جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۳، صفحه ۳۶۹-۳۶۱ (۱۳۹۳)

اثر متیل‌جاسمونات بر آنزیم‌های متابولیسمی و مواد فنلی در گیاه دارویی آگاستاکه (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze)

فاطمه رؤف‌فرد[۱]، مظفر شریفی[۲*]، رضا امیدبیگی[۳]، فاطمه سفیدکن[۴]، مهرداد بهمنش[۵] و نوراله احمدی[۶]

۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، پست الکترونیک: msharifi@modares.ac.ir
۳- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۴- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
۵- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس
۶- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۱

چکیده

تأثیر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیولیاز (PAL) و ۴-کومارات‌کوآلیگاز (4CL)، مقدار فنل کل و مقدار پروتئین کل در گیاه دارویی آگاستاکه (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze) بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در شرایط هیدروپونیک انجام شد و گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از شروع تیمار، فعالیت آنزیم PAL در گیاهان تیمار شده با ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، در مقایسه با گیاهان تیمار شده با ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و گیاهان شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. فعالیت آنزیم 4CL نیز بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار با ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات، در مقایسه با تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و تیمار شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با وجود این تیمارهای متیل‌جاسمونات هیچ اثر معنی‌داری بر مقدار فنل کل بعد از گذشت ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت از تیمار در مقایسه با تیمارهای شاهد هر یک از زمان‌های یاد شده نداشتند. مقدار پروتئین کل با تیمارهای ۱ یا ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار در مقایسه با شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: متیل‌جاسمونات، آگاستاکه (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze)، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، ۴-کومارات‌کوآلیگاز، مواد فنلی.

مقدمه

آگاستاکه (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze) گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده نعناع (Lamiaceae) می‌باشد (امیدبیگی و محمودی سورستانی، ۱۳۸۹). این گیاه بومی آمریکا و کاناداست (Mallavarapu *et al*., 2004؛ Charles *et al*., 1991) که در ناحیه مدیترانه و شمال و مرکز اروپا کشت می‌شود. در حال حاضر این گیاه در ایران در مناطقی مثل گرگان و شمال تهران کشت می‌شود. اسانس این گیاه رایحه‌ای شبیه انیسون دارد و اساساً در برگ‌ها و گل‌ها ساخته می‌شود (Omidbaigi *et al*., 2008). برگ‌ها و گل‌های این گیاه در تهیه چای گیاهی، کیک‌ها، شیرینی‌ها، سالادها و دسرها مصرف می‌شوند. همچنین برگ‌ها برای درمان ناراحتی‌های قلبی، درد قفسه سینه، القای عرق‌کردن جهت کاهش تب بکار می‌روند (Mallavarapu *et al*., 2004). اسانس این گیاه فعالیت ضدقارچی و ضدمیکروبی دارد (Omidbaigi &

