بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر میزان آنتوسیا نین‌های گیاه دارویی مینای چمنی[1] آلوده به قارچ

رمضان‌علی خاوری نژاد، صدیقه مهرابیان، اکرم اسدی: دانشگاه تربیت معلم

چکیده

عمل‌کرد حفاظتی‌ای که به آنتوسیانین برگ‌ها نسبت می‌دهند، می‌تواند به طور مؤثری با ترکیبات القا کننده مانند ترکیبات بیماری‌زا، سالیسیلیک اسید و تعدادی از ترکیبات دیگر تحریک شود. در این پژوهش گیاه دارویی مینای چمنی[1] از خانواده مرکبیان (کاسنی) ساخته شدن آنتوسیانین سیانیدین٣- مالونیل گلوکورونوزیل گلوکوزید[2]را در برگ‌های خود در پاسخ به سالیسیلیک اسید و عامل بیماری‌زایی افزایش می‌دهد. نتایج حاکی از آن است که مقدار آنتوسیانین در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ٣، ٧ و ١١ میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان تیمار نشده با این اسید و بدون آلودگی قارچی(گیاهان کنترل) افزایش پیدا کرد. همچنین مقدار آنتوسیانین در گیاهان آلوده به قارچ و بدون تیمار سالیسیلیک اسید بیش‌تر از گیاهان کنترل بود. در ضمن زمانی که گیاهان آلوده، با سالیسیلیک اسید تیمار شدند، افزایش چشم‌گیری در مقدار آنتوسیانین نسبت به گیاهان کنترل مشاهده شد. همچنین کروماتوگرام‌های به دست آمده از نمونه‌ها، به روش HPLC و مقایسه آن‌ها با کروماتوگرام آنتوسیانین استاندارد نتایج فوق را تأیید کرد.

مقدمه

گیاهان به عنوان یکی از منابع داروهای طبیعی، قادر به سازش‌های فیزیولوژیک متفاوتی در پاسخ به دامنه وسیعی از محرک‌ها در محیط پیرامونی خود هستند. عوامل بیماری‌زایی که موجب زخم‌های بافت مردگی می‌شوند، غالباً سبب حفاظت گیاه در برابر هجوم همان عامل بیماری‌زا یا موجود زنده دیگر می‌شوند. این پدیده در مورد آلودگی‌های قارچی و باکتریایی گزارش شده است. این مقاومت به شکل مقاومت اکتسابی موضعی[3] و مقاومت اکتسابی همگانی[4] است. تا به حال دو نظریه در زمینه عامل محرک در گیاه و القا کننده SAR معرفی شده است: اولین نظریه، ایجاد پتانسیل عمل در سطح غشای یاخته‌ای است، بدین منظور یک موج واقطبیده (دپلیمریزاسیون) در سطح غشای یاخته‌ای، در واکنش به رها کننده‌ها[5] یا آسیب‌ها، در سراسر گیاه منتشر می‌شود [١].

واژه‌های کلیدی: مینای چمنی، سالیسیلیک اسید ، آنتوسیانین، قارچ

١-*Bellis perennis* L. Cyanidin ٢-malonyl-glucuronosylglucoside ٣ -Local acquired resistance(LAR) ٤ - Systemic acquired resistance (SAR) ٥- elicitors

