نشریه تولید گیاهان زراعی
جلد یازدهم، شماره دوم، تابستان ۹۷
۱۰۹-۱۲۲
http://ejcp.gau.ac.ir
DOI:

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

***فاطمه رسولی[۱]، منوچهر قلی‌پور[۲]، کامبیز جهان‌بین[۳] و حمیدرضا اصغری[۲]**

[۱] دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه صنعتی شاهرود، [۲]دانشیار گروه زراعت، دانشگاه صنعتی شاهرود،
[۳]استادیار 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. الیسیتورها به‌طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. الیسیتورها می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی را در گیاه القا نمایند. استعمال خارجی ترکیباتی مثل اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک باعث القا 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 50 ja- 0.5 sa) و (5ja-1 sa, 20 ja-1 sa و 50 ja-1sa)] 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 پراکسیدهیدروژن 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 به‌ترتیب در تیمار 20ja-1sa و تیمار شاهد با میانگین ۰/۲۰۵ و ۰/۰۳۸ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر به‌دست آمد. بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز به تیمار 20ja-1sa با میانگین ۰/۲۹ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ تعلق داشت که تقریبا ۲ برابر شاهد بود. بیشترین میزان فنل کل در تیمار 0.5 sa مشاهده شد که حدود ۳/٦۸ برابر شاهد بود. بالاترین میزان اسید آسکوربیک در شرایط اعمال تیمار 5ja-0.5 sa حاصل گردید که ٤/٦۸ برابر شاهد بود.

نتایج: الیسیتورها شبکه‌ای از ترارسانی علامت را القا می‌کنند که با تشخیص مولکول‌های الیسیتور توسط پذیرنده شروع می‌شوند، به‌دنبال 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 به‌وجود 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: آنتی‌اکسیدان‌های‌آنزیمی و غیرآنزیمی، پروتئین محلول، کلروفیل

مقدمه

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، ۳٦ و ۳۸).

در زراعت گیاهان دارویی اگر تولید متابولیت خاصی مورد هدف قرار گیرد و بتوان از طریق 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. الیسیتورها به‌طور کارآمدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. استعمال خارجی ترکیباتی مثل اسیدجاسمونیک، اسیدسالیسیلیک و متیل‌سالیسیلات (الیسیتور شیمیایی) باعث القاء تنش کاذب در گیاه شده و پاسخ‌های دفاعی گیاه را بر می‌انگیزد. در اصل، مواد خروجی الیسیتورها، آغازگر یک مسیر پیام‌رسانی پیچیده شده و به فعال شدن پاسخ‌های دفاعی منجر می‌گردند (۲۳، ٤٤ و ٤٦). برخی از این الیسیتورها به شکل مستقیم به درون سلول تزریق می‌شوند و در آنجاست که با فرآورده‌های ژنی R (ژن‌های مقاوم گونه‌ی گیاهی) برهمکنش نشان می‌دهند، فعالیت

اکسیداسیونی بروز می‌کند و پاسخ فراحساسیتی به واسطه تجمع سریع اکسیژن واکنش‌دهنده و اکسید نیتریک پیش می‌رود (۱، ۱۵، ۱٦ و ۱۷). در نتیجه این امر، تولید متابولیت ثانویه و مقاومت اکتسابی سیستمیک افزایش می‌یابد (۱۷ و ۲٦).

اسیدسالیسیلیک هورمون گیاهی است که نقش مهمی در فرآیندهای‌های فیزیولوژیکی نظیر جوانه‌زنی بذر، کنترل تنفس، بسته شدن روزنه‌ها، گلیکولیز و القای گلدهی دارد (۱۲ و ٤۰). 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، ٤۵ و ٤٦). گزارشات مختلفی مبنی بر تأثیر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه آرابیدوپسیس (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 فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) کنگرفرنگی تحت تأثیر متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلک در شرایط درون شیشه‌ای 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 (٤۱). در بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر گیاه دارویی آگاستاکه گزارش شده است که تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیولیاز و ٤-کومارات کوآلیگاز گردید (۳۹). بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک 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 ۵۸/۵٤ درجه و عرض شمالی ۳۵/۳٦ درجه با ارتفاع ۱٤۲۰ متری از سطح دریا، در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹٤ انجام گرفت. شهرستان بسطام دارای میانگین دمای متوسط سالانه ۱٤ درجه سانتی‌گراد، میانگین دراز مدت بارندگی سالانه ۱۸۰ میلی‌متر و رطوبت نسبی ٦۳ 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)، اسیدسالیسیلیک با سه غلظت (۰، ۰/۵ 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