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(Mahmoodi, 2010). مطالعات متعددی بر مقدار و محتوای اسانس آگاستاکه انجام شده‌است و در همه این مطالعات متیل‌چاویکول به‌عنوان جزء اصلی اسانس گزارش شده‌است (Charles *et al*., 1991؛ Mazza & Kiehn, 1992؛ Mallavarapu *et al*., 2004؛ Omidbaigi & Sefidkon, 2003) که در صنایع عطرسازی و طعم‌دهندگی دارای اهمیت است (Fuentes-Granados & Widrlechner, 1995). متیل‌چاویکول از طریق مسیر فنیل‌پروپانوئیدی (Gang *et al*., 2001) که مسیر بیوسنتزی اغلب ترکیب‌های فنلی است ساخته می‌شود. در این مسیر سه واکنش اصلی وجود دارد: ۱) آنزیم PAL (Phenylalanine Ammonia-Lyase) که برای تولید ترانس سینامیک اسید، آمین‌زدایی فنیل‌آلانین را کاتالیز می‌کند، ۲) آنزیم C4H (Cinnamate 4-Hydroxylase) که ترانس سینامیک اسید را به p-کوماریک اسید تبدیل می‌کند و ۳) آنزیم 4CL (4-Coumarate:CoA Ligase) که p-کوماریک اسید را برای ساختن p-کوماریل COA مصرف می‌کند (Tuan *et al*., 2011). واکنش‌های متوالی کاتالیز شده توسط این سه آنزیم مسیر فنیل‌پروپانوئیدی عمومی را تشکیل می‌دهند (Yamamura *et al*., 2001). PAL ازجمله آنزیم‌هایی است که به‌دلیل نقش تعیین‌کننده در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مختلف، در گیاهان بسیار مطالعه شده‌است (Song & Wang, 2009) و یک آنزیم مهم نقطه انشعابی است که متابولیسم اولیه و ثانویه گیاهی را به‌هم مرتبط می‌کند (Weitzel & Petersen, 2010). این آنزیم همچنین بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدی را در واکنش به تنش‌زاهای زیستی و غیرزیستی نظیر حملات پاتوژن، تابش UV، زخم‌زنی مکانیکی و نور القا می‌کند (Xu *et al*., 2010). فعالیت PAL در سطح رونویسی (transcriptional) تنظیم می‌شود و با توجه به مرحله تمایز سلولی و قرارگرفتن در معرض انواع مختلف تنش به مقدار زیادی متغیر است (Weitzel & Petersen,. 2010). آنزیم 4CL نیز به‌دلیل موقعیت انتهایی در مسیر فنیل‌پروپانوئیدی عمومی ممکن است نقشی کلیدی را در تنظیم جریان کربن به سمت مسیرهای انشعابی خاص متابولیسم فنیل‌پروپانوئیدی بازی کند (Lee & Douglas, 1996).

جاسمونیک‌اسید و متیل‌استر آن (متیل‌جاسمونات)، ترکیب‌هایی سیکلوپنتانونی (Cyclopentanone compounds) از مشتقات اسید لینولنیک (linolenic acid) می‌باشند که از طریق مسیر اکتادکانوئید (octadecanoid pathway) ساخته می‌شوند و در گیاهان عالی توزیع وسیعی دارند (Qian *et al*., 2004؛ Biondi *et al*., 2001). این ترکیب‌ها فرایندهای فیزیولوژیکی متعددی نظیر رسیدن میوه، رشد ریشه، پیری، واکنش‌های دفاعی در برابر پاتوژن‌ها و حمله حشرات و واکنش گیاه به زخم و تنش‌های غیرزیستی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (Maciejewska *et al*., 2004؛ Choi *et al*., 2005). شواهدی وجود دارد که جاسمونیک‌اسید و متیل‌جاسمونات به‌عنوان مولکول‌های سیگنال فعالیت می‌کنند (Memelink, 2009) و به‌عنوان یک گروه از انتقال‌دهندگان مهم پیام در دفاع از گیاه در برابر زخم، حشره، حمله پاتوژن و غیره می‌باشند (Qian *et al*., 2004). این مولکول‌های سیگنال در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القاکننده آنزیم‌های خاص کاتالیزکننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مثل پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند. معلوم شده است که وقتی این مولکول‌های سیگنال به صورت خارجی بکار برده می‌شوند به‌صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دفاعی می‌گردند (Yao & Tian, 2005).

هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر متیل‌جاسمونات در القای متابولیسم فنیل پروپانوئیدی در گیاه آگاستاکه از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های PAL و 4CL (دو آنزیم کلیدی این مسیر) و نیز اندازه‌گیری مقدار فنل کل در نظر گرفته شد.

مواد و روشها

بذرهای گیاه آگاستاکه، از شرکت گیاهان دارویی زردبند در سال ۱۳۸۸ تهیه گردید. این تحقیق در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. بذرها در فروردین ۱۳۸۹ در خاک شنی- لومی با زهکشی خوب در عمق ۵ سانتی‌متری به‌صورت ردیفی در مزرعه کشت شدند. تمام عملیات به‌زراعی مورد نیاز انجام شد. گیاهان در مرحله ۶ برگی بعد از گذشت ۲ ماه، از مزرعه برداشت شده و ریشه‌هایشان به آرامی با آب شسته شد، سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. در آنجا گیاهان به یک سیستم هیدروپونیک متشکل از ۹ جعبه پلاستیکی (با ابعاد ۲۴ × ۹

