نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و پنجم، شماره یکم، ۱۳۹۷
http://jopp.gau.ac.ir

اثر اسیدجاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر برخی آنتی‌اکسیدان‌ها، قند کل و پراکسیداسیون لیپید در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در شرایط مزرعه‌ای

***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: ۱۳۹۶/۳/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: مهم‌ترین مشکلات در تجاری‌سازی گیاهانی که متابولیت‌های ثانویه از آن‌ها استخراج می‌شود، میزان تولید در سطوح کم و تقاضای بالای صنعت برای این مولکول‌ها می‌باشد. امروزه محققین به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از الیسیتورهایی چون اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بهره می‌گیرند که می‌توانند گیاه را وادار به تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک در اندام هدف نمایند. الیسیتورها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی، از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه عمدتا در واکنش به تنش‌ها یا مولکول‌های محرک رخ می‌دهد. بنابراین هدف از اجرای این آزمایش بررسی اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر برخی آنتی‌اکسیدان‌ها غیرآنزیمی (که اغلب جنبه دارویی دارند)، قند محلول و پراکسیداسیون لیپید در گیاه دارویی سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای بود.

مواد و روش‌ها: آزمایش حاضر در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹٤ در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود در سه تکرار، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار انجام شد. علت عدم اجرای آزمایش به‌صورت فاکتوریل، یافتن بهترین ترکیب تیماری اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بود نه تحلیل ماهیت برهمکنش آن‌ها تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک با چهار غلظت (۰، ۵، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک 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 شروع و در سه نوبت تکرار گردید. علت استفاده از فاصله زمانی ۱۰ روز این بود که مدت اثرگذاری اسید جاسمونیک تنها ۸ الی ۱۰ روز می‌باشد و امکان دارد که استفاده هم‌زمان آن‌ها اثر آنتاگونیستی در گیاه ایجاد نماید. در مطالعه حاضر نقش اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق ایجاد تنش کاذب با اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپید و سپس اندازه‌گیری قند کل و آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله فنل‌ها، فلانویید، آنتوسیانین، اسید آسکوربیک و کارتنویید صورت گرفت.

*مسئول مکاتبه: F.rasouli86@gmail.com

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و نیز استفاده با هم آن‌ها با فاصله زمانی ۱۰ روز بر صفات اندازه‌گیری شده، با اطمینان ۹۹ درصد اثرگذار بوده است. در اغلب تیمارها، غلظت فنل کل، فلانویید، آنتوسیانین، اسید آسکوربیک و کارتنویید بیشتر از شاهد شد. بیشترین میزان اسید آسکوربیک در تیمار پنج میکرومولار اسید جاسمونیک با میانگین ٤/٦ میکروگرم بر گرم بافت تر مشاهده شد که ۱/٦ برابر شاهد بود. بیشترین میزان فنل کل در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (Sa ۰/۵) و تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (20 Ja- 1Sa) با میانگین‌های ۱۰/۹٦ و ۱۰/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین میزان آن در تیمار شاهد با میانگین ۲/۹۷٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید.
نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک توانست تولید و تجمع متابولیت ثانویه را تحریک کند. محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها در اغلب تیمارها شد که با توجه به آنتی‌اکسیدان هدف، می‌توان از غلظت مناسب آن استفاده نمود. با توجه به اینکه فنل کل یکی از مهمترین متابولیت‌های سرخارگل می‌باشد و تیمار ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب افزایش میزان فنل کل گردید، استفاده از این ماده در سرخارگل می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد به‌ویژه این‌که ماده‌ای ارزان و در دسترس است.

واژه‌های کلیدی: اسید آسکوربیک، پراکسیداسیون لیپید، فنل کل، کارتنویید

مقدمه

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* (Moench) .L از خانواده Astraceae، از گیاهان علفی چند ساله و بومی آمریکای شمالی می‌باشد (۳٤). فرآورده‌های این گیاه دارویی جزء چهارمین گیاه دارویی پرفروش در اروپا و ششمین گیاه دارویی پرفروش در ایالات متحده در سال ۲۰۱۰ شناخته شده است (٦). بر اساس گزارش‌های اتحادیه اروپا، فرمولاسیون‌های حاصله از *E. purpurea* که به‌صورت تزریقی یا خوراکی تجویز شده‌اند اثرات محرک سیستم ایمنی را از خود نشان داده‌اند (۱۷ و ۲۱). این داروها منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و سلول‌های طحال شده و توانایی فاگوسیتوز توسط گرانولوسیت‌ها را زیاد می‌کنند (۹، ۱۷ و ۲۱). مهمترین ترکیبات موجود در گیاه که در بروز سیستم ایمنی مؤثر است مشتقات اسید کافئیک، آلکیل آمیدها و پلی‌ساکاریدها می‌باشند (۲۱ و ۱۷).

مهمترین مشکلات در تجاری‌سازی گیاهانی که متابولیت‌های ثانویه از آن‌ها استخراج می‌شود، میزان تولید در سطوح کم و تقاضای بالای صنعت برای این ترکیبات می‌باشد و سنتز شیمیایی آن‌ها معمولا پیچیده و پرهزینه است. یکی از راه‌های متداول کنونی برای تولید متابولیت‌های ثانویه، استفاده از زیست‌فناوری، کشت بافت و سلول گیاهی می‌باشد که در آن‌ها از روش‌های مختلفی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از الیسیتورها[1]، افزودن پیش‌سازها، بهینه‌سازی محیط کشت و مهندسی متابولیت اشاره کرد. الیسیتور-ها از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌گردند. استفاده ازجاسمونات‌ها (الیسیتورشیمیایی) به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود معرفی شده است (١٤).

1- Elicitor

تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه عمدتا در واکنش به تنش‌ها یا مولکول‌های محرک رخ می‌دهد (۲۰ و ٤٠).

