اثر تحریکی سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی‌آمین اکسیداز در کالوس آویشن دنایی

انسیه شاهرودی[۱]، فرانسواز برنارد[۱]، داریوش مینایی تهرانی[۲] و سیده بتول حسنی[۱*]

[۱] **ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی**

[۲] **ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه زیست سلولی و مولکولی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۵

چکیده

بر اساس مطالعات گذشته، سالیسیلیک اسید باعث کاهش پدیده شیشه‌ای شدن در گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) می‌گردد و این پدیده ممکن است از طریق تأثیر بر روی متابولیسم پلی آمین‌ها صورت گیرد. آنزیم پلی آمین اکسیداز کاتابولیسم پلی آمین‌ها را در سلول انجام داده و یکی از محصولات جانبی آن هیدروژن پراکسید (H_2O_2) می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی‌آمین اکسیداز کالوس آویشن دنایی می‌باشد. در این پژوهش، فعالیت آنزیم پلی‌آمین اکسیداز، محتوای H_2O_2 و پاسخ آنتی‌اکسیدانی شامل فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز مورد اندازه‌گیری قرارگرفت. نتایج نشان داد که تیمار سالیسیلیک اسید (غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار)، باعث افزایش وابسته به غلظت فعالیت پلی‌آمین اکسیداز گردید. در کالوس تحت تیمار سالیسیلیک اسید (۲۰ میکرومولار)، کاهش فعالیت پراکسیداز محلول و افزایش H_2O_2 مشاهده شد. افزایش H_2O_2 ممکن است نتیجه تأثیر سالیسیلیک اسید بر فعالیت پلی‌آمین اکسیداز و پراکسیداز باشد. در حالی‌که تغییرات سطوح H_2O_2 نتیجه تغییر در فعالیت کاتالاز نمی‌باشد. تنظیم سطوح H_2O_2 توسط سالیسیلیک اسید از طریق تأثیر بر پلی‌آمین اکسیداز احتمالاً در هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش دارد که برای فرایندهای نمو درون شیشه‌ای سلول‌های گیاهی ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی، پراکسیداز، پلی‌آمین اکسیداز، کاتالاز، هیدروژن پراکسید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۹۹۰۵۹۳۵-۰۲۱، پست الکترونیکی:b_hassani@sbu.ac.ir

مقدمه

آویشن دنایی (*Thymus daenensis*)، متعلق به خانواده نعناییان (Lamiaceae) می‌باشد و در مناطق نیمه‌خشک ایران رویش وسیعی دارد. این گیاه به‌دلیل خواص دارویی فراوان مورد برداشت بسیار قرارگرفته و در معرض خطر انقراض می‌باشد. به‌همین دلیل کشت بافت درون‌شیشه‌ای این گیاه روشی مفید برای تکثیر آن است. یکی از مشکلات کشت بافت درون‌شیشه ای، پدیده شیشه‌ای شدن می‌باشد. بر اساس تحقیقات گذشته، این مشکل تا حدودی با به‌کارگیری سالیسیلیک اسید در گیاه آویشن دنایی حل‌شده است (۱۲). سالیسیلیک اسید یک هورمون گیاهی است که در تنشهای محیطی بعنوان تنظیم‌کننده و پیام‌رسان عمل می‌کند (۱۳). شیشه‌ای شدن می‌تواند به‌دلیل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و اختلال در پاکسازی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) ایجاد شود (۱۲).

