

تأثیر متیل جاسمونات بر متابولیت‌های ثانویه گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

فائزه قناتی^{۱*}، سمیه بختیاریان^۲، پرویز عبدالمالکی^۳

۱- دانشجویار علوم گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

*تهران، صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵

ghangia@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۴/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۶)

چکیده- برای بررسی تأثیر متیل جاسمونات بر متابولیت‌های ثانویه گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، گیاهان به مدت ۱۰ روز در کشت هیدروپونیک با محلول غذایی هوگلند (۱/۲) قرار گرفتند و سپس با ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر متیل جاسمونات تیمار شدند. محتوای لیگنین در ریشه گیاهان تیمار شده، کاهش و در بخش هوایی، افزایش معنی‌داری، در مقایسه با گیاهان شاهد، نشان داد. محتوای کل فنل‌های متصل به دیواره، در ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد، افزایش و در بخش هوایی، کاهش نشان داد. محتوای آنتوسیانین‌های ریشه، تنها با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار، کاهش یافت ولی در بخش هوایی کاهش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین در هر دو غلظت، در مقایسه با گیاهان شاهد، مشاهده شد. محتوای کل فلاونوئید در اندام هوایی گیاهان تیمار شده، کم‌تر از گیاهان شاهد بود. میزان پراکسید شدن لیپیدهای غشا، هم در ریشه و هم در اندام هوایی، در تیمارها در مقایسه با گیاهان شاهد تغییر معنی‌داری نداشت. ترکیب غالب مشاهده شده در اسانس، α -Cadinol بود. القای سسکویی ترپن ضد قارچ α -Muureloene در تیمار با متیل جاسمونات و افزایش آن در غلظت‌های بالاتر، پیشنهاد می‌کند که می‌توان از متیل جاسمونات برای القای تغییر در مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها و تولید فیتو الکسین‌های خاص استفاده کرد.

کلیدواژه‌گان: اسانس، متابولیت‌های ثانویه، متیل جاسمونات، همیشه بهار.

۱- مقدمه

در دهه ۱۹۶۰، جاسمونات‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در اسانس گیاه گل یاس (*Jusmin Sp.*) یافت شدند. دو دهه پس از شناسایی اولیه جاسمونات‌ها، نخستین تأثیرهای فیزیولوژیکی آن‌ها شناسایی شد و این مواد

جاسمونیک اسید (JA)، مشتقات آن و پیش‌سازهایش که تحت عنوان جاسمونات‌ها شناخته می‌شوند (شکل ۱)، برای انجام پدیده‌های مختلف در گیاه ضروری است.

روشی معین در طول گیاه حرکت می‌کنند و باعث بیان شدن ژن‌های دفاعی خاصی در گیاه می‌شوند [۶-۵].

۳- مثال‌هایی از کاربرد خارجی متیل جاسمونات در کشت سلولی گیاهی

گیاهان به‌صورت موضعی و عمومی، با مولکول‌های علامت‌رسان مانند جاسمونات‌ها به تنش‌ها پاسخ می‌دهند [۷]. جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات به‌طور گسترده در گیاهان حضور دارند و پدیده‌های مختلفی مانند رسیدن میوه، تولید دانه‌ی زنده و فعال، رشد ریشه، پیچ خوردگی تندرل‌ها، پاسخ به زخم و تنش‌های غیرزیستی، دفاع در برابر میکروب‌های بیماری‌زا و حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۸-۳]. گزارش شده است که کاربرد خارجی متیل جاسمونات، باعث تجمع Paclitaxel در کشت تعلیقی سلول‌های تاکسوس [۹] و تجمع رزمارینیک اسید در کشت تعلیقی سلول‌های *Lithospermum erythrorhizon* شد [۱۰].

گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی یک‌ساله، متعلق به خانواده Asteraceae است که اغلب از آن به‌عنوان یک گیاه دارویی و زینتی استفاده می‌شود. این گیاه، دارای گل‌هایی به رنگ زرد تا نارنجی است و بومی مناطق مدیترانه‌ای است. گیاه همیشه بهار حاوی سسکویی‌ترین گلیکوزید، ساپونین، زانتوفیل، تریول‌ترین، فلاونوئید و ترکیبات فرار است [۱۱].

۴- اهداف تحقیق

در این تحقیق سعی شده است اثر متیل جاسمونات به‌عنوان یک الیسیتور شیمیایی، بر میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه مختلف تولید شده، بررسی شود.

به‌عنوان ترکیبات پیش‌برنده پیری، بازدارنده رشد، و محرک‌هایی برای متابولیسم ثانویه در گونه‌های مختلف گیاهی شناخته شدند [۱-۲]. در گیاهان عالی، جاسمونات و استر متیلی آن، متیل جاسمونات به‌عنوان فیتوهورمون‌هایی در نظر گرفته می‌شوند که گلدهی و پیری را در گیاه تنظیم می‌کنند و منجر به راه انداختن پاسخ‌های مربوط به دفاع و تنش می‌شوند [۳-۲].