اسید سالیسیلیک مولکولی پیام‌رسان با ماهیت فنلی است که مسیر پیام‌رسانی آن با مسیر پیام‌رسانی رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر هم‌کنش دارد. تیمار با اسید سالیسیلیک خارجی سبب تجمع پراکسید هیدروژن در آرابیدوپسیس گردید (۳۳). رائو و همکاران (۱۹۹۷) بیان داشتند که اگرچه مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد مخرب می‌باشد و باعث آسیب‌های سلولی و حتی مرگ گیاه می‌شود، با وجود این مقادیر کم رادیکال‌های اکسیژنی به‌ویژه پراکسید هیدروژن نقش پیام‌رسانی داشته و مسیرهای دفاعی خاصی مانند سنتز برخی هورمون‌ها نظیر جاسمونات، اسید سالیسیلیک، اتیلن و یا سنتز یا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را فعال می‌کند (۳۳). همچنین اسید سالیسیلیک در القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی نقش دارد و از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و به تأخیر انداختن پیری موجب حفاظت گیاهان و طولانی‌تر شدن دوره حیات گیاهان می‌شوند (٤٠). صمدی و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) در کنگرفرنگی تحت تأثیر متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلک در شرایط درون شیشه‌ای بیان داشتند که تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنلی و فلانوییدی تحت تأثیر نسبت‌های مختلف محرک قرار گرفت و نسبت به هم همبستگی نشان دادند (۳۵). بیشترین میزان فنل کل و فلانویید در نمونه‌های تیمار شده با تیمار ۱۰۰ میکرمولار متیل‌جاسمونات مشاهده شد. با افزایش اسیدسالیسیلک نیز تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی افزایش یافت (۳۵). رئوف‌فرد و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر آنزیم‌های متابولیسمی و مواد فنلی در گیاه دارویی آگاستاکه در شرایط درون شیشه‌ای بیان داشتند که تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین‌آمونیولیاز و ٤-کومارات کوآلیگاز گردید. با وجود این تیمارهای متیل‌جاسمونات هیچ اثر معنی‌داری بر مقدار فنل کل بعد از گذشت ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت از تیمار در مقایسه با تیمارهای شاهد هر یک از زمان‌های یاد شده نداشتند (۳۲). بیشتر مطالعات در زمینه افزایش متابولیت ثانویه در شرایط کشت بافت و سلولی صورت می‌گیرد، حال اگر بتوان در شرایط مزرعه‌ای 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. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرغلظت‌های مختلف اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک به‌عنوان محرک القای تنش کاذب از طریق اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید و سپس افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق اندازه‌گیری قند محلول و برخی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله فنل‌ها، فلانویید، آنتوسیانین، اسید آسکوربیک و کارتنویید در شرایط مزرعه‌ای در گیاه سرخارگل بود.

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 ٥٨/٥٤ درجه و عرض شمالی ٣٥/٣٦ درجه با ارتفاع ١٤٢٠ متری از سطح دریا، در سال زراعی ١٣٩٥-١٣٩٤ انجام گرفت. شهرستان بسطام دارای میانگین دمای متوسط سالانه ١٤ درجه سانتی‌گراد، میانگین دراز مدت بارندگی سالانه ١٨٠ میلی‌متر و رطوبت نسبی ٦٣ درصد

می‌باشد. شهرستان بسطام دارای آب و هوای معتدل سرد و مرطوب کوهستانی می‌باشد.

قبل از انجام آزمایش از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک مزرعه نمونه‌برداری شده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در آزمایشگاه تعیین گردید. بر این اساس خاک مزرعه دارای بافت لوم‌سیلتی، ۰/۷٦ کربن آلی خاک، فسفر قابل جذب ppm ۵/۵٤، پتاسیم قابل جذب ppm ۲۵۰، نیتروژن کل ۰/٦۰ درصد، ۷/۲ =pH و ۲/۵ =EC دسی‌زیمنس بر متر بود.

معرفی گیاه مورد بررسی: در این مطالعه از گیاه *Echinacea purpurea* L. تهیه شده از پاکان بذر اصفهان استفاده شد. مبدأ این گیاه در شمال آمریکا بوده، از آنجایی که این گیاه بومی ایران نمی‌باشد لذا کاشت آن برای اولین بار توسط کوره‌پز به‌صورت آزمایشی در سال ۱۳۸۰ انجام شد (۲۲). در هدایت الکتریکی کمتر از ms/cm ۱ رشد آن مطلوب می‌باشد و PH بین ۸-۵/۹ را تحمل می‌کند. این گیاه به نور فراوان نیاز دارد و به سرما مقاوم بوده و تا دمای منفی ۱۰ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کند (۲۱ و ۹). این گیاه برای اولین بار برای در منطقه بسطام کشت گردید.

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)، اسید سالیسیلیک 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 (۳۹ و ۲۵) 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 اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بود نه تحلیل ماهیت برهمکنش آن‌ها؛ در این شرایط می‌توان ترکیب فاکتورها را به‌عنوان یک سطح تیمار مدنظر قرار داد (۳٦). تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱ : 5Ja-0.5Sa (پنج میکرومولار اسید جاسمونیک-۰/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک)، تیمار ۲: 5Ja-1Sa (پنج میکرومولار اسید جاسمونیک- یک‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، تیمار ۳: 5Ja (پنج میکرومولار اسید جاسمونیک)، تیمار ٤: شاهد، تیمار ۵: 20Ja-0.5 Sa(۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- ۰/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک)، تیمار ٦: 20Ja-1Sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- یک‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، تیمار ۷: 20 Ja (۲۰ میکرومولار اسیدجاسمونیک)، تیمار ۸: 50Ja-0.5 Sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، تیمار ۹: 50Ja-1 Sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- یک‌میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک)، تیمار ۱۰: 50 Ja (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک)، تیمار ۱۱: 0.5 Sa (۰/۵میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، و تیمار ۱۲: 1Sa (یک‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک).

