

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

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

۱- دانشیار 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 ۱۴۱۱۵-۱۵۴

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 هیدرопونیک با محلول غذایی هوگلندر (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 معنی داری، 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 میکرومولا، کاهش یافت ولی در بخش هوایی کاهش معنی دار 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 لپیدهای غشاء، هم در ریشه و هم در اندام هوایی، در تیمارها در مقایسه با گیاهان شاهد تغییر معنی داری نداشت. ترکیب غالب مشاهده شده در انسان، Cadinol- 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 بیوسنتر ایزوپرینوئیدها و تولید فیتو الکسین‌های خاص استفاده کرد.

کلیدواژگان: انسان، متابولیت‌های ثانویه، متیل جاسمونات، همیشه بهار.

در دهه ۱۹۷۰، جاسمونات‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه

در انسان گیاه گل یاس (Jusmin Sp.) یافت شدند. دو

دهه پس از شناسایی اولیه جاسمونات‌ها، نخستین

تأثیرهای فیزیولوژیکی آن‌ها شناسایی شد و این مواد

۱- مقدمه

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 به صورت موضعی و عمومی، با مولکول‌های علامت‌رسان مانند جاسمونات‌ها به تنش‌ها پاسخ می‌دهند [۷]. جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات به طور گسترش در گیاهان حضور دارند و پدیده‌های مختلفی مانند رسیدن میوه، تولید دانه گرده زنده و فعال، رشد ریشه، پیچ خوردگی تندریل‌ها، پاسخ به زخم و تنش‌های غیرزیستی، دفع 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 *Lithospermum erythrorhizon* کشت تعلیقی سلول‌های شد [۱۰].

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

۴- اهداف تحقیق

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

به عنوان ترکیبات پیش‌برنده پیری، بازدارنده رشد، و محرك‌هایی برای متابولیسم ثانویه در گونه‌های مختلف گیاهی شناخته شدند [۱-۲]. در گیاهان عالی، جاسمونات و استر متیلی آن، متیل جاسمونات به عنوان 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

به طور 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 بازدارنده‌گی رویش و جوانه‌زنی دانه و دانه‌ی گرده و مهار رشد ریشه و دستگاه‌های فتوستزی، 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 در گیرند و منجر به القای فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای می‌شوند که واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به تولید ترکیبات دفاعی مانند پلی فنل‌ها، آکالوئیدها، و پروتئین‌های وابسته به میکروب‌های بیماری‌زا (PR) را کatalیز می‌کنند. نتیجه این فرایند، القا شدن پاسخ‌های دفاعی و محافظت گیاه در برابر حمله میکروب‌های بیماری‌زا است [۳-۵]. این مولکول‌های علامت‌رسان، وقتی به طور خارجی به کار برده شوند نیز با

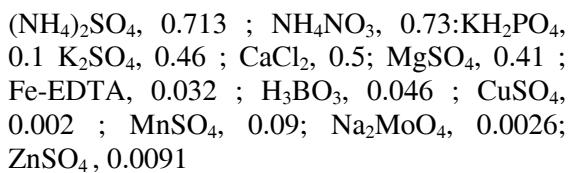
۵- مواد و روش‌ها

سپس به مدت ۱۰ دقیقه در 8×1000 سانتی‌فیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل، ۲ بار، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه با اتانول مطلق شست و شو داده شد و پس از هر بار شست و شو 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].

۲-۵- 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 پیچ دار، 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 محلوت حاصل در بالان 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 (Specific Absorption Coefficient) SAC معادل $20 \text{ g}^{-1} \text{ Lcm}^{-1}$ محاسبه شد [۱۳].

گیاهان همیشه بهار همسان 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 هوگلن ۱/۲ با اندازی تغییر، انتقال یافتند. ترکیب محلول غذایی هوگلن ۱/۲ (pH = ۶) بر حسب میلی مولار، به شرح زیر بود [۱۲].



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 بهوسیله 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 غلاظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس نمونه‌های شاهد و تیمار شده برداشت شدند. پس از شست و شو با آب مقطر، اندام هوایی و ریشه گیاهان مورد نظر، 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.

۱-۵- آنالیزهای بیوشیمیایی

۱-۱- استخراج دیواره سلولی

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

در $g \times 12000$ سانتریفوژ 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 آنتوسبیانین از ضریب خاموشی $Cm^{-1}M^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد [۱۴].

