

اثر سینامیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL) و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه تنباکو *Nicotiana rustica* L. تحت شرایط تنش شوری کشت در شیشه

الهام محققیان M.Sc.، علی اکبر احسان پور Ph.D.*

- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فن آوری‌های زیستی، گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@sci.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۳۰

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر سینامیک اسید (CA) بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و میزان تحمل به شوری گیاه تنباکو (*Nicotiana rustica* L.) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه قطعات جداگشت گیاه تنباکو رشد یافته در محیط MS به محیط‌های کشت MS حاوی سینامیک اسید (غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) و نمک NaCl (غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار) منتقل گردید. پس از چهار هفته میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL)، میزان ترکیبات فنلی کل و پروتئین کل، میزان تجمع فلاونوئید، آنتوسیانین، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، میزان پتاسیم، سدیم و پرولین اندازه گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد در اثر تیمار گیاهان با CA میزان فعالیت آنزیم PAL (غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA به ترتیب ۲۵ و ۲۷ درصد افزایش در میزان فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان شوری ۱۰۰ میلی مولار بدون CA نشان دادند) و TAL (در شوری ۲۰۰ میلی مولار، غلظت ۵ میلی گرم در لیتر CA باعث افزایش ۲۰ درصدی میزان فعالیت آنزیم TAL نسبت به گیاهان شوری ۲۰۰ میلی مولار بدون CA شده‌اند)، میزان ترکیبات فنلی کل و پروتئین کل نیز نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. تیمار CA باعث افزایش میزان تجمع فلاونوئید، آنتوسیانین و پرولین و نیز میزان پتاسیم و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نسبت به گیاهان شاهد گردید. اما میزان سدیم و H_2O_2 در نتیجه تیمار CA در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافت.

نتیجه گیری: می‌توان احتمال داد که CA با افزایش میزان ترکیبات فنلی کل و نیز پرولین در شرایط تنش شوری موجب افزایش تحمل به شوری گیاه تنباکو می‌شود.

واژگان کلیدی: تنش شوری، سینامیک اسید، گیاه تنباکو، تحمل به شوری

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که رشد و تولید گیاهان را محدود می‌کند. شوری با منفی‌تر کردن پتانسیل اسمزی محلول خاک موجب القای تنش آبی می‌شود (۱). تنش شوری هم‌چنین با افزایش غلظت یون‌های سمی درون پیکر گیاه منجر به کاهش رشد و تولید گیاه می‌شد (۲). از آنجایی که مقادیر بالای یون‌های سمی کلر و سدیم، به‌ویژه در سیتوزول، بازدارنده بسیاری از فرایندهای متابولیکی سلولی است، از این‌رو این یون‌ها در واکنش‌ها انبار می‌شوند (۳). تولید گونه‌های فعال اکسیژن، تغییر در متابولیسم نیتروژن و کربن، ناپایداری و تخریب غشاهای سلولی، سمیت متابولیکی، ممانعت از فتوسنتز و کاهش جذب مواد غذایی از عواملی هستند که به‌رویدادهای نامطلوب در گیاه می‌انجامد (۴). گیاهان در پاسخ به شرایط تنش راه‌کارهای دفاعی مختلفی دارند، یکی از آن‌ها تولید متابولیت‌های ثانویه است (۵). مطالعات بیوشیمیایی نشان داده است که در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری، تعدادی از ترکیبات آلی (محلول‌های سازگارکننده) تجمع می‌یابد. این ترکیبات تداخلی در فرایندهای شیمیایی گیاه وارد نمی‌کنند. از این ترکیبات می‌توان به ترکیبات نیتروژنه مانند پرولین و گلاسیسین بتائین اشاره کرد (۶). مسیر فنیل پروپانوئید نیز یکی از مهم‌ترین مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه است که طی آن ترکیبات فنلی تولید می‌شود (۷). در استرس شوری میزان تجمع ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. این ترکیبات در القای بیان ژن، هدایت مسیرهای سیگنالی و هومئوستازی متابولیکی در گیاهان تحت شرایط نامطلوب محیطی برای تنظیم پاسخ‌های استرسی در جهت بقا مرتبط هستند (۸). ترکیبات مسیر فنیل پروپانوئید دارای بالاترین پتانسیل کاهش ROS بوده و منحصر در پاسخ به مجموعه تنش‌های غیرزیستی ساخته می‌شوند (۹). تنش‌های محیطی، فنیل پروپانوئیدهایی را که از سینامیک اسید مشتق می‌شوند افزایش می‌دهد (۷، ۱۰). سینامیک اسید به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانت پیش‌ماده بیوسنتزی مهم برای بسیاری از ترکیبات مسیر فنیل پروپانوئیدی از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها است که از دامیناسیون فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) سنتز می‌شود (۱۱). فلاونوئیدها برای انجام فعالیت‌های مهارکنندگی به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت‌های کلیدی تحت استرس‌های غیرزیستی در گیاهان عالی پیشنهاد شده‌اند (۱۲). به‌غیر از تنش‌های زیستی و غیرزیستی برخی ترکیبات دیگر می‌توانند بر میزان فلاونوئید گیاه تاثیر گذارند، به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای بر روی گیاه *Thymus vulgaris* تیمار سالیسیلیک اسید توانست غلظت فلاونوئید را افزایش دهد و باعث بهبود روغن اساسی آن شود (۱۳). سینامیک اسید و مشتقات آن فعالیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانتی را در گیاهان در پاسخ به شرایط پرتنش نشان می‌دهند (۱۴). مطالعات انجام شده بر روی خیار و گندم نشان داده است، تیمار CA می‌تواند گیاهان را از تنش سرما (۱۵)، خشکی (۱۶) و شوری (۱۷) به‌واسطه تنظیم فعالیت آنتی‌اکسیدانتی محافظت کند و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید شود. در گیاهان فنیل آلانین توسط آنزیم PAL به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌شود. سپس CA توسط آنزیم سینامیک اسید ۴-هیدروکسی‌لاز (C4H) به p-کوماریک اسید تبدیل می‌شود. هم‌چنین آنزیم تیروزین آمونیا لیا ز (TAL) موجب تبدیل تیروزین به p-کوماریک اسید می‌شود. آنزیم PAL و TAL دو آنزیم کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئیدها می‌باشند (۱۸). هم‌چنین، بیان ژن‌های آنزیم‌های بعدی بیوسنتز فنیل پروپانوئید اغلب متناسب با PAL تنظیم می‌شود. در واقع سطوح آنزیمی و mRNA این آنزیم با افزایش محصولات فنیل پروپانوئیدی همراه است (۱۹). نشان داده شده است که سنتز از نو (de novo) ایزوفرم‌های PAL به‌وسیله فاکتورهای زیستی و غیرزیستی افزایش یافته‌اند، و بنابراین بیان گوناگون ایزوفرم‌های PAL موجب سنتز و تجمع ترکیبات فنلی در بافت‌های مختلف می‌شود (۲۰). بررسی پروتئین‌هایی که تحت تاثیر تنش قرار می‌گیرند می‌توانند به درک سازوکار فیزیولوژیک حساسیت یا تحمل به شوری کمک نماید. در گزارش‌های منتشر شده الکتروفورز دو بعدی مشخص شده است که تنش شوری سبب اختلافات قابل مشاهده‌ای در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد می‌شود که این امر