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

× ۱۷ سانتی‌متر هر یک دربرگیرنده ۸۷ گیاه) هر یک فقط حاوی ۲۵۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی تغییریافته هوگلند با نصف غلظت، منتقل گردیدند. محلول غذایی هوادهی شده هر ۴ روز یکبار تعویض شد. وقتی ریشه‌های جانبی به مدت ۲ هفته رشد کردند تیمارها اعمال شدند. محلول غذایی درون هر جعبه پلاستیکی با ۰ (شاهد)، ۰/۱ یا ۱ میلی‌مولار محلول متیل‌جاسمونات تیمار شد. از آنجا که محلول‌های غذایی دارای متیل‌جاسمونات حاوی ۱٪ درصد اتانول بودند که برای حل کردن متیل‌جاسمونات استفاده شد، از این رو به محلول غذایی شاهد نیز ۱٪ اتانول افزوده شد. بخش‌های هوایی گیاهان در همه تیمارها پس از سپری شدن ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت از شروع تیماردهی برداشت شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گردیده و تا زمان انجام سنجش‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش‌های بیوشیمیایی

سنجش پروتئین کل

۰/۲۵ گرم از بافت گیاهی در نیتروژن مایع، در ۷۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (۸pH)، دارای ۰/۰۲۵ گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدون و ۲ میلی‌مولار دیتیوتریتول در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً ساییده شد. مخلوط حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شد و برای سنجش غلظت پروتئین و نیز فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

غلظت پروتئین در عصاره‌های مزبور، به روش برادفورد و با استفاده از BSA (آلبومین سرم گاوی) به‌عنوان استاندارد، بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر تعیین گردید (Bradford, 1976). در نهایت مقدار پروتئین کل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) در ۴ مقطع زمانی (۴، ۸، ۱۲و ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار) به‌طور مستقل از هم، در هر یک از زمان‌های یاد شده، ارزیابی شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز مطابق شیوه‌نامه Wakabayashi و همکاران (۱۹۹۷) با کمی تغییر، براساس مقدار سینامیک اسید تولید شده سنجیده شد. برای این منظور، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (۸pH) و ۳۰۰ میکرولیتر محلول فنیل‌آلانین ۲۰ میلی‌مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر HCl (۵M) متوقف گردید و سینامیک اسید تولید شده با ۱/۵ میلی‌لیتر اتیل استات در ۳ مرحله استخراج شد. فاز اتیل استاتی در معرض جریان هوا تبخیر شد و رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر متانول حل شد.

مقدار سینامیک اسید تولید شده، با استفاده از منحنی استاندارد آن، به کمک دستگاه HPLC (KNAUER, Germany) با دتکتور UV/Vis و ستون C18-ODS3 (۲۵۰mm × ۴) محاسبه شد. در نهایت فعالیت آنزیم PAL برحسب میکروگرم سینامیک اسید تولید شده بر میلی‌گرم پروتئین در ساعت (µgr cinnamic acid/mg protein/h) محاسبه گردید.

برای رسم منحنی استاندارد سینامیک اسید، ابتدا غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سینامیک‌اسید به‌عنوان استاندارد آماده شد و به دستگاه HPLC تزریق شد. سپس با استفاده از سطح زیر منحنی هر یک از غلظت‌ها، منحنی استاندارد رسم شد. در نهایت، فعالیت آنزیمPAL تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل‌جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار)، در ۴ مقطع زمانی (۴، ۸، ۱۲و ۲۴ ساعت پس از تیمار) به‌طور مستقل از هم، در هر یک از زمان‌های ذکر شده، ارزیابی شد.

سنجش فعالیت آنزیم ۴-کومارات‌کوآلیگاز (4CL)

برای سنجش فعالیت 4CL، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۷۸۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (۷/۵pH)، ۵۰ میکرولیتر p-کوماریک اسید ۲۰ میلی‌مولار در متانول ۵۰٪، ۲۰ میکرولیتر آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) ۵۰ میلی‌مولار، ۲۰ میکرولیتر $MgCl_2$ ۱۲۵ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر دیتیوتریتول ۰/۱ مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با افزودن ۲۰ میکرولیتر کوآنزیمآ (۵ میلی‌مولار) واکنش آغاز شد، و با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تغییرات جذب در طول موج ۳۳۳nm پس از ۱/۵ دقیقه بررسی شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر حسب میلی‌مول بر گرم پروتئین در دقیقه، به کمک ضریب

خاموشی معادل ۲۱/۱ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر محاسبه گردید (Garden, 2003) و فعالیت آنزیم4CL تحت‌تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل‌جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار)، ۲۴ ساعت پس از تیمار ارزیابی شد.