۲- آثار جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر گیاهان

به‌طور معمول، از متیل جاسمونات خارجی، در کشت سلولی گیاهی برای فعال کردن متابولیسم ثانویه استفاده می‌شود، اما مطالعاتی که در مورد تأثیر آن بر رشد گیاه صورت گرفته است، نشان می‌دهد که جاسمونات‌ها، فعالیت‌های زیستی گوناگونی مانند بازدارندگی رویش و جوانه‌زنی دانه و دانه‌ی گرده و مهار رشد ریشه و دستگاه‌های فتوسنتزی، دارند [۴]. مولکول‌های علامت‌رسان مانند سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA) و متیل جاسمونات (MeJA)، تنظیم‌کننده‌های درونی رشد گیاه هستند که نقش‌های کلیدی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. این مولکول‌های علامت‌رسان در برخی از سیستم‌های انتقال علامت درگیرند و منجر به القای فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای می‌شوند که واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به تولید ترکیبات دفاعی مانند پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها، و پروتئین‌های وابسته به میکروب‌های بیماری‌زا (PR) را کاتالیز می‌کنند. نتیجه این فرایند، القا شدن پاسخ‌های دفاعی و محافظت گیاه در برابر حمله میکروب‌های بیماری‌زا است [۳-۵]. این مولکول‌های علامت‌رسان، وقتی به‌طور خارجی به‌کار برده شوند نیز با

۵- مواد و روش‌ها

گیاهان همیشه بهار همسن و همسان رشد یافته در خاک دارای نسبت ۱ به ۱ شن و خاک برگ، در مرحله زایشی انتخاب شدند. برای سازگاری و خروج مواد جذب شده قبلی، به مدت ۱۰ روز، به محیط کشت هایدروپونیک حاوی محلول غذایی پایه هوگلند ۱/۲ با اندکی تغییر، انتقال یافتند. ترکیب محلول غذایی هوگلند ۱/۲ ($\text{pH} = 6$) برحسب میلی مولار، به شرح زیر بود [۱۲].

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.713 ; NH_4NO_3 , 0.73; KH_2PO_4 , 0.1 K_2SO_4 , 0.46 ; CaCl_2 , 0.5; MgSO_4 , 0.41 ; Fe-EDTA , 0.032 ; H_3BO_3 , 0.046 ; CuSO_4 , 0.002 ; MnSO_4 , 0.09; Na_2MoO_4 , 0.0026; ZnSO_4 , 0.0091

شدت نور در سطح گیاهان، معادل $41 \mu\text{M} / \text{m}^2\text{s}$ ، دمای محیط، ۲۳ درجه و طول دوره روشنایی، ۱۶ ساعت بود. محیط‌های کشت به وسیله پمپ، هوادهی و هر ۴ روز یک بار تعویض می‌شد. گیاهان پس از سازگار شدن با شرایط محیط هایدروپونیک، به سه دسته تقسیم شدند. یک گروه، گیاهان شاهد و دو گروه دیگر که به ترتیب تحت تیمار با متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس نمونه‌های شاهد و تیمار شده برداشت شدند. پس از شست‌وشو با آب مقطر، اندام هوایی و ریشه گیاهان موردنظر، جدا و با نیتروژن مایع منجمد شد و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنالیزهای بعدی روی نمونه‌ها، با ۳ تکرار مستقل انجام شد.

۵-۱- آنالیزهای بیوشیمیایی

۵-۱-۱- استخراج دیواره سلولی

برای استخراج دیواره سلولی، اندام هوایی و ریشه گیاه به طور جداگانه در آب مقطر، کاملاً ساییده شدند و

سپس به مدت ۱۰ دقیقه در $1000 \times \text{g}$ سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل، ۲ بار، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه با اتانول مطلق شست‌وشو داده شد و پس از هر بار شست‌وشو با استفاده از پمپ خلاء بر روی قیف بوخنر، کاغذ صافی و نایلون مش صاف شد. رسوب حاصل به مدت یک شب در محلول متانول-کلروفرم (۱:۲) قرار گرفت. پس از صاف کردن، رسوب حاصل پس از یک ساعت با استون شسته شد و سپس در مجاورت هوا خشک شد. دیواره سلولی حاصل، برای سنجش لیگنین و فنل‌های متصل به دیواره استفاده شد [۱۲].

۵-۲- سنجش لیگنین

ماده خشک شده دیواره سلولی نمونه‌ها ساییده شد و پودر حاصل از الک ۱۵۰ میکرومتری رد شد. لیگنین موجود در دیواره سلولی با روش استیل بروماید تعیین و محاسبه شد. بدین منظور در لوله‌های در پیچ‌دار، به ۶ گرم پودر ساییده شده دیواره سلولی، ۲/۵ میلی‌لیتر استیل بروماید ۲۵ درصد در استیک اسید، حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۷۰ درصد اضافه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای تکان داده شد. سپس لوله‌ها در یخ سرد شدند و مخلوط حاصل در بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۲ نرمال و ۶ میلی‌لیتر استیک اسید صاف شد. و سپس حجم نهایی با استیک اسید به ۲۵ میلی‌لیتر رسید. محتوای لیگنین، با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب مخصوص ($\text{Specific Absorption Coefficient}$) SAC معادل $20 \text{ g}^{-1} \text{Lcm}^{-1}$ محاسبه شد [۱۳].

