علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۵ (ص ۴۴۳-۴۳۵)
DOI: 10.22059/ijhs.2016.59806

تغییرپذیری رنگدانه‌های نورساختی، اسید کلروژنیک، اسید کافئیک و پرولین پینۀ 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، دانشکدۀ تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳. دانشیار دانشکدۀ 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 آمونیالیاز 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 پینۀ (کالوس) کنگرفرنگی بررسی شد. به این منظور نمونه‌های پینۀ کنگرفرنگی با پنج سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار SA و MeJA (الیسیتور) با چهار تکرار، در قالب طرح کامل تصادفی تیمار شدند. بر پایۀ نتایج به‌دست‌آمده تجمع پرولین و محتوای اسید کلروژنیک و اسید کافئیک تحت تأثیر غلظت‌های مختلف محرک‌های به‌کاربرده‌شده قرار داشتند. نکتۀ جالب‌توجه اینکه بین این ترکیب‌ها و تأثیر محرک‌های مورداستفاده 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 تیمارشده با MeJA نیز نمونه‌های تیمارشده 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 پایۀ نتایج به‌دست‌آمده ممکن است بیان شود، اگرچه تولید متابولیت‌ها تحت تأثیر محرک‌های متابولیتی افزایش می‌یابند، بااین‌وجود افزایش غلظت محرک‌های متابولیتی بیش‌ازحد بهینه نتیجۀ 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 Samadi[1], Azim Ghasemnezhad[2*], Mahdi Alizadeh[2] and Mehran Alami[3]
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 100µM 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.

* Corresponding author E-mail: aghasemnajad@hotmail.com Tel: +98 911 1404782

مقدمه

با پیشرفت علم و فنّاوری روند گرایش افراد به استفاده از مواد طبیعی و ارگانیک، استفاده از داروهای گیاهی به‌جای داروهای شیمیایی رو به گسترش بوده به‌طوری‌که بر پایهٔ 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 ازلحاظ اقتصادی به‌صرفه شود. درواقع تفاوت در میزان مواد دارویی موجود در گیاهان در صورت کشت مزرعه‌ای و ناچیز بودن میزان متابولیت‌های ثانویهٔ موجود در گیاهان دارویی محققان را به کشت درون شیشه‌ای سوق می‌دهد. میزان متابولیت‌های ثانویهٔ موجود در گیاهان دارویی را می‌توان با روش‌های مختلفی مانند بهینه‌سازی شرایط کشت، شوک‌های فیزیکی، الیسیتورها 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 استفادهٔ 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، اشعهٔ فرابنفش (UV)، شوری و کم‌آبی عمل کرده (Popova *et al*., 2003) و از این راه سازوکارهای مقاومتی گیاه را که دربرگیرندهٔ 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. درواقع 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).

پرولین یکی از اسیدهای آمینهٔ مهم گیاهی است که در رویارویی با طیف گسترده‌ای از تنش‌ها در یاختهٔ گیاهی افزایش می‌یابد. افزایش پرولین 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 (Floxd & Nagy, 1984; Smirnoff & 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 پرولین در یاخته می‌شود. پرولین پس از تنش با تأمین الکترون برای چرخهٔ تنفس و تولید کربن و نیتروژن سبب تولید انرژی و بازسازی یاخته می‌شود. ۸۰ درصد پرولین در شرایط تنش و ۲۰ درصد آن در شرایط عادی تولید می‌شود (Hare & Cress, 1997). گیاهان تحت تنش با افزایش اسیدهای آمینه، یون‌ها، پرولین، پروتئین‌های محلول و هیدرات‌های کربن بازدارندهٔ 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 (Ceccarli *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 پاداکسنده‌ها، رادیکال‌های آزاد یاخته‌ها را جذب می‌کنند. اسید کلروژنیک خاصیت ضددیابتی داشته و به‌احتمال یکی از دلایل کاهش قند خون توسط