Archive of SID
www.SID.ir

دومین نظریه، تولید سالیسیلیک اسید[1] است. سالیسیلیک اسید به عنوان گروهی از ترکیبات فنلی متعدد، دارای یک حلقه آروماتیک با یک گروه هیدروکسیل، به عنوان یک القا کننده مؤثر در بیان ژن‌های مقاومت شناخته شده است که پس از افزودن به سطح بیرونی تعدادی از گیاهان، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی(PR) را به رمز در می‌آورد[۲]،[۳]. گزارش‌های موجود بیان می‌کنند، بعد از تلقیح گیاهان با عوامل بیماری‌زا، سالیسیلیک اسید تولید شده به سرعت به گلوکز متصل می‌شود و به سالیسیلیک اسیدβ- گلوکوزید(SAG) تبدیل می‌شود. آنزیمی که SA را به SAG تبدیل می‌کند، سالیسیلیک اسید گلوکوزیل ترانسفراز است که در چندین گیاه شناسایی شده است. یک مدل نقش SAG را در گسترش مقاومت اکتسابی چنین نشان می‌دهد[٤]، [٥]، [٦] که آلودگی اولیه به عامل بیماری‌زا، موجب تشکیل آسیب‌های بافت مردگی و واکنش سریع و تولید سالیسیلیک اسید در سراسر گیاه می‌شود. همین طور مازاد SA بهSAG تبدیل می‌شود. اگر گیاه دو باره با همان عامل بیماری‌زا آلوده شود، مهار بعدی منجر به خرابی یاخته و تغییر در نفوذپذیری غشا در محل آلودگی می‌شود که این امر منجر به انتشار SAG به درون فضاهای برون یاخته‌ای و هیدرولیز آن می‌شود. این عمل غلظت SA را در محل آلودگی افزایش می‌دهد و SA تولید شده می‌تواند به یاخته‌های مجاور وارد شود و پاسخ‌های دفاعی را القا کند. این فرآیند دفاعی در طی آلودگی ثانویه نسبت به دفاع اولیه بیش‌تر مؤثر خواهد بود، و تبدیل سریع SA به SAG به سرعت پاسخ‌های دفاعی را در زمان و مکانی که به آن نیاز است، القا خواهد کرد. این القای سریع و مؤثر در محل آلودگی، آسیب کمتری ایجاد می‌کند. آلودگی گیاهان با عوامل بیماری‌زا اغلب باعث مکانیسم‌های دفاعی چند جزئی و وسیع می‌شود که ممکن است شامل فعال سازی مسیر زیست ساخت(بیوسنتز) فنیل پروپانوئیدها[۷]، تغییر ساختار دیواره یاخته‌ای از طریق ساختن و تشکیل پروتئین‌های غنی از هیدروکسی پرولین[۸]، لیگنین[۹]، تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتیناز و گلوکانازها[۱۰] و ساختن مهارکننده‌های آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره یاخته‌ای[۱۱] باشد. این موارد در واقع شرایطی در گیاه فراهم می‌کند تا تعادل سوخت وسازی در یاخته‌ها در طی پاسخ به عوامل بیماری‌زا حفظ شود[۱۲]. به نظر می‌رسد سالیسیلیک اسید نیز می‌تواند توانایی گیاه را برای بسیج دفاع یاخته‌ای از طریق همان مکانیسم‌های دفاعی چند جزئی و وسیع که عوامل بیماری‌زا فراهم می‌کنند، افزایش دهد و تعادل سوخت و سازی یاخته‌ها را حفظ کند[٥]، [٦]. با توجه به مطالب بیان شده، پژوهش حاضر در صدد فراهم آوردن شرایطی است که بتوان تولید ترکیبات فنلی، از جمله آنتوسیانین‌ها را در گیاه دارویی مینای چمنی در موقع حمله عوامل بیماری‌زا به حداکثر رساند. گیاه دارویی مینای چمنی کوچک و علفی از خانواده مرکبیان (کاسنی)، بومی اروپا و همچنین در نقاطی از آسیا است. قسمت‌های مورد استفاده این گیاه که خواص درمانی نیز دارند، ریشه و برگ هستند. این گیاه شهرت زیادی در درمان زخم‌ها دارد و همچنین در

۱-Salicylic acid (SA)

Archive of SID

www.SID.ir

درمان امراض داخلی- مانند اختلالات کبدی - از عصاره آن استفاده می‌شود، این گیاه همچنین تصفیه کننده خون، ملین ملایم، از بین برنده التهاب، آرام کننده، دفع کننده سنگ کلیه، و مفید در برطرف کردن دردهای روماتیسمی و ... است[۱۳]. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین‌ها در طی آلودگی گیاه به عنوان هدف پژوهش در نظر گرفته شده است، زیرا این ترکیبات نقش مهمی در بهبود پاسخ‌های ایمنی در گیاهان ایفا می‌کنند .

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان

بعد از تهیه بذرها از بخش گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، و ضد عفونی کردن آن‌ها، بستر مورد نیاز برای انتقال بذرها شامل $\frac{2}{3}$ ماسه و $\frac{1}{3}$ رس الک شده تهیه و سپس بذرها به این سطح انتقال یافتند. گلدان‌ها در مقابل پنجره قرار داده شدند و بعد از جوانه‌زنی گلدان‌های حاوی دانه‌رست به اتاق کشت منتقل گردیدند. میزان نور در طول روز نوسان داشت، به طوری که در صبح مقدار نور ۲۵۸۵ لوکس بود و تا میانه روز به ۳۰۰۰ لوکس افزایش می‌یافت و این مقدار در عصر به همان مقدار نور در صبح می‌رسید. بنا براین برای به حداقل رساندن اثرات میکروکلیمایی در محوطه رشد گیاه، گردش وضعی و جابه جایی تصادفی گلدان‌ها به طور روزانه در دوره رشد صورت گرفت. حرارت محیط پیرامونی در نقاط اتاق کشت در ساعات مختلف روز اندازه‌گیری شد و دمای روزانه در حدود ۳± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و دمای شبانه ۳± ۱۵درجه سانتی‌گراد ثبت شد. دانه‌رست‌ها تا روز دهم با آب مقطر افشانه شدند. از روز دهم تا روز پانزدهم، یک روز در میان حجم معیّنی از محلول غذایی هوگلند $\frac{1}{10}$ به گلدان‌ها اضافه شد. از روز پانزدهم تا روز بیستم دو روز در میان محلول غذایی هوگلند $\frac{1}{5}$ و از روز بیستم تا بیست و پنجم سه روز در میان محلول غذایی هوگلند $\frac{1}{2}$ و از روز بیست و پنجم سه روز در میان حجم معیّنی از محلول غذایی هوگلند کامل به گلدان‌ها اضافه شد. هر روز به میزان کاهش آب از دست رفته آب مقطر اضافه گردید. از روز بیست و نهم که گیاهان در آستانه تشکیل برگ سوم بودند، تیماردهی با غلظت‌های ۳،۷و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید آغاز شد. بدین منظور محلول ۰/۰۰۱ مولار سالیسیلیک اسید به عنوان محلول مادر تهیه شد. و از این محلول غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید(۳، ۷ و۱۱ میکرومولار) تهیه شد. لازم به ذکر است که تیماردهی هر سه روز یک‌بار تا پایان روز برداشت(هفتادمین روز) ادامه داشت.