سنجش مقدار فنل کل

مقدار فنل کل با استفاده از معرف Folin-Ciocalteu سنجیده شد (Maizura *et al*., 2011). ۰/۲ گرم از بافت گیاهی در ۵ میلی‌لیتر معرف فولین که قبلاً با آب دیونیزه ۱۰ برابر رقیق شده بود، ساییده شد و به مدت ۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن افزوده و اجازه داده شد تا به مدت ۲ ساعت دیگر در دمای اتاق و در تاریکی باقی بماند و در نهایت جذب هر یک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد محلول گالیک اسید (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با رویه‌ای مشابه تهیه گردید. نتایج برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن تر محاسبه شد و در نهایت مقدار فنل کل تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل‌جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) در ۳ مقطع زمانی (۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار) به‌طور مستقل از هم، در هر یک از زمان‌های یاد شده، ارزیابی شد.

محاسبات آماری

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. از نرم‌افزار SAS برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده گردید و با مشاهده تفاوت معنی‌دار در تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p \leq$ ۰/۰۵) انجام شد. نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

تأثیر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در زمان‌های ۴، ۸ و ۱۲ ساعت بعد از شروع تیمار اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای متیل‌جاسمونات و تیمار شاهد مربوط به هر زمان وجود نداشت، اما بعد از گذشت ۲۴ ساعت از استعمال متیل‌جاسمونات اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد (جدول ۱). پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع تیمار، بیشترین فعالیت آنزیم PAL با استعمال ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات حاصل شد که این مقدار ۱/۳ برابر تیمار شاهد همین زمان بود. البته میزان فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات از نظر آماری با تیمار شاهد همین زمان اختلافی نداشت (شکل ۱).

تأثیر متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم 4CL

تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) بر میزان فعالیت آنزیم 4CL فقط در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار سنجیده شد. نتایج نشان داد که فعالیت 4CL تحت تأثیر تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات در مقایسه با تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و تیمار شاهد، افزایش معنی‌داری یافت، به‌طوری که مقدار آن به ۲/۶۵ برابر تیمار شاهد رسید. میزان فعالیت 4CL تحت تأثیر تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۲).

تأثیر متیل‌جاسمونات بر فنل کل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که در هیچ یک از زمان‌های بررسی شده (۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار) تیمار متیل‌جاسمونات در مقایسه با شاهد مربوط به هر زمان، تأثیر معنی‌داری بر مقدار فنل کل نداشته است (جدول ۲).

تأثیر متیل‌جاسمونات بر مقدار پروتئین کل

نتایج تجزیه واریانس حاصل از اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل نشان داد که تأثیر متیل‌جاسمونات بر مقدار پروتئین کل، تنها ۲۴ ساعت پس از استعمال آن، نسبت به تیمار شاهد همین زمان، معنی‌دار بوده‌است و غلظت‌های بکار رفته متیل‌جاسمونات در سایر زمان‌ها در مقایسه با شاهد مربوط به هر زمان، تأثیر معنی‌داری بر مقدار پروتئین کل نداشته‌اند (جدول ۳). پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع تیمار، گیاهان دریافت‌کننده متیل‌جاسمونات با هر دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار از نظر مقدار پروتئین کل، افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد همین زمان نشان دادند، ولی بین گیاهان دریافت‌کننده غلظت‌های ۰/۱ یا ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات از نظر مقدار پروتئین کل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL در زمان‌های مختلف پس از شروع تیمار