۳-۵- استخراج فنل‌های متصل به دیواره

به ۳۰ میلی‌گرم دیواره‌ی استخراج شده از هر یک از اندام‌های هوایی و ریشه، ۴ میلی‌لیتر آمونیوم آگزالات افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. پس از عصاره‌گیری توسط پمپ خلا، محلول رویی نگه داشته شد و این عمل دو بار دیگر بر رسوب تکرار شد و محلول رویی به محلول قبلی اضافه شد. سپس به رسوب حاصل از هر نمونه، ۴ میلی‌لیتر NaOH ۰/۱ مولار افزوده شد، سرلوله‌ها با پارافیلیم بسته شد و پس از ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. محلول حاصل به محلول‌های قبلی افزوده شد. از این محلول، ترکیبات فنلی طی ۳ بار و هر بار با ۳ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج شدند و محلول جدا شده با هوادهی خشک شد. رسوب حاصل که حاوی فنل‌های متصل به پکتین دیواره بود، در متانول مطلق حل شد و سپس با دستگاه HPLC (KNAUER, Germany) مجهز به ستون (ODS -80Ts Column 4/6×250 mm) در Flow rate ۰/۵ mL/min با شیب خطی ۳۰-۸۰ درصد متانول حاوی استیک اسید ۰/۱ درصد در طول موج ۲۸۰ نانومتر سنجش و اندازه‌گیری شد [۱۲]. غلظت ترکیبات فنلی، از مقایسه مساحت زیر منحنی با استانداردهای لازم (فرولیک اسید، سینامیک اسید، گالیک اسید، تانیک اسید و هیدروکسی بنزوئیک اسید) در غلظت‌های صفر تا $25 \mu\text{g. mL}^{-1}$ به دست آمد.

۴-۵- اندازه‌گیری آنتوسیانین تام

برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۲ گرم از هر یک از اندام‌های هوایی و ریشه‌های منجمد شده گیاه در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) خوب ساییده و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه

در $g \times 12000 \times$ سانتی‌فیوژ شد. محلول رویی پس از صاف شدن به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد و جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cintra6, GBC, Victoria, Australia) خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی $\text{Cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد [۱۴].

۵-۵- اندازه‌گیری فلاونوئید تام

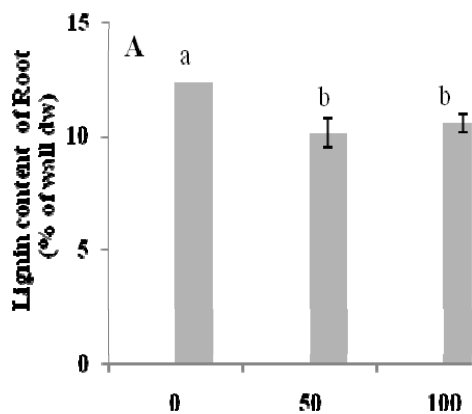
برای سنجش فلاونوئیدها ۰/۲ گرم توده سلولی منجمد شده در ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (اتانول و اسید استیک به نسبت ۹۹ به ۱)، خوب ساییده و به مدت ۱۵ دقیقه در $g \times 12000 \times$ سانتی‌فیوژ شد. پس از صاف کردن، محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن، توسط اسپکتروفوتومتر در سه طول موج، ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئیدها، از ضریب خاموشی $\text{Cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد [۱۵].

۶-۵- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

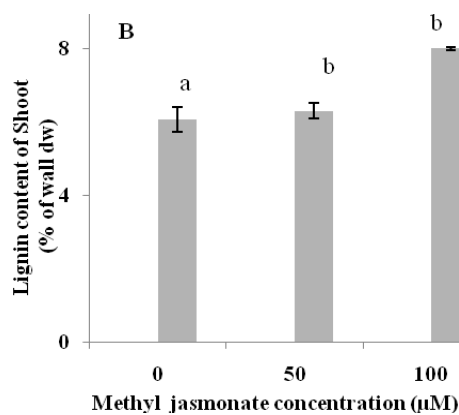
۰/۲ گرم از هر یک از بخش‌های هوایی و ریشه‌ی گیاه به طور جداگانه در ۳ mL محلول ۱۰ درصد TCA (تری کلرو استیک اسید) ساییده و به مدت ۱۵ دقیقه در $g \times 12000 \times$ سانتی‌فیوژ شد. به محلول رویی ۱ میلی‌لیتر از TBA (تیو باربیتوریک اسید) ۰/۲۵ درصد اضافه شد و در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از سرد شدن محلول، مقدار جذب در دو طول موج ۵۳۲nm و ۶۰۰nm سنجیده شد. میزان MDA (مالون دی آلدئید) به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا براساس تفاوت جذب

۶- نتایج

محتوای لیگنین ریشه گیاهان تیمارشده با متیل جاسمونات، کاهش معنی دار، (شکل ۱- الف) و در اندام هوایی، افزایش معنی داری را در مقایسه با گیاهان شاهد داشت (شکل ۱- ب).