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 (٤٢). تیمارهای آزمایشی شامل شاهد،5 Ja-0.5 Sa ، 5 Ja-1Sa، 5 Ja، 20 Ja-0.5 Sa، 20 Ja-1Sa، 20 Ja، 50 Ja-0.5 Sa، 50 Ja-1 Sa، 50 Ja، 0.5Sa و1Sa 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 (٤٢) 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 (٢٤).

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

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 پلی‌فنل اکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم به روش کار و میشرا 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، ٤).

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول: جهت استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش براد فورد استفاده شد (٦).

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).

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

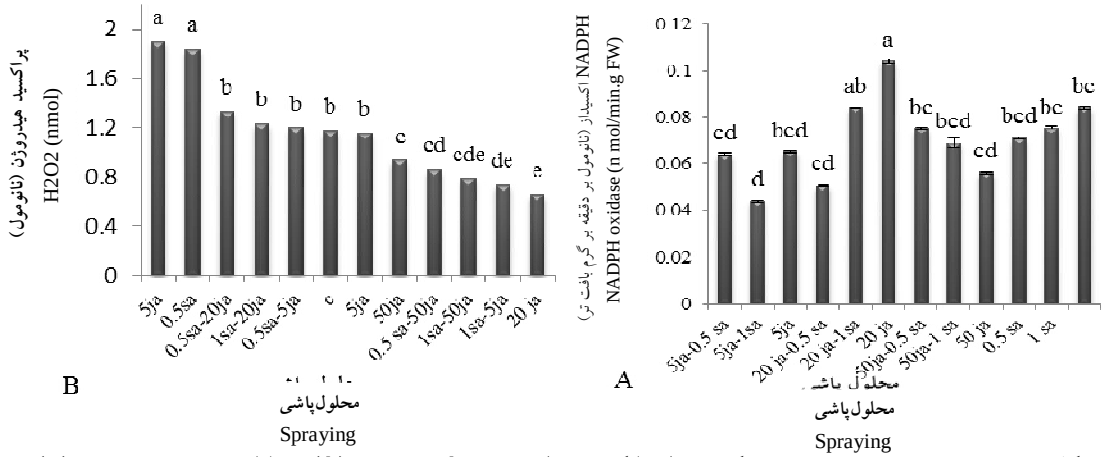
Table 1. Results of analysis of variance (Mean square) for NADPH Oxidase H_2O_2, guaiacol peroxidase leaf and petal, polyphenol oxidase leaf and petal and ascorbate peroxidase leaf.

		میانگین مربعات Mean square							
منبع تغییرات S.O.V	df	NADPH اکسیداز NADPH Oxidase	پراکسید هیدروژن H_2O_2	گایاکول پراکسیداز برگ GPX	گایاکول پراکسیداز گلبرگ petal GPX	پلی‌فنل اکسیداز برگ leaf PPX	پلی‌فنل اکسیداز petal PPX	آسکوربات پراکسیداز APX
بلوک Block	2	0.0005n.s	0.0006 $^{n.s}$	0.0003 $^{n.s}$	0.69 $^{n.s}$	0.047 $^{n.s}$	0.00030 $^{n.s}$	0.00003 $^{n.s}$
محلول‌پاش Sparying	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