می‌تواند به علت تاثیرات بازدارندگی تنش شوری بر فرآیند رونویسی ژن‌ها باشد (۲۱). تاکنون ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در فرآیند تنظیم شوری متعددی با مطالعه ریزآرایه و پروتئومیک در ریشه‌های گیاهان گوناگون مانند: گوجه‌فرنگی، آرابیدوپسیس، توتون، تنباکو و برنج شناسایی شده است. پروتئین‌های پاسخ به شوری شناخته شده در اعمال مختلف سلولی نظیر: تنظیم کربوهیدرات‌ها، متابولیسم نیتروژن و انرژی، پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن، سم‌زدایی و مسیر پیام‌رسانی، پردازش RNA و پروتئین و اسکلت سلولی درگیر هستند (۲۲). تنباکو گیاهی یک‌ساله از تیره سیب‌زمینی است. تنباکو گیاهی گل‌یکوفیت بوده، به شوری بسیار حساس است و رشد آن در بیش از ۵۰ میلی‌مول سدیم کلرید که در خاک معادل هدایت الکتریکی ۵ دسی‌زیمنس بر متر است، متوقف شده، گیاه می‌میرد (۲۳). به‌طور کلی استرس شوری در تنباکو می‌تواند به سمیت یونی از جمله تخریب ساختار غشای پلاسمایی، اختلال در جذب عناصر معدنی و دیگری، اثر استرس ثانویه مانند استرس اکسیداتیو و خشکی تقسیم شود (۲۴ و ۲۵). در این مطالعه سعی بر آن شده است که تاثیر سینامیک اسید خارجی برمیزان فعالیت دو آنزیم PAL و TAL، میزان فنل کل و هم‌چنین برمیزان برخی از متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئید، آنتوسیانین و پرولین طی تنش شوری در کشت در شیشه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ابتدا بذره‌های گیاه تنباکو (*Nicotiana rustica L.*) خریداری شده از شرکت پاکان بذر اصفهان به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد حجمی، سپس به مدت ۳۰ ثانیه با محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و در پایان با آب مقطر استریل ۳ مرتبه شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد، بذره‌های استریل بر روی محیط کشت MS کشت داده شدند. جهت تکثیر گیاه یک میان‌گره از گیاه به محیط کشت انتقال داده شد. در این تحقیق جدا کشت‌های گیاهی (explant) در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سینامیک اسید به همراه سطوح شوری ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl کشت داده 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 مترمربع بر ثانیه رشد داده شدند. پس از ۴ هفته میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL و هم‌چنین میزان ترکیبات فنلی کل، میزان پروتئین کل، میزان سدیم و پتاسیم، فلاونوئید، آنتوسیانین، پرولین، مقدار H_2O_2 و ظرفیت آنتی‌اکسیدانته کل در گیاه اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری‌ها نسبت به گیاهان شاهد در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید (S100) و گیاهان شاهد در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار (S200) مورد مقایسه قرار گرفتند. کلیه آزمایشات در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و با حداقل ۳ تکرار انجام شده و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۴ انجام گرفت. در این مطالعه عامل CA در چهار سطح و عامل شوری در سه سطح در نظر گرفته شده و در مجموع ۱۲ نوع تیمار به دست آمده و هر تیمار بر روی حداقل ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت و میزان تاثیر تیمار CA، شوری و اثر متقابل آن‌ها بر روی گیاه نیز در این مطالعه ارائه شده است. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون Duncan و روش two way ANOVA انجام و سطوح معنی‌داری تیمارها در سطح $p \leq 0.05$ محاسبه شد. جدول ۱ اطلاعات آنالیز واریانس داده‌ها را نشان می‌دهد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL: برای استخراج آنزیم PAL و TAL مقدار ۰/۳ گرم بافت تازه برگ با ۴ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸/۵) که حاوی ۲-مرکاپتواتانول (۱۴/۴ میلی‌مولار) و ۵ درصد PVP بود ساییده شد. محلول هم‌گن حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی به دست آمده مجدداً در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و عصاره حاصل جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. بافر واکنش آنزیمی شامل ۵۰۰ میکرومولار تریس (pH=۸) حاوی سوبسترای آنزیم (۶ میکرومول

فنیل آلانین برای آنزیم PAL و ۵/۵ میکرومول تیروزین برای آنزیم TAL) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۱ میلی لیتر بود. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در نهایت به این محلول مقدار ۵۰ میکرولیتر HCl با غلظت ۵ نرمال اضافه شد تا واکنش آنزیمی متوقف شود. مقدار ترانس-سینامیک اسید (حاصل فالیات PAL) تشکیل شده در طول موج ۲۹۰ نانومتر و جذب کوماریک اسید (حاصل فعالیت TAL) در طول موج ۳۳۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1600 اندازه گیری شد (۲۶).

اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی کل: ۱۰ میلی لیتر متانول درصد به ۰/۱ گرم بافت برگ اضافه شده و ساییده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و محلول رویی جمع آوری شد. مقدار ترکیبات فنلی کل در عصاره‌ها بر اساس روش Folin-Ciocalteu اندازه گیری شد (۲۷).

اندازه گیری میزان پروتئین کل: برای اندازه گیری پروتئین کل از کیت پروتئین (محصول شرکت درمان فراز) استفاده شد. ابتدا سه نمونه S، T، و B تهیه شد. نمونه T حاوی ۰/۰۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی و ۱ میلی لیتر معرف بیوره می‌باشد. نمونه S حاوی ۰/۰۲ میلی لیتر محلول استاندارد پروتئین و ۱ میلی لیتر معرف بیوره می‌باشد و نمونه B حاوی ۱ میلی لیتر معرف بیوره می‌باشد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌های T و S در مقابل لوله B (بلانک) در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت شد.

