



اثر اسیدسالیسیلیک و اسید جاسمونیک در القای تنش اکسیداتیو، افزایش مقاومت و عملکرد در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)

*فاطمه رسولی^۱، منوچهر قلی پور^۲، کامبیز جهان بین^۳ و حمیدرضا اصغری^۲

^۱ دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ^۲دانشیار گروه زراعت، دانشگاه صنعتی شاهرود،

^۳استادیار گروه صنایع غذایی دانشگاه صنعتی شاهرود

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: در زراعت گیاهان دارویی تولید متابولیت‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از این رو استفاده از برخی مواد در جهت افزایش رشد و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه مورد توجه واقع شده است. الیستورها به‌طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. الیستورها می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی را در گیاه القا نمایند. استعمال خارجی ترکیباتی مثل اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک باعث القای تنش کاذب در گیاه شده و پاسخ‌های دفاعی آن را بر می‌انگیزد. گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را زیاد نموده و به‌دنبال آن، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی (اغلب جنبه دارویی دارند) افزایش پیدا می‌کند. بنابراین هدف از انجام این آزمایش، بررسی اثر اسیدسالیسیلیک و اسیدجاسمونیک در القای تنش اکسیداتیو، و افزایش مقاومت و عملکرد در سرخارگل بود.

مواد و روش‌ها: آزمایش حاضر در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود در سه تکرار و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با چهار غلظت اسید جاسمونیک (۰، ۵، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار)، سه غلظت اسیدسالیسیلیک (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و محلول‌پاشی هر دوی آن‌ها [5ja-0.5 sa, 20 ja-0.5 sa و 5ja-0.5 sa و 50 ja-0.5 sa) و 5ja-1 sa, 20 ja-1 sa و 50 ja-1 sa) با فاصله زمانی ۱۰ روز از زمان ورود به فاز زایشی بود، که در سه نوبت تکرار گردید. القای تنش اکسیداتیو از طریق اندازه‌گیری فعالیت NADPH اکسیداز و غلظت پراکسید هیدروژن، افزایش مقاومت از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله فنل کل و اسید آسکوربیک گلبرگ نشان داده شد؛ در نهایت غلظت پروتئین محلول برگ، کلروفیل a و b، وزن خشک برگ و عملکرد وزن خشک گل تحت اثر محلول‌پاشی سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که محلول‌پاشی، کلیه صفات مورد بررسی را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد. بیشترین میزان فعالیت NADPH اکسیداز در تیمار 20ja-1 sa مشاهده شد که ۱/۶ برابر شاهد بود. بیشترین

*مسئول مکاتبه: F.rasouli86@gmail.com

غلظت پراکسید هیدروژن در تیمارهای 5 ja و 0.5 sa مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار 20 ja با میانگین ۰/۰۲۱ نامومول بر دقیقه بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد. بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ به ترتیب در تیمار 20ja-1sa و تیمار شاهد با میانگین ۰/۲۰۵ و ۰/۰۳۸ نامومول بر دقیقه بر گرم بافت تر به دست آمد. بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز به تیمار 20ja-1sa با میانگین ۰/۲۹ نامومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ تعلق داشت که تقریباً ۲ برابر شاهد بود. بیشترین میزان فنل کل در تیمار 0.5 sa مشاهده شد که حدود ۳/۶۸ برابر شاهد بود. بالاترین میزان اسید آسکوربیک در شرایط اعمال تیمار 5ja-0.5 sa حاصل گردید که ۴/۶۸ برابر شاهد بود.

نتایج: ایستتورها شبکه‌ای از ترانسانی علامت را القا می‌کنند که با تشخیص مولکول‌های ایستتور توسط پذیرنده شروع می‌شوند، به دنبال آن اسیدی شدن سیتوپلاسم و افزایش pH خارج سلول را سبب می‌گردند؛ فعالیت NADPH اکسیداز مسئول تولید گونه‌های اکسیژن فعال افزایش یافت و تولید پراکسید هیدروژن یکی از گونه‌های فعال اکسیژن افزایش یافت، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی از جمله میزان فنل‌ها و اسید آسکوربیک افزایش یافت. افزایش فعالیت سیستم‌های دفاعی در گیاه باعث به وجود آمدن شرایط مطلوب برای فعالیت‌های سوخت و ساز گیاه نظیر افزایش میزان کلروفیل‌های a و b و افزایش میزان پروتئین محلول و در نهایت افزایش وزن خشک برگ و گل گیاه گردید.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، پروتئین محلول، کلروفیل

مقدمه

مدیریت‌های زراعی مناسب و فرآوری صحیح به این هدف یعنی افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه خاص و افزایش تولید دست یافت، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. ایستتورها به‌طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. استعمال خارجی ترکیباتی مثل اسیدجاسمونیک، اسیدسالسیلیک و متیل‌سالسیلات (ایستتور شیمیایی) باعث القاء تنش کاذب در گیاه شده و پاسخ‌های دفاعی گیاه را بر می‌انگیزد. در اصل، مواد خروجی ایستتورها، آغازگر یک مسیر پیام‌رسانی پیچیده شده و به فعال شدن پاسخ‌های دفاعی منجر می‌گردند (۲۳، ۴۴ و ۴۶). برخی از این ایستتورها به شکل مستقیم به درون سلول تزریق می‌شوند و در آنجاست که با فرآورده‌های ژنی R (ژن‌های مقاوم گونه‌ی گیاهی) برهمکنش نشان می‌دهند، فعالیت

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* L. از خانواده *Astraceae*، بومی آمریکای شمالی می‌باشد. مواد مؤثره این گیاه سبب افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌گردد (۲۱ و ۲۸). این گیاه به‌عنوان دارویی مؤثر در پیشگیری و درمان امراضی چون سرماخوردگی، آنفولانزا، التهابات پوستی و عفونت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). از آنجا که این گیاه خاصیت تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی بدن و ضد ویروس را دارد، در درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی می‌توان از آن استفاده کرد. این گیاه امروزه به‌عنوان کاندیدای درمان بیماری ایدز مطرح می‌باشد (۱۱، ۳۶ و ۳۸).