H_2O_2 به‌عنوان یک‌گونه فعال اکسیژن (ROS)، در طی دهه‌های اخیر بسیار موردتوجه قرارگرفته است. این مولکول در بسیاری از تنش‌های محیطی اعم از زیستی یا غیرزیستی در گیاهان ایفای نقش می‌کند. اخیراً مشاهده‌شده است که H_2O_2 در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند پیری، تنفس نوری و فتوسنتز، کنترل باز و بسته شدن روزنه، فرایند چرخه سلولی و رشد و نمو شرکت دارد (۱۴). از

طرفی افزایش و تجمع H_2O_2، خود نوعی تنش اکسیداتیو به شمار می آید که باعث آغاز فرایند مرگ سلولی می‌شود. بنابراین، بقای همه ارگانیسمهای هوازی بستگی به هوموستازی H_2O_2 دارد. این هوموستازی شامل تولید H_2O_2 از مسیرهای مختلف و پاکسازی آن می‌باشد. اخیراً نقش کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها در تولید H_2O_2 بسیار مورد توجه قرارگرفته است (۲۱). سیستم پاکسازی H_2O_2 شامل مسیرهای آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. آنزیم‌های جاروب کننده H_2O_2 شامل سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) می‌باشند (۴). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل توکوفرولها، آسکوربیک اسید، گلوتاتیون(GSH) و پلی‌آمین‌ها هستند (۴).

بر طبق نتایج حسن نژاد و همکاران (۲۰۱۱)، سالیسیلیک اسید از طریق تغییر در متابولیسم پلی‌آمین‌ها سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). پلی آمین‌ها، پلی‌کاتیونهای آلیفاتیک با وزن مولکولی کم، غیرپروتئینی و راست زنجیر می‌باشند که در تمام سلولهای پروکاریوت و یوکاریوت یافت می‌شوند (۱۷). پلی‌آمینها شامل پوترسین، اسپرمیدین، اسپرمین و کاداورین می‌باشند (۱۷). پلی‌آمینها در همه بخشهای سلول گیاهی شامل هسته، میتوکندری، کلروپلاست و واکوئل حضور دارند، که این موضوع اهمیت نقش آنها در فرایندهای گوناگون سلولی ازجمله پاسخ به تنشهای زیستی و غیرزیستی را نشان می‌دهد (۳، ۱۷، ۱۹و ۲۱). تنظیم سطح پلی‌آمینهای آزاد در سلول به‌طور مؤثری توسط کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها صورت می‌گیرد. همچنین محصولات کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها می‌توانند نقش فیزیولوژیکی مهمی را تحت شرایط عادی و تنش ایفا کنند (۲۱). در گیاهان کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها توسط آنزیم‌های دی‌آمین اکسیداز و پلی‌آمین اکسیدازها صورت می‌گیرد. تحقیقات گذشته نشان داده است که آنزیم پلی‌آمین اکسیداز در بخشهای مختلف سلولی شامل پراکسی زوم، سیتوپلاسم و آپوپلاست فعالیت دارد (۲۱). یکی از محصولات جانبی کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها توسط آنزیم پلی‌آمین اکسیداز، H_2O_2 می‌باشد (۲۱). H_2O_2 تولید شده در آپوپلاست می‌تواند در واکنش لیگنینی شدن دیواره مورد استفاده قرارگیرد و در نهایت باعث استحکام دیواره سلولی شود (۲۱). از طرفی افزایش H_2O_2 از طریق کاتابولیسم پلی‌آمینها، می‌تواند بر روی بیان ژنهای آنتی‌اکسیدانی مرتبط با تنش تأثیر بگذارد (۲۱).

مطالعات پیشین نشان داده است که سالیسیلیک اسید تأثیرات مختلفی بر سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی و سطح H_2O_2 نشان می‌دهد (۱۳). باتوجه به تحقیقات گذشته در زمینه تأثیر سالیسیلیک اسید بر تغییرات سطوح پلی‌آمینها در گیاه آویشن دنایی (۱۲)، در پژوهش حاضر تأثیر سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت پلی‌آمین اکسیداز در کالوس این گیاه مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

کشت کالوس: از ریشه گیاهچه‌های آویشن دنایی کشت شده در محیط MS حاوی هورمون NAA، کالوس این گیاه به‌دست آمد. سپس کالوسها بمنظور ازدیاد در محیط MS (pH =۵,۷) به تعداد 5 عدد در هر شیشه واکشت داده شدند.