اندازه گیری میزان سدیم و پتاسیم: جهت اندازه گیری سدیم و پتاسیم، از روش تغییر یافته Wet ashing استفاده شد (۲۸). میزان ۱۰ میلی گرم از پودر خشک نمونه‌ها با ۱۰ میلی لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد. از این محلول برای اندازه گیری سدیم و پتاسیم استفاده شد. پس از آماده سازی محلول‌های استاندارد، غلظت نمونه‌ها به کمک دستگاه شعله سنج مدل Halstead, Essex-orning410 اندازه گیری شد.

اندازه گیری میزان فلاونوئید و آنتوسیانین: به منظور سنجش محتوای فلاونوئید، ۰/۱ گرم بافت تر برگ با متانول ۸۰ درصد بر روی یخ و در تاریکی ساییده شد و عصاره حاصل در دور ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره حاصل با ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد، ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲۰۰ میکرولیتر سدیم استات (۱ مولار) مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد (۲۹). آنتوسیانین کل نیز بر اساس روش کار واگنر (۳۰) استخراج و اندازه گیری شد.

اندازه گیری میزان پرولین: اندازه گیری پرولین با استفاده از روش اصلاح شده باتس (۳۱) انجام شد.

اندازه گیری مقدار H_2O_2 سنجش با استفاده از روش ولیکووا و همکاران (۳۲) انجام گرفت.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانته کل: ظرفیت آنتی اکسیدانته کل بر اساس روش تغییر یافته بیتائیب و همکاران (۳۳) اندازه گیری شد. در این روش از عصاره آنزیمی جهت اندازه گیری ظرفیت خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد استفاده شد. ابتدا محلول ۲-۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) آماده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲ میلی لیتر از محلول DPPH مخلوط شد. سپس مخلوط واکنش به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار گرفت. سپس جذب کنترل و نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ قرائت شد. در نهایت درصد ممانعت کنترلی محاسبه شد.

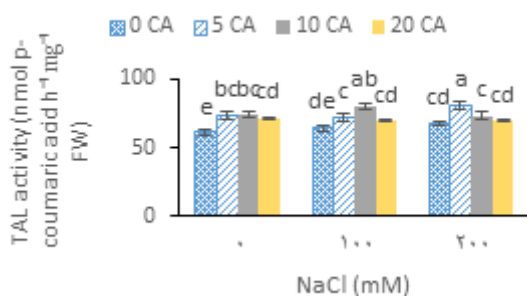
نتایج

اثر سینامیک اسید بر فعالیت آنزیم PAL

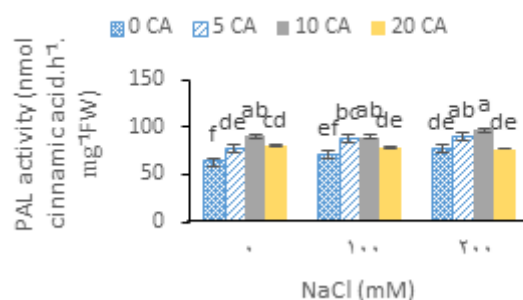
نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم PAL در گیاهان S₂₀₀ نسبت به گیاه شاهد در شوری صفر ۲۲ درصد افزایش داشته است. در شرایط بدون شوری هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر CA باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم PAL در اندام هوایی شده است. که این افزایش به ترتیب ۲۳، ۴۳ و ۲۶ درصد نسبت به شاهد بوده است. در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر CA به ترتیب ۲۵ و ۲۷ درصد افزایش در میزان فعالیت آنزیم PAL نسبت به گیاهان S₁₀₀ نشان دادند. در شرایط شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نیز غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر CA باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم PAL نسبت به گیاهان S₂₀₀ شده است (شکل ۱).

اثر CA بر فعالیت آنزیم TAL

همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد میزان فعالیت آنزیم TAL در گیاهان S₂₀₀ نسبت به شاهد افزایش داشته است. در شرایط بدون شوری هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر CA به ترتیب باعث افزایش ۲۱، ۲۲ و ۱۸ درصد میزان فعالیت آنزیم TAL نسبت به شاهد شده است. در شرایط شوری ۱۰۰ میلی‌مولار غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر CA افزایش را در میزان فعالیت آنزیم TAL نسبت به گیاهان S₁₀₀ نشان می‌دهد. در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر CA باعث افزایش ۲۰ درصدی میزان فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان S₂₀₀ شده است.



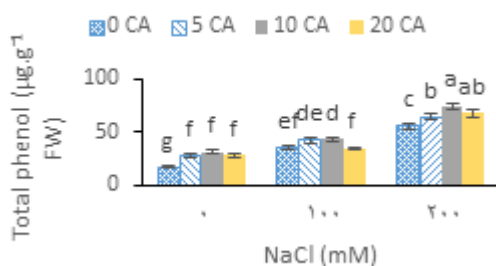
شکل ۲: اثر CA و شوری بر فعالیت آنزیم TAL



شکل ۱: اثر CA و شوری بر فعالیت آنزیم PAL

اثر CA بر میزان ترکیبات فنلی کل

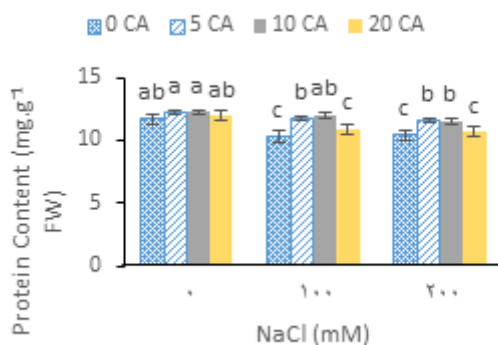
با توجه به شکل ۳ با افزایش شوری میزان فنل کل در گیاه افزایش یافت. در شرایط بدون شوری هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر CA باعث افزایش فنل کل نسبت به گیاه شاهد شد. در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر CA افزایش ۲۲ درصدی را نسبت به گیاهان S₁₀₀ نشان داد. در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر CA باعث افزایش فنل کل به ترتیب ۱۷، ۳۴ و ۲۳ درصد نسبت به گیاهان S₂₀₀ شد (شکل ۳).