مراقبت زراعی: به‌دلیل کندی رشد و بد سبزی بذر سرخارگل در مزرعه، بذرهای سرخارگل دهه سوم اسفند در خزانه کشت و ۱۵ خرداد انتقال نشاها به زمین اصلی صورت گرفت. عملیات تهیه زمین شامل یک شخم عمیق، دو دیسک عمود بر هم و ایجاد جوی و پشته‌ها بود، فاصله پشته‌ها از هم ٦۰ سانتی‌متر بود. هر واحد آزمایشی به ابعاد ۳×۳ متر دارای پنج خط کاشت، به فاصله ردیف ٦۰ سانتی‌متر (فاصله پشته‌ها)، فاصله‌ی بوته‌ها ۳۰ سانتی‌متر و تراکم ٦ بوته در واحد سطح کشت شد. برای تغذیه گیاه از

ورمی‌کمپوست به میزان چهار تن در هکتار استفاده شد. آبیاری مزرعه هر ۷ روز یک بار صورت می‌گرفت. به‌دلیل کند بودن رشد سرخارگل در سال اول بعد از نشاء، کود شیمیایی نیتروژن به‌صورت سرک در سه مرحله (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) بعد از نشا (در مرحله ٤ برگی، پنجه‌زنی و آغاز گلدهی) افزوده شد.

اعمال تیمار و نمونه‌برداری: محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک از زمان ورود به مرحله زایشی (ظهور غنچه) شروع و در سه نوبت تکرار گردید. محلول‌پاشی تیمارهای ترکیبی با فاصله زمانی ۱۰ روز انجام شد. برای محلول‌سازی اسید جاسمونیک (با سمپلر) و اسید سالیسیلیک پس از وزن کردن در دو میلی‌لیتر اتانول حل شد و سپس با آب مقطر به حجم موردنظر رسانیده شد. در گیاه شاهد نیز محلول‌پاشی با آب مقطر به‌همراه دو میلی‌لیتر الکل صورت گرفت. سپس یک هفته بعد از پایان محلول‌پاشی آخر که مقارن با گلدهی کامل بود نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی صورت گرفت، نمونه‌برداری از آخرین برگ کاملا توسعه یافته فوقانی 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. برای تعیین وزن خشک برگ، همزمان با برداشت مرحله آخر گل برداشت گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک برگ، نمونه‌ها به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند و پس از خشک شدن با ترازوی EK-200 i با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند.

استخراج قندها: استخراج قندهای محلول با اتانول، بر اساس روش اوموکولو و همکاران (۱۹۹٦) همراه با تغییراتی انجام شد (۳۰).

اندازه‌گیری قند کل: برای اندازه‌گیری قند کل از روش مک کریدی و همکاران (۱۹۵۰) استفاده شد (۳۱). برای این کار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان جذب پس از سرد شدن نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر مدل UV 2160 در طول موج ٦۲۰ نانومتر قرائت شد. سپس غلظت قند کل با استفاده از منحنی استانداری که با استفاده از گلوکز تعیین شده بود محاسبه گردید ($y = 0.0014x - 0.073$ $R^2 = 0.9912$).

استخراج پراکسید هیدروژن: عمل استخراج بر اساس روش ژانا و چادهوری (۱۹۸۱) انجام شد (۲۰). مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت برگ گیاه سرخارگل در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ٦/۵ حاوی هیدروکسیل آمین ۱ میلی‌مولار هموژن گردید و بعد از آن با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن استفاده شد.

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن با استفاده از رنگ‌سنجی انجام گردید (۲۰). از معرف تیتانیوم کلراید برای تشخیص غلظت پراکسید هیدروژن استفاده شد. برای تعیین غلظت پراکسید هیدروژن مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر عصاره را با ٤۰۰ میکرولیتر معرف ترکیب و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. شدت رنگ وابسته به تشکیل کمپلکس تیتانیوم- پراکسید هیدروژن بوده که به‌وسیله

دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ٤١٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. از روی جذب نور به‌دست آمده بر اساس ضریب خاموشی (ε) برابر $\mu\ mol^{-1}.cm^{-1}$ ۰/۲۸ برای کمپلکس تیتانیوم- پراکسید هیدروژن، مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید.

سنجش پراکسیداسیون لیپید: اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید به روش هث و پاکر (١٩٦١) انجام شد (۱۸). در این روش، ۰/۱ گرم بافت برگ (از قسمت فوقانی) با ٤ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد در هاون چینی هموژنیزه گردید. عصاره هموژن شده به لوله فالکون منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از فاز بالایی (شفاف) از این عصاره با ٤ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد حاوی TBA ۰/۲۵ درصد اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب‌جوش قرار گرفت. بلافاصله پس از این مرحله لوله‌های فالکون به‌مدت ۱۵ دقیقه در یک ظرف یخ قرار داده شد. سپس میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج‌های ٤٤٠، ٥٣٢ و ٦٠٠ نانومتر قرائت شد. محلول بلانک حاوی ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد بود که با ۲ میلی‌لیتر معرف TBA۰/۲۵ درصد مخلوط شده بود و تمامی تیمارها با محلول بلانک سنجیده شد. میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس مقدار مالون‌دی‌آلدیید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$LP\ (nmol.\ ml^{-1}) = [[(A_{532}-A_{600})-[(A_{440}-A_{600})]]/157000]10^{6}$$

که MDA جذب مولی ساکارز در غلظت‌های ۱۰-۱ میلی مولار در ٥٣٢ و ٦٠٠ نانومتر است که به‌ترتیب ۸/٤ و ١٤٧ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰٥٧١ می‌باشد (۱۲).

سنجش اسیدآسکوربیک: استخراج اسیدآسکوربیک با استفاده از روش فویر و همکاران (۱۹۸۳) انجام شد (۱۵). مقدار ۰/۱۵ گرم از بافت تر برگ در متافسفریک اسید ۵ درصد در هاون چینی سرد هموژن شد، و بعد در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رویی عصاره برای اندازه‌گیری مقدار اسیدآسکوربیک استفاده شد. مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری به حجم سه میلی‌لیتر شامل ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی، ۲/۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH= ٥/٦، ۵۰ میکرولیتر اسید متافسفریک ۵ درصد اضافه شد و بلافاصله جذب نور در طول موج ٢٦٥ نانومتر قرائت شد، سپس غلظت اسید آسکوربیک از طریق منحنی استانداردی که با استفاده از اسید آسکوربیک، اسید متافسفریک و بافر فسفات ۰/۲ مولار تهیه شده بود تعیین گردید ($y=0.0266x+0.0392,\ R^2=0.9978$).

