

تغییر پذیری رنگدانه‌های نورساختی، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و پرولین پینه کنگرفرنگی تحت تأثیر کاربرد محرک‌های متابولیتی

صبا صمدی^۱، عظیم قاسم‌نژاد^{۲*}، مهدی علیزاده^۲ و مهران اعلمی^۳

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳. دانشیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۲۵)

چکیده

اسید سالیسیلیک (SA) و متیل جاسمونات (MeJA) به‌عنوان دو هورمون گیاهی با القای ساخت (سنتز) آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و تحریک تولید و تجمع پروتئین کینازها، اکسیژن‌های رادیکال آزاد و اسمولیت‌هایی مانند پرولین نقش بسزایی در تولید متابولیت‌های ثانویه ایفاء می‌کنند. در این پژوهش تأثیر محرک‌های SA و MeJA بر تجمع امینواسید پرولین، محتوای اسید کلروژنیک و اسید کافئیک و همچنین غلظت رنگدانه‌های درونی پینه (کالوس) کنگرفرنگی بررسی شد. به این منظور نمونه‌های پینه کنگرفرنگی با پنج سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار SA و MeJA (الیستور) با چهار تکرار، در قالب طرح کامل تصادفی تیمار شدند. بر پایه نتایج به‌دست‌آمده تجمع پرولین و محتوای اسید کلروژنیک و اسید کافئیک تحت تأثیر غلظت‌های مختلف محرک‌های به‌کاربرده شده قرار داشتند. نکته جالب‌توجه اینکه بین این ترکیب‌ها و تأثیر محرک‌های مورد استفاده همبستگی مشاهده شد. به‌طوری‌که تحت تأثیر تیمار ۱۰۰ میکرومولار SA بیشترین تجمع اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و پرولین مشاهده شد. افزایش سطح محرک‌ها از این مقدار، کاهش محتوای اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و میزان پرولین را به همراه داشت. در نمونه‌های تیمار شده با MeJA نیز نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار بیشترین محتوای اسید کافئیک و پرولین را داشته و بیشترین میزان اسید کلروژنیک در تیمار ۲۰۰ میکرومولار تجمع یافت همچنین بر پایه نتایج به‌دست‌آمده ممکن است بیان شود، اگرچه تولید متابولیت‌ها تحت تأثیر محرک‌های متابولیتی افزایش می‌یابند، باین وجود افزایش غلظت محرک‌های متابولیتی بیش‌ازحد بهینه نتیجه عکس خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک، پرولین، متیل جاسمونات.

Influence of elicitors on photosynthesis pigments, caffeic acid, chlorogenic acid and proline content of *Cynara scolymus* callus

Saba Samadi¹, Azim Ghasemnezhad^{2*}, Mahdi Alizadeh² and Mehran Alami³

1, 2. M.Sc. Student and Associate Professors, Department of Plant production, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran

3. Associate Professor, Department of Food Science, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Gorgan, Gorgan, Iran
(Received: Nov. 21, 2014 - Accepted: Apr. 14, 2015)

ABSTRACT

Salicylic acid (SA) and Methyl jasmonate (MeJA) as phytohormone regulate synthesis of secondary metabolites in a wide range of plant species by accumulation of phenylalanine ammonia lyase enzyme (PAL) and accelerate the production of oxygen free radicals, protein kinase, proline and nitrite oxide content. To study the effect of these compounds on synthesis of secondary metabolites, in two separate experiments the callus of artichoke was treated with different levels of MJ and SA (0, 50, 100, 200, 250 μM) in the solid MS medium. A positive correlation between proline accumulation and phenolic compounds and negative correlation by photosynthesis pigments showed that in artichoke, the cells try to balance primary and secondary metabolites. Based on the obtained results, when the elicitors applied to cell culture, the amount of phenyl propanoid compounds and proline significantly increased. Application of SA at 100 μM had the highest effect on the production of chlorogenic acid and caffeic acid as well as proline. And MJ in 100 μM had the maximum amount of caffeic acid and proline and highest amount of chlorogenic acid was seen in 200 μM . It can be concluded that poly phenolic compounds production, influenced by executed treatments. Optimization the elicitor concentrations could lead to desirable secondary metabolite production of artichoke under in-vitro conditions.

Keywords: caffeic acid, chlorogenic acid, methyl jasmonate, proline, salicylic acid.