در زراعت گیاهان دارویی اگر تولید متابولیت خاصی مورد هدف قرار گیرد و بتوان از طریق

بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسیدجاسمونیک و اسیدسالسیلیک به‌عنوان محرک القای تنش اکسیداتیو در سرخارگل و افزایش مقاومت آن به تنش از طریق اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پروتئین محلول، کلروفیل a و b، اسیدآسکوربیک گلبرگ، فنل کل و آنتوسیانین و در نهایت عملکرد می‌باشد.

مواد و روش

مشخصات جغرافیایی و اقلیمی محل اجرای آزمایش: این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود (واقع در بسطام) با مختصات جغرافیایی طول شمالی ۵۸/۵۴ درجه و عرض شمالی ۳۵/۳۶ درجه با ارتفاع ۱۴۲۰ متری از سطح دریا، در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ انجام گرفت. شهرستان بسطام دارای میانگین دمای متوسط سالانه ۱۴ درجه سانتی‌گراد، میانگین دراز مدت بارندگی سالانه ۱۸۰ میلی‌متر و رطوبت نسبی ۶۳ درصد می‌باشد. شهرستان بسطام دارای آب و هوای معتدل سرد و مرطوب کوهستانی می‌باشد.

اجرای طرح آزمایشی: آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک با چهار غلظت (۰، ۵، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار)، اسیدسالسیلیک با سه غلظت (۰، ۵/۵ و ۱ میلی‌مولار) و محلول‌پاشی هر دوی آن‌ها با فاصله زمانی ۱۰ روز از زمان ورود به فاز زایشی (ظهور غنچه) شروع و در سه نوبت تکرار گردید. به لحاظ این‌که استفاده همزمان دو هورمون با هم به‌دلیل احتمال وجود اثر آنتاگونیستی ممکن نبود با فاصله زمانی ۱۰ روز محلول‌پاشی آن‌ها صورت گرفت و هر کدام تیمار جدا در نظر گرفته شد. شایان ذکر است که علت عدم اجرای آزمایش به‌صورت فاکتوریل، یافتن

اکسیداسیونی بروز می‌کند و پاسخ فراحساسیتی به واسطه تجمع سریع اکسیژن واکنش‌دهنده و اکسید نیتریک پیش می‌رود (۱، ۱۵، ۱۶ و ۱۷). در نتیجه این امر، تولید متابولیت ثانویه و مقاومت اکتسابی سیستمیک افزایش می‌یابد (۱۷ و ۲۶).

اسیدسالسیلیک هورمون گیاهی است که نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر جوانه‌زنی بذر، کنترل تنفس، بسته شدن روزنه‌ها، گلیکولیز و القای گلدهی دارد (۱۲ و ۴۰). هورمون‌های گیاهی گروه جاسمونات (متیل جاسمونات، اسید جاسمونیک، توبرونیک اسید و نظایر آن از طریق هیدروپراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع به‌وسیله آنزیم لیپواکسیژناز در اثر تنش اکسیداتیو تولید می‌شوند. جاسمونات‌ها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند، معرفی شده‌اند (۸، ۲۰، ۴۵ و ۴۶). گزارشات مختلفی مبنی بر تأثیر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه آراییدوپسیس (۲۵) و بادام‌زمینی (۳۱) ارائه شده است. در یک بررسی مشخص شد که متیل جاسمونات باعث افزایش شدید محتوای پروتئین در ریشه و ساقه کلزا گردید (۱۲). در بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمینوآز (PAL) کنگرفرنگی تحت تأثیر متیل‌جاسمونات و اسیدسالسیلیک در شرایط درون‌شیشه‌ای گزارش شد که تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنلی و فلانوییدی تحت تأثیر نسبت‌های مختلف محرک قرار گرفت و نسبت به هم همبستگی نشان دادند (۴۱). در بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر گیاه دارویی آگاستاکه گزارش شده است که تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانیل‌آمینوآز و ۴-کومارات کوآلیگاز گردید (۳۹). بنابراین هدف از انجام این پژوهش

تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم بر اساس روش چانس و مهلی همراه با تغییراتی انجام گردید (۹).

تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم به روش کار و میشر همراه با تغییراتی انجام شد (۲۷).

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: جهت سنجش آنزیم از روش ناکانو و آسادو استفاده شد (۳۵).

اندازه‌گیری میزان اسیدآسکوربیک: اندازه‌گیری اسیدآسکوربیک با استفاده از روش نوید و همکاران انجام شد (۱۸).

اندازه‌گیری میزان فنل: اندازه‌گیری فنل از روش حاجی‌مهدی‌پور و همکاران صورت گرفت (۲۱).

اندازه‌گیری کلروفیل: جهت سنجش این پارامتر استخراج از روش آرنون و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل از روش اردکانی و نادور استفاده گردید (۳، ۴).

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول: جهت استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش براد فورد استفاده شد (۶).

داده‌های به‌دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS9.2 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، محلول‌پاشی با اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک با اطمینان ۹۹ درصد بر صفات کاتالاز، گایاکول پراکسیداز برگ و گلبرگ، پلی‌فنل اکسیداز برگ و گلبرگ و آسکوربات پراکسیداز برگ معنی‌دار بود (جدول ۱).

بهترین ترکیب تیماری اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بود نه تحلیل ماهیت برهمکنش آن‌ها؛ در این شرایط می‌توان ترکیب فاکتورها را به‌عنوان یک سطح تیمار مدنظر قرار داد (۴۲). تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، 20 Ja-، 5 Ja، 5 Ja-1Sa، 5 Ja-0.5 Sa، 20 Ja، 20 Ja-1Sa، 0.5 Sa، 50 Ja-0.5 Sa، 50 Ja، Ja-1 Sa و 1Sa بود.

اعمال تیمار و نمونه‌برداری: محلول‌پاشی با اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک از زمان ورود به فاز زایشی (ظهور غنچه) شروع و در سه نوبت تکرار گردید. محلول‌پاشی تیمارهای ترکیبی با فاصله زمانی ۱۰ روز انجام شد. سپس یک هفته بعد از پایان محلول‌پاشی آخر که مقارن با گلدهی کامل بود نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی صورت گرفت. برای تعیین عملکرد گل بعد از پایان محلول‌پاشی برداشت گل در سه نوبت صورت گرفت و بعد از خشک کردن در سایه، وزن خشک گل برای تعیین عملکرد در هکتار استفاده گردید.