(الف)



(ب)

شکل ۱ محتوای لیگنین موجود در گیاهان همیشه بهار

(*Calendula officinalis* L.)، در تیمار با متیل جاسمونات (MJ). (الف) ریشه، (ب) اندام هوایی. داده‌ها،

به دست آمده در این دو طول موج و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (Extinction Coefficient) معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ محاسبه شد [۱۶].

۵-۷- استخراج اسانس

ابتدا بخش هوایی نمونه‌های گیاهان شاهد و تیمار شده، در آون، در دمای 70°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند و سپس اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب، به مدت ۶ ساعت برای هر کدام از نمونه‌ها با دستگاه کلونجر انجام شد. اسانس حاصل روی آب در مبرد جمع‌آوری شد [۱۷]. سنجش درصد ترکیبات موجود در اسانس نمونه‌ها، به وسیله دستگاه گاز کروماتوگرافی - طیف‌سنجی جرمی (GC-MS, TRACE Thermoquest - Finnigan)، مجهز به ستون مویینه DB \bar{Q} به طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. برنامه دمایی آون ستون، از دمای اولیه 60°C درجه سانتی‌گراد تا دمای 250°C درجه سانتی‌گراد بود که در دقیقه، 5°C درجه سانتی‌گراد به آن افزوده می‌شد. طیف‌سنجی جرمی از نوع Quadrupole، دمای محفظه یونش 250°C درجه سانتی‌گراد، نوع گاز حامل، هلیوم و مقدار جریان گاز حامل، $1/1 \text{ mL/min}$ بود.

۵-۸- آنالیزهای آماری

همه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل، هر یک با سه نمونه، انجام شد. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها، از بسته نرم‌افزاری Excel استفاده شد. همچنین برای تعیین معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در بسته نرم‌افزاری SPSS استفاده شد. آنالیز اسانس به دلیل محدودیت دستگاهی تنها در یک تکرار انجام شد.

میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف معیار (میله‌های عمودی) است. حروف غیر یکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0/05$ است.

محتوای آنتوسیانین در ریشه گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات، ۵۰ میکرومولار کاهش داشت ولی در تیمار با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار، در مقایسه با گیاهان شاهد، تغییر معنی‌داری نداشت (شکل ۲- الف). در اندام هوایی، در هر دو غلظت از متیل جاسمونات، محتوای آنتوسیانین در مقایسه با گیاهان شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲- ب).

محتوای کل فنل‌های متصل به دیواره، در ریشه گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات، در مقایسه با گیاهان شاهد، افزایش یافت (جدول ۱) اما محتوای کل فنل‌های متصل به دیواره در اندام هوایی، در تیمارها در مقایسه با شاهد، کاهش پیدا کرد (جدول ۲).

جدول ۱ میزان فنل‌های متصل به پکتین در دیواره سلول‌های ریشه گیاهان همیشه بهار (*Calendula officinalis* L) در تیمار با متیل جاسمونات (MJ). داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل است.

MJ (μ M)	Ferulic Acid	Cinnamic Acid	Gallic Acid	Tannic Acid	Hydroxy Benzoic Acid	Total
(μ g /g Cell Wall DW)						
.	۳۶/۵۶ \pm ۱/۱	۶۸ \pm ۱/۷	N	N	۲۷/۷۶ \pm ۰/۵	۱۳۲/۳۲ \pm ۲/۰
۵۰	۴۳/۸۷ \pm ۲/۷	۶۸/۷۷ \pm ۴/۰	۴/۸۸	۱۷/۹ \pm ۰/۸	N	۱۳۵/۴۲ \pm ۴/۰ *
۱۰۰	۷/۹۵ \pm ۱/۰	۷۸/۶۵ \pm ۴/۸	N	۲۲/۲۷ \pm ۱/۰	۵۵/۰۳ \pm ۶/۳	۱۶۳/۹ \pm ۶/۳ **

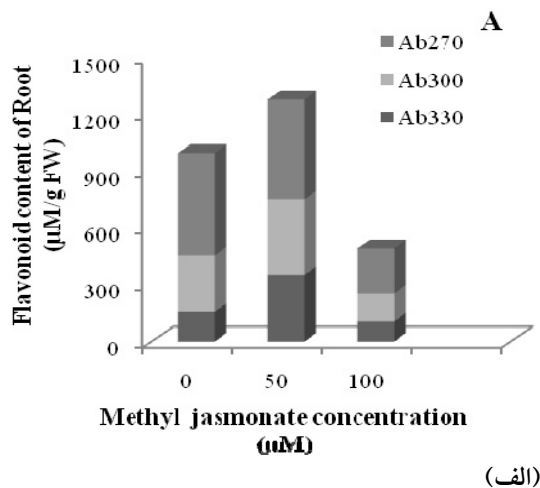
N، نمایانگر این است که ترکیب مورد نظر در تیمار مربوطه مشاهده نشده است.
* معرف تفاوت معنی‌دار در حد $P \leq 0/05$.
** معرف تفاوت معنی‌دار در حد $P \leq 0/005$ با شاهد است.