شکل ۳: اثر CA و شوری بر میزان فنل کل

اثر CA بر میزان پروتئین کل

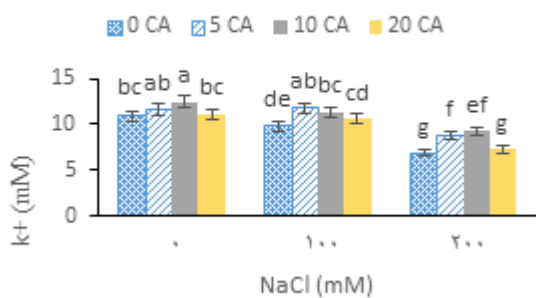
در شرایط بدون شوری تفاوت معنی داری در میزان پروتئین کل مشاهده نشد. غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA موجب افزایش میزان پروتئین کل در شرایط شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار به ترتیب نسبت به گیاهان S₁₀₀ و گیاهان S₂₀₀ شدند. میزان پروتئین گیاهان S₂₀₀ نسبت به شاهد ۱۲ درصد کاهش داشت (شکل ۴).



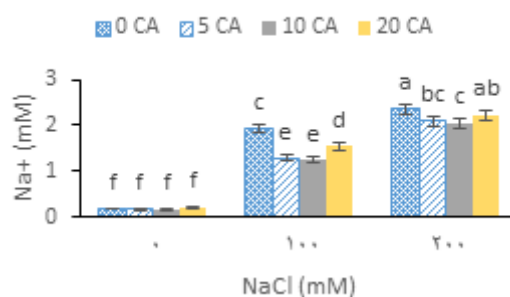
شکل ۴: اثر CA و شوری بر میزان پروتئین کل

اثر CA بر میزان سدیم و پتاسیم

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت مقدار سدیم در گیاه نیز افزایش می‌یابد. در شرایط بدون شوری تفاوت معنی داری در غلظت‌های مختلف سینامیک اسید نسبت به گیاه شاهد مشاهده نشد. در شرایط شوری ۱۰۰ میلی مولار هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر CA باعث کاهش مقدار سدیم در گیاه شد که این کاهش به ترتیب ۳۶، ۳۴ و ۲۱ درصد نسبت به گیاهان S₁₀₀ بود. در شرایط شوری ۲۰۰ میلی مولار دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA باعث کاهش مقدار سدیم نسبت به گیاهان S₂₀₀ شدند (شکل ۵). مقدار پتاسیم در شرایط بدون شوری تنها در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر CA افزایش نشان داد. در شرایط شوری ۱۰۰ میلی مولار غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA باعث افزایش مقدار پتاسیم نسبت به گیاهان S₁₀₀ شد. در شرایط شوری ۲۰۰ میلی مولار غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA باعث افزایش ۲۹ و ۳۵ درصد میزان پتاسیم نسبت به گیاهان S₂₀₀ شد (شکل ۶).



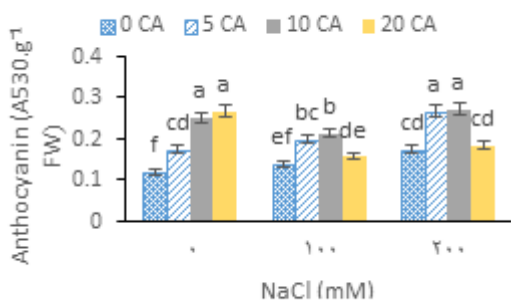
شکل ۶: اثر CA و شوری بر میزان پتاسیم



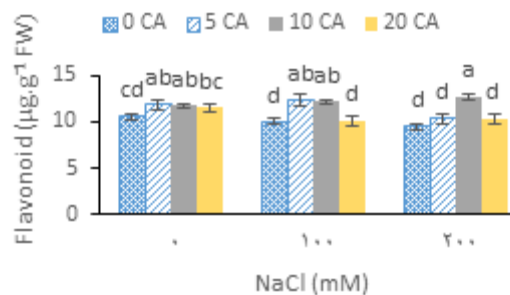
شکل ۵: اثر CA و شوری بر میزان سدیم

اثر CA بر میزان فلاونوئید و آنتوسیانین

سنجش میزان فلاونوئید نشان داد در شرایط بدون شوری غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA باعث افزایش میزان فلاونوئید نسبت به گیاه شاهد شده است. در شوری ۱۰۰ میلی مولار نیز غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA به ترتیب ۲۳ و ۲۱ درصد افزایش در میزان فلاونوئید نسبت به گیاهان S₁₀₀ نشان دادند. در شوری ۲۰۰ میلی مولار تنها غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر CA باعث افزایش میزان فلاونوئید نسبت به گیاهان S₂₀₀ شده است (شکل ۷). میزان آنتوسیانین در شرایط بدون شوری در هر سه تیمار ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر CA افزایش داشته است که غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر CA به ترتیب افزایش ۱/۱۱ و ۱/۲۵ برابری را نسبت به شاهد نشان داده‌اند. در شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA باعث افزایش میزان آنتوسیانین به ترتیب نسبت به گیاهان S₁₀₀ و S₂₀₀ شده‌اند (شکل ۸).



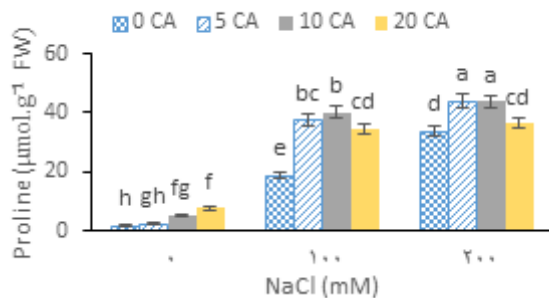
شکل ۸: اثر CA و شوری بر میزان آنتوسیانین



شکل ۷: اثر CA و شوری بر میزان فلاونوئید

اثر CA بر میزان پرولین

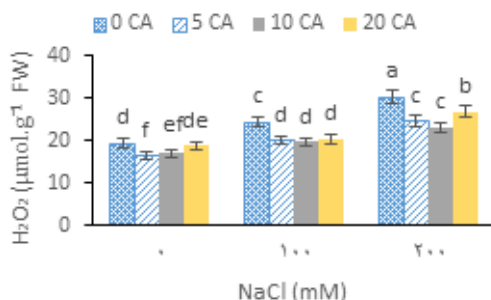
به طور کلی با افزایش غلظت شوری میزان پرولین افزایش یافته است. در شرایط بدون شوری غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر CA افزایش ۱/۹۷ و ۳/۳۵ برابری در میزان پرولین گیاه نسبت به شاهد نشان دادند. در شرایط شوری ۱۰۰ میلی مولار هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر CA به ترتیب ۹۹، ۱۱۳ و ۸۳ درصد افزایش در غلظت پرولین نسبت به گیاهان S₁₀₀ داشته‌اند و در شرایط شوری ۲۰۰ میلی مولار غلظت ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر CA نسبت به گیاهان S₂₀₀ افزایش نشان دادند (شکل ۹).