استخراج آنزیم NADPH اکسیداز: استخراج آنزیم NADPH اکسیداز به روش کامپاروت (۱۳) انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز به روش (۴۲) انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: عمل استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن با استفاده از رنگ‌سنجی و به روش جانا و چدهوری انجام شد (۲۴).

استخراج عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز: استخراج به روش کار و میشر انجام شد (۲۷).

جدول ۱- نتایج واریانس (میانگین مربعات) NADPH، اکسیداز، پراکسید هیدروژن، گایاکول پراکسیداز برگ و گلبرگ، پلی فنل اکسیداز برگ و گلبرگ و آسکوربات پراکسیداز برگ.

Table 1. Results of analysis of variance (Mean square) for NADPH Oxidase H₂O₂, guaiacol peroxidase leaf and petal, polyphenol oxidase leaf and petal and ascorbate peroxidase leaf.

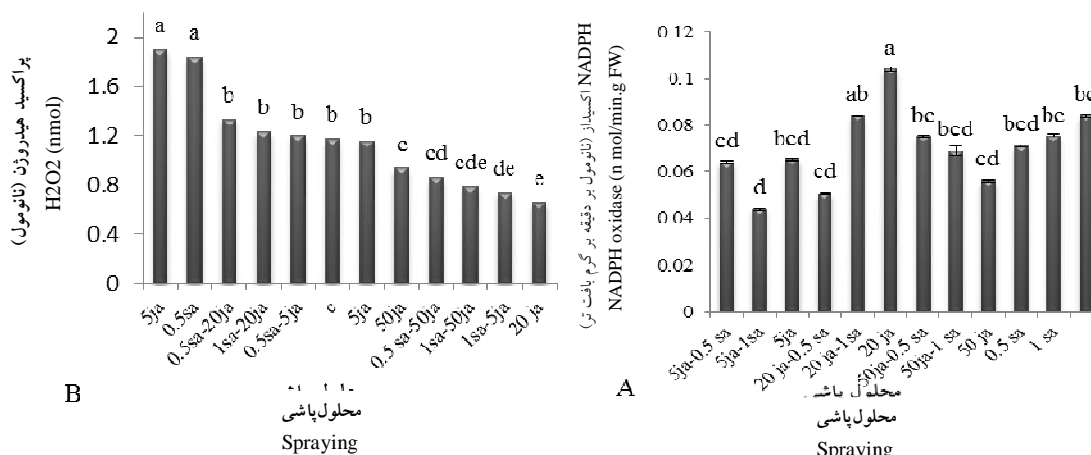
		میانگین مربعات Mean square						
منبع تغییرات S.O.V	df	NADPH اکسیداز NADPH Oxidase	پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂	گایاکول پراکسیداز GPX برگ	گایاکول پراکسیداز گلبرگ petal GPX	پلی فنل اکسیداز برگ leaf PPX	پلی فنل اکسیداز petal PPX	آسکوربات پراکسیداز APX
بلوک Block	2	0.0005 ^{n.s}	0.0006 ^{n.s}	0.0003 ^{n.s}	0.69 ^{n.s}	0.047 ^{n.s}	0.00030 ^{n.s}	0.00003 ^{n.s}
محلول پاش Spraying	11	0.0008 ^{**}	0.4800 ^{**}	0.0003 ^{**}	14.29 ^{**}	45.910 ^{**}	0.00600 ^{**}	0.00600 ^{**}
خطا Error	22	0.0003	0.0120	0.0003	0.66	0.080	0.00003	0.00010

** معنی داری در سطح ۱ درصد و n.s عدم معنی داری می باشد.

** Significant at 1% probability level and ns not significant

به دنبال آن غشای پلاسمایی نامتعادل می گردد (۹) و (۲). از آنجا که هدف از محلول پاشی القای تنش کاذب در گیاه بود، این امر پس از استعمال، از طریق راه اندازی برخی واکنش ها و سپس فعال شدن NADPH اکسیداز موجب تولید گونه های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن گردید (شکل b). همچنین در این پژوهش محلول پاشی سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در تیمارهای 5ja و 0.5 sa نسبت به شاهد شد، که حاکی از تنش اکسیداتیو در گیاه می باشد.

فعالیت NADPH اکسیداز و غلظت پراکسید هیدروژن: نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در بررسی محلول پاشی با اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک در شکل ۱ a ارائه شده است، محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در تیمارهای 20ja-1 sa، 0.5 sa، 1 sa، 50 ja و 20 ja-0.5 sa نسبت به شاهد گردید. گونه های فعال اکسیژن ROS به وسیله فعالیت آنزیم های مختلفی تولید می شود که یکی از مهم ترین آن ها NADPH اکسیداز می باشد. پتانسیل سیتوسول به جهت استفاده از الیستورها یا حمله پاتوژن ها کاهش می یابد و

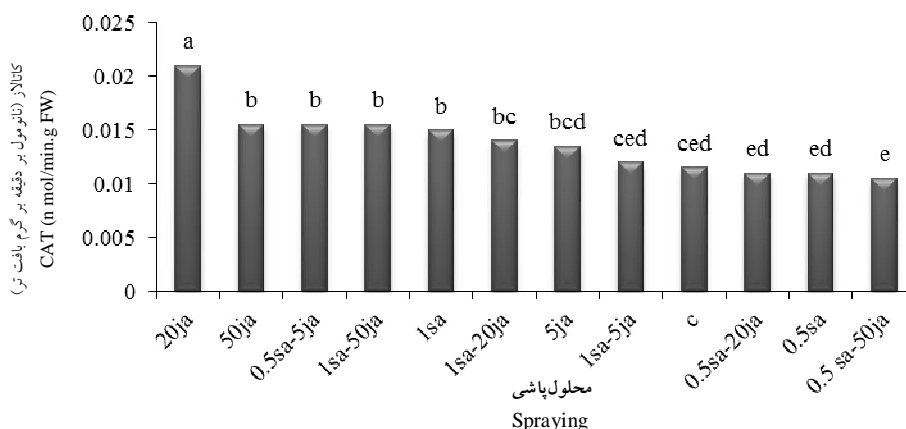


شکل ۱- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت NADPH اکسیداز (A) و غلظت پراکسید هیدروژن (B).