**معنی‌داری در سطح ۱ درصد و n.s عدم معنی‌داری می‌باشد.

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

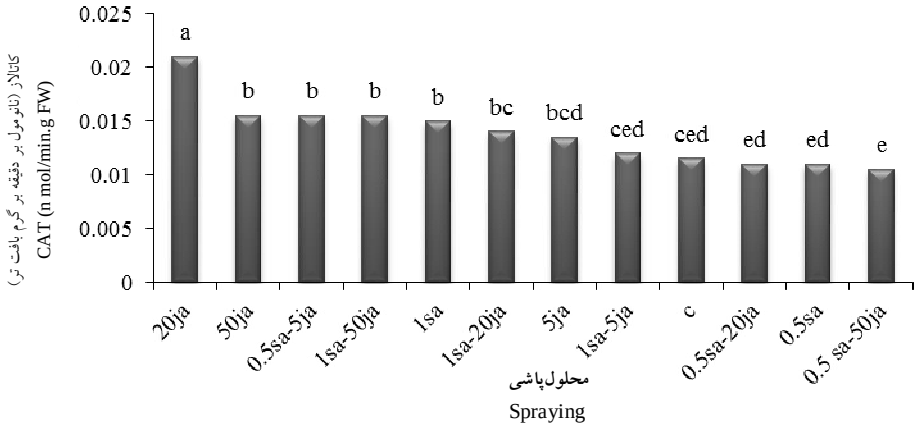
فعالیت NADPH اکسیداز و غلظت پراکسید هیدروژن: نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در بررسی محلول‌پاشی با اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک در شکل a ۱ ارائه شده است، محلول‌پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در تیمارهای 20ja-1 sa، 0.5 sa، 1 sa، 50 ja، 20 ja و 50 ja-0.5 sa نسبت به شاهد گردید. گونه‌های فعال اکسیژن ROS به‌وسیله فعالیت آنزیم‌های مختلفی تولید می‌شود که یکی از مهم‌ترین آن‌ها NADPH اکسیداز می‌باشد. پتانسیل سیتوسول به جهت استفاده از الیسیتورها یا حمله پاتوژن‌ها کاهش می‌یابد و به‌دنبال آن غشای پلاسمایی نامتعادل می‌گردد (۹ و ۲). از آنجا که هدف از محلول‌پاشی القای تنش کاذب در گیاه بود، این امر پس از استعمال، از طریق راه‌اندازی برخی واکنش‌ها و سپس فعال شدن NADPH اکسیداز موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن گردید (شکل b ۱). همچنین در این پژوهش محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن در تیمارهای 5ja و 0.5 sa نسبت به شاهد شد، که حاکی از تنش اکسیداتیو در گیاه می‌باشد.



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).

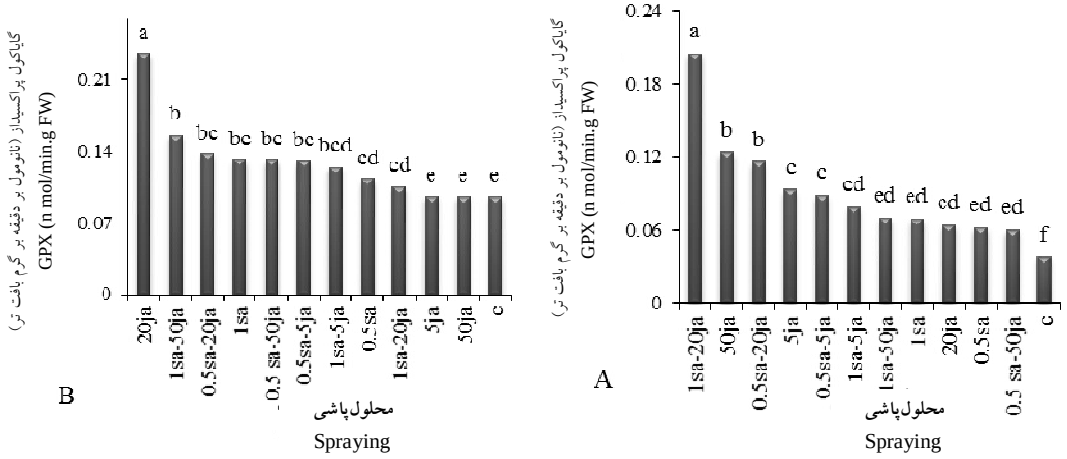
فعالیت کاتالاز: محلول‌پاشی فعالیت آنزیم کاتالاز را در اغلب تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 20ja با میانگین ۰/۰۲۱ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ مشاهده شد (شکل ۲). کاتالاز از پراکسیدهیدروژن به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه سریع این ماده اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند. پراکسید هیدروژن برای سلول‌های گیاهی به‌خصوص کلروپلاست بسیار مضر می‌باشد. چرا که در غلظت‌های پایین باعث مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین به‌ویژه آنزیم‌های دارای گروه سولفیدریل از جمله گلیسرآلدیید، ۳- فسفات دهیدروژناز و فروکتوز ۱ و ٦ بیس فسفات می‌شود (۳).