شکل ۹: اثر CA و شوری بر میزان پرولین

اثر CA بر میزان H_2O_2

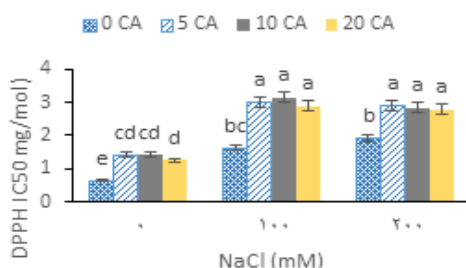
باتوجه به شکل ۱۰ با افزایش شوری میزان H_2O_2 نیز در گیاه افزایش یافته است. در شرایط بدون شوری غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر CA موجب کاهش H_2O_2 نسبت به شاهد شده است. در شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر CA باعث کاهش میزان H_2O_2 به ترتیب نسبت به گیاهان S_{100} و گیاهان S_{200} شده‌اند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: اثر CA و شوری بر میزان H_2O_2

اثر CA بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل

ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در گیاهان S_{200} نسبت به گیاهان شاهد ۲ برابر افزایش داشته است. در شرایط بدون شوری، شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و شوری ۲۰۰ میلی‌مولار، هر سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر CA افزایش را در میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل به ترتیب نسبت به گیاهان شاهد، S_{100} و S_{200} نشان دادند. این افزایش در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار در هر سه غلظت CA به ترتیب ۸۶، ۹۵ و ۷۹ درصد نسبت به گیاهان S_{100} و در شوری ۲۰۰ به ترتیب ۵۱، ۴۸ و ۴۵ درصد نسبت به گیاهان S_{200} بوده است (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: اثر CA و شوری بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل

جدول ۱: جدول اثرات بین آزمودنی (شوری، تیمار CA و شوری×CA) سطوح معنی‌داری $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شده است.

میانگین مربعات						درجه آزادی (df)	منابع تغییر
پتاسیم	سدیم	پروتئین	فنل	TAL	PAL		
۴۱/۳۲۰	۱۲/۴۹۹	۳/۲۲۷	۴۷۴۷/۱۸۰	۱۷/۱۹۱	۱۶۶/۶۴۲	۲	شوری
۶/۷۴۸	۰/۲۲۳	۲/۷۷۹	۲۸۸/۷۹۶	۲۷۰/۳۲۰	۷۸۳/۳۵۰	۳	CA
۰/۴۷۳	۰/۰۷۴	۰/۲۱۵	۳۸/۲۷۳	۴۶/۳۲۰	۵۲/۹۱۵	۶	شوری×CA
۰/۲۳۱	۰/۰۰۹	۰/۱۰۴	۱۷/۸۴۳	۱۴/۲۷۶	۲۲/۹۶۰	۲۴	خطا

میانگین مربعات					درجه آزادی (df)	منابع تغییر
ظرفیت آنتی اکسیداتی کل	H ₂ O ₂	پروپیلین	آنتوسیانین	فلاونوئید		
۸/۵۵۲	۲۰۹/۸۹۶	۴۲۰۹/۵۷۹	۰/۰۰۷	۱/۵۸۷	۲	شوری
۲/۳۵۴	۴۱/۸۹۲	۲۳۶/۶۶۲	۰/۰۱۶	۷/۹۹۲	۳	CA
۰/۱۰۰	۴/۱۴۲	۷۰/۶۰۵	۰/۰۰۵	۱/۶۷۲	۶	شوری×CA
۰/۰۳۸	۱/۲۵۳	۳/۲۶۳	۰/۰۰۰	۰/۳۶۲	۲۴	خطا

بحث

تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید متابولیت‌های ثانویه را القا می‌کند که در دفاع گیاهان در مقابل شرایط سخت محیطی نقش دارند و به‌طور معنی‌داری فعالیت آنتی اکسیداتی بافت‌های گیاهی را افزایش می‌دهند (۵). مسیر فنیل پروپانوئید یکی از مهم‌ترین مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۹). PAL و TAL دو آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید هستند (۷). در شرایط استرس شوری میزان فعالیت و بیان آنزیم PAL افزایش می‌یابد که این فرایند با افزایش میزان ترکیبات فنلی در شرایط استرس شوری مرتبط است (۳۴). CA طی فرایند دامیناسیون فنیل آلانین توسط آنزیم PAL تولید می‌شود که یک نقطه تنظیمی مهم بین متابولیسم اولیه و ثانویه است (۳۵). نتایج حاصل از پژوهش ما نیز نشان داد که در غلظت بالای شوری میزان فعالیت آنزیم PAL و همچنین TAL نسبت به شاهد افزایش داشته است. افزایش فعالیت آنزیم PAL و TAL در شرایط شوری در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۳۶). هم‌چنین مشاهدات ما نشان داد که تیمار سینامیک اسید موجب افزایش فعالیت PAL و TAL هم در شرایط شوری و هم بدون شوری شده است. گزارش شده است که با افزایش غلظت CA (در غلظت‌های پایین CA) به‌صورت خارجی، میزان بیان آنزیم سینامیک اسید-۴-هیدروکسی‌لاز (C4H) افزایش یافته است (این آنزیم تبدیل CA را به p-کوماریک اسید کاتالیز می‌کند) و با افزایش بیان آنزیم C4H نیز بیان آنزیم PAL افزایش یافته است. در واقع بین افزایش بیان ژن آنزیم C4H با بیان ژن PAL یک ارتباط مستقیم و مثبت وجود دارد (۳۷). به‌هرحال وجود چنین ارتباطی در گیاه تنباکو و در شرایط آزمایشات حاضر نیاز به بررسی دقیق‌تری در آینده دارد. در پژوهشی بر روی گیاه گندم مشخص شد که میزان بیان و فعالیت آنزیم TAL و PAL طی فرایند لیگنین‌سازی

افزایش می‌یابد (۳۸). از آنجایی که سینامیک اسید میزان لیگنین‌سازی را افزایش می‌دهد (۳۹) به نظر می‌رسد که از این طریق بر افزایش فعالیت آنزیم TAL اثر گذاشته باشد.