Figure 1. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on NADPH oxidase activity (A) and Hydrogen peroxide concentration (B).

برای سلول‌های گیاهی به‌خصوص کلروپلاست بسیار مضر می‌باشد. چرا که در غلظت‌های پایین باعث مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه کلونین به‌ویژه آنزیم‌های دارای گروه سولفیدریل از جمله گلیسرآلدید، ۳- فسفات دهیدروژناز و فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات می‌شود (۳).

فعالیت کاتالاز: محلول‌پاشی فعالیت آنزیم کاتالاز را در اغلب تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 20ja با میانگین ۰/۰۲۱ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ مشاهده شد (شکل ۲). کاتالاز از پراکسید هیدروژن به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه سریع این ماده اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند. پراکسید هیدروژن

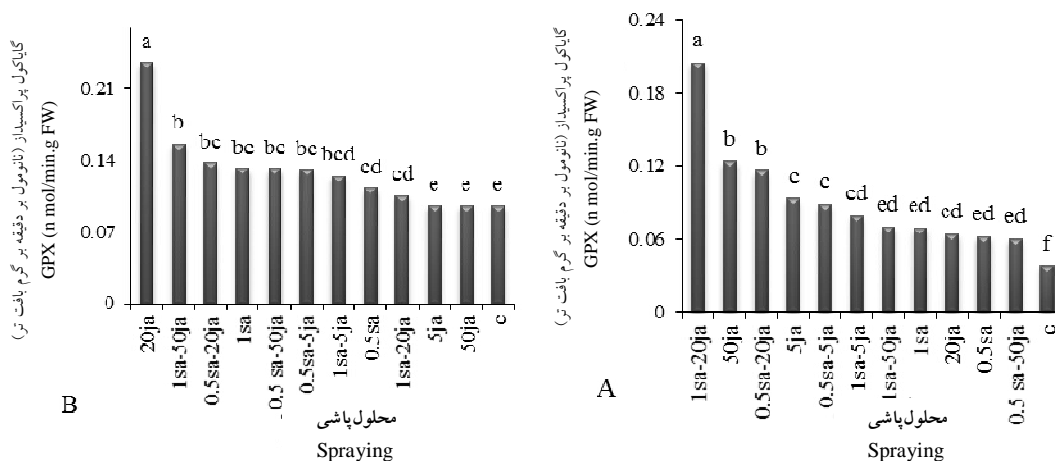


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالسیلیک بر فعالیت کاتالاز برگ.

Figure 2. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on catalase activity

موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن گردید (شکل ۱). گیایاکول پراکسیداز به‌عنوان جزئی از سیستم‌های دفاعی گیاه جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن هم در برگ و هم در گلبرگ افزایش یافت. گیایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی گیایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه آب اکسیژنه استفاده نموده و به عنوان دهنده الکترون عمل می‌کند. این آنزیم در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئول نیز دیده می‌شود (۳، ۲۱ و ۳۳).

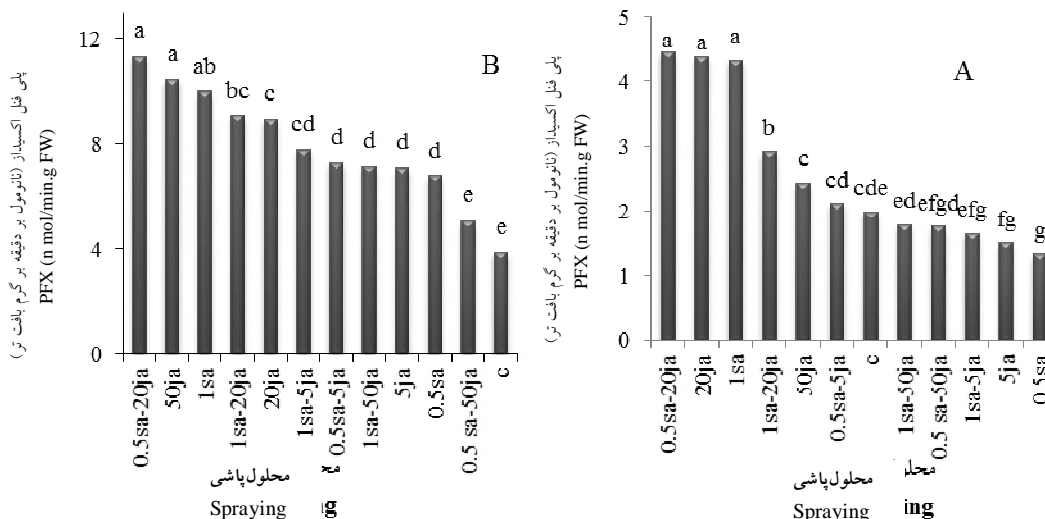
گیایاکول پراکسیداز: محلول‌پاشی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم گیایاکول پراکسیداز بافت برگ (همه تیمارها) و گلبرگ (بیشتر تیمارها) نسبت به شاهد شد (شکل ۳). در برگ، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 1sa-20ja با میانگین ۰/۰۲۱ و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد با میانگین ۰/۰۰۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ بود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در گلبرگ مربوط به تیمار 20ja با میانگین ۰/۰۲۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر گلبرگ بود. القای تنش کاذب که با محلول‌پاشی صورت گرفت



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر فعالیت گایاکول پراکسیداز برگ (A) و گلبرگ (B).
 Figure 3. Mean comparison of jasmonic and salicylic acid effects on GPX activity leaf (A) and petal (B).

پلی فنل اکسیداز: در شکل های a و b میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تحت تأثیر محلول پاشی ارائه شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در برگ در تیمار 20ja، 20ja-0.5sa و 1sa با میانگین حدود ۴/۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ مشاهده گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در بافت گلبرگ در تیمارهای 20ja-0.5sa و 50ja با میانگین های ۱۱/۳۴ و ۱۰/۴۷ و کمترین میزان فعالیت آنزیم در بافت گلبرگ در تیمار شاهد با میانگین ۳/۸۶ (۳۲ و ۳).