۵-۵- اندازه گیری فلاونوئید قام

برای سنجش فلاونوئیدها $0/2$ گرم توده سلولی منجمد شده در 3 میلی لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید استیک به نسبت 99 به 1)، خوب ساییده و به مدت 15 دقیقه در $g \times 12000$ سانتریفوژ شد. پس از صاف کردن، محلول رویی به مدت 10 دقیقه در حمام آب گرم با دمای 80 درجه قرار داده شد. میزان جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن، توسط اسپکتروفوتومتر در سه طول موج، 270 ، 300 و 330 نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئیدها، از ضریب خاموشی $Cm^{-1}M^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد [۱۵].

۶- سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا
 $0/2$ گرم از هر یک از بخش‌های هوایی و ریشه‌ی گیاه به طور جداگانه در mL^3 محلول 10 درصد TCA (تری کلرو استیک اسید) ساییده و به مدت 15 دقیقه در $g \times 12000$ سانتریفوژ شد. به محلول رویی 1 میلی لیتر از TBA (تیو باریتوريک اسید) $0/25$ درصد اضافه شد و در حمام آب گرم 100 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه حرارت داده شد. پس از سرد شدن محلول، مقدار جذب در دو طول موج $532nm$ و $600nm$ سنجیده شد. میزان MDA (مالون دی آلدئید) به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا براساس تفاوت جذب

۳-۵- استخراج فنلهای متصل به دیواره

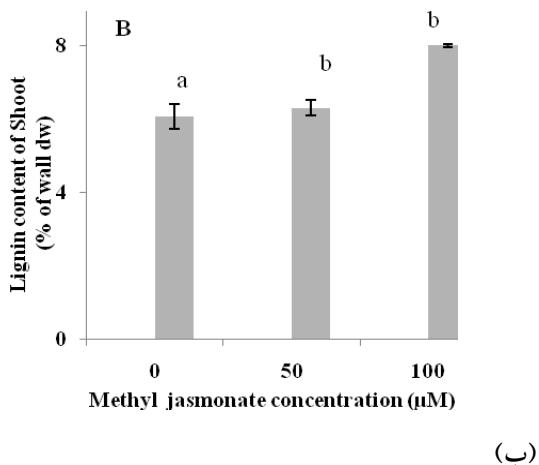
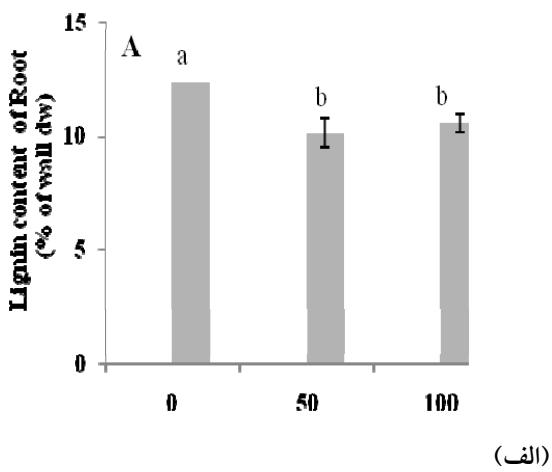
به 30 میلی گرم دیواره استخراج شده از هر یک از اندام‌های هوایی و ریشه، 4 میلی لیتر آمونیوم اگزالات افزوده شد و به مدت 15 دقیقه در حمام آب گرم (دمای 90 درجه سانتی گراد) قرار داده شد. پس از عصاره‌گیری توسط پمپ خلا، محلول رویی نگه داشته شد و این عمل دو بار دیگر بر رسو ب تکرار شد و محلول رویی به محلول قبلی اضافه شد. سپس به رسو حاصل از هر نمونه، 4 میلی لیتر $0/1$ NaOH $0/1$ مولار افزوده شد، سر لوله‌ها با پارافیلم بسته شد و پس از 24 ساعت عصاره‌گیری شد. محلول حاصل به محلول‌های قبلی افزوده شد. از این محلول، ترکیبات فنلی طی 3 بار و هر بار با 3 میلی لیتر اتیل استرات استخراج شدند و محلول جدا شده با هوادهی خشک شد. رسو حاصل که حاوی مجهرز به ستوون (ODS-80Ts Column $4/6 \times 250$ mm) در $0/5$ mL/min Flow rate با شب خطی $30-80$ درصد متانول حاوی استیک اسید $0/1$ درصد در طول موج 280 نانومتر سنجش و اندازه گیری 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 $25\mu g/mL^{-1}$ به دست آمد.

۴-۵- اندازه گیری آنتوسبیانین قام

برای سنجش آنتوسبیانین، $0/2$ گرم از هر یک از اندام‌های هوایی و ریشه‌های منجمد شده گیاه در 3 میلی لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و اسید کلریدریک به نسبت 99 به 1) خوب ساییده و سپس عصاره حاصل به مدت 15 دقیقه

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).