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات برای فعالیت PAL			
		۴ ساعت	۸ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
تیمار (غلظت‌های مختلف MeJa)	۲	۰/۰۹۴۷ ns	۰/۲۲۹۵ ns	۰/۱۳۵۰ ns	۰/۰۹۲۷ ***
خطای آزمایشی	۶	۰/۰۵۲۶	۰/۱۰۷۳	۰/۲۱۷۴	۰/۰۰۳۱

ns و***: به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱٪

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر مقدار فنل کل در زمان‌های مختلف پس از شروع تیمار

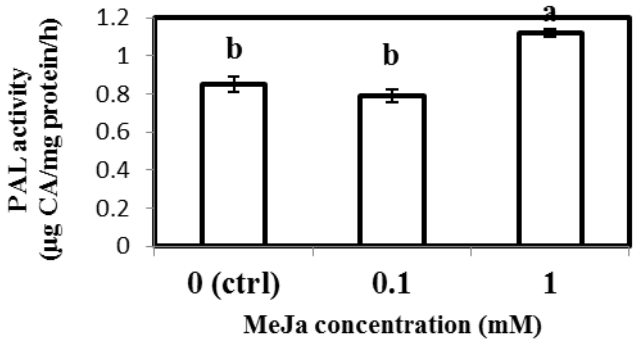
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات برای مقدار فنل کل		
		۸ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
تیمار (غلظت‌های مختلف MeJa)	۲	۰/۹۹۶۰ ns	۰/۱۴۵۷ ns	۱/۰۰۲۹ ns
خطای آزمایشی	۶	۱/۱۶۹۷	۰/۲۹۹۹	۰/۵۰۰۳

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر مقدار پروتئین کل در زمان‌های مختلف پس از شروع تیمار

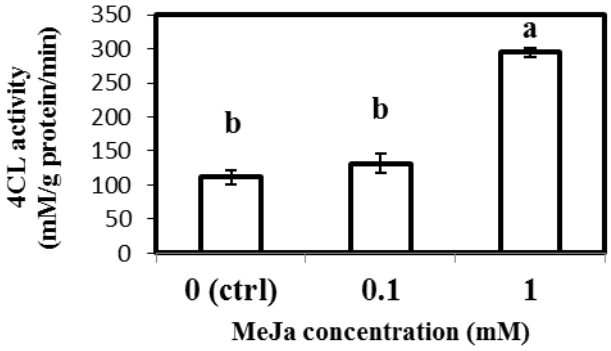
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات برای مقدار پروتئین کل			
		۴ ساعت	۸ ساعت	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت
تیمار (غلظت‌های مختلف MeJa)	۲	۰/۰۰۰۲ ns	۰/۰۰۱۰ ns	۰/۰۰۰۳ ns	۰/۰۰۱۳ *
خطای آزمایشی	۶	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۲

ns و*: به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪



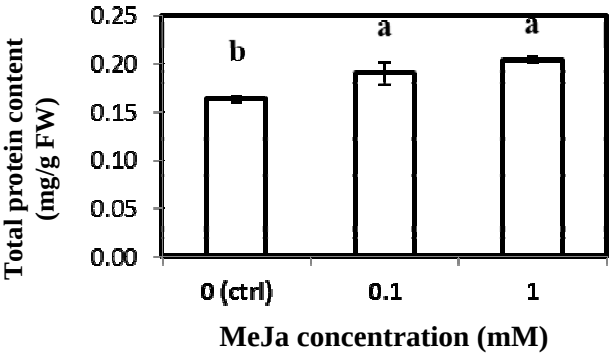
شکل ۱- اثر تیمار غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL در آگاستاکه، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار

(میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشد.)



شکل ۲- اثر تیمار غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم 4CL در آگاستاکه، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار

(میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشد.)



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر مقدار پروتئین کل در آگاستاکه، ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار

(میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشد.)