سنجش آنتوسیانین: اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین با استفاده از روش میتا و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد (۲۳). مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ با ٤ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) هموژن گردید و به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال قرار داده شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه و سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. جذب نور در فاز رویی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ٦٥٧ و ٥٣٠ نانومترخوانده شد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه و و بر اساس میکروگرم بر گرم بافت تر بیان گردید:

$$A=A530-(0.25\ A657) \qquad \text{رابطه (۱)}$$

سنجش کارتنویید: جهت سنجش این شاخص استخراج از روش آرنون (١٩٤٩) و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل از روش اردکانی و نادور (۲۰۰۸) استفاده

گردید (۳ و ۱). برای این منظور ۰/۲ گرم وزن تر برگ که از برگ‌های کاملا توسعه‌یافته فوقانی برداشت گردیده بود با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده و هموژنیزه گردید. آنگاه در داخل لوله سانتریفیوژ ریخته و به‌مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰۰۰ دور در دقیقه ساتریفیوژ شد. فاز بالایی (شفاف) برداشته و در داخل لوله داخل بالون ژوژه ریخته شد. مواد ته لوله سانتریفیوژ مجددا به‌همراه ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد دوباره ساییده و سپس سانتریفوژ گشت. فاز بالایی شفاف به بالون ژوژه اضافه شد. این عمل تا خاکستری شدن بافت برگ و رسیدن بالون به حجم ۱۵ میلی‌لیتر ادامه یافت. سپس با اسپکتروفتومتر مدل UV 2160 در طول موج‌های ٤٨٠ و ٥١٠، نانومتر قرائت شد. میزان کارتنویید با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید. قبل از قرائت در این طول موج‌ها ابتدا با بلانک (استون ۸۰ درصد) صفر شد.

رابطه (۲)

$$C_{(\text{کارتنویید})} = 7/6(A_{480}) - 1/49(A_{510}) \times \frac{v}{1000 \times w}$$

V حجم عصاره مصرف شده، W وزن نمونه و C کارتنویید بر حسب (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) می‌باشد.

استخراج و اندازه‌گیری فنل: ۰/۱ گرم از بافت تر برگ با ٢٤ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در سه مرحله هموژن گردید. هموژن حاصل به‌مدت ٢٤ ساعت در تاریکی نگهداری گردید. سپس در دمایی پایین‌تر از ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا متانول تبخیر گردد و حجم عصاره به ٤/٨ میلی‌لیتر رسانده شد. آنگاه به منظور حذف ترکیبات رنگی به عصاره تغلیظ شده به نسبت یک به پنج کلروفرم اضافه گردید. بعد از ورتکس کردن به‌مدت ۱ دقیقه رها شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. کلروفرم که جرم مولکولی بیشتری نسبت به عصاره دارد در زیر و عصاره شفاف در رو قرار می‌گیرد، از فاز رویی برای اندازه‌گیری فنل استفاده گردید. اندازه‌گیری میزان فنل با روش حاجی‌مهدی‌پور و همکاران (۲۰۰۸) صورت گرفت (۱۷). ٤٠٠ میکرولیتر از عصاره به‌همراه ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکاتیو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱۰:۱) درون لوله فالکون ریخته شد و در بن‌ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس به آن ۳ میلی‌لیتر محلول بیکربنات سدیم ٦ درصد افزوده و مجددا در بن‌ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. لازم به ذکر است که بلانک نیز مانند نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به جای عصاره، ٤٠٠ میکرولیتر آب مقطر به لوله فالکون اضافه گردید. غلظت فنل با استفاده از محنی استانداردی که با استفاده از اسید کلروژنیک رسم شده بود تعیین گردید ($y=3.0619\times0.0363$, $R^2=0.999$).

سنجش میزان فلاونوئیدها: مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ با ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی به نسبت حجمی ۹۹ سی‌سی اتانول و ۱ سی‌سی اسید استیک گلایسال هموژن گردیده، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، پس از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس شدت جذب در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید (۲۳)

داده‌های به‌دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 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

نتایج مربوط به تجزیه واریانس داده‌ها در جدول ۱ آورده شده است. نتایج این تجزیه نشان داد که غلظت‌های مختلف اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و نیز استفاده با هم آن‌ها با فاصله زمانی ۱۰ روز با اطمینان ۹۹ درصد بر میزان قند کل، پراکسیداسیون لیپید، اسید آسکوربیک و آنتوسیانین اثرگذار بوده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس قند کل، پراکسیداسیون لیپید، H_2O_2 برگ، آنتوسیانین و اسید آسکوربیک.

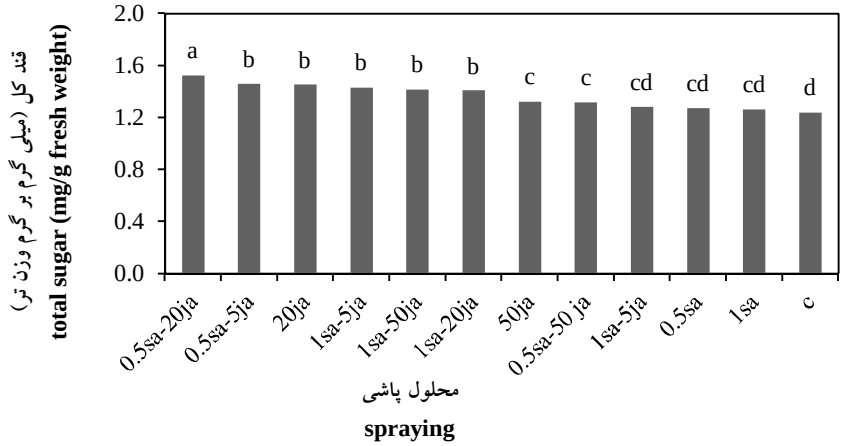
Table 1. Analysis of variance of total sugar, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, ascorbic acid, anthocyanin