شیشه‌های حاوی کالوسها در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، با دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۲۰۰ لوکس نگه‌داری شدند. سپس کالوس‌ها به تعداد 85 عدد با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰ و۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار شدند. نمونه‌برداری پس از ۱۴ روز بمنظور انجام آزمایشهای بعدی صورت گرفت.

سنجش مقدار هیدروژن پراکسید (H_2O_2): اندازه‌گیری H_2O_2 به روش ولیکوا و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد (۲۶). ۰/۱ گرم بافت تازه گیاهی در ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل تری‌کلرواستیک اسید ۱ درصد حجمی –حجمی به

مدت ۲ دقیقه در هاون سرد هموژن شد. عصاره‌ها در ۴۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ۲۰۰ میکرولیتراز محلول رویی با ۵۰۰ میکرولیتر پتاسیم یدید (M ۱) و ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷ ,۱۰mM) مخلوط گردید و غلظت H_2O_2 در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت H_2O_2 در هر نمونه با کمک معادله حاصل از منحنی استاندارد محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: اندازه‌گیری کاتالاز به روش کار و همکاران (۱۹۷۶) صورت گرفت (۱۶) مقدار 50 میلی‌گرم بافت تازه گیاهی به مدت ۲ دقیقه در هاون چینی سرد با ۲میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH=۶/۸,۰/۱Mm) هموژن شد. عصاره‌ها در rpm۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و مقدار پروتئین محلول استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش چانس و مائلی (۱۹۵۵) (۷) همراه با تغییراتی جزئی انجام شد. ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH=۶/۸ ، ۵۰mM) و ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۰/۲ مولار به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن H_2O_2 به مخلوط واکنش شروع می‌گردد. میزان کاهش جذب نور در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به مدت 8 دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین به‌صورت $OD_{240}\ min^{-1}mg^{-1}Pr\Delta$ محاسبه شد (۷). اندازه‌گیری پروتئین محلول به روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام گرفت (۶) .

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: اندازه‌گیری پراکسیداز به روش رولی و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد (۲۳). ۰/۱ گرم بافت تازه گیاهی در۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH=۷,۰/۱mM) به مدت ۲ دقیقه در هاون سرد هموژن شد. عصاره‌ها در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و مقدار پروتئین محلول استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۴۵۰ میکرولیتر H_2O_2 (۲۰mM) و۴۵۰ میکرولیتر گلایکول ۲ درصد مخلوط شدند و میزان تغییرات جذب در طول 3 دقیقه و در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم به صورت $OD_{510}\ min^{-1}mg^{-1}Pr\Delta$ بیان شد (۱۷). اندازه‌گیری پروتئین محلول به روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام گرفت (۶).

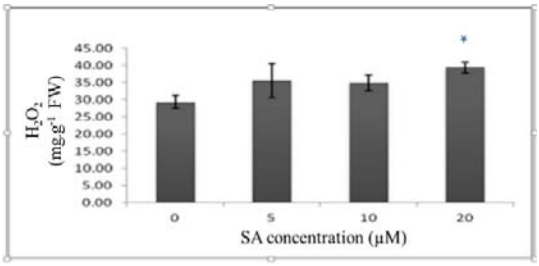
سنجش فعالیت آنزیم پلی‌آمین اکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت پلی‌آمین اکسیداز به روش Smith (۱۹۷۴) همراه با تغییرات جزئی انجام شد (۲۵). ۰/۰۶۵ گرم بافت تازه گیاهی در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (۱۰۰mM ، pH=۶/۵) به مدت ۲ دقیقه در هاون سرد هموژن شد. عصاره‌ها در rpm ۱۲۰۰۰به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و مقدار پروتئین محلول استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۵۰ میکرولیتر گلایکول (۲۵mM) و ۵۰ میکرولیتر پراکسیداز HRP ($1mg.ml^{-1}$) مخلوط شد و پس از انکوبه‌شدن بمدت ۲ دقیقه در دمای اتاق (۲±۲۳ درجه سانتی گراد)، ۵۰ میکرولیتر اسپرمین ($0/5mg.ml^{-1}$) به مخلوط واکنش اضافه شد. تغییرات جذب بین زمان‌های ۰ و ۶۰ دقیقه و در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV - Visble مدل Specord210-anallytikjena اندازه‌گیری شدند. فعالیت آنزیم به‌صورت $OD_{470}\ min^{-1}mg^{-1}Pr\Delta$ بیان شد (۱۸). اندازه‌گیری پروتئین محلول به روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام گرفت (۶).