شکل ۱ محتوای لیگنین موجود در گیاهان همیشه بهار

جاسمونات (MJ). (الف) ریشه، (ب) اندام هوایی. داده‌ها،

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

۷- استخراج اسانس

ابتدا بخش هوایی نمونه‌های گیاهان شاهد و تیمار شده، در آون، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند و سپس اسانس گیری 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 جمع آوری شد [۱۷]. سنجش درصد ترکیبات موجود در اسانس نمونه‌ها، به وسیله دستگاه گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی (GC-MS, TRACE Thermoquest – Finnigan) به ستون مویینه DB ۶۰ متر، قطر داخلی $۰/۲۵$ میلی‌متر و ضخامت فیلم $۰/۲۵$ میکرومتر انجام شد. برنامه دمایی آون ستون، از دمای اولیه ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود که در دقیقه، ۵ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده می‌شد. طیف‌سنجی جرمی از نوع Quadrupole، دمای محفظه یونش ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، نوع گاز حامل، هلیوم و مقدار جریان گاز حامل، $۱/۱ \text{ mL/min}$ بود.

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 بسته‌ی 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.

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 معنی داری نداشت (شکل ۲-الف). در اندام هوازی، در هر دو غلظت از متیل جاسمونات، محتوای آنتوسیانین در مقایسه با گیاهان شاهد، کاهش معنی داری نشان داد (شکل ۲-ب).

میانگین سه تکرار مستقل \pm انحراف معیار (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

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 هوازی، 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 (μM)	Ferulic Acid	Cinnamic Acid	Gallic Acid	Tannic Acid	Hydroxy Benzoic Acid	Total
($\mu\text{g/g Cell Wall DW}$)						
.	۳۷/۵۶ $\pm ۱/۱$	۷۸ $\pm ۱/۷$	N	N	۲۷/۷۶ $\pm ۰/۵$	۱۲۲/۳۲ $\pm ۲/۰$
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 معنی دار در حد $P \leq 0.05$.

**: معرف تفاوت معنی دار در حد $P \leq 0.005$ با شاهد است.

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

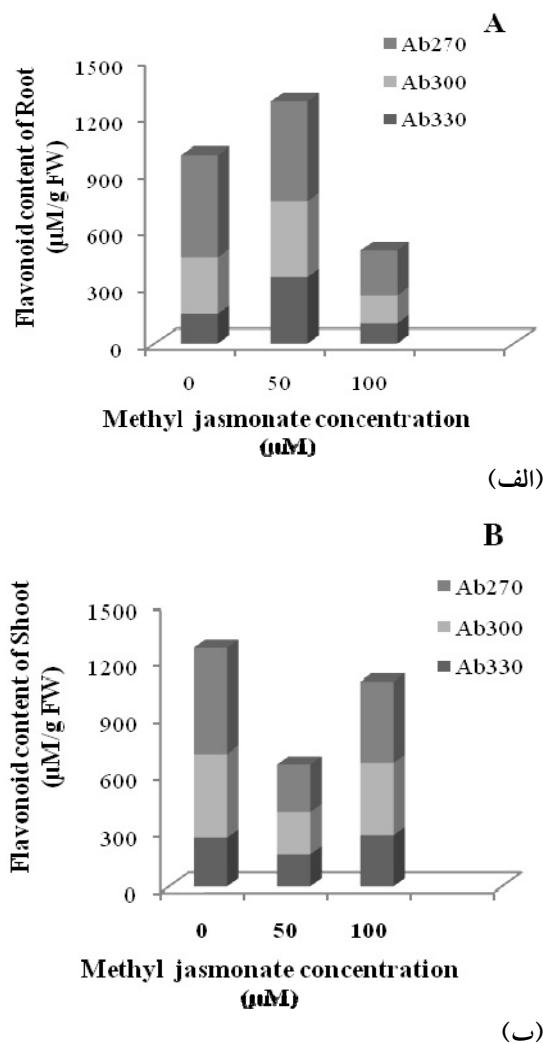
MJ (μM)	Ferulic Acid	Cinnamic Acid	Gallic Acid	Tannic Acid	Hydroxy Benzoic Acid	Total
($\mu\text{g/g Cell Wall DW}$)						
.	۱۹/۱۹ $\pm ۱/۰$	۵۹/۴۷ $\pm ۱/۰$	۲۹/۵۱ $\pm ۲/۲$	۴۵/۸۵ $\pm ۲/۷$	N	۱۵۴/۰۲ $\pm ۴/۰$
۵۰	۴۳/۸۷ $\pm ۲/۷$	۳۶/۳۴ $\pm ۲/۵$	N	۵/۱۱ $\pm ۱/۲$	N	۱۲/۱ $\pm ۱/۴۵$ **
۱۰۰	۱۷/۱۶ $\pm ۱/۲$	۵۲/۴۸۵ $\pm ۲/۳$	N	۳۵/۵۸ $\pm ۱/۴$	N	۱۰۵/۲۲ $\pm ۳/۱$ **