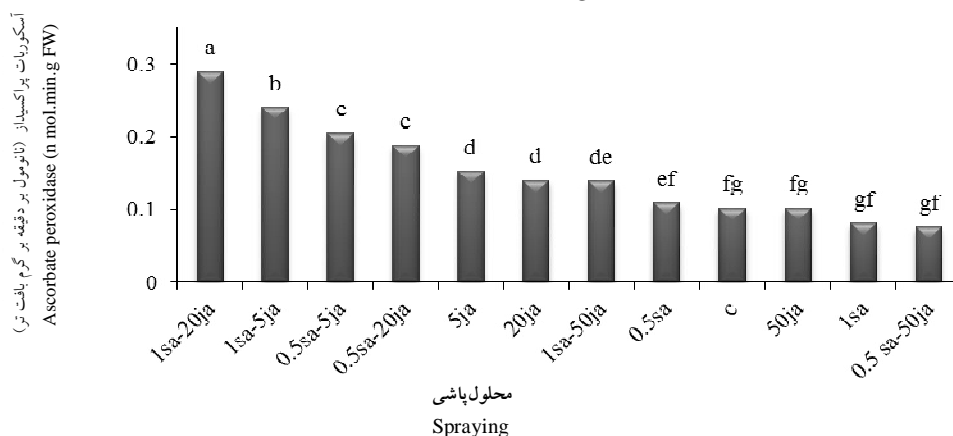
پلی فنل اکسیداز (نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر) اکسیدازها در تمام بخش های گیاه یافت می شوند و از فنل ها به عنوان دهنده الکترون استفاده کرده و در بیوستز لیگنین نقش دارند (۳۲ و ۲۲). پلی فنل اکسیداز یا تیروزیناز آنزیمی دارای دو اتم مس در هسته مرکزی خود می باشد و اکسیداسیون دی فنل ها به کینون ها را انجام می دهد. این آنزیم در این واکنش از اکسیژن مولکولی به عنوان سوپسترا استفاده می نماید (۳۲ و ۳).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر فعالیت پلی فنل اکسیداز برگ (A) و گلبرگ (B).
 Figure 4. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on polyphenol oxidase activity in leaf (A) and petal (B).

به طور عمده در کلروپلاست، سیتوزول و پراکسی زوم تجمع داشته و وظیفه آن‌ها حذف پراکسید هیدروژن تولید شده در این اندامک‌ها می‌باشد (۷). از آنجا که توازن بین گونه‌های فعال اکسیژن و پالاینده‌ها برای ادامه حیات ضروری می‌باشد گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را زیاد نموده و به دنبال آن‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی افزایش پیدا می‌کند (۵).

آسکوربات پراکسیداز: محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۵). بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تیمارهای 20ja-0.5sa، 20ja-1sa با میانگین ۰/۲۹ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بافت تر به دست آمد که تقریباً ۲ برابر شاهد بود. آسکوربات پراکسیداز در سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست، سبب پالایش و زدودن H₂O₂ می‌گردند. گزارش شده است که پراکسیدازهایی که از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز برگ.

Figure 5. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on leaf ascorbate peroxidase activity.

اسید آسکوربیک، وزن خشک برگ و گل معنی دار بود (جدول ۲).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک با اطمینان ۹۹ درصد بر صفات کلروفیل a، کلروفیل b، پروتئین محلول، فنل،

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) کلروفیل a، کلروفیل b، پروتئین محلول، فنل، اسید آسکوربیک، وزن خشک برگ و گل.

Table 2. Results of analysis of variance (Mean square) for chlorophyll a and b, soluble protein, phenol, ascorbic acid, leaf and flower dry weight.

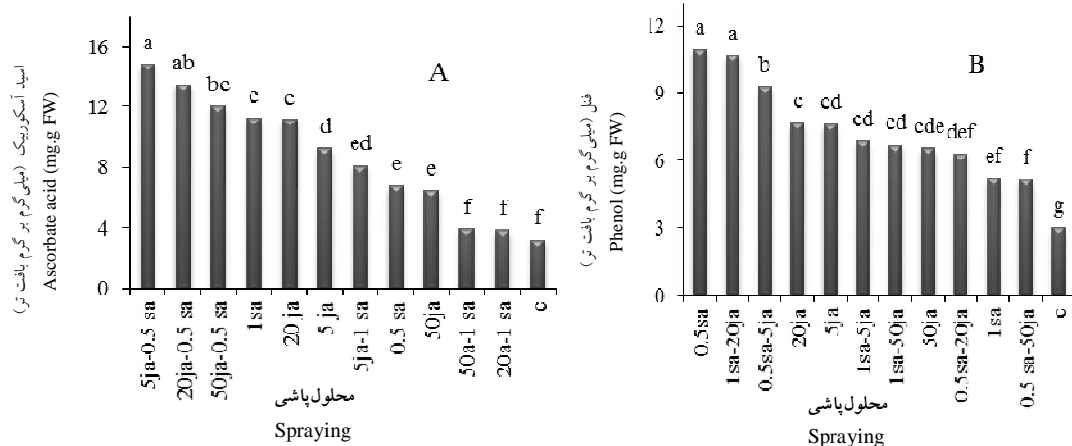
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square						
		کلروفیل a chl a	کلروفیل b chl b	پروتئین محلول soluble protein	فنل Phenol	اسید آسکوربیک Ascorbic acid	وزن خشک برگ Leaf dry weight	وزن خشک گل Flower dry weight
بلوک Block	2	0.09 ^{ns}	0.23 ^{ns}	6.68 ^{ns}	0.0320 ^{ns}	0.012 ^{ns}	0.59 ^{ns}	0.34 ^{ns}
محلول پاشی Sparying	11	0.87 ^{**}	0.54 ^{**}	18.50 ^{**}	15.9970 ^{**}	46.420 ^{**}	23.10 ^{**}	16.90 ^{**}
خطا Error	22	0.13	0.11	5.17	0.0628	1.244	0.72	0.89

** معنی داری در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی داری می‌باشد.

** Significant at 1% probability level and ns not significant.

و زدودن رادیکال آزاد را دارند. تجمع ترکیبات فنلی و افزایش فعالیت آنزیم PAL در انگور پس از کاربرد اسیدسالیسیلیک گزارش شده است (۹). اسیدآسکوربیک: محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت اسیدآسکوربیک در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۶a). بیشترین میزان اسیدآسکوربیک در تیمار 5ja-0.5sa مشاهده شد که ۴/۷ برابر شاهد بود. با توجه به این‌که قندهای محلول (D- گلوکز) پیش‌ماده اولیه بیوستز اسیدآسکوربیک هستند، می‌توان گفت که قندهای محلول موجب افزایش میزان اسیدآسکوربیک می‌گردند. اسید آسکوربیک یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هاست که در طیف وسیعی از واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به‌عنوان پالاینده اصلی گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌دهنده عمل می‌کند (۲۲ و ۱۹). L- اسیدآسکوربیک (ویتامین ث) ویتامینی مهم در رژیم غذایی انسان بوده و به‌دلیل اهمیت تغذیه‌ای و دارویی آن، توزیع آن در گیاهان به‌طور گسترده‌ای اندازه‌گیری شده است (۱۹ و ۲۲).