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها: آزمایشات در قالب طرحهای کاملاً تصادفی (CRD) انجام شد. برای تعیین اختلاف معنی‌داری بین تیمارها آنالیز واریانس یک‌طرفه

(One- Way ANOVA) انجام شد. بمنظور بررسی میانگین‌های تیمارهای معنی‌دار شده (ویا دارای احتمال معنی‌دار) از آزمون LSD در سطح احتمال ($P\leq$۰,۰۵) استفاده شد. آزمایشات با ۵ تکرار صورت گرفت و آنالیز آماری آنها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 18) انجام شد.

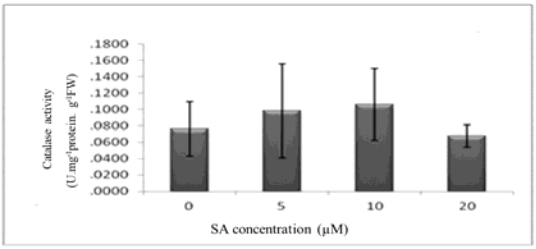
نتایج

نتایج حاصل از بررسی H_2O_2 نشان داد که مقدار H_2O_2 در کالوس آویشن دنایی تیمار شده با سالیسیلیک اسید افزایش یافت. همزمان با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید میزان H_2O_2 روند صعودی نشان داد. به‌طوری که در تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید، میزان H_2O_2 در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد سالیسیلیک اسید) به مقدار ۱/۴۳ برابر افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱).

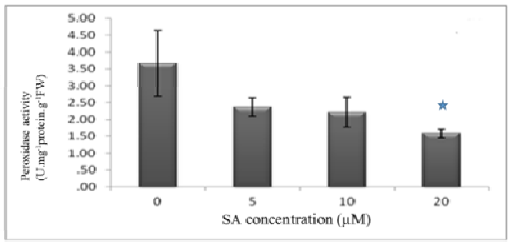


شکل۱- تأثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۲۰و ۵۰ میکرومولار) سالیسیلیک اسید بر میزان H_2O_2 در کالوس آویشن دنایی پس از ۱۴ روز. مقادیر میانگین ۵ تکرار ± خطای معیار می‌باشد. تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P\leq$۰,۰۵ نشاندار می‌باشد

سالیسیلیک اسید بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد بررسی (کاتالاز و پراکسیداز کل محلول) تأثیر متفاوتی داشت. نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید نشان می‌دهد که حضور کالوسها در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید تغییر محسوسی بر فعالیت کاتالاز ایجاد نمی‌کند (شکل۲). درحالیکه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوسهای تیمار شده با سالیسیلیک اسید نسبت به کالوس تیمار شاهد کاهش یافت. نتایج نشان داد که سالیسیلیک اسید بازدارنده فعالیت پراکسیداز می‌باشد که این اثر بازدارندگی در غلظت ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به سایر غلظت‌ها بیشتر و معنی‌دار می‌باشد. بطوریکه فعالیت آنزیم پراکسیداز در این تیمار نسبت به شاهد در حدود ۲/۵ برابر کاهش یافت (شکل ۲).