جدول ۲ میزان فنل‌های متصل به پکتین، در دیواره سلول‌های اندام هوایی گیاهان همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) در تیمار با متیل جاسمونات (MJ). داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل است.

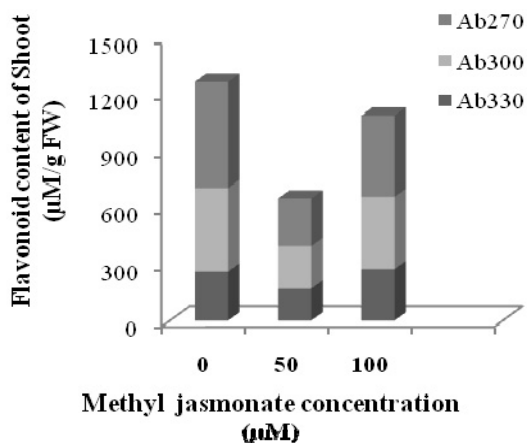
MJ (μ M)	Ferulic Acid	Cinnamic Acid	Gallic Acid	Tannic Acid	Hydroxy Benzoic Acid	Total
(μ g /g Cell Wall DW)						
.	۱۹/۱۹ \pm ۱/۰	۵۹/۴۷ \pm ۱/۰	۲۹/۵۱ \pm ۳/۲	۴۵/۸۵ \pm ۲/۷	N	۱۵۴/۰۲ \pm ۴/۵
۵۰	۴۳/۸۷ \pm ۲/۷	۳۶/۳۴ \pm ۲/۵	N	۵/۱۱ \pm ۱/۲	N	\pm ۲/۱ ** ۴۱/۴۵
۱۰۰	۱۷/۱۶ \pm ۱/۲	۵۲/۴۸۵ \pm ۲/۳	N	۳۵/۵۸ \pm ۱/۴	N	\pm ۳/۱ ** ۱۰۵/۲۲

N، نمایانگر این است که ترکیب مورد نظر در تیمار مربوطه مشاهده نشده است.
* معرف تفاوت معنی‌دار در حد $P \leq 0/05$.
** معرف تفاوت معنی‌دار در حد $P \leq 0/005$ با شاهد است.

ولی در تیمار با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار، تاحدی این کاهش را جبران کرد (شکل ۳-ب). تغییر در میزان فلاونوئید تام در ریشه و اندام هوایی، تحت تأثیر متیل جاسمونات، متأثر از تغییرات نسبی هر سه گروه فلاونوئیدی سنجش شده با سه طول موج مختلف بود.

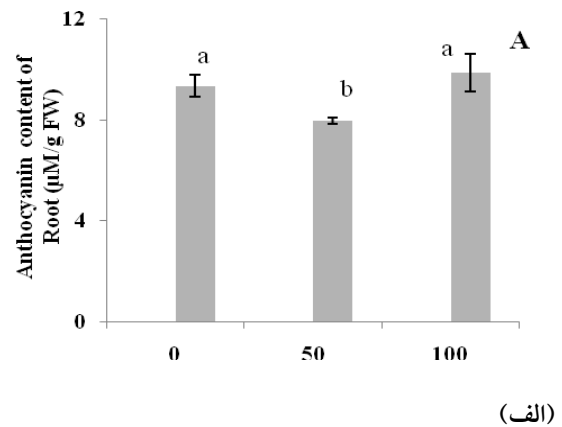


B

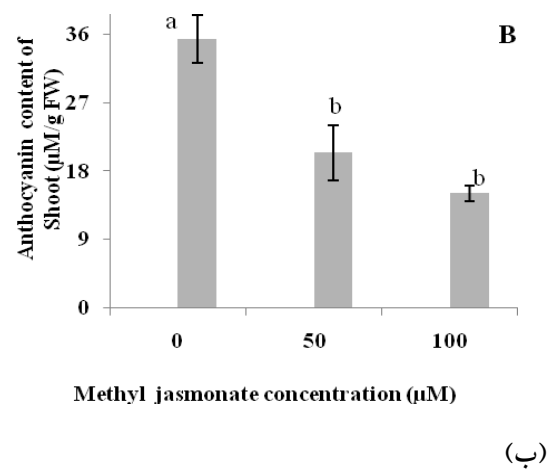


(ب)

شکل ۳ تغییرات میزان فلاونوئید موجود در گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (MJ) (الف) ریشه، (ب) اندام هوایی داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل است.