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

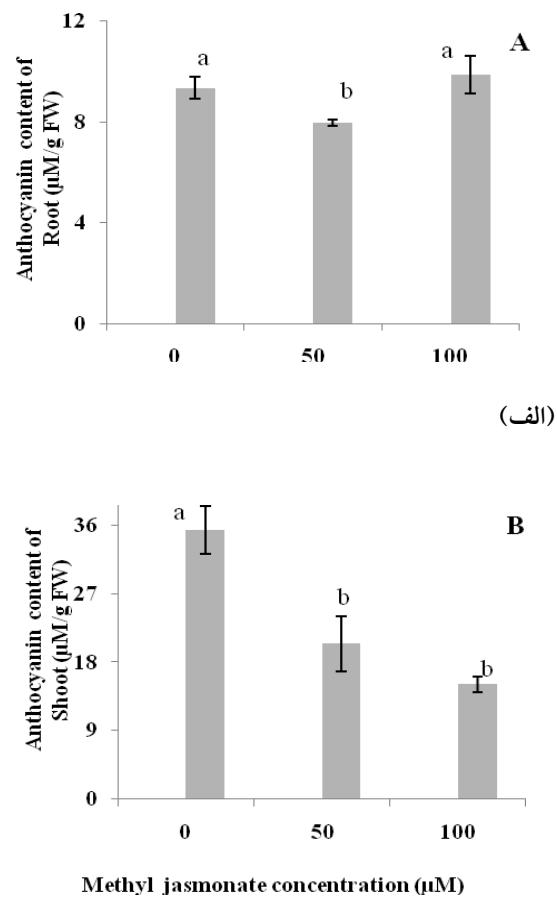
*: معرف تفاوت معنی دار در حد $P \leq 0.05$.

**: معرف تفاوت معنی دار 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.



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



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

محتوای فلاونوئید تام ریشه گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار، در مقایسه با شاهد، افزایش معنی دار و در تیمار با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار، کاهش معنی دار یافت (شکل ۳-الف). محتوای فلاونوئید کل در اندام هوایی، در تیمار با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار، در مقایسه با شاهد، کاهش معنی دار 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 -Cadino. در مقایسه با کترول، 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. در گیاهان شاهد مشاهده نشد، در صورتی که 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 حالی که در هر دو تیمار، این ترکیب مشاهده شد و بیشترین مقدار آن مربوط به تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بود.

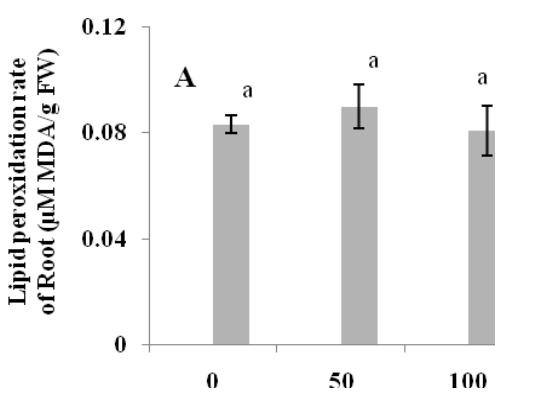
جدول ۳ ترکیبات مهم موجود در اسانس گیاهان همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.), در تیمار با متیل جاسمونات (MJ).

MI (mM)	Δ -Cadinene	Guaiol	δ -Cadinol	α -Cadinol	Muurolone	α -Cadinene
(% of Total)						
۰	۴/۲۸	۷/۵۱	۴/۷۵	۸۴/۳۶	N	N
۵۰	۷/۲	۴/۱۵	۷/۱۱	۷۷/۱۶	۰/۴۳	۰/۰۹
۱۰۰	۷/۴۶	۴/۳۹	۷/۵۹	۸۰/۰۸	۰/۹۱	۰/۰۱