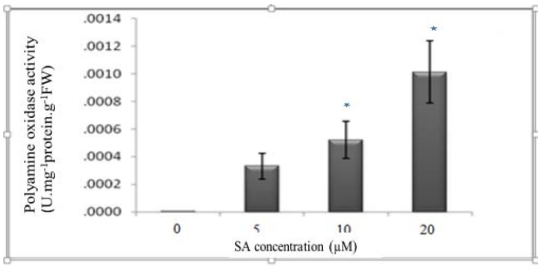


شکل۲- تأثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۲۰و ۵۰ میکرومولار) سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت کاتالاز در کالوس آویشن دنایی پس از ۱۴ روز. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±خطای معیار می‌باشد. در سطح احتمال $P\leq$۰,۰۵ تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها مشاهده نشد



شکل۳- تأثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰، ۲۰و ۵۰ میکرومولار) سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت پراکسیداز در کالوس آویشن دنایی پس از ۱۴ روز. مقادیر میانگین ۵ تکرار ± خطای معیار می‌باشد. تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P\leq$۰,۰۵ نشاندار می‌باشد

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم پلی آمین اکسیداز در غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید نشان داد که اثر غلظت سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت این آنزیم معنی‌دار می‌باشد. بطوریکه در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید روند صعودی معنی‌داری در فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل۴). بنابراین سالیسیلیک اسید محرک فعالیت پلی امین اکسیداز است و این تأثیر وابسته به غلظت سالیسیلیک اسید می‌باشد (شکل۴).



شکل۴- تاثیر غلظتهای مختلف (۰، ۱۰، ۲۰و ۵۰ میکرومولار) سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت پلی آمین اکسیداز در کالوس آویشن دنایی پس از ۱۴روز. مقادیر میانگین ۵ تکرار ± خطای معیار می‌باشد. تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال P≤۰,۰۵ نشاندار می‌باشد

بحث و نتیجه‌گیری

در گیاهان H_2O_2 بعنوان یک‌گونه فعال اکسیژن در بسیاری از تنشهای زیستی و غیر زیستی ایفای نقش می‌کند (۱۴). اما مقادیر بالای این ماده بعنوان یک تنش اکسیداتیو بشمار می‌رود (۱۴). سطوح تولید و پاکسازی این ماده هر دو در هموستازی این ماده نقش دارند. یکی از راههای تولید H_2O_2 در سلول ، آنزیم پلی آمین اکسیداز می‌باشد (۲۱). مسیرهای پاکسازی H_2O_2 شامل مسیرهای آنزیمی (مثل آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز) و مسیرهای غیر آنزیمی است (۴).

تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید باعث تغییر در متابولیسم پلی آمینها می‌شود (۱۲). پلی آمین اکسیداز آنزیم کاتابولیسم کننده پلی آمین‌ها می‌باشد که یکی از محصولات واکنش این آنزیم H_2O_2 است (۲۱). بنابراین تغییر در فعالیت این آنزیم می‌تواند بر میزان H_2O_2 مؤثر باشد. در پژوهش حاضر تاثیر سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم پلی آمین اکسیداز در کالوسهای آویشن دنایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز به‌عنوان آنزیم‌های پاکسازی کننده H_2O_2 نیز اندازه‌گیری شد.