کنگرفرنگی مربوط به این ترکیب است (Arion *et al*., 1997). برخی از پژوهش‌ها مبین نقش پاداکسندگی اسیدهای کلروژنیک و کافئیک علیه ۲-آمیدین پروپان هیدروکلراید (AAPH) و CU^{2+} تولیدشده در اثر پروکسیداسیون لیپوپروتئین با وزن مخصوص کم[1] (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 پروپانوئیدی مانند اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به هنگام تنش هستند (Babar Ali *et al*., 2007; Hosseini *et al*., 2011). 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 پاداکسندگی 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 فلاونوئیدی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

استقرار ریزنمونه در محیط کشت

برای انجام پژوهش، بذرهای کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) از مزرعهٔ 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 ریزنمونه، به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید برای پینه (کالوس)زایی انتقال داده شد و سپس نمونه‌های پینه (ترجیحاً سبزرنگ) 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 ۲۵۰×۴/۶ میلی‌متر و اندازهٔ ذرات ۵ میکرومتر استفاده شد. نمونه‌ها با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه با دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس در طول‌موج 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 آمینهٔ پرولین ۰/۵ گرم از پینهٔ تر در ۱۰ میلی‌لیتر سولفو سالیسیلیک اسید ۳ درصد در هاون به‌خوبی همگن (هموژن) شده و عصارهٔ 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 درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. سپس برای پایان یافتن واکنش لوله‌های آزمایش درون بستر یخی قرارگرفته و ۴ میلی‌لیتر تلوئن به هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تلوئن با استفاده از طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) مدل Camspec M501 در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و درنهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد (Bates *et al*., 1973).

1. LDL

اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های درونی در نمونه‌های درون شیشه‌ای

برای اندازه‌گیری میزان سبزینهٔ (کلروفیل) a, b، کل و کارتنوئیدها ۰/۵ گرم از بافت پینه توزین و در هاون چینی کوبیده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید به آن افزوده شد. نمونه به مدت سه ساعت در آون ۷۵ تا ۸۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از این محلول به لولهٔ جدید منتقل شده و با دی‌متیل‌سولفوکساید به حجم ۵ میلی‌لیتر رسید. از دی‌متیل‌سولفوکساید 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):

Chlo a (mg/g.F.W)= (۱)
12.7 (A663)-2.69 (A645)*V/1000*W

Chlo b (mg/g.F.W)= (۲)
22.9 (A645)-4.68 (A663)*V/1000*W

Chlo total (mg/g.F.W)= (۳)
20.2 (A645) +8.02 (A663)*V/1000*W

Car (mg/g.F.W)= (۴)
7.6 (A480)-1.49 (A510)*V/1000*W

که در آن:

A= طول‌موج

V= حجم نهایی

W= وزن نمونه

تجزیهٔ آماری

این آزمایش به‌صورت طرح کامل تصادفی در چهار تکرار انجام و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه‌وتحلیل شد و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل[1] استفاده شد.

1. Excel

نتایج و بحث

بررسی انجام‌شده نشان داد که نه‌تنها تراکم رنگدانه‌ای پینه بلکه ترکیب‌های بیوشیمیایی یاخته‌های پینهٔ کنگرفرنگی نیز تحت تأثیر کاربرد محرک‌های متابولیتی غیرزنده مورداستفاده در این آزمایش قرار گرفت.

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

مقایسهٔ میانگین‌ها (شکل‌های ۱ و ۲) نشان‌دهندهٔ کاهش معنی‌دار میزان رنگدانه‌های نورساختی (فتوسنتزی) در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات است. به‌طوری‌که 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 به بیشینه رساندن توان تولید متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهد، درواقع 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 موردنظر قرار گیرد.