(الف)



(ب)

شکل ۲ میزان آنتوسیانین موجود در گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، در تیمار با متیل جاسمونات (MJ) (الف) ریشه، (ب) اندام هوایی داده‌ها میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف معیار (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

محتوای فلاونوئید تام ریشه گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار، در مقایسه با شاهد، افزایش معنی‌دار و در تیمار با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار، کاهش معنی‌دار یافت (شکل ۳-الف). محتوای فلاونوئید کل در اندام هوایی، در تیمار با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار، در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌دار نشان داد

نوع و غلظت ترکیبات مشاهده شده در اسانس گیاهان شاهد و تیمار در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، Δ -Cadinene در همه تیمارها، در مقایسه با شاهد افزایش یافته است. ترکیب Guaiol نیز در همه تیمارها در مقایسه با شاهد، کاهش یافت. δ -Cadinol، در مقایسه با کنترل، در هر دو تیمار، افزایش یافت. α -Cadinol نیز در مقایسه با شاهد، کاهش یافت. α -Cadinol، ترکیب غالب مشاهده شده در تیمارها و هم‌چنین شاهد بود. α -Muuroloene در گیاهان شاهد مشاهده نشد، در صورتی‌که در هر دو تیمار این ترکیب مشاهده شد و بیش‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بود. δ -Cadinene نیز در گیاهان شاهد مشاهده نشد، در حالی‌که در هر دو تیمار، این ترکیب مشاهده شد و بیش‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بود.

جدول ۳ ترکیبات مهم موجود در اسانس گیاهان همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، در تیمار با متیل جاسمونات (MJ).

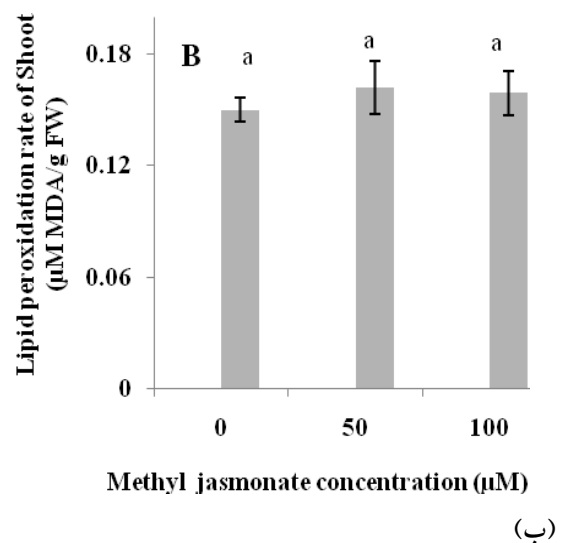
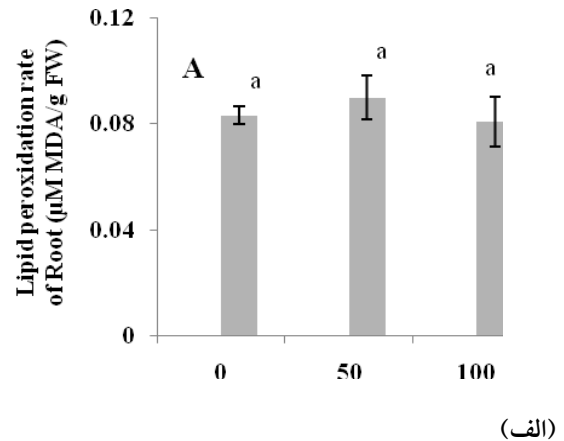
MJ (mM)	Δ -Cadinene	Guaiol	δ -Cadinol	α -Cadinol	α -Muuroloene	δ -Cadinene
۰	۴/۳۸	۶/۵۱	۴/۷۵	۸۴/۳۶	N	N
۵۰	۷/۲	۴/۱۵	۶/۱۱	۷۷/۱۶	۰/۴۴	۰/۵۹
۱۰۰	۶/۴۶	۴/۳۹	۶/۵۹	۸۰/۰۸	۰/۹۱	۰/۵۱

N، نمایانگر این است که ترکیب مورد نظر در تیمار مربوطه مشاهده نشده است.

۷- بحث

فنیل پروپانوییدها، متابولیت‌های ثانویه‌ای است که به‌طور گسترده در گیاهان منتشر شده و عملکردهای مختلف و متنوعی دارد. هنگامی‌که گیاهان در معرض تنش‌های محیطی، مانند جراحت و میکروب‌های بیماری‌زا قرار

تفاوت معنی‌داری بین سرعت پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ریشه و اندام هوایی گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات و گیاهان شاهد مشاهده نشد (شکل ۴).



شکل ۴ میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در گیاهان همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، در تیمار با متیل جاسمونات (MJ). الف) ریشه، ب) اندام هوایی. داده‌ها، میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف معیار، (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان معرف تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

می‌گیرند، بیوستز ترکیبات فنیل پروپانوییدی نظیر فنل‌های متصل به دیواره، لیگنین، فلاونوئیدها، و آنتوسیانین‌ها افزایش می‌یابد [۱۸].