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	قند کل Total sugar	پراکسیداسیون لیپید Lipid peroxidation	H_2O_2 برگ Leaf H_2O_2	آنتوسیانین Anthocyanin	اسید آسکوربیک Ascorbic acid
بلوک Block	2	0.0009 $^{n.s}$	0.000014 $^{n.s}$	0.00063 $^{n.s}$	0.000063 $^{n.s}$	0.0248 $^{n.s}$
محلول‌پاشی Spraying	11	0.0265**	0.00024 **	0.479 **	0.00132 **	2.460 **
خطا Error	22	0.030	0.00011	0.0117	0.000022	0.130
ضریب تغییرات (درصد) CV		7.2	17.18	9.39	7.38	10.11

**معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی‌دار

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

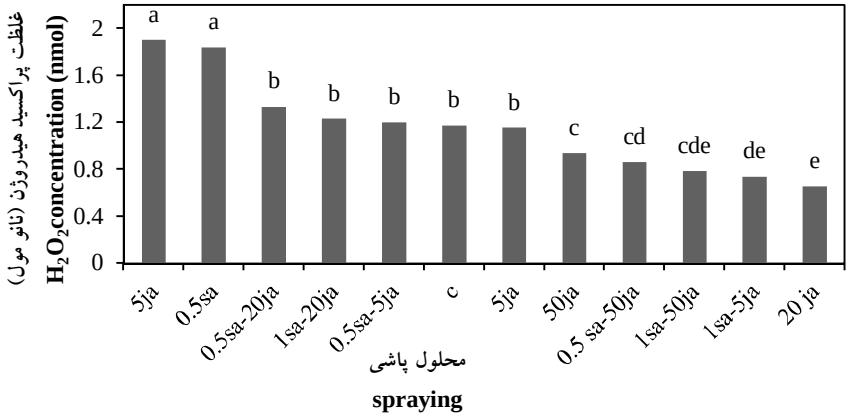
قند کل: شکل ۱ روند تغییرات قند کل در بررسی محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را نشان می‌دهد. محلول‌پاشی سبب افزایش قند کل در اغلب تیمارها شد. بیشترین میزان غلظت قند کل در تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (20ja-0.5 sa) با میانگین ۱/٦ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین غلظت در تیمار شاهد با میانگین ۱/۲٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تر حاصل گردید. افزایش میزان کلروفیل a، b (داده‌ها نشان داده نشد) و افزایش طول دوره سبزینگی سبب افزایش قندها گردید، افزایش قندها در سنتز متابولیت اولیه و ثانویه بسیار اثرگذار می‌باشد زیرا پایه اسکلتی بیشتر این ترکیبات کربنی می‌باشد. افزایش قندهای کل می‌تواند نقش دوگانه قندها را در خصوص گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده تداعی نماید. از یک سو، قندهای کل سبب تشدید فرآیندهای متابولیکی مثل تنفس میتوکندریایی شده که این امر خود تولیدکننده گونه‌های فعال اکسیژن است و از سوی دیگر، وجود قندها تأمین‌کننده انرژی لازم برای بیوسنتز آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی از جمله فنل‌ها، کارتنوییدها، آنتوسیانین، اسید آسکوربیک و نیز مسیر پنتوز فسفات لازم می‌باشد (٤ و ۷ و ۱۲). این ارتباط متضاد بین قندهای کل، تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده و فرآیندهای آنتی‌اکسیدانی به وسیله آنالیزهای رونویسی ژن تأیید شده است و حاکی از آن است که پیام‌رسانی قند با کنترل تنش اکسیداتیو مرتبط می‌باشد (۱۰)



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر قند کل در سرخارگل، LSD=۰/۰۶۲۶۰.

Figure 1. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects on total sugar in *Echinacea purpurea*, LSD= 0.06260.

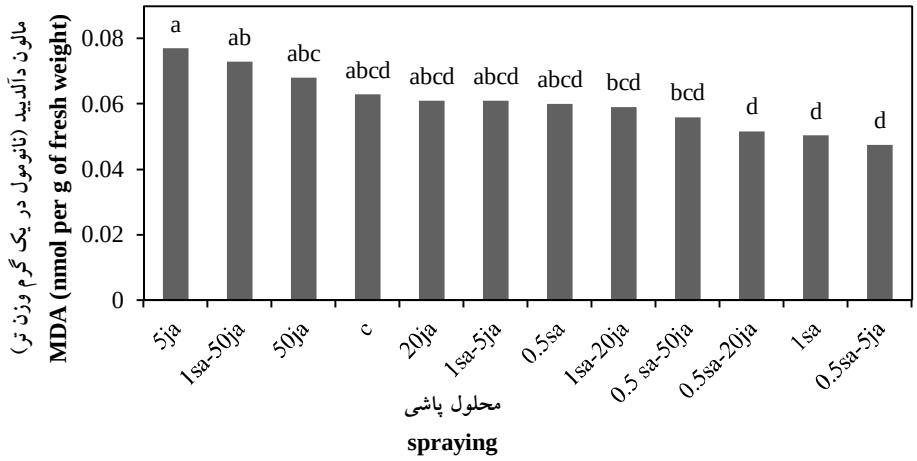
پراکسید هیدروژن: در شکل ۲ نتایج مربوط به مقایسه میانگین غلظت پراکسید هیدروژن تحت اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک ارائه شده است. غلظت پراکسید هیدروژن در تیمارهای پنج میکرومولار اسید جاسمونیک (5 ja) و ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (0.5 sa) به‌ترتیب با میانگین‌های ۱/۹ و ۱/۸ نانومول در رده اول قرار داشت. تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک (20 ja) کمترین غلظت پراکسید هیدروژن را به خود اختصاص داد. اسید سالسیلیک و جاسمونیک به عنوان یک مولکول پیام رسان داخلی با مسیر پیام‌رسانی رادیکال‌های آزاد بر همکنش دارند (۱۹ و ۳۲). اگر چه مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد مخرب می‌باشند، با وجود این مقادیر کم گونه‌های فعال اکسیژن، به‌ویژه پراکسید هیدروژن نقش پیام‌رسانی داشته و مسیر دفاعی خاص، مانند سنتز برخی هورمون‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های خاص را فعال می‌کنند (۵).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت پراکسید هیدروژن در سرخارگل، LSD= ۰/۱۸۳.