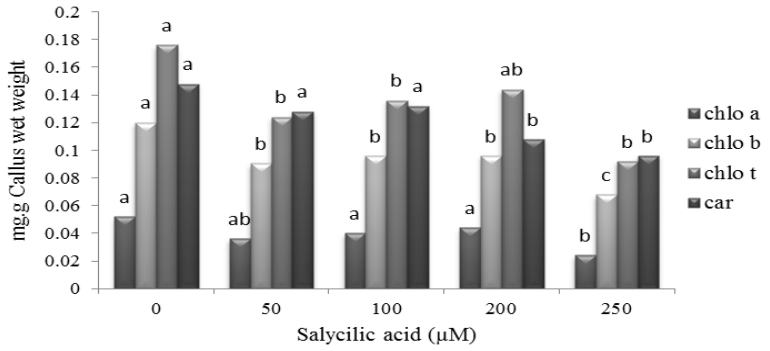
نشان داده شده است که تغییرپذیری سبزینه‌ها تحت تأثیر اسید سالیسیلیک به اثر این ترکیب بر فعالیت ACC سنتتاز یا اکسیداز در فرآیند تولید اتیلن مرتبط

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 کلروفیلاز است 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). و mRNA AtClH1 به‌عنوان القاکنندهٔ پیری و تخریب سبزینه (ساخت کلروفیلاز) در گیاهان در اثر تیمار متیل جاسمونات القاشده و باعث افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تخریب سبزینه می‌شود (Rudell & Matteis, 2002).

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

نتایج به‌دست‌آمده 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 تیمار اسید سالیسیلیک تا سطح ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد. در مورد میزان اسید کافئیک در نمونه‌های تیمارشده با اسید سالیسیلیک نیز روند همسانی مشاهده شد، به‌طوری‌که 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.

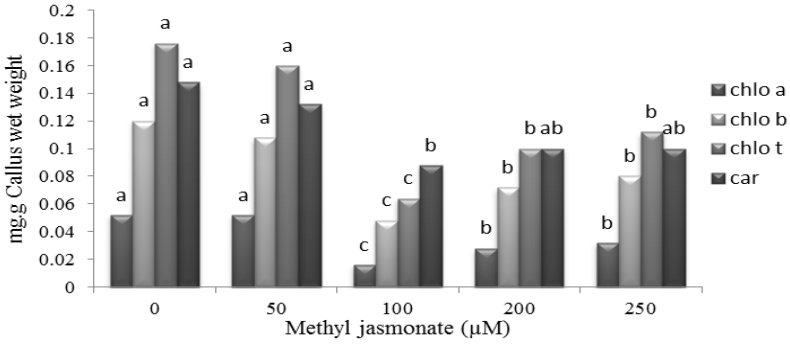


شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر نسبت رنگدانه‌های پینهٔ کنگرفرنگی

Chlo a: سبزینهٔ a، chlo b: سبزینهٔ b، chol t: سبزینهٔ کل، car: کاروتنوئید

Figure1. Salicylic acid effect on pigments of *Cynara scolymus* callus

Chol a: Chlorophyll a, Chol b: Chlorophyll b: Chol t: total Chlorophylls, Car: Carotenoids

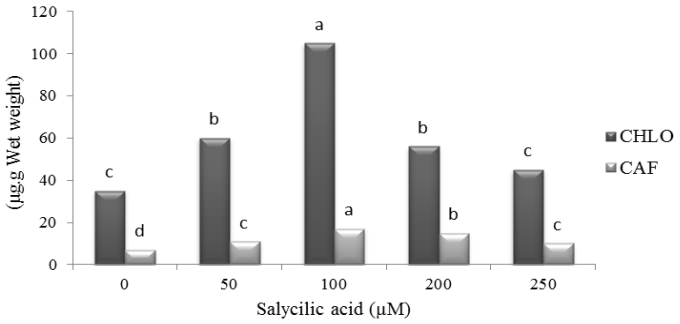


شکل ۲. تأثیر متیل جاسمونات بر تغییرپذیری رنگدانه‌های پینهٔ کنگرفرنگی

Chlo a: سبزینهٔ a، chlo b: سبزینهٔ b، chol t: سبزینهٔ 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 پینهٔ کنگرفرنگی