جدول ۱-

نام تیمار	ترکیب محلول غذایی در تیمارهای اعمال شده
نمونه کنترل	محلول غذایی هوگلند کامل
SA_3	محلول غذایی هوگلند کامل + غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید
SA_7	محلول غذایی هوگلند کامل + غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید
SA_{11}	محلول غذایی هوگلند کامل + غلظت ۱۱میکرومولار سالیسیلیک اسید

Archive of SID

www.SID.ir

زمان و روش تلقیح

میکروارگانیسم‌های مورد پژوهش به طور خالص از مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، بخش باکتریولوژی تهیه شد. نمونه‌های قارچی بررسی شده *فوزاریوم سامباسینوم*[1] و *آلترناریا اس پی پی*[2] بودند. میکروارگانیسم‌های آزمایش شده از لحاظ خالص بودن بررسی شدند. و برای حفظ قارچ‌ها هر پانزده روز یک‌بار بر روی محیط کشت جدید از نمونه‌های فوق کشت جدید تهیه می‌شد. از علائم بیماری‌ای که قارچ *فوزاریوم سامباسینوم* ایجاد می‌کند پژمردگی و پوسیدگی آوندی است، سم این قارچ تری‌ترپنوئیدی و بازدارنده مرگبار سنتز پروتئین در موجودات یوکاریوت است. همچنین از علامت‌هایی که قارچ *آلترناریا اس پی پی* ایجاد می‌کند لکه‌های قارچی بر روی برگ‌ها و پژمردگی است. سم این قارچ تنتوکسین از سموم منشأ گرفته از اسید آمینه است، این سم میزان بازشدن روزنه‌ها را از طریق منع فسفوریله شدن نوری کاهش می‌دهد[۱٤]. بر این اساس عمل تلقیح بر طبق روش انیدی[۱٥] شصت روز پس از جوانه‌زنی انجام شد. در هر گیاه سطح تحتانی دو برگ (از چهار ردیف برگی موجود ، برگ‌های ردیف سوم به دلیل این که نه پیر و نه زیاد جوان بودند انتخاب شدند) با سرنگ بدون سوزن استریل زخمی شد. سپس ماده تلقیحی تهیه شده (در ۱٥ میلی‌لیتر آب مقطر استریل یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی(10^5spore ml^{-1}) اضافه شد) بر روی گیاه مربوطه پاشیده شد و ماده تلقیحی بر روی محل زخم با دست به آرامی مالش داده شد تا از نفوذ قارچ اطمینان حاصل گردد، سپس گلدان‌ها به مدت٤۸ ساعت در اتاق تاریک قرار گرفتند و بعد از این مدت به اتاق کشت منتقل شدند. از روز اول تا روز دهم بعد از تلقیح که معادل روز هفتادم و زمان برداشت بود شدت بیماری در طی روز گزارش گردید.

روش استخراج آنتوسیانین‌ها

مقدار معیّنی از بافت تازه برگ(۲ دیسک برگی۲۰ میلی‌متری) در۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی شده (HCl 1%, v/v) برای ۲٤ ساعت در دمای ٤ °C با کمک دستگاه تکان دهنده مداوم (اوربیتال شیکر) به آرامی تکان داده شد. برای حذف کلروفیل و رنگیزه‌های دیگر از۱ میلی‌لیتر استن: آب(v:v،۱:٤) استفاده شد. برای ۲ میلی‌لیتر از عصاره آنتوسیانینی ۱/٥ میلی‌لیتر آب و ۲/٥ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و بعد از سانتریفوژ کردن در۱٦۰۰g برای ۲۰ دقیقه در دمای ٤ °C محلول‌های روشناور محتوی آنتوسیانین به لوله‌ها منتقل شدند[۱٦].

شناسایی آنتوسیانین با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد

نمونه‌های به دست آمده از فرآیند استخراج، توسط کروماتوگرافی ستونی(پیش ستون) جداسازی شد، بدین منظور یک ستون شیشه‌ای به طول ٥۰ سانتی‌متر و قطر ۱۲ میلی‌متر محتوی سیلیکاژل کروماتوگرافی به عنوان فاز ثابت در نظر گرفته شد. این فاز درسیستم حلال شامل تری کلرومتان: متانول: آب(۲:۱۰:۱٥) به تعادل رسید.