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

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

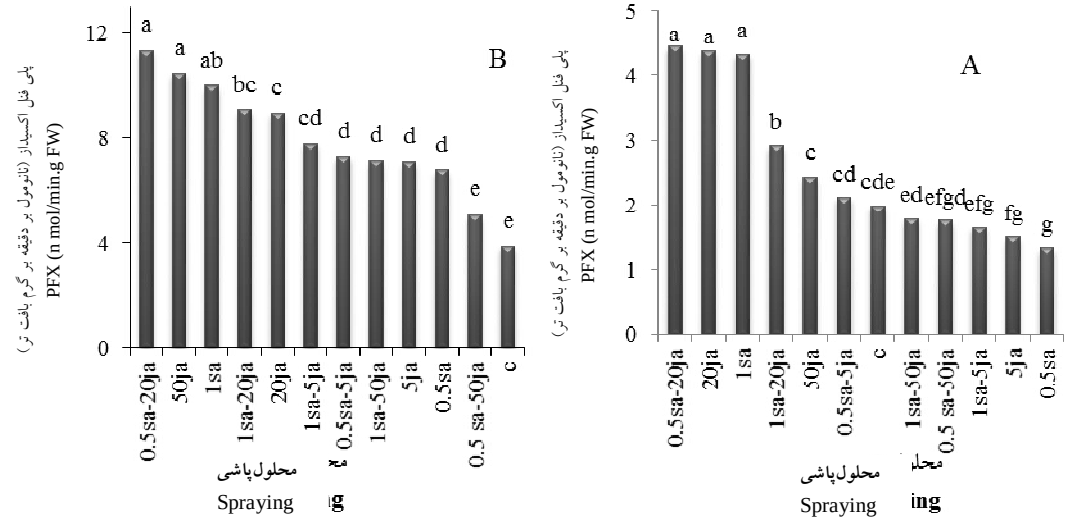
گایاکول پراکسیداز: محلول‌پاشی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بافت برگ (همه تیمارها) و گلبرگ (بیشتر تیمارها) نسبت به شاهد شد (شکل ۳). در برگ، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 1sa-20ja با میانگین ۰/۲۱ و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد با میانگین ۰/۰٤ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در گلبرگ مربوط به تیمار 20ja با میانگین ۰/۲٤ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر گلبرگ بود. القای تنش کاذب که با محلول‌پاشی صورت گرفت موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن گردید (شکل ۱). گایاکول پراکسیداز به‌عنوان جزیی از سیستم‌های دفاعی گیاه جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن هم در برگ و هم در گلبرگ افزایش یافت. گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی گایاکول 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).



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).

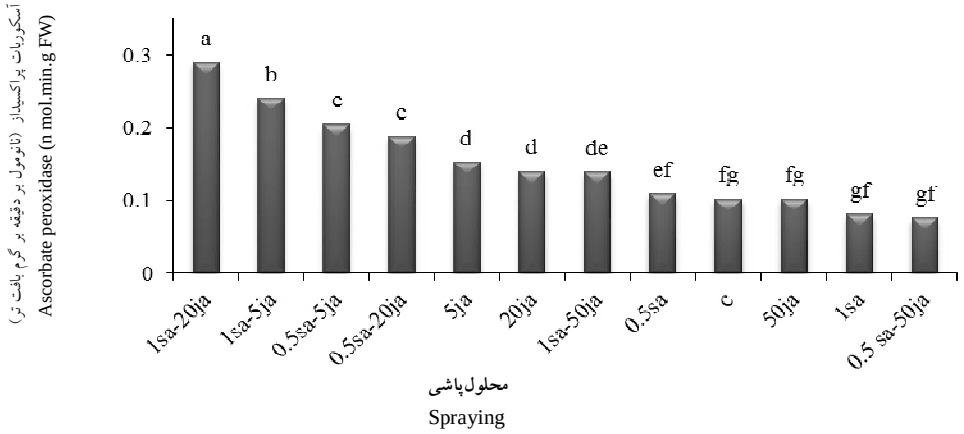
پلی‌فنل اکسیداز: در شکل‌های a ٤ و b ٤ میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تأثیر محلول‌پاشی ارائه شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در برگ در تیمار 20ja-0.5sa، 20ja و 1sa با میانگین حدود ٤/٤ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ مشاهده گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در بافت گلبرگ در تیمارهای در تیمار 20ja-0.5sa و 50ja با میانگین‌های ١١/٣٤ و ١٠/٤٧ و کمترین میزان فعالیت آنزیم در بافت گلبرگ در تیمار شاهد با میانگین ٣/٨٦ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. پلی‌فنل اکسیدازها در تمام بخش‌های گیاه یافت می‌شوند و از فنل‌ها به عنوان دهنده الکترون استفاده کرده و در بیوسنتز لیگنین نقش دارند (٣٢ و ٢٢). پلی‌فنل اکسیداز یا تیروزیناز آنزیمی دارای دو اتم مس در هسته مرکزی خود می‌باشد و اکسیداسیون دی‌فنل‌ها به کینون‌ها را انجام می‌دهد. این آنزیم در این واکنش از اکسیژن مولکولی به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌نماید (٣٢ و ٣).