Figure 2. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects on hydrogen peroxide in *Echinacea purpurea*, LSD= 0.183

پراکسیداسیون لیپید: میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس مقدار مالون دی‌آلدیید (MDA) موجود در هر عصاره تعیین گردید. بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپید در تیمار پنج میکرومولار اسید جاسمونیک (5 ja) با میانگین ۰/۰۷۷ نانومول در یک گرم وزن تر مشاهده شد و تیمار شاهد نیز با میانگین ۰/۰۶۳ نانو مول در یک گرم وزن تر در رده‌های بعدی قرار گرفت (شکل ۳). محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک جهت القای تنش کاذب سبب افزایش میزان پراکسید هیدروژن به عنوان یکی از گونه‌های فعال اکسیژن در تیمار پنج میکرومولار اسید جاسمونیک (5 ja)، ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (0.5 sa) و تیمارهای ترکیبی ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک –۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (-20 ja 0.5 sa)، ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (20 ja-1 sa) و پنج میکرومولار اسید جاسمونیک- ۰/۵میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (5 ja-0.5 sa) گردید. افزایش گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است که سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید در گیاه گردد. گونه‌های فعال اکسیژن عوامل زیان‌بخشی هستند که باعث پراکسیداسیون تدریجی ساختارهای لیپیدی، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و صدمه اکسیداتیو می‌گردند (۵). اما در این محلول‌پاشی بر بیشتر تیمارها اثر منفی نداشت زیرا بدنبال القای تنش کاذب با محلول‌پاشی فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی زیاد شد و در نتیجه سبب پالایش گونه‌های فعال اکسیژن گردید.

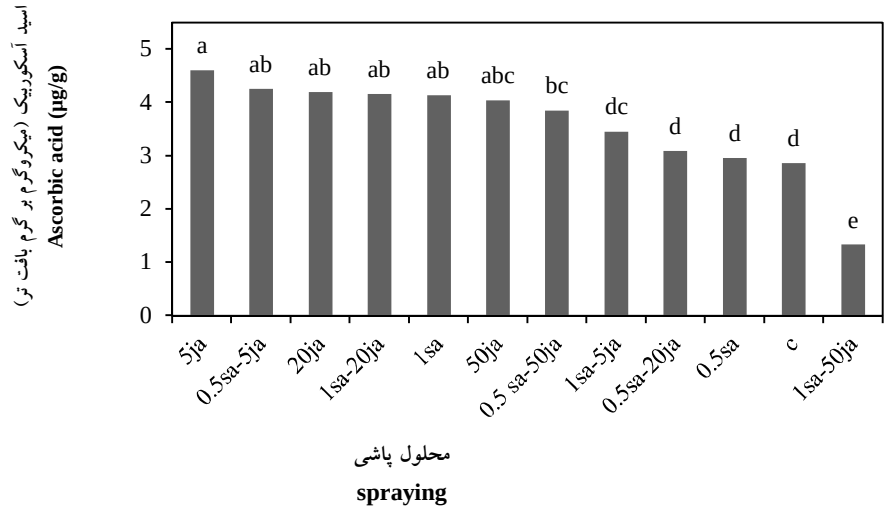


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر پراکسیداسیون لیپید در سرخارگل، LSD= ۰/۰۰۸.

Figure 3. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects on lipid peroxidation in *Echinacea purpurea*, LSD= 0.008.

اسید آسکوربیک: در شکل ٤ روند تغییرات میزان اسید آسکوربیک در بررسی محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک ارائه شده است. محلول‌پاشی سبب افزایش میزان اسید آسکوربیک شد به طوری‌که در اغلب تیمارها نسبت به شاهد، غلظت این ماده بیشتر بود. بیشترین میزان اسید آسکوربیک در تیمار پنج میکرومولار اسید جاسمونیک (5 ja) با میانگین ٤/٦٠٤ میکروگرم بر گرم بافت تر مشاهده شد که ۱/٦ برابر شاهد با میانگین ۲/۸٦ میکروگرم بر گرم بافت تر بود. با توجه به این‌که قندهای محلول پیش‌ماده اولیه بیوسنتز اسید آسکوربیک هستند، می‌توان گفت که افزایش قندها موجب افزایش میزان

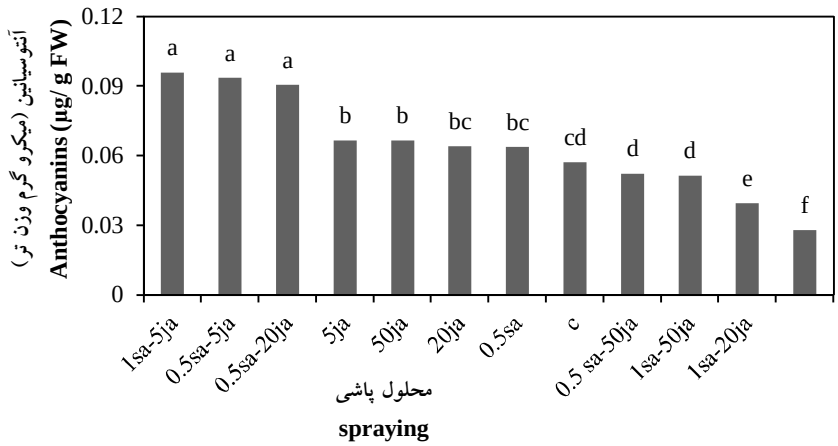
اسید آسکوربیک گردید. در این پژوهش نیز تیمار با اسید سالسیلیک و اسید جاسمونیک نقش پیام‌رسانی داشته و به همین دلیل سبب افزایش تولید بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (داده‌ها نشان داده نشد) و غیرآنزیمی گردید. اسید آسکوربیک یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هاست که در طیف وسیعی از واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به‌عنوان پالاینده اصلی گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌دهنده عمل می‌کند. اسید آسکوربیک می‌تواند به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن را با یا بدون آنزیم‌های کاتالیزوری شکسته و یا به صورت غیرمستقیم آن‌ها را به کمک توکوفرول به شکل احیا شده آن‌ها پاک‌سازی کند و حتی در واکنش با سوپراکسید نقش مشابهی با سوپراکسید دیسموتاز دارد. L- اسید آسکوربیک (ویتامین ث) ویتامینی مهم در رژیم غذایی انسان بوده و در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شود. به‌دلیل اهمیت تغذیه‌ای و دارویی آن، توزیع آن در گیاهان به‌طور گسترده‌ای اندازه‌گیری شده است (۱۶).