مقدمه

پروپیلین یکی از اسیدهای آمینه مهم گیاهی است که در رویارویی با طیف گسترده‌ای از تنش‌ها در یاخته گیاهی افزایش می‌یابد. افزایش پروپیلین در سیتوسول یاخته سبب محافظت از آنزیم‌ها (Arkawa & Timashef, 1983 & 1985) اندام‌های درون‌یاخته‌ای (Rodolph *et al.*, 1986) و پلی‌ریبوزوم‌ها (Kandpal & Rao, 1985) در طی تنش می‌شود. همچنین از راه ایجاد کمپلکس با رادیکال‌های آزاد به‌عنوان یک ترکیب پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) عمل می‌کند (Flood & Nagy, 1984; Smirnov & Cumbes, 1989). این ترکیب در تنش‌های شوری و کم‌آبی با افزایش فشار اسمزی درون‌یاخته سبب جذب و نگهداری بیشتر آب توسط یاخته و حفظ ساختار آن می‌شود. در بررسی‌های انجام‌شده، نشان داده شد که القای تنش و ایجاد رادیکال‌های آزاد سبب القای و افزایش تجمع پروپیلین در یاخته می‌شود. پروپیلین پس از تنش با تأمین الکترون برای چرخه تنفس و تولید کربن و نیتروژن سبب تولید انرژی و بازسازی یاخته می‌شود. ۸۰ درصد پروپیلین در شرایط تنش و ۲۰ درصد آن در شرایط عادی تولید می‌شود (Hare & Cress, 1997). گیاهان تحت تنش با افزایش اسیدهای آمینه، یون‌ها، پروپیلین، پروتئین‌های محلول و هیدرات‌های کربن بازدارنده خروج آب از یاخته و افزایش آب درون‌یاخته می‌شوند (Hare & Cress, 1997).

کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) به‌عنوان یکی از برنامه (رژیم)‌های غذایی محبوب در نواحی مدیترانه، سرشار از ترکیب‌های پلی‌فنلی، اینولین، فیبر و عناصر کانی است (Ziaie *et al.*, 2004). این گیاه نقش مهمی در کاهش کلسترول و مشکلات کبدی، کاهش ابتلا به سرطان و بیماری‌های قلبی داشته و بالاترین میزان فعالیت پاداکسندگی در میان سبزی‌ها را دارد (Ceccaroli *et al.*, 2010).

اسیدهای کلروژنیک و کافئیک دو نمونه از عمده‌ترین اسیدهای فنولیک موجود در گیاه کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) هستند. این ترکیب‌ها مستقیم و یا غیرمستقیم به‌عنوان پاداکسندگی، رادیکال‌های آزاد یاخته‌ها را جذب می‌کنند. اسید کلروژنیک خاصیت ضددیابتی داشته و به‌احتمال یکی از دلایل کاهش قند خون توسط

با پیشرفت علم و فناوری روند گرایش افراد به استفاده از مواد طبیعی و ارگانیک، استفاده از داروهای گیاهی به‌جای داروهای شیمیایی رو به گسترش بوده به‌طوری‌که بر پایه گزارش سازمان جهانی بهداشت حدود ۲۵ درصد از مردم جهان هم‌اکنون از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند (Ahmadi moghadam *et al.*, 2013). تلاش‌ها بر این است که با استفاده از فناوری‌های نوین مانند کشت یاخته و کشت ریشه‌های موئین، تولید صنعتی گیاهان دارویی از لحاظ اقتصادی به‌صرفه شود. در واقع تفاوت در میزان مواد دارویی موجود در گیاهان در صورت کشت مزرعه‌ای و ناچیز بودن میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان دارویی محققان را به کشت درون شیشه‌ای سوق می‌دهد. میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان دارویی را می‌توان با روش‌های مختلفی مانند بهینه‌سازی شرایط کشت، شوک‌های فیزیکی، ایستتورها یا محرک‌های متابولیتی افزایش داد (Ahmadi moghadam *et al.*, 2013).

اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات دو نمونه از محرک‌های طبیعی بی‌خطری هستند، که به‌عنوان ترکیب‌های محرک تولید متابولیت‌های ثانویه از راه القای تنش کاذب عمل می‌کنند (Wang *et al.*, 2009). تصور می‌شود که استفاده خارجی از این ترکیب‌ها می‌تواند به‌عنوان یک عامل تنش‌زا مؤثر باشد. در شرایط طبیعی اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به‌عنوان انتقال‌دهنده‌های پیام و در واکنش به تنش‌های زنده و غیرزنده مانند بیمارگر (پاتوژن)‌ها، اشعه فرابنفش (UV)، شوری و کم‌آبی عمل کرده (Popova *et al.*, 2003) و از این راه سازوکارهای مقاومتی گیاه را که دربرگیرنده زیست‌ساخت (بیوسنتز) متابولیت‌های ثانویه نیز هست، فعال می‌کنند (Gundluch *et al.*, 1992). این ترکیب‌ها بخشی از راهکار دفاعی گیاه در برابر تنش به شمار می‌آیند. در واقع اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات با تأثیر ناهمسازی (آنتاگونیستی) و هم‌افزایی (سینرژیستی) در تنظیم ژن‌های وابسته به تنش و افزایش تولید نقش دارند (Gundluch *et al.*, 1992; Raman & Ravi, 2011).