مطالعات انجام شده نشان داده است که تیمار با متیل جاسمونات، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش آسیب به‌وسیله تنش دمایی پایین (chilling injury)، در گیاه شده و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوستز لیگنین، یعنی PAL، POD و PPO می‌شود [۱۹]. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد جاسمونات‌ها، افزایش تجمع H_2O_2 را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۰-۲۱]. برای مثال، تیمار با متیل جاسمونات، باعث تسریع تجمع H_2O_2 در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی شد [۲۱]. براساس مطالعات انجام شده، کاربرد خارجی متیل جاسمونات می‌تواند سبب افزایش تجمع آنتوسیانین‌ها در گیاه گردد [۲۲-۲۳]. آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی است که از گیاه در برابر واکنش‌های فتودینامیک آسیب رساننده، با سرکوب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، حفاظت می‌کنند. مطالعات انجام شده، مشخص کرده است که کاربرد ترکیباتی که به‌طور طبیعی یافت می‌شوند، مانند متیل جاسمونات می‌تواند باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه شود. برای مثال، تیمار گیاهان توت سیاه با متیل جاسمونات، محتوای فلاونوئید را به‌طور معنی‌دار در این گیاهان افزایش داد [۲۴]. فلاونوئیدها (ترکیبات فنلی گیاهی) در سیتوپلاسم و نیز سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی، سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، نقش حفاظتی دارند. اکسیداسیون فلاونوئیدها (به ویژه ۰-دی فنل‌ها) در شرایط تنش، سبب تولید ترکیبات جاروب‌کننده H_2O_2 ، مانند سمی کوئینون‌ها و کوئینون‌ها می‌شود [۲۵]. تحقیقاتی که روی جهش

یافته‌های حساس به کمبود نیتروژن در آرابیدوپسیس انجام شده است، نشان داد که این حساسیت، با کاهش بیوستز آنتوسیانین و بالعکس با افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوستز لیگنین همراه است [۲۶]. محققین چنین استنتاج کرده‌اند که عامل سازگاری تیپ وحشی گیاه آرابیدوپسیس با شرایط تنش کمبود نیتروژن، تغییر مسیر متابولیسم فنیل پروپانوییدها از لیگنین به سمت افزایش فنل‌های محلولی نظیر آنتوسیانین است [۲۶]. در تحقیق حاضر کاهش بیوستز لیگنین ریشه در تیمار با ۵۰ میلی مول متیل جاسمونات، با افزایش سنتز فنل‌های منفرد متصل به دیواره و نیز افزایش فلاونوئیدها همراه شد. حال آن‌که در ساقه، افزایش معنی‌دار لیگنین در هر دو غلظت به‌کار رفته از متیل جاسمونات، سبب کاهش جریان منوفنل‌ها به سوی بیوستز فلاونوئید و آنتوسیانین شد.

گزارش شده است که کاربرد خارجی متیل جاسمونات، می‌تواند منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن شود. این گونه‌ها منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا با تولید مالون دی‌آلدهید و افزایش سطح آن می‌شوند. در تحقیق حاضر، میزان MDA تولید شده در تیمار با متیل جاسمونات، هم در ریشه و هم در اندام هوایی، در مقایسه با گیاهان شاهد، تغییر معنی‌داری نداشت که نشان می‌دهد گیاه همیشه بهار قادر است با ایجاد تعادل بین فرآورده‌های مختلف فنیل پروپانوییدی غشاهای خود را از خطر تخریب اکسیداتیو در مقابل متیل جاسمونات، تا غلظت ۱۰۰ میکرومول حفظ کند. تحقیقات تکمیل‌کننده‌ای لازم است تا حد توان و استراتژی این گیاه را در برخورد با غلظت‌های بالاتر متیل جاسمونات، مشخص کند.

مطالعات نشان داده است که عوامل محیطی و فاکتورهای تنش‌زا، همواره ترکیب شیمیایی و اسانس

- [3] Creelman, R.A., Mullet, J.E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 4114 - 4119.
- [4] Rossato, L., Le Dantec, C., Laine, P., Ourry, A. (2002). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: identification, and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. J. Exp. Bot. 53: 265 - 275.
- [5] Kozlowski, G., Buchala, A., M'etraux, J.P. (1999). Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 53 - 58.
- [6] Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell. 9: 509 - 520.
- [7] Hendravati, O., Yao, Q., Kim, H.K., Linthorst, H., Erkelens, C., W.M. Lefeberg, A., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2006). Metabolic differentiation of *Arabidopsis* treated with methyl jasmonate using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Phytochemistry 67: 1033-1044.
- گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. برای مثال، افزایش محتوای اسانس موجود در برگ نعنای، تحت تنش اسمزی، گزارش شده است [۲۷]. در این تحقیق، به دلیل مقدار کم اسانس استخراج شده، محاسبه بازده اسانس مقدور نبود و فقط نوع ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس و درصد آن‌ها محاسبه شد. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، ترکیب غالب مشاهده شده در همه تیمارها و شاهد، α Cadinol بود که با گزارش‌های سایر محققین در مورد اسانس همیشه بهار مطابقت دارد [۱۱-۲۸]. تیمار گیاه با ۵۰ میکرومول متیل جاسمونات سبب سنتز سسکویی ترپن α -Muureloene توسط گیاه و بروز آن در اسانس شد. میزان این ماده در تیمار با ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات به دو برابر افزایش یافت. با توجه به فعالیت ضد قارچی α -Muureloene علیه برخی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، مانند *Cladosporium cucumerinum* [۲۹-۳۰]، می‌توان تیمار گیاهان با متیل جاسمونات را برای القای تغییر در مسیر بیوسنتزی ترکیبات ایزوپرنوئیدی و تولید فیتو الکسین‌های خاص پیشنهاد کرد.