بحث

PAL اولین آنزیمی است که در متابولیسم فنیل‌پروپانوئیدی فعالیت می‌کند و در تولید اغلب ترکیب‌های دفاعی فنلی نقش کلیدی دارد (Heredia & Cisneros-Zevallos, 2009). 4CL نیز از دیگر آنزیم‌های مهم مسیر فنیل‌پروپانوئیدی است (Lee & Douglas, 1996) که با وجود اهمیت آن، در آزمایش‌ها کمتر مورد توجه قرار گرفته‌است. القای متابولیسم فنیل‌پروپانوئیدی می‌تواند توسط تیمار با الیسیتورها نیز حاصل شود. مطالعات وجود یک رابطه مثبت بین استعمال خارجی متیل‌جاسمونات و سنتز ترکیب‌های فنلی را، احتمالاً به‌عنوان بخشی از واکنش دفاعی گیاه نشان داده‌اند (Heredia & Cisneros-Zevallos, 2009). همچنین گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم PAL در کشت‌های سلولی بعد از استعمال متیل‌جاسمونات موجود است که از آن جمله می‌توان به کشت‌های سلولی توتون (Sharan *et al*., 1998)، تاکسوس (Wu & Lin 2003)، فندق (رضایی و همکاران، ۱۳۹۰)، سویا (Gundlach *et al*., 1992)، *Coleus blumei* (Szabo *et al*., 1999) و *Lithospermum erythrorhizon* (Mizukami *et al*., 1993) اشاره کرد که میزان فعالیت آنزیم PAL در نتیجه استعمال متیل‌جاسمونات افزایش یافته‌است. گزارش شده‌است که تیمار کاهوی رومایین (Romaine) با متیل‌جاسمونات ۰/۵ میلی‌مولار موجب اختلاف معنی‌دار مقدار فنل کل با شاهد در زمان‌های ۲، ۶ و ۸ روز بعد از تیمار گردید، به‌طوری که در زمان ۲ روز بعد از تیمار حداکثر مقدار آن حاصل شد. همچنین در زمان‌های ۲ و ۶ روز بعد از تیمار، میزان فعالیت آنزیم PAL در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Kim *et al*., 2007). محققان دیگری نیز گزارش کردند که با مه‌افشانی دانه‌رست‌های ۴ برگی برنج با متیل‌جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت، شاهد تجمع اسیدهای فنولیک و افزایش ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL بودند (Bi *et al*., 2007). همچنین گزارش شده‌است که مه‌افشانی متیل‌جاسمونات ۱ میلی‌مولار بر جوانه تربچه (*Raphanus sativus* L.) بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، موجب افزایش ۶۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL گردید (Kim *et al*., 2006). متیل‌جاسمونات در میوه‌های گواوا نیز باعث افزایش فعالیت PAL شده است اما مقدار فنل کل را تحت‌تأثیر قرار نداده‌است (González-Aguilar *et al*., 2004). Lee و Douglas (۱۹۹۶)، گزارش کردند که ژن‌های 4CL قابل القا توسط متیل‌جاسمونات هستند. همچنین گزارش شده‌است که در گیاه جعفری و نیز در کشت تعلیقی سلول‌های جعفری متیل‌جاسمونات باعث افزایش بیان ژن 4CL گردیده‌است (Ellard-Ivey & Douglas, 1996). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت از شروع تیمار، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های PAL و 4CL نسبت به تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و تیمار شاهد همین زمان گردید و به‌ترتیب باعث افزایش فعالیت ۳۰ درصدی و

۱۶۵ درصدی این دو آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد در همین زمان شد. با وجود این در هیچ یک از زمان‌های بررسی شده در این تحقیق، مقدار فنل کل تحت تأثیر غلظت‌های بکار رفته متیل‌جاسمونات، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مربوط به هر زمان نشان نداد. القای فعالیت آنزیم‌های PAL و 4CL می‌تواند نشانه فعال شدن مسیر فنیل‌پروپانوئیدی توسط متیل‌جاسمونات باشد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که احتمالاً با طولانی کردن مدت زمان آزمایش به بیش از ۲۴ ساعت، تغییر در مقدار فنل کل نیز ایجاد شود. همچنین در این تحقیق معلوم شد که بعد از گذشت ۲۴ ساعت از شروع تیمار، مقدار پروتئین کل تحت تأثیر هر دو غلظت متیل‌جاسمونات (۱ و ۰/۱ میلی‌مولار) نسبت به تیمار شاهد همین زمان، افزایش معنی‌داری داشت. افزایش میزان پروتئین‌ها در نتیجه استعمال متیل‌جاسمونات ممکن است به‌دلیل فعال شدن مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و در نتیجه سنتز بیشتر آنزیم‌های شرکت‌کننده در این مسیر و همین‌طور سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد. در مجموع نتایج این آزمایش پیشنهاد می‌کند که متیل‌جاسمونات می‌تواند به‌عنوان یک الیسیتور در آگاستاکه عمل کند. هر چند در این آزمایش ما تنها تأثیر متیل‌جاسمونات را بر فعالیت دو آنزیم PAL و 4CL مطالعه کردیم، اما مطالعات بعدی روی ژن‌ها و فعالیت دیگر آنزیم‌های دخالت‌کننده در مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی، مطالعه عمیق‌تر تنظیم این مسیر در آگاستاکه را توسط متیل‌جاسمونات امکان‌پذیر خواهد کرد.