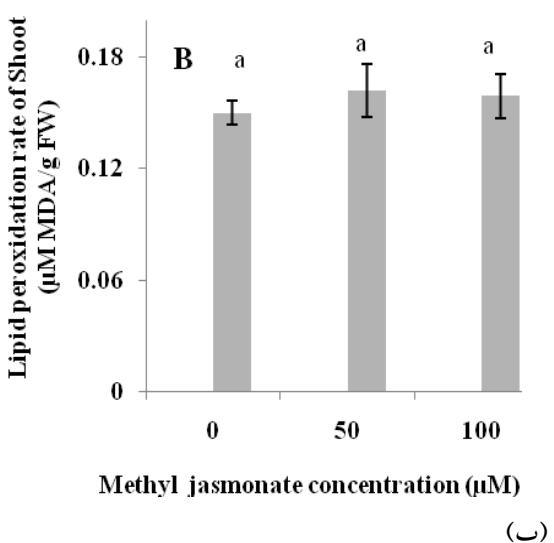
N: نمایانگر این است که ترکیب مورد نظر در تیمار مربوطه مشاهده نشده است.

۷- بحث
فنیل پروپانوئیدها، متابولیت‌های ثانویه‌ای است که به طور گسترده در گیاهان منتشر شده و عملکردهای مختلف و متنوعی دارد. هنگامی که 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).



(الف)



(ب)

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.

یافته‌های حساس به کمبود نیتروژن در آراییدوپسیس انجام شده است، نشان داد که این حساسیت، با کاهش بیوسنتر آنتوسبیانین و بالعکس با افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتر لیگنین همراه است [۲۶]. محققین چنین استنتاج کردند که عامل سازگاری تیپ وحشی گیاه آراییدوپسیس با شرایط تنش کمبود نیتروژن، تغییر مسیر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها از لیگنین به سمت افزایش فنل‌های محلولی نظیر آنتوسبیانین است [۲۶]. در تحقیق حاضر کاهش بیوسنتر 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 به کار رفته از متیل جاسمونات، سبب کاهش جریان منوفنل‌ها به سوی بیوسنتر فلاونوئید و آنتوسبیانین 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 دی آلدھید 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 فراورده‌های مختلف فنیل پروپانوئیدی غشاهای خود را از خطر تخریب اکسیداتیو در مقابل متیل جاسمونات، تا غلظت ۱۰۰ میکرومول حفظ کند. تحقیقات تکمیل کننده‌ای 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 شیمیابی و انسانس

می‌گیرند، بیوسنتر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نظیر فنل‌های متصل به دیواره، لیگنین، فلاونوئیدها، و آنتوسبیانین‌ها افزایش می‌یابد [۱۸].

مطالعات انجام شده نشان داده است که تیمار با متیل جاسمونات، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش آسیب به‌وسیله تنفس دمای پایین (chilling injury)، در گیاه شده و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتر لیگنین، یعنی PAL، PPO و POD می‌شود [۱۹]. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد جاسمونات‌ها، افزایش H_2O_2 را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۰-۲۱]. برای مثال، تیمار با متیل جاسمونات، باعث تسريع تجمع H_2O_2 در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی شد [۲۱]. براساس مطالعات انجام شده، کاربرد خارجی متیل جاسمونات می‌تواند سبب افزایش تجمع آنتوسبیانین‌ها در گیاه گردد [۲۲-۲۳]. آنتوسبیانین‌ها و فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی است که از گیاه در برابر واکنش‌های فتوبدینامیک 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، محتواهی 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 آنتی اکسیدانتی در برابر تنفس‌های زیستی و غیرزیستی، نقش حفاظتی دارند. اکسیداسیون فلاونوئیدها (به ویژه ۰- دی فنل‌ها) در شرایط تنش، سبب تولید ترکیبات جاروب کننده H_2O_2 ، مانند سمی کوئینون‌ها و کوئینون‌ها می‌شود [۲۵]. تحقیقاتی که روی جهش

- [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 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 ., J.M Linthorst, H., Erkelens, C ., W.M.Lefebreg ,A., Choi , Y.H.,Verpoorte, R. (2006). Metabolic differentiation of *Arabidopsis* treated with methyl jasmonate using nuclear magnetic

گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. برای مثال، افزایش محتوای اسانس موجود در برگ نعناع، تحت تنش اسمزی، گزارش شده است [۲۷]. در این تحقیق، به دلیل مقدار کم اسانس استخراج شده، محاسبه بازده اسانس محدود 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 [۲۸-۱۱]. تیمار گیاه با ۵۰ میکرومول متیل جاسمونات سبب سنتز سسکویی ترپن α -Muureloene 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* تیمار گیاهان با متیل جاسمونات را برای القای تغییر در مسیر بیوسنتری ترکیبات ایزوپرئوئیدی و تولید فیتوالکسین‌های 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 Fragance 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-Cárdenas, M.L., Narváez-Vásquez, 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] Pérez, A.G., Sanz, C., Oliás, R., Oliás, 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.