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر فعالیت پلی‌فنل 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).

آسکوربات پراکسیداز: محلول‌پاشی 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، 20 20ja-1sa با میانگین ۰/۲۹ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر به‌دست آمد که تقریبا ۲ برابر شاهد بود. آسکوربات پراکسیداز در سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست، سبب پالایش و زدودن H_2O_2 می‌گردند. گزارش شده است که پراکسیدازهایی که از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند به‌طور 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 به‌دنبال آن‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی افزایش پیدا می‌کند (۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز برگ.

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

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، محلول‌پاشی با اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک با اطمینان ۹۹ درصد بر صفات کلروفیل a، کلروفیل b، پروتئین محلول، فنل، اسید آسکوربیک، وزن خشک برگ و گل معنی‌دار بود (جدول ۲).

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.

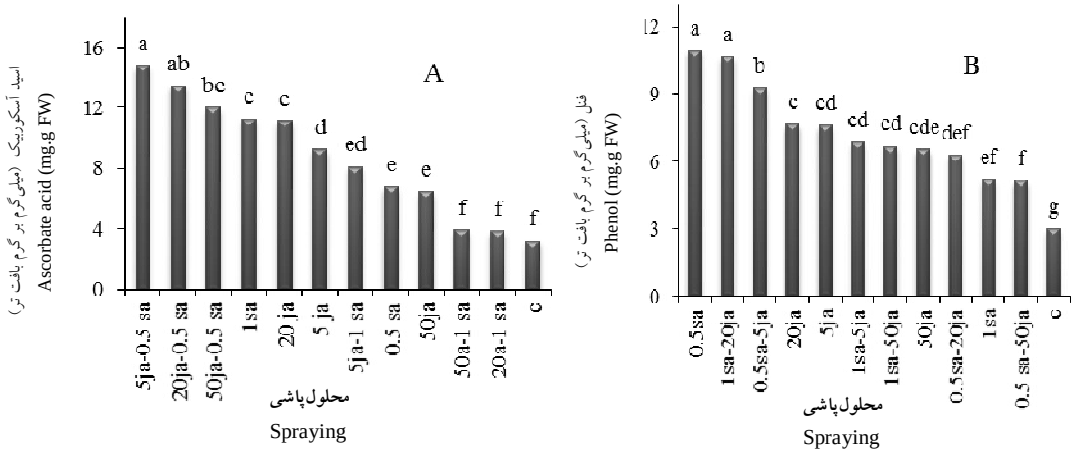
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square						
		کلروفیل a chl a	کلروفیل b chl b	پروتئین محلول soluble protein	فنل Phenol	اسید آسکوربیک Ascorbic asid	وزن خشک برگ Leaf dry weight	وزن خشک گل Flower dry weight
بلوک Block	2	0.09 $^{n.s}$	0.23 $^{n.s}$	6.68 $^{n.s}$	0.0320 $^{n.s}$	0.012 $^{n.s}$	0.59$^{n.s}$	0.34 $^{n.s}$
محلول‌پاشی 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

**معنی‌داری در سطح ۱ درصد و n.s عدم معنی‌داری می‌باشد.

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

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 (٤١ و ٢١). مقایسه میانگین فنل کل تحت تأثیر محلول‌پاشی در شکل ٦ ارائه شده است. بیشترین میزان فنل کل در تیمارهای 0.5sa و 20ja-1sa با میانگین حدود ١٠/٧ بود و در تیمار شاهد مقدار آن به ٢/٩ 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 و زدودن رادیکال آزاد را دارند. تجمع ترکیبات فنلی و افزایش فعالیت آنزیم PAL در انگور پس از کاربرد اسیدسالیسیلیک گزارش شده است (٩).