همان‌طور که در نتایج مشاهده شد، افزایش H_2O_2 می‌تواند از طریق تاثیر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی آمین اکسیداز صورت بگیرد. آنزیم‌های متعددی ازجمله آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در شرایط تنش باعث پاکسازی H_2O_2 می‌شوند. آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شدید (نظیر غلظتهای بالای سالیسیلیک اسید) که H_2O_2 تجمع زیادی دارد می‌تواند فعال شود و با پاکسازی H_2O_2 مانع آسیب اکسیداتیو شود. تاثیر سالیسیلیک اسید بر فعالیت کاتالاز در مورد چند گیاه بررسی‌شده و اثر بازدارنده سالیسیلیک اسید بر روی فعالیت این آنزیم مشاهده شده است. در این مطالعات صورت گرفته غلظت سالیسیلیک اسید بسیار بالا بوده‌است که باعث افزایش ناگهانی H_2O_2 شده است (۱۱). افزایش H_2O_2 بعنوان تنش اکسیداتیو باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌گردد (۴). در پژوهش حاضر غلظتهای خیلی کم سالیسیلیک اسید بکار گرفته‌شده است. نتایج حاصله نشان داده است که در چنین شرایطی سالیسیلیک اسید بر روی کاتالاز تاثیر نداشته ولی باعث افزایش ملایم مقدار H_2O_2 گردید. سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم اکسیداتیو پراکسیداز نیز تاثیر بازدارنده دارد (۱۸). این تاثیر بازدارنده در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد. پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز به تیمار سالیسیلیک اسید حساسیت بیشتری را نشان داد. این موضوع بیانگر آن است که افزایش H_2O_2 می‌تواند در نتیجه کاهش فعالیت پراکسیداز باشد. اما افزایش H_2O_2 فقط درنتیجه کاهش فعالیت پراکسیداز نمیباشد.

پیش تیمار بذر گندم (*Triticum aestivum*) با غلظت 0.5 میلی مولار سالیسیلیک اسید باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (۱). همچنین سالیسیلیک اسید باعث کاهش فعالیت این آنزیم در گیاه ریحان (*Octimum basilicum*) گردید (۲).از آنجایی که سالیسیلیک اسید بازدارنده فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد و چون این آنزیم باعث پاکسازی هیدروژن پراکسید می‌گردد، با کاهش فعالیت این آنزیم هیدروژن پراکسید افزایش میابد (۱۱). هیدروژن پراکسید در غلظتهای بالا سمی بوده و توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پاکسازی میگردد، اما در غلظتهای پایین نقش

سیگنال را در فرآیندهای انتقال پیام بازی می‌کند و باعث فعال شدن ژنهای وابسته به مقاومت در گیاه میشود (۱۰). همچنین گزارشاتی مبنی بر تغییر در الگوی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش عناصر سنگین و دیگر تنش‌های غیرزنده، تحت تیمارهای سالیسیلیک اسید و بدون آن ارائه شده‌است (۲۰). این نتایج بیان میدارد که سالیسیلیک اسید با اتصال به کاتالاز باعث کاهش فعالیت آن در توتون (۸) و چندگونه دیگر گیاهی (۲۴) میشود. اما در پژوهش حاضر به علت پایین بودن غلظت سالیسیلیک اسید بکار رفته، این اثر بازدارنده روی کاتالاز مشاهده نشد.

سالیسیلیک اسید در غلظتهای بالاتر به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان میشود. این ماده بعنوان سوبسترای دهنده الکترون برای آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز عمل می‌نماید. در بیشتر موارد مشاهده شده‌است که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۱ میلی مولار فعالیت آنزیم را در مقایسه با غلظت ۰/۵ میلی مولار که کاهنده فعالیت آنزیمی بود، افزایش می‌دهد. این‌طور به نظر مارسد که این افزایش غلظت خود به‌صورت یک تنش در گیاه عمل می‌کند که باعث ارتقای سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی گیاه میشود. در ذرت نیز پیش تیمار بذر با سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان میشود (۱۵).

نتایج جدید بدست آمده، چند نوع پلی آمین‌اکسیداز را در سلول گیاهی نشان می‌دهند که شامل پلی آمین‌اکسیدازهای آپوپلاستی، پراکسی‌زومی و سیتوپلاسمی می‌باشند. آنزیم پلی آمین‌اکسیداز، اسپرمین و اسپرمیدین را اکسید کرده و یکی از محصولات جانبی این واکنش H_2O_2 می‌باشد. تولید H_2O_2 از طریق آنزیم پلی آمین اکسیداز بدو صورت انجام می‌پذیرد. به‌طورکلی در گیاهان انجام واکنش تبدیل اسپرمین و اسپرمیدین به پوترسین و از طرف دیگر اکسیداسیون اسپرمین و اسپرمیدین در آپوپلاست نقش مهمی دارد (۹و ۲۱). همچنین سطح H_2O_2 آپوپلاستی نقش کلیدی در تنظیم رشد سلول و توسعه و لیگنینی شدن دیواره سلولی دارد (۲۲). پلی آمین اکسیداز اندازه‌گیری شده در این پژوهش، نوع آپوپلاستی می‌باشد.