فنل کل: از آنجا که جهت استانداردسازی فرمولاسیون‌های گیاهان دارویی، یک ترکیب و یا دسته مشخصی از ترکیبات به‌عنوان مارکر ردیابی شده و تعیین می‌شوند، در اکثر فرمولاسیون‌های گیاه سرخارگل طبق مراجع معتبر مجموع ترکیبات فنلی نظیر اسید کلروژنیک، اسید شیکوریک، اسید کافتاریک و ... تعیین می‌گردند و از آنجا که این ترکیبات مشتقات فنلی می‌باشد، بنابراین فنل کل به‌عنوان یکی از مواد مؤثره سرخارگل در نظر گرفته شد (۴۱ و ۲۱). مقایسه میانگین فنل کل تحت تأثیر محلول‌پاشی در شکل ۶ ارائه شده است. بیشترین میزان فنل کل در تیمارهای 0.5sa و 20ja-1sa با میانگین حدود ۱۰/۷ بود و در تیمار شاهد مقدار آن به ۲/۹ میلی‌گرم بر گرم بافت تر رسید. گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام‌رسان مثل اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک و یا تنش‌ها آزاد می‌سازند. فنل‌ها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که توانایی پالایش



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر غلظت فنل (B) و اسیدآسکوربیک در برگ (A).

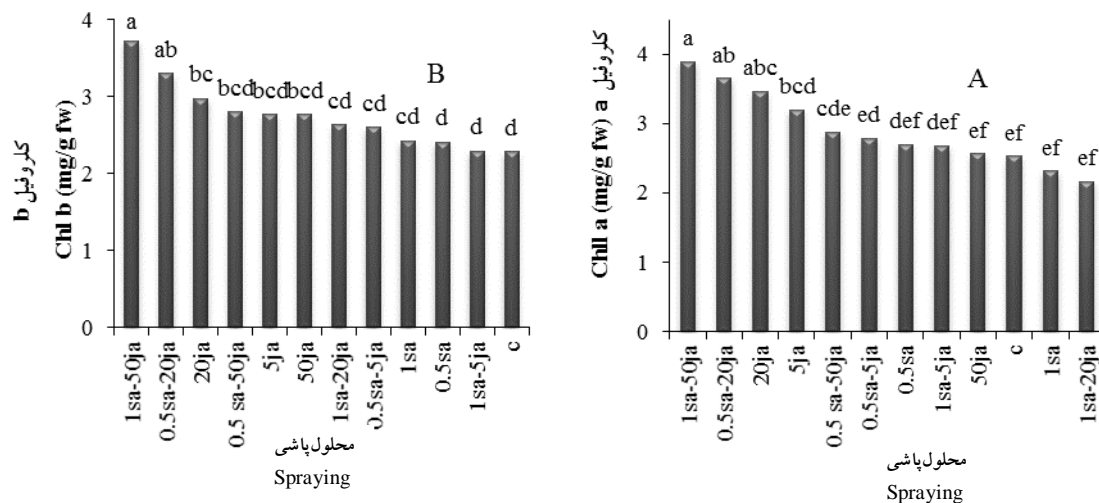
Figure 6. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on phenol (A) and ascorbic acid (B) concentration in leaf.

تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۷a). بیشترین غلظت کلروفیل a در تیمار 50ja-1sa با میانگین ۳/۸۹ میلی‌گرم بر گرم بافت تر مشاهده شد که ۱/۵

کلروفیل a و b: در شکل ۷ مقایسه میانگین غلظت کلروفیل a و b تحت اثر محلول‌پاشی ارائه شده است؛ محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت کلروفیل a در اکثر

تشکیل آمینولولینیک اسید دخالت دارد (۳۷ و ۴۳). میزان کلروفیل در گیاهان یکی از شاخص‌های مهم می‌باشد زیرا تعیین‌کننده ظرفیت فتوسنتزی گیاه می‌باشد. افزایش غلظت و حفظ سلامت غشاهای کلروفیل در برابر رادیکال‌های آزاد حاکی از تداوم فتوسنتز، افزایش تولید ماده خشک و به‌دنبال آن افزایش میزان متابولیت‌های اولیه و ثانویه، رشد و عملکرد در گیاه را سبب می‌گردد.

برابر شاهد بود. بیشترین غلظت کلروفیل b در تیمار 50ja-0.5sa، با میانگین ۳/۷۲ و کمترین غلظت آن در تیمار شاهد با غلظت ۲/۲۸ میلی‌گرم بر گرم بافت تر به‌دست آمد که با دو تیمار 0.5sa و 5ja-0.5sa در یک سطح آماری قرار داشت. گزارشات حاکی از آن است که استفاده از متیل‌جاسمونات در حضور نور سبب تحریک تشکیل کلروفیل a و b می‌شود (۳۰). به‌علاوه این‌که متیل‌جاسمونات در بیان برخی از ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل از طریق

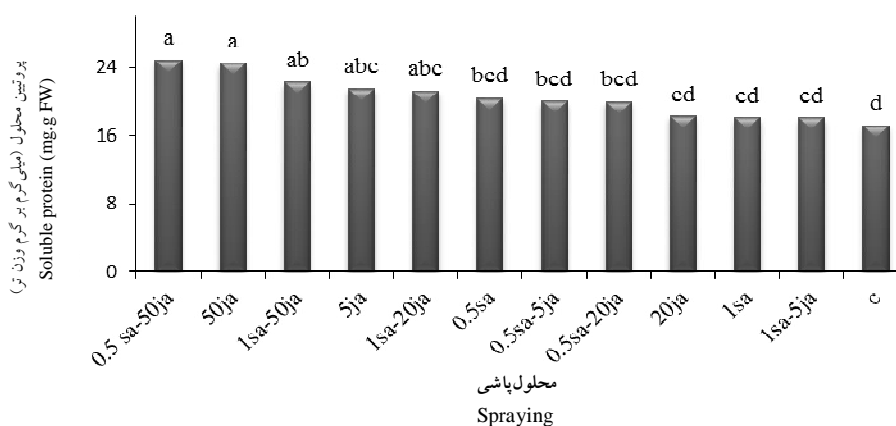


شکل ۷- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر غلظت کلروفیل a (A) و b (B).