۱-Fusarium sambacinum ۲ - Alternaria spp

Archive of SID

www.SID.ir

فاز متحرک به همراه نمونه در فضای داخل فاز ثابت با سرعت ۳۰ میلی‌لیتر در ساعت به حرکت درآمد. تغییرات جذب توسط آشکارساز مدل«UV-Detector-uniCom 4225» ارزیابی و نقاط دارای جذب به هم ارتباط یافت و توسط ثبات به صورت منحنی رسم گردید. محلول خروجی از آشکارساز در فاصله‌ای که جذب قابل توجه بود (در طول موج ۵۳۰ نانومتر) برای مرحله بعد با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد جمع آوری شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه HPLC مدل «Crystal-200-uniCom 4225» تزریق گردید و از ستون C_{18} با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر استفاده شد. تحت شرایط گرادیان عمل شست و شو توسط متانول با غلظت‌های ۴۰ تا ۱۰۰ درصد و اسید فسفریک ۰/۰۰۵ درصد(v/v) و سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه با فاصله زمانی ۲۴ دقیقه از پمپ‌ها وارد ستون شد. مدت زمانی که طول می‌کشد تا اولین قله مشاهده شود، با زمان بازداری ۱۵ دقیقه است. جذب توسط آشکارساز در ۵۳۰ نانومتر برای وجود آنتوسیانین‌ها تعیین گردید. برای تعیین غلظت آنتوسیانین نمونه‌ها، از نمونه استاندارد«Cyanidin 3-O-ß-D-glucopyranoside» ۱۰درصد با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰...۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده و به ترتیب به دستگاه تزریق شد (به دلیل محدودیت در تهیه استانداردهای دیگر از انواع آنتوسیانین‌ها، تنها امکان تشخیص و جداسازی مشتق سیانیدین آنتوسیانین، به دلیل شاخص‌تر بودن مشتق سیانیدین در مینای چمنی برای پژوهش‌گران ممکن بود). استانداردها کروماتوگرافی شدند و زمان بازداری[۱] و نواحی قله‌هایشان با یک هماهنگ کننده مدل« 3396A, Hewlett-Padcard » تعیین شد. زمان بازداری برای شناسایی و تعیین مقدار آنتوسیانین‌ها در یک نمونه و مقایسه آن‌ها با غلظت شناخته شده در یک نمونه استاندارد است.

روش آماری

پس از تعیین نتایج خام اولیه، برای تفسیر نتایج از محاسبات آماری استفاده شد. برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS برای تعیین میانگین، انحراف معیار و آنالیز واریانس دو عاملی استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی ظاهری گیاهان تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید و آلودگی با قارچ

در گیاهان آلوده با قارچ‌های فوزاریوم و آلترناریا از روز اول آثار بیماری در برگ‌های زخمی(لکه‌های قارچی بر روی برگ‌ها و پژمردگی) به طور خفیف ظاهر شد و بعد از سه روز بیماری در همان برگ‌ها به طور کامل قابل تشخیص بود و در برگ‌های دیگر نیز پیشرفت بیماری مشاهده شد. اما در نمونه‌های آلوده ولی تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید از روز اول آثار بیماری آشکار نشد و بعد از

۱-Retation time

Archive of SID

www.SID.ir

سه روز در برگ‌های زخمی شده، بیماری به صورت لکه‌های قارچی ظاهر شد و در روز دهم بعد از تلقیح گسترش بیماری در بعضی از برگ‌ها به کندی صورت گرفته بود. بدین ترتیب نشان داده شد که تیمار سالیسیلیک اسید در کاهش ظهور علائم بیماری در گیاه مؤثر بوده و مرگ گیاه را به تعویق انداخته است .

نتایج بررسی زیست شیمیایی آنتوسیانین‌ها در گیاه مینای چمنی

سنجش مقدار آنتوسیانین با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد انجام شد به طوری که نتایج حاصل از هر دو روش با هم همخوانی داشتند.

با محاسبه سطح زیر منحنی و مقایسه زمان بازداری هر کدام از نمونه‌ها و مقایسه آن‌ها با آنتوسیانین استاندارد تعیین شد(جدول ۱).

جدول ۱- مقادیر آنتوسیانین(X±SE) برحسب($\mu gmg^{-1}fw$) سنجش شده به روش HPLC

تیمارسالیسیلیک اسید (SA) بر حسب(µM)	control	SA_3	SA_7	SA_{11}
control	۷/۲ ±۲/۲	۲۳/۵ ± ۴/۲	۳۰/۷ ± ٤/٥	١٦/٩ ± ٣/٧
Fusarium sambacinum	١١/٨ ± ٢/٨	١٤ ± ٣/٥	١٦/٦ ± ٣/٦	١٩/٣ ± ٣/٧
Alternaria spp	٢١ ± ٣/٦	٣٥ ± ٥/٣	٢٤ ± ٤/١	٣٣ ± ٥/٦

چنان که از جدول ۱ استنباط می‌شود، مقدار آنتوسیانین در گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و فاقد آلودگی قارچی(گیاهان کنترل)، ۷/۲ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن‌تر است. زمانی که گیاهان با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند و بدون هر گونه آلودگی قارچی‌اند افزایش چشمگیری در مقدار آنتوسیانین مشاهده می‌شود به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به۲۳/۵ میکروگرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۳۰/۷ میکروگرم در گیاهان تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۶/۹میکروگرم برای گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و تیمار شده با غلظت‌های ۳($P<۰/۰۰۱$)، ۷($P<۰/۰۰۱$) و ۱۱($P<۰/۰۱$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده گردید.