بر اساس نتایج این پژوهش، نقش سالیسیلیک اسید در تغییرات مقدار پلی آمینها احتمالاً از طریق تنظیم فعالیت پلی آمین اکسیداز آپوپلاستی و مقدار H_2O_2 آپوپلاستی اعمال میشود و از این طریق می‌تواند یکی از دلایل کاهش شیشه‌ای شدن در آویشن دنایی باشد. مطالعات صورت گرفته نقش احتمالی تغییرات در متابولیسم پلی آمینها را در فرآیند لیگنینی شدن و کاهش شیشه‌ای شدن تقویت می‌کند (۵و ۱۲). به عبارتی طبق نتایج حسن نژاد و همکاران (۲۰۱۱) سالیسیلیک اسید بر متابولیسم پلی آمین‌ها مؤثر است (۱۲). این فرضیه وجود دارد که این امر از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم پلی آمین اکسیداز صورت می‌گیرد. نتایج پژوهش حاضر این فرضیه را تقویت کرد. بنابراین سالیسیلیک اسید می‌تواند با تاثیر بر روی فعالیت پلی آمین اکسیداز، روی متابولیسم پلی آمین‌ها تاثیر داشته و باعث کاهش شیشه‌ای شدن گردد.

منابع

۱- دولت‌آبادیان، آ.، ثانوی، ع.، و اعتمادی، ف.، ۱۳۷۸. اثر پیش تیمار سالیسیلیک اسید بر جوانه‌زنی بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش شوری، مجله زیست‌شناسی ایران، ۱۲ (۴)، صفحات ۶۹۲-۷۰۲.

۲- قیصری، س.، سعیدنعمت پور، ف.، و صفی‌پور افشار، ا.، ۱۳۹۴. اثر سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر محتوای رنگیزه های فتوسنتزی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه ریحان (*Octimum basilicum*) تحت تنش سرب، مجله زیست‌شناسی ایران ۲۸ (۴)، صفحات ۸۱۴-۸۲۵.

3- Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Konez, C., Carrasco, P., and Tiburcio, A. F., 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta, 23(6), PP: 1237-1249.

4- Apel, K., and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol, 55, PP: 373–399.

5- Bernard, F., Navvab Moghadam, N., and Mirzajani, F., 2015. The effect of colloid silver nanoparticles on the level of lignification and hyperhydricity syndrome in *thymus daenensis* vitro shoots: a possible involvement of bonded polyamines, Plant Physiol. Biochem, 51, PP: 40-46.

6- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sesitivemethod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding, Anal. Biochem, 72, PP: 248-254.

7- Chance, B., and Maehly, A. C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymol, 11, PP: 764-755.

8- Chen, Z., Ricigliano, J. R., and Klessig, D. F., 1993. Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 90, PP: 9533-9537.

9- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., Tavladoraki, P., 2006. Functions of amine oxidases in plant development and defense. Trends Plant Sci, 11, PP: 80–88.

10- -Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., and Scott, I. M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathioneassociated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling. Plant Physiol, 100, PP: 241– 254.

11- Harvath, E., Janda, T., Szalai, G., and Paldi, E., 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance, Plant science, 163, PP: 1129-1135.

12- Hassannejad, S., Bernard, F., Mirzajani, F., and Gholami, M., 2011. S. A., improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. Plant Physiol. Biochem., In vitro cell Dev. Biol- Plant, 51, PP: 546-553. doi:10.1016/j.plaphy.2011.10.006.

13- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., and Ahmad, A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment. A review. Environ. Exper. Bot., 68, PP: 14–25.