اسیدآسکوربیک: محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت اسیدآسکوربیک در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل a ٦). بیشترین میزان اسیدآسکوربیک در تیمار 5ja-0.5sa مشاهده شد که ٤/٧ برابر شاهد بود. با توجه به این‌که قندهای محلول (D- گلوکز) پیش‌ماده اولیه بیوسنتز 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 (٢٢ و ١٩). 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 (١٩ و ٢٢).

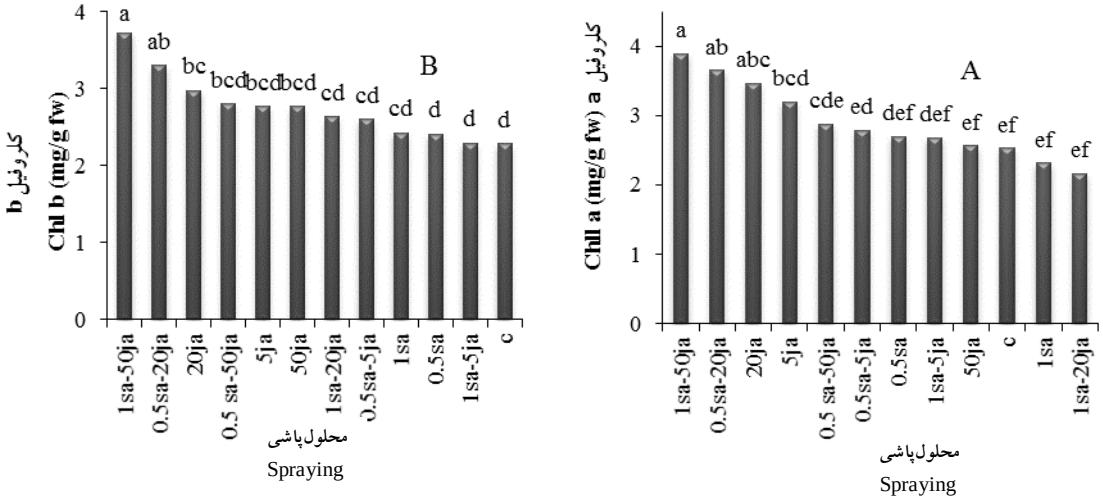


شکل ٦- مقایسه میانگین اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر غلظت فنل (B) و اسیدآسکوربیک در برگ (A).

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

کلروفیل a و b: در شکل ٧ مقایسه میانگین غلظت کلروفیل a و b تحت اثر محلول‌پاشی ارائه شده است؛ محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت کلروفیل a در اکثر تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل a ٧). بیشترین غلظت کلروفیل a در تیمار 50ja-1sa با میانگین ٣/٨٩ میلی‌گرم بر گرم بافت تر مشاهده شد که ١/٥

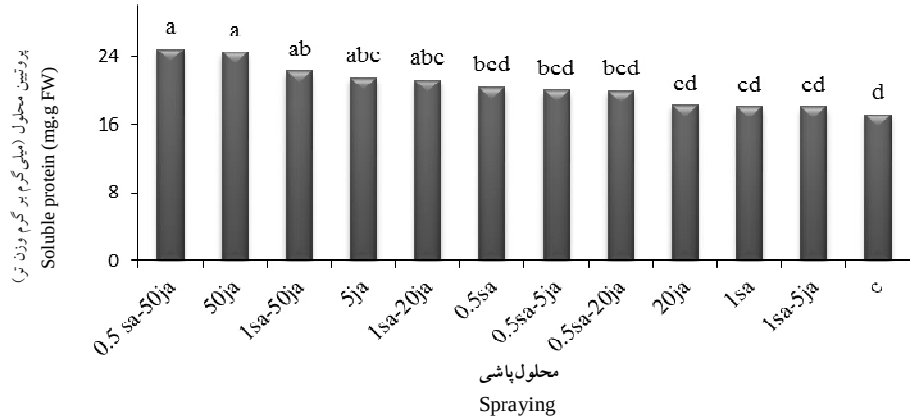
برابر شاهد بود. بیشترین غلظت کلروفیل b در تیمار 50ja-0.5sa، با میانگین ۳/۷۲ و کمترین غلظت آن در تیمار شاهد با غلظت ۲/۲۸ میلی‌گرم بر گرم بافت تر به‌دست آمد که با دو تیمار 5ja-0.5sa و 0.5sa در یک سطح آماری قرار داشت. گزارشات حاکی از آن است که استفاده از متیل‌جاسمونات در حضور نور سبب تحریک تشکیل کلروفیل a و b می‌شود (۳۰). به‌علاوه این‌که متیل‌جاسمونات در بیان برخی از ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل از طریق تشکیل آمینولوولنیک اسید دخالت دارد (۳۷ و ٤۳). 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.