۸- مراجع

- [1] Balbi, V., Devoto, A. (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*, crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. New Phytol. 177: 301 - 318.
- [2] Wasternack, C., Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. Trends Plant Sci. 2: 302-307.

- procedure. *J.Sci.Food Agric.*51: 145 - 161.
- [14] Masukasu, Hara., Karin, Oki., Kyoto, Hoshino. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls; *Plant Science.* 164: 2: 259 - 265.
- [15] Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadyaya, A., Mirecki, R.M. (1993). UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiol. Plant.* 88: 350 – 358.
- [16] Cakmak, I. Horst, W.J. (1991). Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Plant Physiology* 83:463–468.
- [17] Mechkovski, A., Akerele, CO. (1992). Quality control methods for medicinal plant materials, WHO/PHARM/92.559. World Health Organization, Switzerland.
- [18] Kim, DG., Kim, YJ., Lee, SH., Lee, I. (2005). Effect of Wounding and Chemical Treatments on Expression of the Gene Encoding Cinnamate-4-Hydroxylase in *acuminata* Leaves. *Plant Biol.* September. 48(3): 298-303.
- [19] Cao, Sh., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., Tang, Sh. (2009). Effect of methyl resonance spectroscopy. *Plant Science.* 170: 1118 - 1124.
- [8] Turner, J.G., Ellis C., A. Devoto. (2002). The jasmonate signal pathway, *Plant Cell Suppl.* 153 - 164.
- [9] Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y., Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures, *Nat. Biotechnol.* 14: 1129 – 1132.
- [10] Mizukami, H., Tabira, Y., Ellis, B.E. (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures, *Plant Cell Rep.* 12 : 706 - 709.
- [11] Chalchat, J.C., Garry, R.Ph., Michet, A. (1991). Chemical Composition of Essential Oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). *Flavour Fragrance J.* 6: 189 - 192.
- [12] Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H. (2005). Induction of Suberin and Increase of Lignin Content by excess Boron in Tobacco Cells. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48(3) : 357 - 364.
- [13] Iiyama, K. Wallis, A.F.A. (1990). Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide

- antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes anti proliferation and promotes anti proliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*.107: 1261 - 1269.
- [25] Pourcel L, Routaboul J.M.,Cheynier V.,Lepiniec L, Debeaujon I.(2006). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological Functions .*Trends in plant Science*.12,1
- [26] Peng M., Hudson D., Schofield A.,Tsao R.,Yang R., Gu H., Bi Y.M., Rothstein S.J. (2008). Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *Journal of Experimental Botany* 59 (11):2933-44.
- [27] Charles, JD., Simon, JE.(1990). Composition of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *J. Amer.Soc.Hort.Sci*.115: 458 - 462.
- [28] Gazim Z.C., Rezende C.M., Fraga S.R., Svidzinski T.I.E., Cortez D.A.G: Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. *Braz J Microbiol* 2008 , 39(1):61-63.
- jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. *Food Chemistry*. 118: 641 - 647.
- [20] Maksymiec, W., Krupa, Z.(2002). The in vivo and in vitro influence of methyl jasmonate on oxidative processes in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Acta Physiol. Plant*. 24: 351 - 357.
- [21] Orozco-C´ardenas, M.L., Narv´aez-V´asquez, J., Ryan, C.A. (2001). Hydrogen peroxide as a second messenger for the induction of defense genes in tomato to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*. 13: 179 - 191.
- [22] Kondo, S., Tsukada, N., Niimi, Y., Seto, H. (2001). Interactions between jasmonates and abscisic acid in apple fruit, and stimulative effect of jasmonates on anthocyanin accumulation. *Journal of Japan Society for Horticultural Science*.70: 546 -552.
- [23] Pe´rez, A.G., Sanz, C., Oli´as, R., Oli´as, J.M. (1997). Effect of methyl jasmonate on in vitro strawberry ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 3733 - 3737.
- [24] Wang, S.Y., Bowman, L., Ding, D. (2008). Methyl jasmonate enhances

- [30] Edrada, R.A., Wray, V., Witte, L., Ofwegen L. van, Proksch, P. (2000). Bioactive terpenes from the soft coral *Heteroxenia* sp. from Mindoro, Philippines. *Z Naturforsch [C]* 55, 82-86.
- [29] Ali, N.A.A., Wurster M., Arnold, N., Lindequist, U., Wessjohan, L. (2008). Essential Oil Composition from Oleogum Resin of *Soqotraen Commiphora kua*. *Rec. Nat. Prod.* 2:3 70-75.