Figure 7. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on chlorophyll a (A) and b (B) concentration.

خود را افزایش می‌دهد و یا می‌تواند به‌دلیل افزایش فعالیت‌های متابولیکی یا ذخیره‌ای در گیاه باشد. گزارش شده است که اسیدسالیسیلیک در تولید پروتئین‌های دفاعی و انواع متفاوتی از کینازها و روبیسکو تأثیرگذار است. احتمال می‌رود که اسیدسالیسیلیک بتواند با تأثیر بر آنزیم‌های مسیر سنتزی در افزایش پروتئین‌ها دخالت داشته باشد (۳۷).

غلظت پروتئین محلول: محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت پروتئین محلول در همه تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۸). بیشترین غلظت پروتئین محلول در تیمارهای 5ja-0.5sa و تیمار 50ja به‌ترتیب با میانگین‌های ۲۴/۹ و ۲۴/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ به‌دست آمد. این افزایش می‌تواند تحت تأثیر تحریک‌کنندگی این دو هورمون و به‌دنبال آن تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد که گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، تولید پروتئین‌های ضد تنش

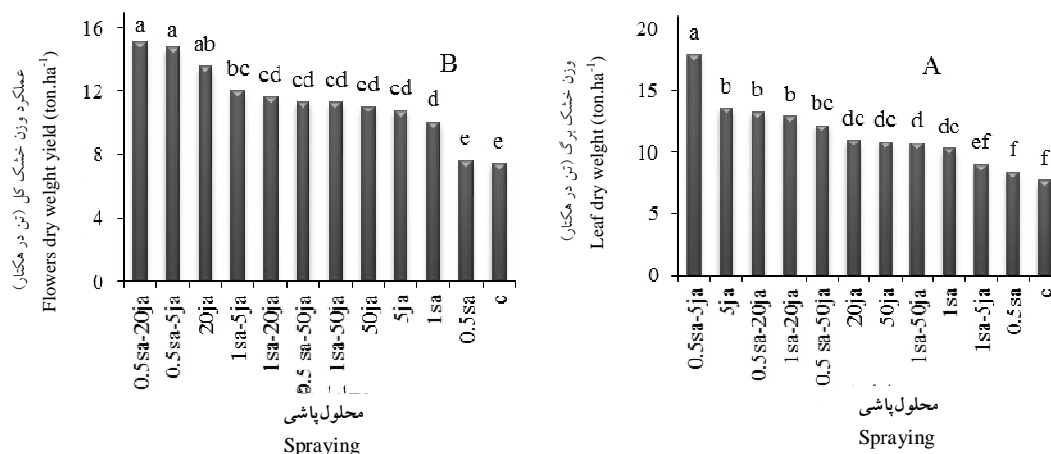


شکل ۸- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر غلظت پروتئین محلول.

Figure 8. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on soluble protein.

میزان کلروفیل a و b، (مطلوب‌تر شدن شرایط)، افزایش وزن خشک برگ، تعداد غنچه و گل (داده‌ها نشان داده نشد) را به دنبال داشته است. نتایج حاصل از کاربرد اسیدسالیسیلیک بر گیاه داوری گشنیز نشان داد که ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی در بوته، وزن خشک شاخه و برگ و عملکرد بذر به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک افزایش یافتند (۳۴).

وزن خشک برگ و گل: شکل ۹ روند تغییرات وزن خشک برگ و گل را تحت تأثیر محلول‌پاشی نشان می‌دهد بیشترین میزان وزن خشک برگ از تیمار 5ja-0.5sa حاصل گردید. بیشترین میزان وزن خشک گل در تیمارهای 0.5sa-5ja و 20ja-0.5sa بود. به‌نظر می‌رسد که تنش کاذب القا شده سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله اسید آسکوربیک و فنل‌ها شده و با افزایش



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر جاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر وزن خشک برگ (A) و گل (B).

Figure 9. Mean comparison effects of jasmonic and salicylic acid on leaf (A) and flower (B) dry weight.

را افزایش داد. این امر می‌تواند بر پالایش مؤثر گونه‌های فعال اکسیژن و به تأخیر انداختن پیری گیاه دلالت داشته باشد. افزایش میزان کلروفیل‌ها در اثر

نتیجه‌گیری کلی

محلول‌پاشی با اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه

بود. بیشترین میزان فنل کل، مهم‌ترین متابولیت ثانویه در سرخارگل نیز در تیمار 0.5 sa مشاهده گردید. اسیدسالیسیلیک ترکیبی ارزان و به سهولت قابل دسترس است. با توجه به این امر و اهمیت متابولیت ثانویه، کاربرد این ماده قابل توصیه می‌باشد.

تیمارهای به‌کار رفته نیز می‌تواند نشان‌دهنده افزایش تولید بوده و توجه‌کننده افزایش وزن خشک برگ و گل باشد. محلول‌پاشی سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه گردید؛ بیشترین میزان اسید آسکوربیک در تیمار 5ja-0.5 sa مشاهده شد که ۴/۶۸ برابر شاهد

over-inducing mitotic activity and cell expansion. *Planta.*, 220: 507-519.

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

10. Chan, Z., and Tian, S. 2006. Induction of H₂O₂ metabolizing enzyme and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry. *Postharvest Biol. Technol.*, 39: 314-320.