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسیدسالیسیلیک بر غلظت آسکوربیک اسید در سرخارگل، LSD= ۰/٦۱۳.

Figure 4. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects on ascorbic acid concentration in *Echinacea purpurea*, LSD= 0.613.

آنتوسیانین: بررسی میزان آنتوسیانین با اعمال محلول‌پاشی نشان داد که محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و نیز استفاده توأم آن‌ها منجر به افزایش معنی‌دار آنتوسیانین در برخی تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۵). بیشترین میزان آنتوسیانین در تیمارهای پنج میکرومولار اسید جاسمونیک- یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (1 sa- 5 ja)، پنج میکرومولار اسید جاسمونیک - ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (5 ja-0.5 sa) و ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (20 ja-0.5 sa) به‌ترتیب با میانگین ۰/۰۹٦، ۰/۰۹۳ و ۰/۰۹۱ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. در بسیاری از گونه‌های گیاهی، تجمع آنتوسیانین نیز به‌وسیله قندها القا می‌شود که ساکارز منجر به بیان ژن تولیدکننده رنگیزه‌های آنتوسیانین می‌شود. به احتمال زیاد افزایش قندهای کل به‌طور غیرمستقیم در بیان این ژن و تولید آنتوسیانین دخالت می‌کند. در این مطالعه نیز در بیشتر تیمارها افزایش غلظت آنتوسیانین نسبت به شاهد مشاهده شد. آنتوسیانین‌ها در گیاه دارای نقش حمایتی هستند و به‌عنوان سد دفاعی در مقابل UV به شمار می‌روند (۲٤ و ۲۸).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت آنتوسیانین در برگ سرخارگل، LSD=۰/۰۰۸

Figure 5. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects onanthocyanin concentration in *Echinacea purpurea* leaf, LSD=0.008.

جدول ۲- تجزیه واریانس کارتنویید، فنل و فلانویید.

Table 2. Analysis of variance Carotenoid, Phenol, Flavonoid

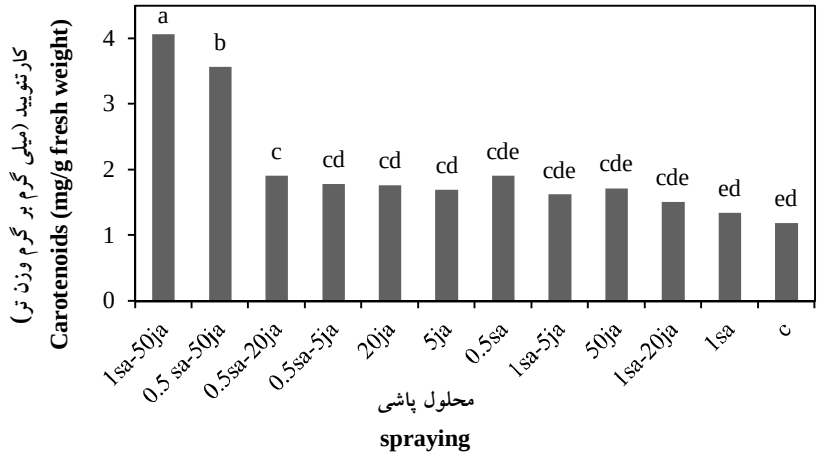
فلانویید Flavonoid	فنل Phenol	کارتنویید Carotenoid	درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V
0.380 $^{n.s}$	0.0320 $^{n.s}$	0.0056$^{n.s}$	2	بلوک Block
0.00001**	15.99 **	2.365 **	11	محلول‌پاشی Spraying
0.000001	0.063	0.078	22	خطا Error
11.89	11.08	14.13		ضریب تغییرات (درصد) CV

**معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ns عدم معنی‌دار.

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

همان‌طور که نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد غلظت‌های مختلف اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و نیز استفاده با هم آن‌ها با فاصله زمانی ۱۰ روز بر میزان کارتنویید، فلانویید و فنل کل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشتند (جدول ۲).

کاروتنویید: نتایج مقایسه میانگین محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت کارتنوییدها در شکل ٦ ارائه شده است. اعمال تیمار سبب افزایش غلظت کارتنوییدها نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان کارتنویید در تیمار ترکیبی ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (50 ja-1 sa) با میانگین ٤/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد که ۳/٤ برابری شاهد با میانگین ۱/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت برگی بود. کاروتنوییدها شامل β- کاروتن و گزانتوفیل‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های چربی دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاروتنوییدها علاوه‌بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به‌صورت مستقیم اکسیژن منفرد را غیرفعال کند و یا از طریق فرو نشاندن کلروفیل برانگیخته شده، به صورت مستقیم از تشکیل اکسیژن منفرد جلوگیری کنند (۲٦ و ۳۰). بدین ترتیب دستگاه فتوسنتزی را از پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند. در پژوهش حاضر، همه تیمارها موجب افزایش غلظت کاروتنویید نسبت به شاهد شدند، که حفاظت بیشتر فتوسیستم در برابر صدمه اکسیداتیو و تنش‌های نوری را در پی داشت.