منابع مورد استفاده

– امیدبیگی، ر. و محمودی سورستانی، م.، ۱۳۸۹. اثر تنش خشکی بر برخی صفات مرفولوژی، میزان و عملکرد اسانس گیاه گل مکزیکی *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze. علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران)، ۴۱(۲): ۱۶۱–۱۵۳.

– رضایی، ا.، قناتی، ف. و بهمنش، م.، ۱۳۹۰. افزایش تولید و آزادسازی تاکسول توسط متیل‌جاسمونات، امواج فراصوت و دی‌بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.). زیست‌شناسی گیاهی، ۳(۷): ۷۱–۵۵.

- Bi, H.H., Zeng, R.S., Su, L.M., An, M. and Luo, S.M., 2007. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. Journal of Chemical Ecology, 33(5): 1089-1103.
- Biondi, S., Scaramagli, S., Capitani, F., Altamura, M.M. and Torrigiani, P., 2001. Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. Journal of Experimental Botany, 52(355): 231-242.
- Bradford, M.H., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.
- Charles, D.J., Simon, J.E. and Widrlechner, M.P., 1991. Characterization of essential oil of *Agastache* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(11): 1946-1949.
- Choi, D.W., Jung, J.D., Ha, Y.I., Park, H.W., In, D.S., Chung, H.J. and Liu, J.R., 2005. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. Plant Cell Reports, 23(8): 557-566.
- Ellard-Ivey, M. and Douglas, C.J., 1996. Role of jasmonates in the elicitor-and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. Plant Physiology, 112(1): 183-192.
- Fuentes-Granados, R.G. and Widrlechner, M.P., 1995. Diversity among and within populations of *Agastache foeniculum*. Proceedings of the 14th Annual North American Prairie Conference: Prairie Biodiversity, Kansas State University, Manhattan, Kansas, 12-16 July, 1994: 1-8.
- Gang, D.R., Wang, J.H., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E., 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiology, 125(2): 539-555.
- Garden, H., 2003. Biotechnological production of podophyllotoxin by *Linum album* suspension cultures. Doctoral Thesis, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- González-Aguilar, G.A., Tiznado-Hernández, M.E., Zavaleta-Gatica, R. and Martínez-Téllez, M.A., 2004. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313(3): 694-701.
- Gundlach, H., Mueller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 89(6): 2389-2393.
- Heredia, J.B. and Cisneros-Zevallos, L., 2009. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on PAL activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. Postharvest Biology and Technology, 51(2): 242-249.
- Kim, H.J., Chen, F., Wang, X. and Choi, J.H., 2006. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(19): 7263-7269.
- Kim, H.J., Fonseca, J.M., Choi, J.H. and Kubota, C., 2007. Effect of methyl jasmonate on phenolic