ریز نمونه، به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۵ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید برای پینه (کالوس) زایی انتقال داده شد و سپس نمونه‌های پینه (ترجیحاً سبز رنگ) به محیط‌های کشت حاوی تیمارهای MeJA و SA در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار انتقال یافتند. پس از چهار هفته اندازه‌گیری‌های مربوطه انجام شد.

اندازه‌گیری اسید کلروژنیک و اسید کافئیک با

استفاده از دستگاه HPLC

برای اندازه‌گیری اسید کلروژنیک و کافئیک از فام‌نگاری (کروماتوگرافی) مایع با کارایی بالای مدل ال-۷۱۰۰، مجهز به پمپ لاکروم و دتکتور UV با ستون C-18 با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر استفاده شد. نمونه‌ها با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه با دمای ۲۷ درجه سلسیوس در طول موج ۳۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. در این آزمایش از ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل، ۱ میلی‌لیتر اسید استیک و ۸۹ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به‌عنوان حالت (فاز) متحرک استفاده شد (Santos-games *et al.*, 2002; Trajtemberg *et al.*, 2006).

اندازه‌گیری میزان پرولین

به منظور اندازه‌گیری اسید آمینه پرولین ۰/۵ گرم از پینه تر در ۱۰ میلی‌لیتر سولفو سالیسیلیک اسید ۳ درصد در هاون به‌خوبی همگن (هموژن) شده و عصاره حاصل صاف شد. سپس ۲ میلی‌لیتر اسید استیک، ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین با ۲ میلی‌لیتر عصاره مخلوط شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس برای پایان یافتن واکنش لوله‌های آزمایش درون بستر یخی قرار گرفته و ۴ میلی‌لیتر تلون به هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تلون با استفاده از طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) مدل Camspec M501 در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد (Bates *et al.*, 1973).

کنگرفرنگی مربوط به این ترکیب است (Arion *et al.*, 1997). برخی از پژوهش‌ها مبین نقش پاداکنسندگی اسیدهای کلروژنیک و کافئیک علیه ۲-آمیدین پروپان هیدروکلراید (AAPH) و Cu^{2+} تولیدشده در اثر پروکسیداسیون لیپوپروتئین با وزن مخصوص کم^۱ (Cheng *et al.*, 2007; Lesli & Romani, 1988;) (Torel & Cillard, 1986) و بیان ژن نیتریک‌اکساید سنتتاز در یاخته‌های اندوتلیال هستند (Lapattelli *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

بسیاری از گزارش‌ها بیانگر نقش اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به‌عنوان القاکننده در تولید ترکیب‌های فنیل پروپانوییدی مانند اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به هنگام تنش هستند (Babar Ali *et al.*, 2011; Hosseini *et al.*, 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهند که متیل جاسمونات نقش مؤثری در افزایش پاکلی‌تاکسول در سرخدار و جنسینوساید در جنسینگ (Larrond *et al.*, 2003) داشته و اسید سالیسیلیک نیز به‌عنوان یک متابولیت پیام‌رسان بسیار مهم، نقش محوری در تجمع ترکیب‌های فنلی و افزایش فعالیت پاداکنسندگی در کشت بافت گیاه مریم‌گلی (Dong *et al.*, 2010) و افزایش فعالیت PAL در جعفری، مرکبات و انگور (Chen *et al.*, 2006; Lafuente *et al.*, 2004) داشته است. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به‌عنوان محرک‌های طبیعی و بی‌خطر بر افزایش میزان تجمع ترکیب‌های فلاونوییدی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

استقرار ریز نمونه در محیط کشت

برای انجام پژوهش، بذریه‌های کنگرفرنگی (Cynara scolymus L.) از مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان گردآوری شده و پس از سترون‌سازی در محیط MS 1/2 کشت شد. پس از تشکیل برگ‌های کوتیلدونی نمونه‌های گیاهی رشدیافته در محیط درون شیشه‌ای، به‌صورت

1. LDL

نتایج و بحث

بررسی انجام شده نشان داد که نه تنها تراکم رنگدانه‌های پینه بلکه ترکیب‌های بیوشیمیایی یاخته‌های پینه کنگرفرنگی نیز تحت تأثیر کاربرد محرک‌های متابولیتی غیرزنده مورد استفاده در این آزمایش قرار گرفت.

تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر میزان سبزینه و کارتنوئید

مقایسه میانگین‌ها (شکل‌های ۱ و ۲) نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار میزان رنگدانه‌های نورساختی (فتوسنتزی) در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات است. به طوری که بیشترین میزان سبزینه‌های a، سبزینه‌های b، سبزینه‌های کل و کارتنوئیدها در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار ۲۵۰ میکرومولار مشاهده شد. البته تغییرپذیری کارتنوئیدی نمونه‌ها روند متفاوت تری داشت. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده می‌شود، به‌رغم کاهش کارتنوئید تا سطح ۱۰۰ میکرومولار، با افزایش سطح اسید سالیسیلیک روند تغییرپذیری کارتنوئیدی افزایشی بود. اگرچه در گیاه زنده تخریب سبزینه‌ها در اثر تنش و تغییر نسبت سبزینه‌ها به کارتنوئیدها مهم‌ترین عامل به شمار می‌آید (Cag et al., 2009; Roustan et al., 1989). ولی در کشت پینه کاهش میزان رنگدانه‌های درونی با افزایش غلظت محرک می‌تواند با زیست‌ساخت کارتنوئیدها در شرایط تنش توجیه شود.

احتمالاً این عمل راهکاری است که یاخته‌های گیاه کنگرفرنگی برای به‌بیشینه رساندن توان تولید متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهد، در واقع با کاهش تولید متابولیت‌های اولیه و عملکرد، تولید ترکیب‌های دفاعی برای محافظت از یاخته افزایش می‌یابد. بنابراین برای دستیابی به یک تولید به‌صرفه و پایدار اقتصادی افزون بر سطح تولید مواد ثانویه باید عملکرد زیست‌توده (بیوماس) نیز مورد نظر قرار گیرد.

نشان داده شده است که تغییرپذیری سبزینه‌ها تحت تأثیر اسید سالیسیلیک به اثر این ترکیب بر فعالیت ACC سنتتاز یا اکسیداز در فرآیند تولید اتیلن مرتبط

اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های درونی در نمونه‌های درون شیشه‌ای

برای اندازه‌گیری میزان سبزینه (کلروفیل) a, b، کل و کارتنوئیدها ۰/۵ گرم از بافت پینه توزین و در هاون چینی کوبیده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل سولفوکساید به آن افزوده شد. نمونه به مدت سه ساعت در آون ۷۵ تا ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از این محلول به لوله جدید منتقل شده و با دی‌متیل سولفوکساید به حجم ۵ میلی‌لیتر رسید. از دی‌متیل سولفوکساید خالص به‌عنوان شاهد استفاده شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنج نوری در طول‌موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شده و با استفاده از رابطه‌های زیر میزان سبزینه‌های b، سبزینه‌های a، سبزینه‌های کل و کارتنوئیدهای موجود در نمونه‌ها محاسبه شد (Barnes et al., 1992):

$$\text{Chlo a (mg/g.F.W)} = 12.7 (A663) - 2.69 (A645) * V / 1000 * W \quad (1)$$

$$\text{Chlo b (mg/g.F.W)} = 22.9 (A645) - 4.68 (A663) * V / 1000 * W \quad (2)$$

$$\text{Chlo total (mg/g.F.W)} = 20.2 (A645) + 8.02 (A663) * V / 1000 * W \quad (3)$$

$$\text{Car (mg/g.F.W)} = 7.6 (A480) - 1.49 (A510) * V / 1000 * W \quad (4)$$

که در آن:

A = طول موج

V = حجم نهایی

W = وزن نمونه

تجزیه آماری

این آزمایش به‌صورت طرح کامل تصادفی در چهار تکرار انجام و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل^۱ استفاده شد.

1. Excel

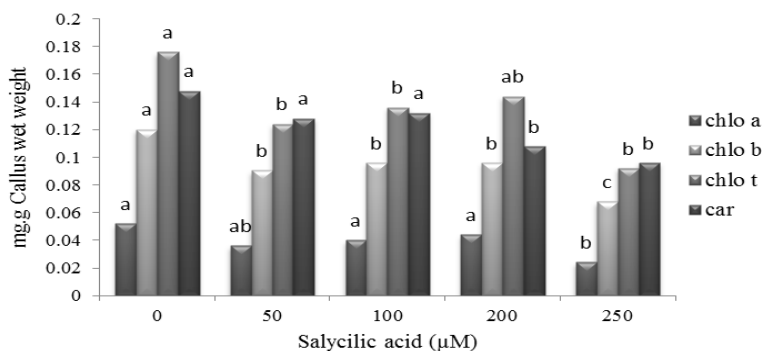
کلروفیل‌ها و تخریب سبزینه می‌شود (Rudell & Matteis, 2002).

تأثیر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر کلروژنیک اسید و کافئیک اسید

نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌ها (شکل ۳) نشان داد که بین تیمار اسید سالیسیلیک و میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد، و میزان اسید کلروژنیک با افزایش اسید سالیسیلیک تا سطح ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد. در مورد میزان اسید کافئیک در نمونه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک نیز روند همسانی مشاهده شد، به طوری که با افزایش غلظت تا سطح ۱۰۰ میکرومولار بر میزان تجمع اسید کافئیک افزوده شده است، سپس با افزایش بیشتر غلظت از میزان این ترکیب کاسته می‌شود.