CHLO: کلروژنیک‌اسید؛ CAF: کافئیک‌اسید

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

بررسی پینه‌های تیمارشده با اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات نشان می‌دهد که یاخته‌های گیاهی در کنگرفرنگی با افزایش میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به‌عنوان ترکیب‌های فنلی مهم که به‌صورت 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 به‌ویژه تولید ترکیب‌های پاداکسندگی ازجمله اسید کلروژنیک اشاره شده است (Babar ali *et al*., 2007; Hosseini *et al*., 2011; Kovacik *et al*., 2010).

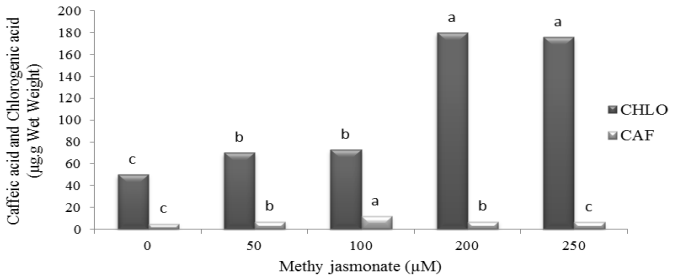
همان‌گونه که در شکل ۴ آمده است، افزایش سطح متیل جاسمونات تا ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش محتوای اسید کافئیک شد، ولی با افزایش غلظت از سقف ۱۰۰ میکرومولار از میزان آن کاسته شد. همچنین بررسی اسید کلروژنیک ساخت‌شده در هر تیمار نشان داد که بیشترین میزان اسید کلروژنیک در غلظت ۲۰۰ میکرومولار وجود داشت. نکتهٔ جالب‌توجه اینکه روند تجمعی این ترکیب تحت تأثیر افزایش سطوح هر دو ترکیب اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات کاهشی بود. با بررسی میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به نظر می‌رسد اسید کافئیک به‌عنوان یک ترکیب فنلی و پیش‌ساز اسید کلروژنیک و دیگر ترکیب‌ها ازجمله سینارین، همواره در میزان بسیار کم در گیاه وجود داشته و افزایش این 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 پینهٔ کنگرفرنگی براثر القای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به‌احتمال 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 دامنهٔ واکنش‌پذیری یاخته، کاهش سوخت‌وساز (متابولیسم) یاخته‌ای و درنهایت کاهش تجمع ترکیب‌های موردنظر را در پی دارد. نکته‌ای که در تغییر اسید کافئیک و اسید کلروژنیک به‌خوبی 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 آمینهٔ 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 به‌عنوان ابزاری برای سازگار شدن یاخته با شرایط تنش اهمیت زیادی دارد. درواقع این ماده با تجمع خود بازدارندهٔ آب از دست‌دهی یاخته و کاهش تأثیر تنش ایجادشده در محیط بر گیاه می‌شود. پرولین در گیاهان

تحت تنش به‌ویژه تنش‌های شوری و خشکی با توجه به ساختار شیمیایی خود، به‌عنوان یک اسمولیت نقش مهمی در حفظ فشار اسمزی یاخته دارد.