for plant secondary metabolism. Biotechnology and Bioengineering, 86(7): 809-816.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N. and Okazaki M., 1998. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. Plant Science, 132: 13-19.
- Song, J. and Wang, Z., 2009. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*. Molecular Biology Reports, 36(5): 939-952.
- Szabo, E., Thelen, A. and Petersen, M., 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Reports, 18(6): 485-489.
- Tuan, P.A., Li, X., Park, N.I., Lee, S.Y., Kim, H.H. and Park, S.U., 2011. Molecular cloning of 4-coumarate: CoA ligase and total phenolic content in garlic (*Allium sativum*). Plant Omics, 4(1): 25-28.
- Wakabayashi, K., Hoson, T. and Kamisaka, S., 1997. Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. Plant Physiology, 113(3): 967-973.
- Weitzel, C. and Petersen, M., 2010. Enzymes of phenylpropanoid metabolism in the important medicinal plant *Melissa officinalis* L. Planta, 232(3): 731-742.
- Wu, J. and Lin, L., 2003. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. Applied Microbiology and Biotechnology, 62(2-3): 151-155.
- Xu, H., Park, N.I., Li, X., Kim, Y.K., Lee, S.Y. and Park, S.U., 2010. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis*. Bioresource Technology, 101(24): 9715-9722.
- Yamamura, Y., Ogihara, Y. and Mizukami, H., 2001. Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression. Plant Cell Reports, 20(7): 655-662.
- Yao, H. and Tian, S., 2005. Effects of pre-and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. Postharvest Biology and Technology, 35(3): 253-262.
compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(25): 10366-10372.
- Lee, D. and Douglas, C.J., 1996. Two divergent members of a tobacco 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins. Plant Physiology, 112(1): 193-205.
- Maciejewska, B.D., Kesy, J., Zielinska, M. and Kopcewicz, J., 2004. Jasmonates inhibit flowering in short-day plant pharbitis nil. Plant Growth Regulation, 43: 1-8.
- Maizura, M., Aminah, A. and Wan Aida, W.M., 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. International Food Research Journal, 18(2): 529-534.
- Mallavarapu, G.R., Kulkarni, R.N., Baskaran, K. and Ramesh, S., 2004. The essential oil composition of anise hyssop grown in India. Flavour and Fragrance Journal, 19(4): 351-353.
- Mazza, G. and Kiehn, F.A., 1992. Essential oils of *Agastache foeniculum*, a potential source of methyl chavicol. Journal of Essential Oil Research, 4(3): 295-299.
- Memelink, J., 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. Phytochemistry, 70(13-14): 1560-1570.
- Mizukami, H., Tabira, Y. and Ellis, B.E., 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 12(12): 706-709.
- Omidbaigi, R., Kabudani M. and Khoorang M., 2008. Nitrogen fertilizer affecting herb dry yield, essential oil content and compositions of *Agastache foeniculum* Pursh. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 11(3): 261-266.
- Omidbaigi, R. and Mahmoodi, M., 2010. Effect of irrigation regimes on the essential oil content and composition of *Agastache foeniculum*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 13(1): 59-65.
- Omidbaigi, R. and Sefidkon, F., 2003. Essential oil composition of *Agastache foeniculum* cultivated in Iran. Journal of Essential Oil Research, 15(1): 52-53.
- Qian, Z.G., Zhao, Z.J., Xu, Y., Qian, X. and Zhong, J.J., 2004. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals

Effect of methyl jasmonate on metabolic enzymes and phenolics, in *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze

F. Raouf Fard[1], M. Sharifi[2*], R. Omidbaigi[3], F. Sefidkon[4], M. Behmanesh[5] and N. Ahmadi[3]

1- PhD. Student, Department of Horticulture, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: msharifi@modares.ac.ir
3- Department of Horticulture, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran
5- Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: July 2012 Revised: October 2012 Accepted: October 2012

Abstract

The effect of methyl jasmonate (MeJa) upon *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze was investigated in aspects of enzymatic activities of phenylalanine ammonialyase (PAL) and 4-coumarate:CoA ligase (4CL), total phenolic content and total protein. The experiments were carried out based on a completely randomized design under a hydroponic system. The plants were subjected to different concentrations of MeJa (0, 0.1 and 1 mM). The PAL activity significantly increased in plants treated with 1 mM MeJa for 24 h compared with 0.1mM MeJa and control. In addition, 4CL activity also significantly increased at 24 h after 1mM MeJa treatment compared with 0.1mM MeJa treatment and control. However, MeJa treatments did not have any significant effect on total phenolic compounds after 8, 12 or 24 h of treatment compared with controls of those times. Total protein content significantly increased with 1 or 0.1 mM MeJa treatments after 24h of treatment compared with control plants.

Key words: methyl jasmonate, *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze, phenylalanine ammonialyase, 4-Coumarate CoA ligase, phenolic compounds.