62(5): 803-809.
- Li, Z., Wang, X., Chen, F. and Kim, H.J., 2007. Chemical changes and overexressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. Journal of Agricultural food chemistry, 55(3): 706-713.
- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy

subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science, 168: 223-231.
- Vaughn, K.C. and Duke, S.O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. Physiologia Plantarum, 60: 106-112.
- Wang, B., Li, Z., Eneji, E.A., Tian, X., Zhai, Z., Li, J. and Duan, L., 2008. Effects of coronatine on growth, gas exchange traits, chlorophyll content, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in maize (*Zea mays* L.) seedling under simulated drought stress. Plant Production Science, 11(3): 283-290.
- Wang, L., Chen, W.J., Wang, Q., Eneji, A.E., Li, Z.H. and Duan, L.S., 2009. Coronatine Enhances Chilling tolerance in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by improving the antioxidative defence system. Journal of Agronomy and Crop Science, 195(5): 377-383.
- Wanger, G.J., 1979. Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.
- Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q.H. and Hung, W.D., 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. Plant Growth Regulation, 55(1): 1-10.
- Xie, Z.X., Duan, L.S., Tian, X.L., Wang, B.Q., Eneji, A.E. and Li, Z.H., 2008. Coronatine alleviates salinity stress in cotton by improving the antioxidative defense system and radical-scavenging activity. Journal of Plant Physiology, 165(4): 375-384.
- Xu, M.J. and Dong, J.F., 2005. Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. Applied Microbiology and Biotechnology, 67: 40-44.

Phenolics content and PAL and PPO activity of *Ocimum basilicum* L. with coronatine pretreatment under arsenic toxicity

S. Zare Dehabadi[1*], Z. Asrar[2], A. Shoushtari[2] and M. Mehrabani[3]

1*- Corresponding author, Ph.D Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, E-mail: Bioscholar_85@yahoo.com
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3- Department of Pharmacognozy, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: August 2012 Revised: August 2013 Accepted: September 2013

Abstract

Enhancing antioxidant pool especially phenolic compounds accumulation is one of the most important non enzymatic tools of plants to resist environmental stresses. In this investigation, basil (*Ocimum basilicum* L.) seedlings, grown in a control condition and irrigated with Hoagland nutrient solution, were treated with coronatine (COR) at 0 (Control), 50 and 100 nM and different concentrations of As (V) at 0 (Control), 150 and 300 µM. Then some parameters in treated plants were measured. Increasing of lipid peroxidation and electrolyte leakage and H_2O_2 accumulation in basil leaves were the symptoms of arsenate toxicity that were ameliorated by COR pretreatment. Increasing phenolic compound contents, flavonoid and anthocyanin content and enhancing PAL and PPO activity indicate that COR as a jasmonates analogue may ameliorate arsenic toxicity in *O. basilicum* seedlings by improving antioxidative defense system.

Keywords: Arsenic, coronatine, phenolic compounds, PAL, PPO.