است. اسید سالیسیلیک در غلظت بالا سبب ساخت (سنتز) اتیلن شده و در غلظت‌های مناسب از ساخت آن جلوگیری کرده و از این روش بر تولید و ماندگاری مولکول‌های سبزینه مؤثر است. سازوکار اثرگذاری اتیلن بر سبزینه‌ها از راه افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌هاست که در شرایط طبیعی با تسریع تخریب سبزینه سبب ظهور بافت‌های رنگی از راه آشکارسازی کارتنوئیدها و دیگر رنگدانه‌های غیر سبزینه‌ای می‌شود (Roustan et al., 1989; Lesli & Romani, 1988).

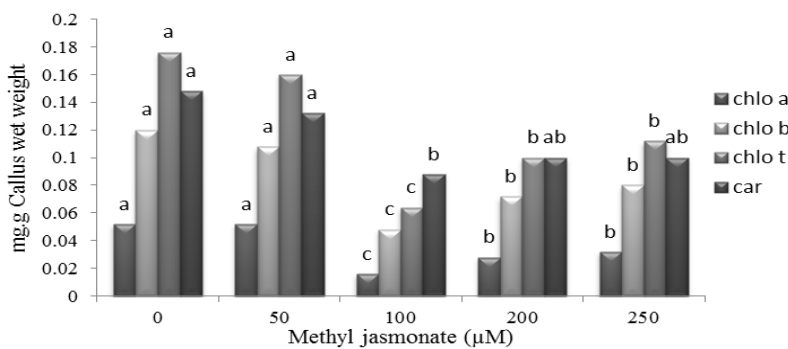
نشان داده شده است که متیل جاسمونات نیز با افزایش فعالیت ACC سنتتاز یا اکسیداز و زیست‌ساخت اتیلن بر میزان رنگدانه‌های درونی مؤثر است (Rudell & Matteis, 2002; See et al., 2011). mRNA AtCIH1 به‌عنوان القاکننده پیری و تخریب سبزینه (ساخت کلروفیل‌ها) در گیاهان در اثر تیمار متیل جاسمونات القاشده و باعث افزایش فعالیت آنزیم



شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر نسبت رنگدانه‌های پینه کنگرفرنگی

Chlo a: سبزینه a, Chlo b: سبزینه b, chol t: سبزینه کل, car: کاروتنوئید

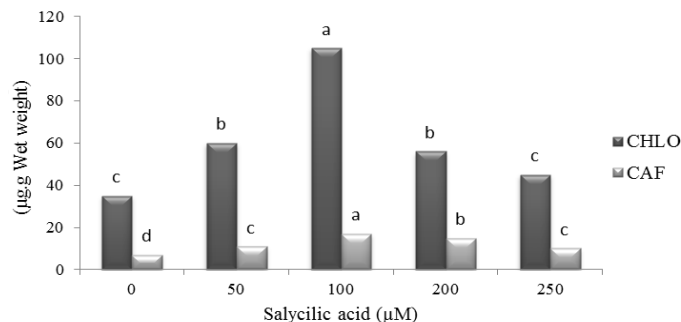
Figure 1. Salicylic acid effect on pigments of *Cynara scolymus* callus
Chol a: Chlorophyll a, Chol b: Chlorophyll b: Chol t: total Chlorophylls, Car: Carotenoids



شکل ۲. تأثیر متیل جاسمونات بر تغییرپذیری رنگدانه‌های پینه کنگرفرنگی

Chlo a: سبزینه a, Chlo b: سبزینه b, chol t: سبزینه کل, car: کاروتنوئید

Figure 2. Influence of Methyl jasmonate on *Cynara Scolymus* callus pigments
Chol a: Chlorophyll a, Chol b: Chlorophyll b: Chol t: total Chlorophylls, Car: Carotenoids



شکل ۳. تأثیر اسید سالیسیلیک بر محتوی اسید کلروژنیک و اسید کافئیک در پینه کنگرفرنگی
CHLO: کلروژنیک اسید؛ CAF: کافئیک اسید

Figure 3. Salicylic acid impact on Chlorogenic and Caffeic acid content of Artichoke callus
CHLO: Chlorogenic acid, CAF: Caffeic acid

ترکیب اغلب در شرایط غیرطبیعی که بیانگر تأثیرگذاری تنش بر فعالیت طبیعی بیوشیمیایی گیاه است مشاهده می‌شود (Hosseini *et al.*, 2011; Babar ali *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد افزایش غلظت ترکیب‌های فنلی در پینه کنگرفرنگی بر اثر القای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به احتمال نشانگر نقش حیاتی این ترکیب‌ها در پاسخ‌های فیزیولوژی گیاه در مهار تنش است. البته همانند اغلب واکنش‌های بیوشیمیایی افزایش سطح عامل تنش‌زا به دلیل عبور از دامنه واکنش‌پذیری یاخته، کاهش سوخت‌وساز (متابولیسم) یاخته‌ای و در نهایت کاهش تجمع ترکیب‌های موردنظر را در پی دارد. نکته‌ای که در تغییر اسید کافئیک و اسید کلروژنیک به خوبی مشاهده می‌شود.

تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر تجمع پرولین

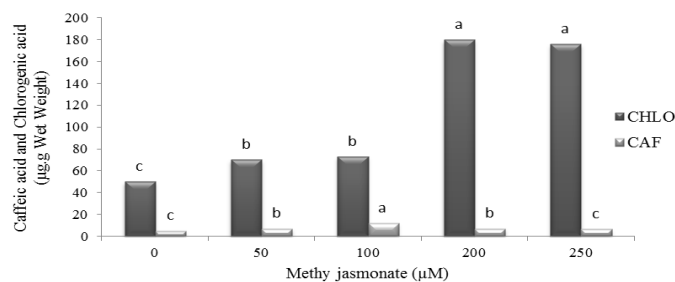
نتایج نشان داد که با افزایش متیل جاسمونات تا سطح ۱۰۰ میکرومولار تجمع اسید آمینه پرولین افزایش یافت (شکل ۵) و همچنین هماهنگ با افزایش اسید سالیسیلیک محیط کشت (شکل ۶) میزان تجمع پرولین نیز همگام با آن افزایش پیدا کرد. که می‌تواند به دلیل تلاش یاخته برای حفظ بقا و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی باشد. همانند ترکیب‌های پاداکسندگی، پرولین نیز به عنوان ابزاری برای سازگار شدن یاخته با شرایط تنش اهمیت زیادی دارد. در واقع این ماده با تجمع خود بازدارنده آب از دست‌دهی یاخته و کاهش تأثیر تنش ایجادشده در محیط بر گیاه می‌شود. پرولین در گیاهان

بررسی پینه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات نشان می‌دهد که یاخته‌های گیاهی در کنگرفرنگی با افزایش میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به عنوان ترکیب‌های فنلی مهم که به صورت مستقیم و غیرمستقیم در فعالیت‌های پاداکسندگی نقش دارند، سعی در افزایش توان مقاومتی گیاه در برابر ترکیب‌های تنش‌زا و کاهش آسیب اکسایش (اکسیداتیو) ناشی از تنش دارند. در تحقیقات بسیاری به نقش اسید سالیسیلیک در القای انواع واکنش‌های دفاعی و مقاومتی در واکنش به تنش به ویژه تولید ترکیب‌های پاداکسندگی از جمله اسید کلروژنیک اشاره شده است (Babar ali *et al.*, 2007; Hosseini *et al.*, 2011; Kovacic *et al.*, 2010).

همان‌گونه که در شکل ۴ آمده است، افزایش سطح متیل جاسمونات تا ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش محتوای اسید کافئیک شد، ولی با افزایش غلظت از سقف ۱۰۰ میکرومولار از میزان آن کاسته شد. همچنین بررسی اسید کلروژنیک ساخت‌شده در هر تیمار نشان داد که بیشترین میزان اسید کلروژنیک در غلظت ۲۰۰ میکرومولار وجود داشت. نکته جالب توجه اینکه روند تجمعی این ترکیب تحت تأثیر افزایش سطوح هر دو ترکیب اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات کاهشی بود. با بررسی میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به نظر می‌رسد اسید کافئیک به عنوان یک ترکیب فنلی و پیش‌ساز اسید کلروژنیک و دیگر ترکیب‌ها از جمله سینارین، همواره در میزان بسیار کم در گیاه وجود داشته و افزایش این

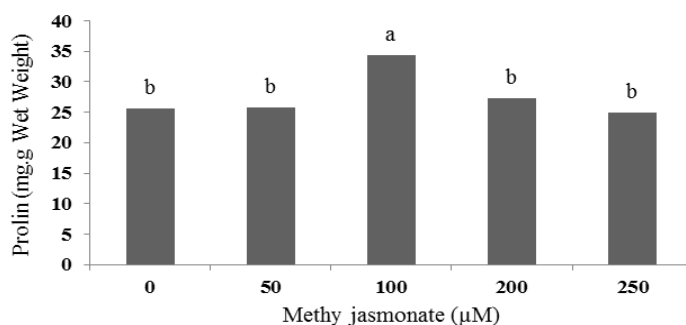
واکنش یاخته به نشانه‌های هشداردهنده تنش شده و در اغلب موارد این کاهش با تخریب جایگاه‌های واکنش به تنش همراه است. به همین دلیل است که در غلظت‌های بالای محرک، توانمندی یاخته در پاسخ‌گویی و فعالیت ژن‌های بازدارنده از تجمع پرولین کاسته می‌شود.