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.

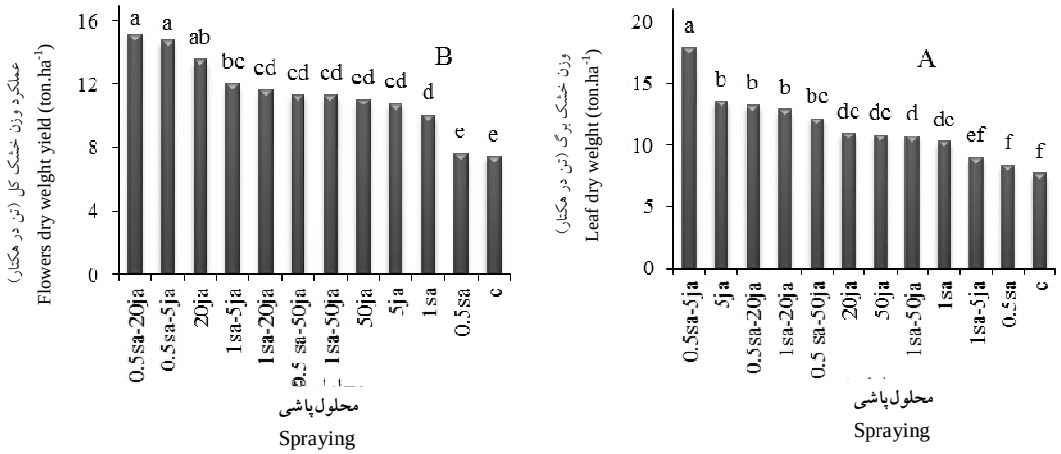
غلظت پروتئین محلول: محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت پروتئین محلول در همه تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۸). بیشترین غلظت پروتئین محلول در تیمارهای 5ja-0.5sa و تیمار 50ja به‌ترتیب با میانگین‌های ۲٤/۹ و ۲٤/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ به‌دست آمد. این افزایش می‌تواند تحت تأثیر تحریک‌کنندگی این دو هورمون و به‌دنبال آن تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد که گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، تولید پروتئین‌های ضد تنش خود را افزایش می‌دهد و یا می‌تواند به‌دلیل افزایش فعالیت‌های متابولیسمی 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).



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.

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 20ja-0.5sa و 0.5sa-5ja 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 میزان کلروفیل a و b، (مطلوب‌تر شدن شرایط)، افزایش وزن خشک برگ، تعداد غنچه و گل (داده‌ها نشان داده نشد) را به‌دنبال داشته است. نتایج حاصل از کاربرد اسیدسالیسیلیک بر گیاه داوریی 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 (۳٤).



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 in leaf (A) and flower (B) dry weight.

نتیجه‌گیری کلی

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

تیمارهای به‌کار رفته نیز می‌تواند نشان‌دهنده افزایش تولید بوده و توجیه‌کننده 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 ٤/٦٨ برابر شاهد 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.

منابع

1. 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.
2. Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Plant Biol., 55: 373-399.
3. Ardakani, M., and Nadvar, A. 2008. Practical principles and technique for plant science proficient. Tehran University Press, 145p. (In Persian)
4. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. Rockville., 24: 1-24.
5. Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann. Bot., 91: 179-194.
6. 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.
7. -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.
8. 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 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 H_2O_2 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 H_2O_2- 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., Leisse, A., Golding, A., Bowsher, C.G., Grimshaw, C., Knight, J.S., and Emes, M.J. 2004. Altered activity of the P_2 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

foliage of Coriander. Food Sci. Technol., 56: 101-110.
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 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 Alché1, 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. Moungsrimuandee, B., Moriwaki, H., Nakayama, M., Nishigaki, S., and Yamamato, 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 purpur*ea (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)

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 H_2O_2 production, oxidative stress and H_2O_2 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.
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.