گیاهان به ترکیبات فنلی برای تجمع رنگدانه‌ها در بافت‌ها، رشد، تولیدمثل و مقاومت به پاتوژن‌ها و بسیاری اعمال دیگر نیاز دارند (۴۰). اصولاً انباشتگی ترکیبات فنلی نوعی پاسخ دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (۴۱). نتایج حاصل از پژوهش ما نیز نشان داد که شوری باعث افزایش میزان فنل کل و هم‌چنین میزان فلاونوئید و آنتوسیانین نسبت به نمونه شاهد شد. مطابق نتایج به‌دست آمده CA باعث افزایش میان فنل کل و فلاونوئید و آنتوسیانین نسبت به گیاهان بدون تیمار CA هم در شرایط شوری و هم بدون شوری شده است. CA ماده اولیه مسیر فنیل پروپانوئیدی می‌باشد و بنابراین به‌عنوان پیش‌ساز بسیاری از ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئید و آنتوسیانین به‌شمار می‌رود. پژوهش‌ها حاکی از آن است که با افزایش غلظت CA میزان سنتز برخی ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد (۴۲). بنابراین به‌نظر می‌رسد با ورود CA (به‌عنوان ماده اولیه مسیر فنیل پروپانوئیدی) به‌صورت خارجی به‌درون مسیر فنیل پروپانوئید میزان تولید ترکیبات فنلی افزایش یافته است.

تنش شوری با افزایش کاتابولیسم پروتئین‌ها، میزان پروتئین‌های محلول را کاهش می‌دهد. هم‌چنین شوری باعث آسیب‌رسانی به ماشین بیان ژنی سلول می‌شود (۴۳). نتایج حاصل از پژوهش ما نیز نشان داد که تنش شوری باعث کاهش میزان پروتئین گیاه تنباکو شده است. به‌علاوه مقدار پروتئین با تیمار CA نسبت به شرایط بدون CA طی تنش شوری افزایش یافته است. Singh و همکاران (۸) در مطالعه‌ای بر روی گیاه ذرت نشان دادند که اثرات CA خارجی بر بیوسنتز پروتئین در شرایط شوری بسیار بارزتر از شرایط بدون شوری بوده است و CA به‌همراه شوری موجب تغییر الگوی پروتئینی شد که به‌نظر می‌رسید مسئول القای چندین ژن پاسخ‌گوی اسمولیتی باشد و ممکن است با سازگاری به استرس شوری مرتبط باشد. هم‌چنین گزارش شده است که سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک آنالوگ برای CA با افزایش تجمع پروتئین‌ها احتمالاً در سازگاری به شوری و تنظیم اسمزی نقش دارد (۴۴). بنابراین به‌نظر می‌رسد که CA و آنالوگ آن با تاثیر بر الگوی پروتئینی و میزان آن می‌توانند اثرات شوری را کاهش دهند و توانایی گیاهان را در سازگاری به شوری بهبود بخشند.

مطابق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، افزایش غلظت نمک میزان سدیم را افزایش و پتاسیم را کاهش داد. این تغییرات با افزایش جذب و تجمع یون‌های سمی مثل سدیم و کلر طی تنش شوری ارتباط دارد (۴۵). به‌نظر می‌رسد افزایش جذب یون سدیم نیز با افزایش نفوذپذیری غشای سلول به‌دلیل آسیب ناشی از تجمع ROS در ارتباط است (۴۶). به‌هم خوردن نسبت‌های یونی در گیاه تحت شرایط شوری، حاصل تداخل جذب سدیم با پتاسیم است. تشابه بین شعاع یون هیدراته سدیم و پتاسیم، عمل تمایز بین دو یون مذکور را برای پروتئین‌های ناقل مشکل ساخته و بدین ترتیب سمیت سدیم فراهم می‌شد. فعالیت آنزیم‌های موجود در سیتوپلاسم حساسیت زیادی به نمک دارد و لذا حفظ نسبت زیاد پتاسیم به سدیم در سیتوزول، یک نیاز اساسی برای رشد گیاه در شرایط شوری زیاد است (۴۷). مطالعات ما هم‌چنین نشان داد که تیمار CA موجب کاهش میزان سدیم و افزایش میزان پتاسیم در گیاه تنباکو شده است. گزارش شده است که CA می‌تواند بر مسیر سیگنالی اکسین اثر گذار باشد و میزان اکسین را افزایش دهد (۴۸). به‌نظر می‌رسد که افزایش میزان اکسین موجب افزایش فعالیت انتقال همسو H^+/K^+ شود و در نتیجه انتقال پتاسیم به‌داخل سلول بیشتر شد (۴۹). هم‌چنین در این پژوهش CA موجب افزایش پرولین شده است که گزارش شده است اسمولیت‌ها می‌توانند اثر سمی ناشی از ROS بر ناقل‌های پتاسیم و در نتیجه آن آسیب‌های ناشی از تنش شوری را به‌کاهند (۵۰).

پرولین انباشته شده در پاسخ به شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون سلولی ایفا می‌کند و آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی را در برابر واسرشتگی حفظ می‌نماید. نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد که افزایش شوری موجب افزایش میزان

پروکلین نسبت به نمونه شاهد شده است. طی تنش شوری، کلرید سدیم مسیر بیوسنتزی پروکلین و توانایی آن‌تی اکسیدان‌تی سلول گیاه را تحریک می‌کند (۵۱ و ۵۲). گزارش شده است ROS تولید شده طی تنش شوری سبب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ در سیتوزول و میتوکندری می‌شود و در نهایت توسط آنزیم گلوتامات دهیدروژناز، گلوتامات پیش ساز سنتز پروکلین در میتوکندری تولید می‌شود (۵۳). در مطالعه ای که توسط Hoque و همکاران (۵۵) انجام شد، مشخص شد در اثر استفاده پروکلین به صورت برون‌زا بر روی سوسپانسیون سلولی گیاه تنباکو در تنش شوری، فعالیت آنزیم‌های آن‌تی اکسیدان‌تی افزایش و در پی آن اثرات مخرب تنش شوری کاهش یافت (۵۴). Yiu و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند که مقدار پروکلین با افزایش شوری افزایش یافت. نتایج ما هم‌چنین نشان داد که تیمار CA موجب افزایش پروکلین نسبت به گیاهان بدون تیمار CA شده است. Karadag و Yucel (۱۷) نتایج مشابهی را از CA در گندم مشاهده کردند. Lin و همکاران (۵۶) نشان دادند در اثر تیمار CA در شرایط تنش شوری میزان پروکلین در برگ‌های استرس یافته‌ی لفل‌دل‌مه‌ای افزایش یافت. پدیده‌ای که ممکن است به ظرفیت بالای آن‌تی اکسیدان‌تی CA برای محافظت از گیاهان در برابر آسیب اکسیدان‌تی ناشی از تنش شوری نسبت داده شود. شاید بتوان گفت افزایش پروکلین در اثر تیمار CA ناشی از ایجاد یک تنش اکسیدان‌تی خفیف در گیاه بر اثر CA خارجی باشد و یا این‌که ممکن است CA بر مسیر بیوسنتزی پروکلین اثر گذاشته و از این‌رو سنتز پروکلین را افزایش داده است که به تحقیقات بیش‌تری در این زمینه نیاز است.