11. Cheryl Kaiser, C., Geneve, R., and Ernst, M. 2015. *Echinacea*. University of Kentucky Press, USA, 50p.

12. Chen, J., Cheng, Z., and Zhong, S. 2007. Effect of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress. *J. Environ. Sci.*, 19: 44-49.

13. Comparot, S.M., Graham, C.M., and Reid, D.M. 2002. Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light and dark grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots. *J. Plant Growth Reg.*, 38: 21-30.

14. Creelman, R.A., and Mullet, I.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 48: 355-381.

15. Debnam, P.M., Fernie, A.R., Lisse, A., Golding, A., Bowsher, C.G., Grimshaw, C., Knight, J.S., and Emes, M.J. 2004. Altered activity of the P₂ isoform of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J.*, 38: 49-59.

16. Divya, P., Puthusseri, B., and Neelwarne, B. 2013. The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compound in

منابع

- Ahmadi Moghadam, Y., Piri, K.H., Bahramnejad, B., and Habibi, P. 2013. Methyl jasmonate and salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (purslan). *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 2: 89-94.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Plant Biol.*, 55: 373-399.
- Ardakani, M., and Nadvar, A. 2008. Practical principles and technique for plant science proficient. Tehran University Press, 145p. (In Persian)
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol. Rockville.*, 24: 1-24.
- Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.*, 91: 179-194.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Cakmak, I., and Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, 98: 1222-1227.
- Capitani, F., Biondi, S., Falasca, G., Ziosi, V., Balestrazzi, A., Carbonera, D., Torrigiani, P., and Altamura, M. 2005. Methyl jasmonate disrupts shoot formation in tobacco thin cell layers by

- activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.*, 57: 315-319.
28. King, C. 2005. Commercial Echinacea production. *Alberta Agric. Food Rural dev.*, 13: 27- 40.
 29. Kumari, G.J., Reddy, A.M., Naik, S.T., Kumar, S.G., Prasanthi, J., Sriranganayakulu, G., Reddy, P.C., and Sudhakar, C. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase enzymes in peanut seedlings. *Biol. Plantarum*, 50: 219-226.
 30. Maria J. Jimenez-Quesada, M.J., Traverso, J.A., and Alché, J.D. 2016. NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues. *Frontiers in plant Sci.* 1-133.
 31. Mittler, R. 2004. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.
 32. Moller, IM., and Sweetlove, LJ. 2010. ROS signalling-specificity is required. *Trends Plant Sci* 2010; 15(7): 370-74.
 33. Moungrimuandee, B., Moriwaki, H., Nakayama, M., Nishigaki, S., and Yamamoto, F., Effects of injection of etherl, Methyl jasmonate and Salicylates and *Raffaelea Quercivora* incubation on sapwood discoloration in *Quercus serrata*. *Tree Physiol.*, 32: 41-53.
 34. Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.*, 22: 867-880.
 35. Omidbaigi R. 2001. Study of cultivation and adaptability of *Echinacea purpurea* (L.) Moench in the north of Tehran. *Sci. Technol. Agric. Natural Res.*, 6: 240-230. (in Persian with English abstract)
 36. Parvaiz, A., and Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil Environ.*, 54: 89-99.
 37. Razavinia, C.M., Aghaalykany, M., and Naghdabadi, H. 2015. The effect of vermicomposting and chemical fertilizer on quantitative and qualitative characteristics of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Iran. J. Med. Arom. Plants.*, 31: 373-357. (In Persian)
 17. Esmaeilzadeh-Bahabadi, S., and Sharifi, M. 2013. The increasing of secondary metabolites in plant with use of biological elicitors. *J. Cells Tissue*, 4: 119-128.
 18. Foyer, C., Rowell, J., and Walker, D. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta.*, 157: 239-244.
 19. Galeshi, S., Torabi, B., Rahami-Karizaki, A., and Barzagar, A. 2009. Stress and stress coping in cultivation plants. Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources Press, 147p. (In Persian)
 20. Gundluch, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 98: 2389-2393.
 21. Haji_Mehdipour, H., Khanavi, M., Shkrchy, M., Abadi, Z., and Pirali-Hamadani, M. 2008. The investigation of best method for phenolic compound extraction in *Echinacea purpurea*. *J. Medic. Plant.*, 8: 145-152. (In Persian)
 22. Hare, P.D. 2007. Metabolic implications of stress-induced accumulation in plant. *Plant Growth Reg.*, 21: 79-103.
 23. Howlett, B. 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 371-375.
 24. Jana, S., and Choudhuri, M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquatic Bot.*, 12: 342-354.
 25. Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *J. Plant physiol. Biochem.*, 42: 231-255.
 26. Kafi, M., Zand, A., Kamkar, B., Mahdavi-Damghani, A., Abbasi, F., and Sharifi, H.R. 1388. *Plant Physiology*. Mashhad University Press, 600p. (In Persian)
 27. Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase

42. Ueda, J., and Saniewski, M. 2006. Methyl Jasmonate- induced stimulation of chlorophyll formation in the basal part of tulip bulbs kept under natural light conditions. *J. Fruit Ornam. Plant Res.*, 14: 199-210.
43. Vasconsuelo, A., and Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.*, 172: 861-875.
44. Weathers, P.J., Towler, M.J., and Xu, J. 2010. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl. Microbiol. Biotec.*, 85: 1339-1351.
45. Zhang, Y., Mian, M.R., and Bouton, J.H. 2006. Recent molecular and genomic studies on stress tolerance of forage and turf grasses. *Crop Sci.*, 46: 497-511.
38. Raouf Fard, F., Sharifi, M., Omidbaigi, R., Sefidkon, F., Behmanesh, M., and Ahmadi, N. 2014. Effect of methyl jasmonate on metabolic enzymes and phenolics, in *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze. *Iran. J. Med. Arom. Plants.*, 30: 361-369. (In Persian)
39. Rao, M.V., Paliyath, G., Ormord, D.P., and Watkins, C.B. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂ metabolizing enzymes. *Plant Physiol.*, 115: 137-149.
40. Samadi, S., Ghasemnezhad, A., and Alizadeh, M. 2014. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *J. Plant Prod. Res.*, 21: 135-148.
41. Soltani, A. 2014. Design and Analysis of Agricultural Experiment with SAS. Mashhad University Press, 431p.