زمانی که گیاهان با قارچ شده *فوزاریوم سامباسینوم* آلوده می‌شوند، مقدار آنتوسیانین در برگ‌ها از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۱۱/۸ میکروگرم افزایش می‌یابد و آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری را بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به قارچ فوزاریوم در $P<۰/۰۵$ بر روی تجمع آنتوسیانین نشان می‌دهد. اما

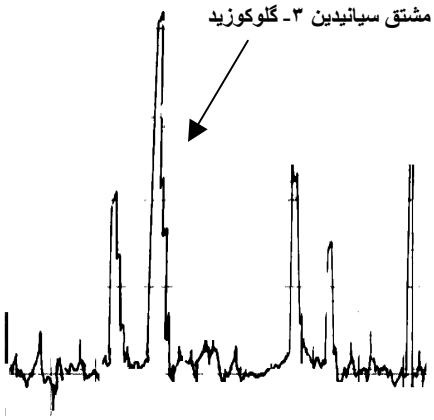
Archive of SID

www.SID.ir

زمانی که گیاهان آلوده با این قارچ با غلظت‌های۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند تغییرات چشم‌گیری در مقدار آنتوسیانین مشاهده می‌شود، به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۱۱/۸ میکروگرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۱۴میکروگرم برای نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید، ۱۶/۶میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۱۹/۳ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳($P<۰/۰۵$) ۷($P<۰/۰۱$) و ۱۱($P<۰/۰۰۱$) میکرومولار سالیسیلیک اسید بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده شد.

در گیاهان آلوده با قارچ شده *آلترناریا اس پی پی* مقدار آنتوسیانین در برگ‌ها از ۷/۲ میکروگرم در گیاهان کنترل به ۲۱ میکروگرم افزایش یافت. آنالیز واریانس دو عاملی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده به قارچ آلترناریا در $P<۰/۰۰۱$ بر روی مقدار آنتوسیانین نشان داد. در زمانی که گیاهان آلوده با قارچ آلترناریا با غلظت‌های۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، مقدار آنتوسیانین افزایش می‌یابد، به طوری که مقدار آنتوسیانین از ۲۱ میکروگرم در نمونه آلوده و تیمار نشده به ۳۵ میکروگرم در نمونه آلوده تیمارشده با غلظت۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید،۲۴ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید و ۳۳ میکروگرم در نمونه آلوده تیمار شده با غلظت ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید افزایش نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس دو عاملی، تفاوت معنی‌داری بین گیاهان کنترل و گیاهان آلوده تیمار شده با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید در $P<۰/۰۰۱$ بر روی مقدار آنتوسیانین مشاهده شد.

همان طور که ملاحظه می‌شود دوزهای پایین سالیسیلیک اسید می‌توانند توانایی گیاه را برای بسیج دفاع یاخته‌ای به منظور افزایش القا ترکیبات دفاعی ویژه(مانند ساپونین‌ها، ترکیبات فنلی، ایزو فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک....) بیفزاید و دوزهای بالا نیز می‌توانند به طور مستقیم برای القای بیشتر همان ترکیبات دفاعی و یا ترکیبات دفاعی دیگر مؤثر باشند[۵].

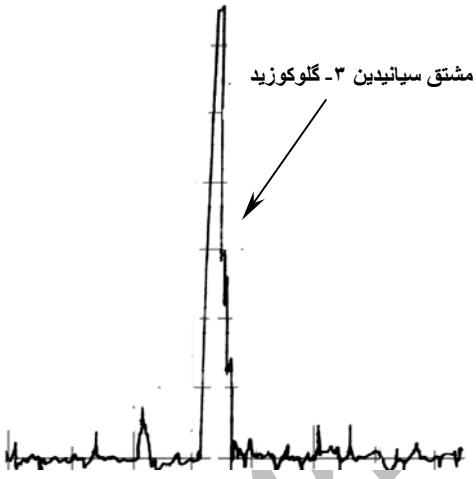


شکل ۱- کروماتوگرام مربوط به آنتوسیانین در نمونه کنترل

Archive of SID

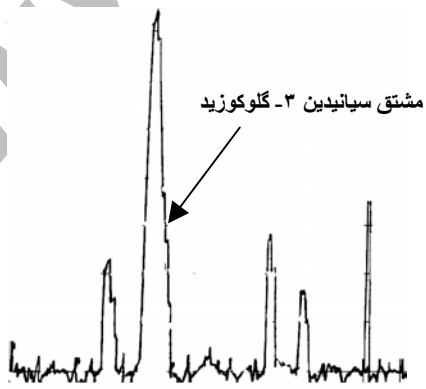
www.SID.ir

کروماتوگرامHPLC آنتوسیانین‌های استخراج شده از گیاهان کنترل یک قله اصلی با زمان بازداری ۵۸/۵ دقیقه را نشان می‌دهد(شکل۱). هیدرولیز اسیدی عصاره(جوشاندن عصاره در اسید کلریدریک ۲درصد برای ۲ ساعت) سبب تشکیل یک قله منفرد شده است که با آنتوسیانین استاندارد (با زمان بازداری ٦٠ دقیقه) در زمانی که باHPLC جداسازی می‌شود کروماتوگرافی می‌گردد. بنا براین آنتوسیانینی که تجمع یافته یک مشتق سیانیدین است(شکل۲).



شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به آنتوسیانین استاندارد

همچنین نمودار HPLC آنتوسیانین‌های استخراج شده از برگ‌های آلوده شده با دو قارچ فوزاریوم و آلترناریا و تحت تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید، یک قله اصلی با زمان بازداری ۵۸/۵ دقیقه را نشان می‌دهد(شکل۳).



شکل۳- کروماتوگرام مربوط به آنتوسیانین در نمونهٔ تیمار شده با سالیسیلیک اسید

بحث

آنتوسیانین‌ها به عنوان یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب در یک نقطه پایانی در مسیر زیست ساخت (بیوسنتز) فلاونوئیدها در سیتوپلاسم ساخته شده و به شکل فعال و جداگانه به داخل واکوئل یاخته‌ها با پمپ گلوتاتیون وارد می‌شوند[۱۷].

Archive of SID
www.SID.ir

برای حضور آنتوسیانین‌ها در برگ‌ها توضیح قابل قبولی وجود دارد. با وجود این، تولید آنتوسیانین‌ها درنتیجه تنش‌های محیطی [۱۸]، وجود برگ‌های سرخ رنگ در زمان‌های پیش بینی شده سال و در مراحل ویژه رشد و نمو برگ‌ها و همچنین درشرایط محیطی ویژه [۱۹]، تعدادی از پژوهش‌گران را بر آن داشته است که به منظور تعیین نقش‌های آنتوسیانین برگ‌ها، بررسی‌های لازم را انجام دهند. تئوری‌هایی درباره عمل آنتوسیانین برگ‌ها در سال‌های اخیر ارائه شده است که می‌توان به: ۱- تعدیل کمی و کیفی نور گرفته شده، ۲- حفاظت از اثرات مخرب UV-B ،۳- حفاظت گیاه از جانوران علف خوار، ٤- حفاظت از مهار نوری و ٥- جارو کننده رادیکال‌های فعال اکسیژنی تحت شرایط تنش محیطی اشاره کرد . البته هیچ یک از عمل‌کردهای پیشنهاد شده منحصر به آنتوسیانین‌ها نیستند. ترکیبات دیگری در برگ‌ها می‌توانند این عمل‌کردها را به طور مؤثری انجام دهند. برای مثال حضور کاروتنوئیدها و توزیع کلروفیل‌ها می‌توانند به طور چشم‌گیری گرفتن نور را تعدیل کنند. و یا ترپن‌ها و متابولیت‌های ثانویه دیگر به عنوان ترکیبات دفاعی ضد علف‌خوارها در تعدادی از گیاهان عمل می‌کنند. بنا براین ممکن است آنتوسیانین‌ها عمل خاصی در برگ‌ها نداشته باشند. اما تحقیقات نشان می‌دهد، آنتوسیانین‌ها می‌توانند در هماهنگی با مولکول‌های حفاظتی در یاخته‌های گیاهی عمل خود را انجام دهند و برای جبران نقص در غلظت مولکول‌ها در طی دوره تنش وارد عمل شوند. البته تئوری‌هایی وجود دارند که بیان‌گر آن است، آنتوسیانین‌ها در مکان‌های ویژه‌ای درون برگ‌ها برای کارایی بهینه گیاه وارد عمل می‌شوند. انباشتگی آنتوسیانین‌ها با محرک‌های محیطی گوناگون مانندUV[۲۰]، دمای پایین[۲۱]، حمله عوامل بیماری‌زا [۲۲]، [۲۳]، [۲٤] و چندین تنظیم کننده رشد مانند سیتوکینین[۲٥]، ژیبرلین‌ها[۲٦]، اتیلن[۲۷] و سالیسیلیک اسید[۲۸] القا می‌شود. آلوده کردن گیاهان با قارچ فوزاریوم و آلترناریا مقدار آنتوسیانین را افزایش می‌دهد و این افزایش زمانی که گیاهان با غلظت‌های ۳، ۷ و ۱۱ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند بیش‌تر می‌گردد. به طوری که نتایج حاصل از تجزیه عصاره‌های تهیه شده از برگ‌های تازه نشان می‌دهد، تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی‌داری در مقدار آنتوسیانین در آن‌ها می‌شود. در گیاهان آلوده نشده بیش‌ترین مقدار آنتوسیانین مربوط به تیمار با غلظت ۷ میکرومولار سالیسیلیک اسید است. همچنین در گیاهان آلوده با قارچ فوزاریوم و آلترناریا بیش‌ترین مقدار آنتوسیانین تولید شده به ترتیب مربوط به تیمار با غلظت‌های ۱۱و۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید است. با وجود این، تنها دو گزارش بر اساس اثر سالیسیلیک اسید بر انباشتگی آنتوسیانین به دست آمده است که تا حدودی هم‌سو با نتایج به دست آمده از این پژوهش است(باتوجه به جستجوهای زیادی که پژوهش‌گران در منابع مختلف انجام داده اند تنها این دو گزارش را که به اثر سالیسیلیک اسید بر انباشتگی آنتوسیانین می‌پردازد، مشاهده کرده‌اند). این گزارش‌ها بر اساس بررسی جعفری و همچنین دانه‌رست‌های لوبیای چشم بلبلی تیمار شده با اسید سالیسیلیک و بنزوتیادیازول(BTH) به دست آمده است[۲۸]، به طوری که افزایش مقاومت در برابر بیماری در لوبیای چشم بلبلی وابسته به افزایش سریع و گذرا در فعالیت آنزیم فنیل آلانین