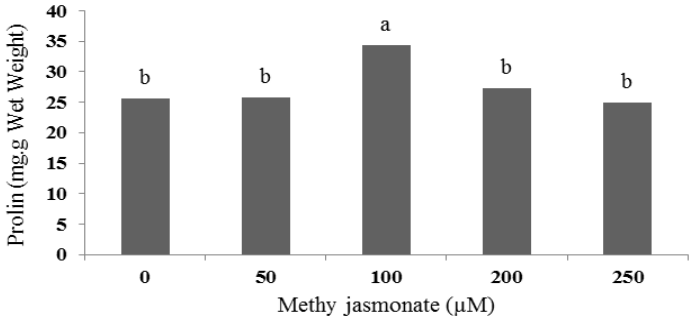
بنابراین افزایش غلظت محرک‌های به‌کاربرده شده بیش‌ازحد سازگارپذیری یاخته سبب کاهش تدریجی واکنش یاخته به نشانه‌های هشداردهندهٔ تنش شده و در اغلب موارد این کاهش با تخریب جایگاه‌های واکنش به تنش همراه است. به همین دلیل است که در غلظت‌های بالای محرک، توانمندی یاخته در پاسخ‌گویی و فعالیت ژن‌های بازدارنده از تجمع پرولین کاسته می‌شود.



شکل ۴. تأثیر متیل جاسمونات بر تغییرپذیری اسید کافئیک و اسید کلروژنیک در پینهٔ کنگرفرنگی

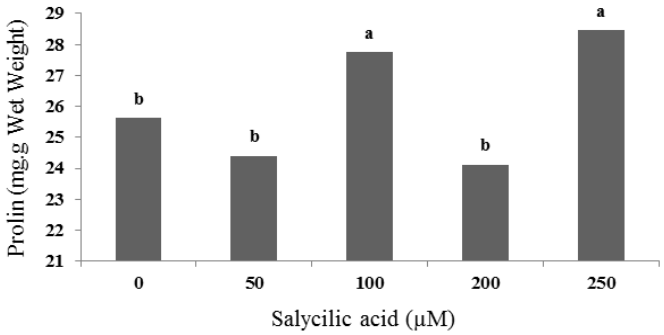
CHLO: کلروژنیک‌اسید؛ CAF: کافئیک‌اسید

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



شکل ۵. تغییر اسید آمینهٔ 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 Artishoke.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به‌عنوان ترکیب‌های مهم هورمون گیاهی (فیتوهورمونی) در بیشتر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پینهٔ کنگرفرنگی نقشی مؤثر ایفا می‌کنند. کنگرفرنگی می‌تواند با ایجاد تعادل بین فرآورده‌های مختلف پلی فنلی، کنترل تولید متابولیت‌های اولیه و تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین خود را از خطر تخریب

اکسایش در برابر تنش‌های القاشده براثر 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. نکتهٔ جالب‌توجه در این تحقیق مشاهدهٔ رابطهٔ مستقیم تجمع پرولین با اسیدهای فنلیک اندازه‌گیری‌شده است که بیانگر نقش همسوی این ترکیب‌ها در حفظ یاخته در برابر تنش است.

به نظر می‌رسد محرک‌ها با تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط و تغییر شدت فعالیت آنزیم‌های مهم کاتالیزکنندهٔ متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش این ترکیب‌ها در بافت کشت‌شده می‌شوند. اما نکتهٔ مهم این است که افزایش محرک بیش‌ازحد معمول نه‌تنها 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 موردنظر را افزایش داد. اگرچه رسیدن به ثبات تولید مستلزم معرفی رقم‌های جدید خواهد بود.

REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. Arakawat, T. & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolyts. *Biophysics Journal*. 47, 411-414.
4. 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.
5. 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.
6. 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 linchens and higher plants. *Environmental Botany*, 32, 85-100.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Gundluch, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal trancducer in elicitor induced plant cell Cultures. In: Proceeding of *Natural Academic Science USA*, 98, 389-2393.
15. 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 (*Eleucine 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* (chlorophylaceae). *Plant Science*, 178, 307-311.
19. Lafuente, M.T., Sala, J.M. & Zacarias, L. (2004). Active oxygen detoxifing enzymes and phenyl alanin ammonia lyase in the ethylene induced chilling tolerance in citusfuit. *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 syntase gene expression in human endothelial cells. *Pharmacology and Exprimental 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 jasmonte 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 chines 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)