14- Hung, S. H., Yu, C. W., and Lin, C. H., 2005. Hydrogen peroxide function as a stress signal in plants. Bot Bull Acad Sin, 46, PP: 1–10.

15- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., and Paldi, E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (Zea mays L.) plants. Planta, 208, PP: 175-180.

16- Kar, M., and Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol, 57, PP: 315-319.

17- Kusano, T., and Suzuki, H., 2015. Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism. Edts, Springer, 336 p.

18- Maksimov, I. V., Surina, O. B., Sakhabutdinova, A. R., Troshina, N. B., and Shakirova, F. M., 2004. Changes in the phytohormone levels in wheat calli as affected by salicylic acid and infected with Tilletia caries, a bunt pathogenic agent. fiziol. rast. (Moscow), vol. 51, PP: 256–261. (Russ. J. Plant Physiol., Engl. Transl.).

19- Marco, F., Alcazar, R., Tiburcio, A. F., and Carrasco, P., 2011. Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses unraveled by transcriptome analysis of polyamine overproducers. OMICS 15, PP: 775-781. Doi: 10.1089/ omi.2011.0084.

20- Matewally, A., Finkemeir, I., Georgi, M., and Dietz, K. J., 2003. Salicylic acid alleviates cadmium toxicity in barley seedlings, Plant Physiol, 132, PP: 272-281.

21- Moschou, P. N., Paschalidis, K. A., and Roubelakis-Angelakis, K. A., 2008. Plant polyamine catabolism: The state of the art. Plant signal. Behav, 3, PP: 1061-1066.

22- Rodriguez, A. A., Maiale, S. J., Menendez, A. B., and Adolfo, O., 2009. Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. Journal of Exp. Bot. 60(15), PP: 4249-4262.

23- Ruley, A. T., Sharma, N. C., and Sahi, S. V., 2004. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. Plant Physiol. Biochem, 42, PP: 899–906.

24- Sanchez-Casas, P., and Klessig, D. F., 1994. A salicylic acid-binding activity and a salicylic acidinhibitable catalase activity is present in a variety of plant species. Plant Physiol, 106, PP: 1675-1679.

25- Smith, T. A., 1974. Polyamine oxidation by enzymes from *Hordeum vulgare* and *Pisum sativum* seedlings. Phytochem, 13, PP: 1075-1081.

26- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci, 152, PP: 59-66.

Stimulatory effect of salicylic acid on polyamine oxidase activity in callus of *Thymus daenensis* L.

Shahroodi E.,[1] Bernard F.,[1] Minaee Tehrani D.[2] and Hassani S.B.[1]

[1] Dept. of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University G.C., Tehran, I.R. of Iran

[2] Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University G.C., Tehran, I.R. of Iran

Abstract

According to previous studies, salicylic acid decreases the hyperhydricity in *Thymus daenesis* and this event might be due to the effect on polyamines metabolism. Polyamine oxidase enzyme catabolizes the polyamines in the cell and one of its byproducts is hydrogen peroxide (H_2O_2). Purpose of this study is analyses of salicylic acid effect on polyamine oxidase activity in *thymus daenensis* callus. In this study, the activity of polyamine oxidase, content of H_2O_2, and responses of enzymatic antioxidant including catalase and peroxidase was measured. Results showed that salicylic acid (concentrations of 10 and 20 µM) caused an increase in polyamine oxidase activity in a dose dependent manner. In callus under salicylic acid treatment (20 µM) a decrease in soluble peroxidase activity and an elevated H_2O_2 content was observed. Increase of H_2O_2 might be due to the influence of salicylic acid on polyamine oxidase and peroxidase activities. While variations in H_2O_2 levels resulted in no changes of catalase activity. Regulation of H_2O_2 level by salicylic acid through its effect on polyamine oxidase activity might contribute to ROS homeostasis, which is necessary for *in vitro* developmental processes in plant cells.

Key words: Catalase, Hydrogen peroxide, Peroxidase, Polyamine oxidase, *Thymus daenesis* L.