Archive of SID

www.SID.ir

آمونیالیاز(PAL) و کالکون ایزومراز(CI) است. آنزیم PAL به عنوان اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید موجب تبدیل فنیل آلانین به ٤-کوماریل کوآنزیمA می‌شود که این ترکیب پیش‌ساز فعال ترکیبات فلاونوئیدی است [۲۹]. فعالیت یا بیان این آنزیم را سالیسیلیک اسید و حمله عوامل بیماری‌زا تحریک می‌کند. به عبارت دیگر آنزیم‌های PAL، CI و CS یک جریان کربنی مستقیم از مسیر فنیل پروپانوئید تا متابولیسم فلاونوئیدها برقرار می‌کنند، زیرا آنزیم‌های PAL و CS هر دو در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها و۳-داکسی آنتوسیانیدین(یک نوع فیتوآکسین) درگیرند هستند، به طوری که آلودگی قارچی و تیمار سالیسیلیک اسید موجب القای شدید ژن آنزیم‌های PAL و CS می‌شود. این پژوهش‌گران پیشنهاد کردند، تیمار دانه‌رست‌های لوبیای چشم بلبلی با سالیسیلیک اسید و BTH می‌تواند مکانیسم‌های دفاعی اولیه را افزایش دهد و پاسخ‌های دفاعی را تعدیل کند. همچنین بیان کردند، تحریک تجمع آنتوسیانین که در اثر تیمار سالیسیلیک اسید ایجاد می‌شود، هماهنگ با فعال سازی ژن آنزیم‌های درگیر در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین است. این اثرات توأم آلودگی قارچی و سالیسیلیک اسید، حضور خانواده های چند ژنی را پیشنهاد می‌کند، گروه‌هایی که ممکن است به وسیله محرک‌های متفاوت نقش‌های ویژه‌ای را در دفاع گیاهی ایفا کنند. با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر در گیاه مینای چمنی به نظر می‌رسد گیاه در پاسخ به عوامل بیماری‌زا می‌تواند با استفاده از یک عامل جبرانی(برای مثال ساختن آنتوسیانین به عنوان یکی از ترکیبات فنلی ساخته شده) نیازهای فیزیولوژیک و زیست شیمیایی خود را برطرف کند[۷]. به نظر می‌رسد استفاده از تیمار سالیسیلیک اسید می‌تواند شرایط مناسبی برای ایجاد یک حالت دفاعی مناسب فراهم کند .

منابع

1. J.F. Thain, H.M. Doherty, D.J. Bowles, D.C. Wildon, Oligosaccharides that Induce Proteinase Inhibitor Activity in Tomato Plants Cause Depolarization of Tomato Leaf Cells, Plant Cell and Enviroment, 13(1990) 569-574.
2. R.F. White, Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tomato Mosaic Virus in Tobacco, Virology, 99 (1979) 410-412.
3. R.F. White, E.P. Rybicki, M.B. Vonwechman, Detection of PR1-Type Proteins in Amaranthcaceae, Chenopodiaceae, Graminae and Solanaceae by Immunoelectrobloting, Journal of General Virology, 68 (1987) 2043-2048.
4. Robin k.Cameron, Salicylic Acid and its Role in Plant Defense Responses:What Do We Really Know?, Physiological and Molecular Plant Pathology, 56 (2000) 91-93.

Archive of SID
www.SID.ir

5. J. Malamy and D.F. Klessing, Salicylic Acid and Plant Disease Resistance, Plant J., 2 (1992) 643-654.

6. K. Maleck and K. Lawton, Plant Strategies for Resistance to Pathogens, Current Opinion in Biotechnology, 9 (1998) 208-213.

7. R.A. Dixon and N.L. Paiva, Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism, Plant Cell, 7 (1995) 1085-1097.

8. L.F. Brisson, R. Tenhaken, C.Lamb, Functions of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Protein in Plant Disease Resistance, Plant Cell, 6(1994) 1703-1712.