تحت تنش به‌ویژه تنش‌های شوری و خشکی با توجه به ساختار شیمیایی خود، به‌عنوان یک اسمولیت نقش مهمی در حفظ فشار اسمزی یاخته دارد. بنابراین افزایش غلظت محرک‌های به‌کاربرده شده بیش‌ازحد سازگارپذیری یاخته سبب کاهش تدریجی



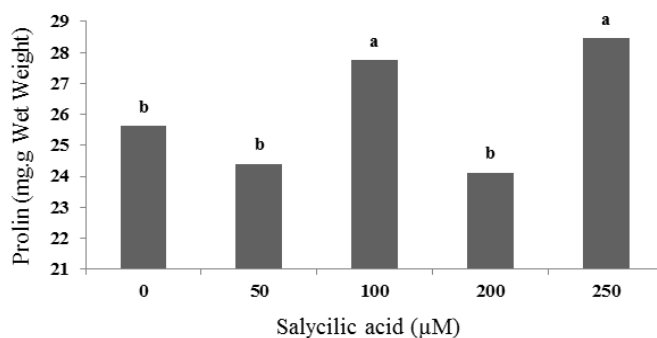
شکل ۴. تأثیر متیل جاسمونات بر تغییرپذیری اسید کافئیک و اسید کلروژنیک در پینه کنگرفرنگی
CHLO: کلروژنیک‌اسید، CAF: کافئیک‌اسید

Figure 4. Methyl jasmonate influence on Chlorogenic and Caffeic acid content of Artichoke callus
CHLO: Chlorogenic acid, CAF: Caffeic acid.



شکل ۵. تغییر اسید آمینه پرولین در تیمارهای متفاوت متیل جاسمونات

Figure 5. Proline variation affected by Methyl jasmonate.



شکل ۶. تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک بر محتوای پرولین کنگرفرنگی

Figure 6. Salicylic acid effect on proline content of Artichoke.

بیوشیمیایی پینه کنگرفرنگی نقشی مؤثر ایفا می‌کند. کنگرفرنگی می‌تواند با ایجاد تعادل بین فرآورده‌های مختلف پلی فنلی، کنترل تولید متابولیت‌های اولیه و تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین خود را از خطر تخریب

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به‌عنوان ترکیب‌های مهم هورمون گیاهی (فیتوهورمونی) در بیشتر فرآیندهای فیزیولوژیکی و

به نظر می‌رسد محرک‌ها با تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط و تغییر شدت فعالیت آنزیم‌های مهم کاتالیزکننده متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش این ترکیب‌ها در بافت کشت شده می‌شوند. اما نکته مهم این است که افزایش محرک بیش از حد معمول نه تنها افزایش متابولیت‌ها را در بر ندارد، بلکه تولید متابولیت‌ها را کم و یا متوقف می‌کند. بنابراین با بهینه‌سازی غلظت محرک و ترکیب‌های غذایی محیط کشت می‌توان بدون دست‌کاری در ساختار ژنتیکی گیاه با افزایش فعالیت آنزیم‌ها میزان متابولیت‌های ثانویه مورد نظر را افزایش داد. اگرچه رسیدن به ثبات تولید مستلزم معرفی رقم‌های جدید خواهد بود.

اکسایش در برابر تنش‌های القاشده بر اثر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات حفظ کند. با توجه به اینکه در واکنش به کاربرد اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات تجمع ترکیب‌ها در سطوح مختلف تیمار دو ترکیب متفاوت بود، به نظر می‌رسد تأثیرگذاری دو ترکیب در همه یا دست‌کم بخشی از مسیر متفاوت باشد. در صورت اثبات این موضوع به‌ویژه با شناسایی درست سازوکار تأثیرگذاری این ترکیب‌ها، پیشرفت قابل‌توجهی در نقش محرک‌ها در زیست‌ساخت متابولیت‌ها حاصل شود. نکته جالب‌توجه در این تحقیق مشاهده رابطه مستقیم تجمع پرولین با اسیدهای فنلیک اندازه‌گیری شده است که بیانگر نقش همسوی این ترکیب‌ها در حفظ یاخته در برابر تنش است.