مقدار H_2O_2 تولید شده در سلول نشان دهنده تعادل بین تولید و تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن در سلول می‌باشد. غلظت‌های بالای H_2O_2 به‌عنوان عامل ایجادکننده تنش اکسیدان‌تیو به‌حساب می‌آیند (۲). در مقایسه با دیگر ROSها، H_2O_2 نسبتاً پایدار است. نتایج حاضر نشان داد که تنش شوری سبب افزایش H_2O_2 گیاه نسبت به شاهد شد. سمیت یون‌های سدیم و کلر و نیز نقصان زنجیره انتقال الکترونی طی تنش شوری موجب افزایش ROS و به‌تبع آن H_2O_2 در گیاه می‌شود (۵۷، ۵۸). هم‌چنین نتایج ما نشان داد پیش تیمار CA موجب کاهش میزان H_2O_2 در گیاه شده است. CA (به‌عنوان یک آن‌تی اکسیدان‌تی غیر آنزیمی) و مشتقات آن ترکیبات آروماتیکی هستند که به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیلی توانایی بالایی در حذف ROSها دارند (۵۹ و ۶۰). توانایی آن‌ها ناشی از واکنش‌پذیری بالا به‌صورت دهنده الکترون و پروتون، تثبیت و جابه‌جایی الکترون‌های منفرد و قابلیت آن‌ها در شلات کردن یون‌های فلزی قابل انتقال است و مشخص شده است که این ترکیبات در بعضی گونه‌ها نقش بارزتری به‌عنوان منبع آن‌تی اکسیدان‌تی دارند (۶۱). در شرایط غیرتنش بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن آن‌ها توسط سیستم دفاع آن‌تی اکسیدان‌تی (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آن‌ها توسط سیستم دفاع آن‌تی اکسیدان‌تی بیش‌تر شده و در نتیجه تنش اکسیدان‌تیو رخ می‌دهد. بنابراین به‌نظر می‌رسد برای مقابله با تنش اکسیدان‌تیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آن‌تی اکسیدان‌تی ضروری می‌باشد. در مطالعه حاضر با در نظر گرفتن نقش سینامیک اسید در افزایش میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و پروکلین در شرایط تنش شوری و بدون شوری این احتمال وجود دارد که با ورود سینامیک اسید به‌صورت خارجی به گیاه میزان فعالیت آن‌تی اکسیدان‌تی افزایش یافته و باعث کاهش H_2O_2 در گیاه شده است و احتمالاً به‌نوعی باعث افزایش مقاومت گیاه به شوری شده است.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که سینامیک اسید دارای نقش القایی آن‌تی اکسیدان‌تی و هورمونی مشابه اکسین از خود نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمار سینامیک اسید سبب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاه شد. هم‌چنین باعث افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و نیز باعث افزایش پتاسیم و کاهش سدیم و H_2O_2 گیاه شد. تیمار سینامیک اسید سبب افزایش

میزان پرولین، فلاونوئید، فنل کل، آنتوسیانین، گلیسین بتائین، فعالیت آنزیم PAL و TAL، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی شامل آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و میزان پروتئین کل در شرایط شوری شد. به نظر می‌رسد تیمار سینامیک اسید با تقویت سیستم آنتی اکسیدانت آنزیمی و همچنین آنتی اکسیدانت های غیرآنزیمی منجر به افزایش مقاومت به شوری گیاه تنباکو شده است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم الهام محققیان می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان و قطب آنتی اکسیدانت‌های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2005; 444(2): 139-58.
2. Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2005; 60(3): 324-49.
3. Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. Sodium transport in plant cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2000; 1465(1-2): 140-51.
4. Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Biology. 2000; 51(1): 463-99.
5. Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior. 2011; 6(11): 1720-1731.
6. Good AG, Zaplachinski ST. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum. 1994; 90(1): 9-14.
7. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell. 1995; 7(7): 1085-1097.
8. Singh PK, Singh R, Singh S. Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. Physiology and Molecular Biology Plants. 2013; 19(1): 53-59.
9. Pollastri S, Tattini M. Flavonols: old compounds for old roles. Annals of Botany. 2011; 108(7): 1225-1233.
10. Guo D, Wong WS, Xu WZ, Sun FF. et al. Ciscinnamic acid-enhanced 1 gene plays a role in regulation of Arabidopsis bolting. Plant Molecular Biology. 2011; 75(4-5): 481-495.
11. Wong WS, Guo D, Wang XL, Yin ZQ, et al. Study of cis-cinnamic acid in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry. 2005; 43(10-11): 929-937.
12. Nakabayashi R, Saito K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology. 2015; 24: 10-6.
13. Khalil N, Fekry M, Bishr M, El-Zalabani S, et al. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. Plant Physiology and Biochemistry. 2018; 123: 65-74.
14. Korkina, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. Cellular and Molecular Biology. 2007; 53(1): 15-25.

15. Li Q, Yu B, Gao Y, Dai AH, et al. Cinnamic acid pretreatment mitigates chilling stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology*. 2011; 168(9): 927-34.
16. Sun WJ, Nie YX, Gao Y, Dai AH, et al. Exogenous cinnamic acid regulates antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2012; 34(2):641-55.
17. Karadağ B, Yücel NC. Cinnamic acid and fish flour affect wheat phenolic acids and flavonoid compounds, lipid peroxidation, proline levels under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*. 2017; 68(4): 388-97.
18. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 2010; 3(1): 2-20.
19. Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, et al. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; 91(16): 7608-7612.
20. Jahnen W, Hahlbrock K. Differential regulation and tissue-specific distribution of enzymes of phenylpropanoid pathways in developing parsley seedlings. *Planta*. 1988; 173(4): 453-458.
21. Chen S, Gollop N, Heuer B. Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine. *Journal of Experimental Botany*. 2009; 60(7): 2005-19.
22. Nam MH, Huh SM, Kim KM, Park WW, et al. Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. *Proteome science*. 2012; 10(1): 1-9.
23. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. London: Academic press; 1995.
24. Sun H, Sun X, Wang H, Ma X. Advances in salt tolerance molecular mechanism in tobacco plants. *Hereditas*. 2020; 157(1): 1-6.
25. Sharma V, Goel P, Kumar S, Singh AK. An apple transcription factor, MdDREB76, confers salt and drought tolerance in transgenic tobacco by activating the expression of stress-responsive genes. *Plant Cell reports*. 2019; 38(2): 221-41.
26. Beaudoin-Eagan LD, Thorpe TA. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*. 1985; 78(3): 438-441.
27. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*. Academic Press. 1999; 299: 152-178.
28. Motsara MR, Roy RN. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. 19th Ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008.
29. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; 10(3):178-182.
30. Wagner GJ. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*. 1979; 64(1): 88-93.
31. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973; 39(1): 205-207.

32. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*.2000; 151(1): 59-66.
33. Bettaieb I, Knioua S, Hamrouni I, Limam F, et al. Water-deficit impact on fatty acid and essential oil composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2010; 59(1): 328-334.
34. Valifard M, Mohsenzadeh S, Niazi A, Moghadam A. Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in '*Salvia*' species. *Australian Journal of Crop Science*. 2015; 9(7): 656.
35. Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, et al. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*. 2010; 153(4): 1526-1538.
36. Alla MM, Younis ME, El-Shihaby OA, El-Bastawisy ZM. Kinetin regulation of growth and secondary metabolism in waterlogging and salinity treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Acta Physiologiae Plantarum*.2002; 24(1): 19-27.
37. Blount JW, Korth KL, Masoud SA, Rasmussen S, et al. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*. 2000; 122(1): 107-116.
38. Green NE, Hadwiger LA, Graham SO. Phenylalanine Ammonia-lyase, Tyrosine Ammonia-lyase, and Lignin in Wheat Inoculated with *Erysiphe graminis* f. sp. *Tritici*. *Phytopathology*.1975; 65: 1071-1074.
39. Salvador VH, Lima RB, dos Santos WD, Soares AR, et al. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69105.
40. Lattanzio V, Lattanzio VM, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*.2006; 661(2): 23-67.
41. Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, et al. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2006; 28(23): 1867-1876.
42. Shourie A. Cinnamic acid Supplementation Regulates the Production of Licochalcone A Liquirtigenin and Licoisoflavone B in callus cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *International Journal of Phytomedicine*.2016; 8(3): 343-345.
43. Am BN. Oxidative stress markers and antioxidant potential of wheat treated with phytohormones under salinity stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2011; 7(4): 250-267.
44. Mikołajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF, et al. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *The Plant Cell*. 2000; 12(1): 165-178.
45. Doğan M. Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 2013; 10(32): 5972-5978.
46. Abo-Kassem EE. Effects of salinity: Calcium interaction on growth and nucleic acid metabolism in five species of *Chenopodiaceae*. *Turkish Journal of Botany*. 2007; 31(2): 125-134.

47. Apse MP, Blumwald E. Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002; 13(2): 146-150.
48. Kurepa J, Shull TE, Karunadasa SS, Smalle JA. Modulation of auxin and cytokinin responses by early steps of the phenylpropanoid pathway. *BMC Plant Biology*. 2018; 18(1): 278.
49. Sharp RE, LeNoble ME. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*. 2002; 53(366): 33-37.
50. Cui TA, Shabala S. Compatible solutes mitigate damaging effects of salt stress by reducing the impact of stress-induced reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*. 2008; 3(3): 207-208.
51. Dmitriev A, Djatsok J, Grodzinsky D. The role of Ca²⁺ in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Reports*. 1996; 15(12): 945-948.
52. Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell*. 2006; 18(10): 2767-2781.
53. Sharma SS, Dietz KJ. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57(4): 711-726.
54. Hoque MA, Okuma E, Banu MN, Nakamura Y, et al. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology*. 2007; 164(5):553-61.
55. Yiu JC, Tseng MJ, Liu CW, Kuo CT. Modulation of NaCl stress in *Capsicum annuum* L. seedlings by catechin. *Scientia Horticulturae*. 2012; 134:200-9.
56. Lin CY, Chung HH, Kuo CT, Yiu JC. Exogenous cinnamic acid alleviates salinity-induced stress in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2020; 48(3):164-82.
57. Ashraf M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*. 2009; 27(1): 84-93.
58. Abogadallah GM. Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*. 2010; 5(4): 369-374.
59. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Litinas K, Geromichalos G. Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: Design, synthesis and modeling studies. *Molecules*. 2014; 19(7): 9655-9674.
60. Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure– activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47(4): 1453-1459.
61. Gould K, Davies KM, Winefield C. (Eds.). *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. Springer Science & Business Media. New Zealand; 2008.

Effect of Cinnamic acid on the activity of phenylalanine ammonialyase (PAL) and tyrosine ammonialyase (TAL) enzymes and some physiological characteristics of tobacco plant (*Nicotiana rustica* L.) under salinity stress *in vitro* culture

Mohagheghian E M.Sc., Ehsan Pour AA * Ph.D.

- Biology Department, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: ehsanpou@sci.ac.ir

Received: 19 Jan. 2021

Accepted: 11 Jul. 2021

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the effect of Cinnamic acid (CA) on some physiological characteristics and salt tolerance of tobacco (*Nicotiana rustica* L.) plants.

Materials and Methods: In this study, explants of tobacco grown in MS medium was transferred to MS media containing CA (concentrations of 0, 5, 10 and 20 mg / l) and NaCl salt (concentrations of 0, 100 and 200 mM). After four weeks of treatment, the necessary analysis contains measurement activity of phenylalanine ammonialyase (PAL) and tyrosine ammonialyase (TAL), total phenolic compound and total protein, accumulation of flavonoid, anthocyanins, total antioxidant capacity, hydrogen peroxide (H₂O₂), potassium and sodium and proline done on the treated plants.

Results: The results showed that the treatment of plants with CA increased the activity of PAL and TAL, total phenolic compounds and total protein. CA treatment also increased the accumulation of flavonoids, anthocyanins and proline as well as potassium and total antioxidant capacity. But the amount of sodium and H₂O₂ decreased as a result of CA treatment.

Conclusion: It is possible that CA increases the salt tolerance of tobacco by increasing the amount of total phenolic compounds as well as proline under salt stress conditions.

Keywords: Salt stress, Cinnamic acid, Tobacco, Salt tolerance