9. R.J. Bruce, C.A. West, Elicitation of Lignin Biosynthesis and Isoperoxidase Activity by Pectic Fragments in Suspension Cultures of Castorbean, Plant Physiol, 91(1988) 889-897.

10. E. Kombrink, K. Hahlbrock, K. Hinze, M. Schroder, Molecular Responses of Potato to Infection by *Phytophthora infestans* .In C.J. Smith. Ed, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions. Oxford University Press, Oxford, UK, (1991) 237-254

11. L. Degra, G. Salvi, D. Marrioti, D. De Lorenzo, F. Cervone, A Poly-Galacturonase-Inhibiting Protein in Alfalfa Callus Cultures, J. Plant Physiol, 133(1988) 364-371.

12. E. Kombrink, K. Hahlbrock, Rapid, Systemic Repression of the Synthesis of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase Small-Subunit mRNA in Fungus-Infected or Elicitor-Treated Potato Leaves, Planta, 181(1990) 216-219.

۱۳- زرگری، علی: گیاهان دارویی. تهران، دانشگاه تهران، (۱۳۷۱). ج. ۳.

۱٤- استریت، روبرت: تشخیص بیماری‌های گیاهی. ترجمه بهروز جعفر پور، ماهرخ فلاحتی رستگار. مشهد، انتشارات جهاد دانشگاهی،(۱۳۷۳).

15. A.J. Enyedi, N. Yalpani, P. Silverman and I. Raskin, Localization, Conjugation and Function of Salicylic Acid in Tobacco during the Hypersensitive Reaction to Tobacco Mosaic Virus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 2480-2484.

16. P. Adamse, Mutants as an Aid to the Study of Higher Plant Photomorphogenesis, PhD Thesis, Agriculture University, Wageningen, The Netherlands, (1988).

17. K.A. Mars, M.R. Alfenito, A.M. Lloyd and V.A. Walbot, Glutathione S-Transferase Involved in Vacuolar Transfer Encoded by the Maize gene *Bronze-2*, Nature, 375(1995) 397-400.

18. L. Chalker-Scott, Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Response, Photochemistry and Photobiology, 70(1999) 1-9.

Archive of SID

www.SID.ir

19. D.W. Lee, J.B. Lowry and B.c. Stone, Abaxial Anthocyanin Layer in Leaves of Tropical Rain Forest Plants: Enhancer of Light Capture in Deep Shade, Biotropica, 11(1979) 70-77.
20. V.S. Reddy, K.V. Gould, R. Sharma and A.R. Reddy, Ultraviolet-B-Responsive Anthocyanin Production in Rice Is Associated with a Specific Phase of Phenylalanine Ammonia Lyase Biosynthesis, Plant Physiol, 105(1994) 1059-1066.
21. P.J. Christie, M.R. Alfenito and V. Walbot, Impact of Low-Temperature Stress on General Phenylpropanoid and Anthocyanin Pathways: Enhancement of Transcript Abundance and Anthocyanin Pigmentation in Maize Seedlings, Planta, 194(1994) 541-549.
22. B.J. Harrison and R.G.; Strickland, Precursors and Genetic Control of Pigmentation V. Initiation of Anthocyanin Synthesis in *Antirrhinum majus* by *Botrytis cinerea*, Heredity, 44 (1980)103-109.
23. D. Heim, R.L. Nicholson, S.F. Pascholati, A.E. Hagerman and W. Billet, Etiolated Maize Mesocotyls: A Tool for Investigating Disease Intractions, Phytopathology, 73(1983) 424-428.
24. J. Hipskind, K. Woodand and R.L. Nicholson, Localized Stimulation of Anthocyanin Accumulation and Delineation of Pathogen Ingress in Maize Genetically Resistant to *Bipolaris maydis* Race O., Physiol Mol Plant Pathol, 49(1996) 247-256.
25. J. Deikman and P.E. Hammer, Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinin in *Arabidopsis thaliana*, Plant Physiology, 108(1)(1995) 47-57.
26. D. Mealem- Beno, G.Tamari, Y.L. Leitner- Dagan, A. Borochov and D. Weiss, Suger-Dependent Gibberellin- Induced Chalcone Synthase Gene Expression in *Petunia corollas*, Plant Physiol, 113(1997) 419-424.
27. E.J. Woltering and D. Somhorst, Regulation of Anthocyanin Synthesis in Cymbidium Flowers: Effects of Emasculation and Ethylene, J. Plant Physiol., 136 (1990)295-299.
28. O.Akinwunmi, The Plant Defense Activator Acibenzolar-S-Methyl Primes Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] Seedlings for Rapid Induction of Resistance, Physiol. Mol. Plant Pathol, 58 (2001) 199-208.
29. L. Clive, Sze-Chung and R. Nicholson, Reduction of Light-Induced Anthocyanin Accumulation in Inoculated Sorghum Mesocotyls Implication for a Compensatory Role in the Defense Response, Plant Physiol, 116(1998) 979-989.

Archive of SID
www.SID.ir