REFERENCES

- Ahmadi Moghadam, Y., Piri, K. H., Bahramnejad, B. & Habibi, P. (2013). Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (purslan). *Bulletin on Environmental Pharmacology Life Science*, 2(6), 89-94.
- Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1983). Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 244, 169-177.
- Arakawat, T. & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolyts. *Biophysics Journal*. 47, 411-414.
- Arion, W.J., Canfield, W.K., Ramos, F.C. & Schindler, P.W. (1997). Chlorogenic acid and hydroxyl nitrogen 2 aldehyde: new inhibitor of hepatic glucose 6-phosphatase. *Archives of Biochemistry*, 339 (2), 315-322.
- Babar Ali, M., Hahn, E.J. & Peak, K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12, 621-627.
- Barnes, S. D., Balaguer, L., Manirque, E., Elvira, S., Davison, A. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental Botany*, 32, 85-100.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. & Teare, I. D. (1973) Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Cag, S., Ahir-Oz, G. C., Sarsag, M. & Georen-Saglam, N. (2009). Effect of salicylic acid on pigment, protein content and peroxidase activity in excited sunflower cotyledons. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2297-2303.
- Ceccarlli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C. & Giovannetti, M. (2010). Globe Artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Natural Metabolism*, 3, 197-201.
- Chen, H., Jones, A. D. & Howe, G. A. (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling path way enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters*, 580, 2540-25460.
- Cheng, J.C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L. & Liu, Z.L. (2007). Antioxidant activity of hydroxyl cinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 104, 132-139.
- Dong, J., Wan, G. & Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in *Salvia miltorrhiza* cell cultur. *Journal of Biotechnology*, 148, 99-104.
- Floxd, R. A. & Nagy, Z. S. (1984). Formation of long-lived hydroxyl free radical adducts of proline and hydroxyl proline in a Fenton reaction. *Biochemica et Biophysica Acta*, 790, 94-97.
- Gundluch, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell Cultures. In: Proceeding of *Natural Academic Science USA*, 98, 389-2393.
- Hare, P. D., Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21, 79-102.

16. Hosseini, S. S., Mashayekhi, K., Alizadeh, M. & Ebrahimi, P. (2011). Effect of salicylic acid on somatic embryogenesis and chlorogenic acid levels of carrot (*Daucus carota* cv. Nantes) explants. *Ornamental and Horticultural Plant*, 1(2), 105-113.
17. Kandpal, R.P. & Rao, N.A. (1985). Alterations in biosynthesis of proteins and nucleic acids in finger millet (*Eleusine coracana*) seedlings during water stress and effect of proline on protein biosynthesis. *Plant Science*, 40, 73-79.
18. Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J. & Backor, M. (2010). Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (chlorophyllaceae). *Plant Science*, 178, 307-311.
19. Lafuente, M.T., Sala, J.M. & Zacarias, L. (2004). Active oxygen detoxifying enzymes and phenyl alanin ammonia lyase in the ethylene induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3606-3611.
20. Lapattelli, G., Marchesi, S., Lombardini, R., Roscini, A. R., Trinca, F., Gemelli, F. & Elmo, M. (2004). Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Science*, 76 (7), 775-782.
21. Larrond, F., Gaudillere, J.P., Krisa, S., Decend, A., Deffieux, G. & Merillon, J. M. (2003). Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *Am. J. Enol. Vitic*, 54, 63-66.
22. Lesli, C.A. & Romani, R.J. (1988). Inhibition of ethylene biosynthesis salicylic acid. *Plant Physiology*, 88, 833-837.
23. Li, H., Xia, N.B., Rausch, I., Yao, Y. & Forstermann, U. (2004). Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L) upregulate endothelial-type nitric oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310 (3), 926-932.
24. Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V. & Stoinova, Z. H. (2003). Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Plant Physiology and Special Issue*, 133-152.
25. Raman, V. & Ravi, S. (2011). Effect of Salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Heamatococcus pluvialis*. *Acta Physiology Plant*, 33, 1043-1049.
26. Rodolph, A.S., Crowe, S.H. & Crowe, L.M. (1986). Effects of three stabilizing agents-proline, betaine and trehalose on membr and phospholipids. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 245, 134-143.
27. Roustan, J. P., Lotch, A. & Fallot, J. (1989). Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis cobalt and nickel. *Plant Cell Reports*, 8, 182-185.
28. Rudell, D. R. & Matteis, J. P. (2002). Methyl jasmonate enhances anthocyanin accumulation and modifies production of phenolics and pigments in fuji apples. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 127, 435-441.
29. Santos-games, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. & Fernandes-ferreira, M. (2002). Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Physiology*, 160, 1025-1032.
30. See, K. S., Bhatt, A. & Keng, C. L. (2011). Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). *Review of Biological Trop*, 59 (2), 597-606.
31. Smirnoff, N. & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057-1060.
32. Torel, J., Cillard, J. & Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25 (2), 383-385.
33. Trajtemberg, S. P., Apstolo, N. M. & Fernandez, G. (2006). Calluses of *Cynara cardunculus* var *cardunculus* cardoon (asteraceae): determination of cynarine and chlorogenic acid by automated high-performance capillary electrophoresis. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 42, 537-537.
34. Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z. & Zheng, Y. (2009). Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chine bayberries. *Agricultural Food Chemistry*, 57, 5809-5850.
35. Ziaei, C., Dast Pak, A., Naghdi Badi, H., Poor Hoseini, L., Hemmati Moghadam, A. & Ghorori Naiini, M. (2004). A review on *Cynara scolymus* L. *Journal of Medicinal Plants*, 13, 1-10. (in Farsi)