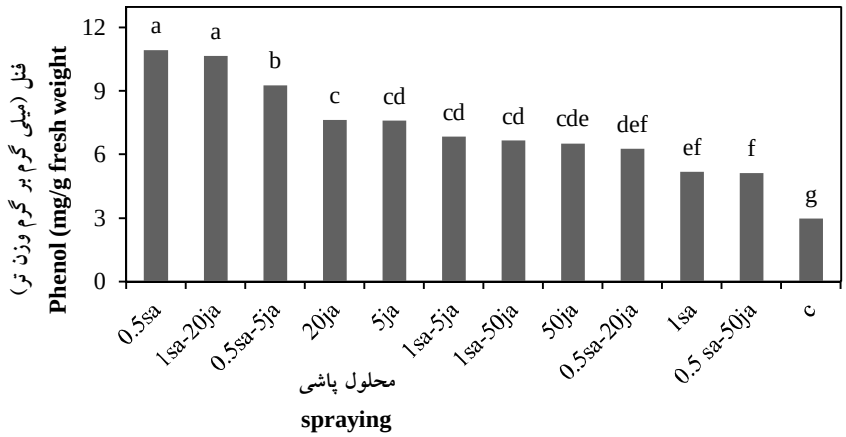


شکل ٦- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت کارتنویید در سرخارگل، LSD= ۰/۳٤۷۱

Figure 6. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects onCarotenoid in *Echinacea purpurea*, LSD=0.3471

فنل کل: شکل ۷ نتایج مقایسه میانگین روند تغییرات میزان فنل کل را در بررسی محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد. محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت فنل کل در اغلب تیمارها نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان آن در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (0.5 sa) با میانگین ۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک - یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (20 ja-1 sa) با میانگین ۱۰/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد و در تیمار شاهد مقدار آن به ۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید. گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام‌رسان مثل اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و یا تنش‌ها آزاد می‌سازند (١٤). فنل‌ها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که توانایی پالایش و زدودن رادیکال آزاد را دارند. این ویژگی آن‌ها به ساختار آن‌ها، حضور حلقه‌های آروماتیک و گروه فنلی این متابولیت‌ها مرتبط می‌باشد (۳۷). گروه هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک توان زدودن رادیکال‌های آزاد را دارا هستند. به همین خاطر، آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش داده و ساختارهای سلولی را از اثرات منفی رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کنند (۳۷). تجمع ترکیبات فنلی و افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در انگور توسط چان و تین (۲۰۰٦) پس از کاربرد اسید سالیسیلیک گزارش شده است (۱۰). به دنبال افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز میزان این ترکیبات در گیاه افزایش یافته است (۱۰). از آنجا که جهت استانداردسازی فرمولاسیون‌های گیاهان دارویی، یک ترکیب و یا دسته مشخصی از ترکیبات به‌عنوان مارکر ردیابی شده و تعیین مقدار می‌شوند، بنابراین در اکثر فرمولاسیون‌های گیاه سرخارگل طبق مراجع معتبر مجموع ترکیبات فنلی نظیر اسید کلروژنیک، اسید شیکوریک، اسید کافتاریک و به روش HPLC تعیین مقدار می‌گردند (۱۷ و ۲۹). اساس این روش استفاده از کلروژنیک اسید به‌عنوان استاندارد خارجی و زمان‌های بازداری نسبی سایر ترکیبات نسبت به کلروژنیک اسید می‌باشد. به‌علت بالا بودن قیمت این سه اسید و مشکل بودن تهیه آن‌ها در بازار به جهت تهیه ماده استاندارد از روش HPLC استفاده نشد. از آنجا که این ترکیبات فنلی می‌باشند، مجموع این ترکیبات با عنوان فنل تام یا کل به‌عنوان یکی از

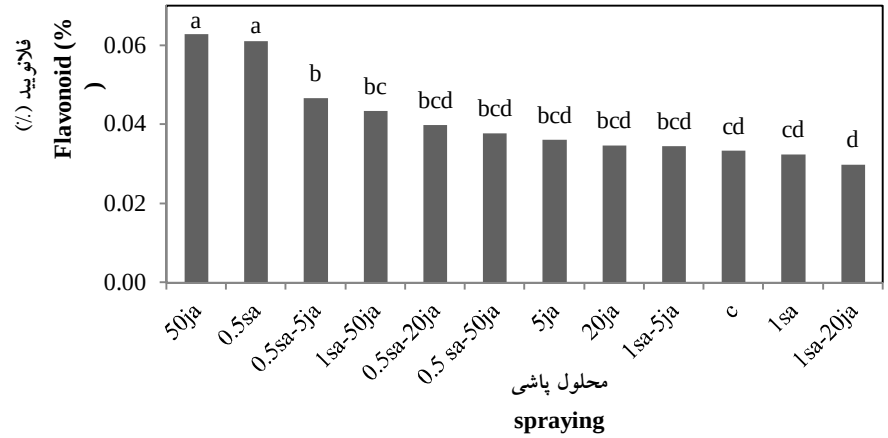
مهم‌ترین مواد مؤثره سرخارگل در نظر گرفته شد و با استفاده از روش اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد (۱۷ و ۲۹). در این پژوهش استفاده از اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک موجب افزایش غلظت فنل کل در همه تیمارها نسبت به شاهد گردید که علاوه‌بر نقش محافظتی فنل‌ها در گیاه در مقابل صدمات اکسیداتیو، میزان فنل (یکی از ترکیبات مهم و هدف در کشت گیاه دارویی سرخارگل) زیاد شد. تیمار ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک- یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک بالاترین تأثیر افزایشی را بر میزان فنل به جای گذاردند. با توجه به در دسترس بودن و پایین بودن قیمت اسیدسالیسیلیک، کاربرد آن برای رسیدن به غلظت فنلی بیشتر پیشنهاد می‌گردد.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت فنل در سرخارگل، LSD= ۱/۳۴۲.

Figure 7. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects onPhenol concentration in *Echinacea purpurea*, LSD=1.342.

فلانوییید: در شکل ۸ نتایج مربوط به مقایسه میانگین محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و نیز استفاده توأم آن‌ها بر میزان فلانوییید ارائه شده است، محلول‌پاشی سبب افزایش معنی‌دار فلانوییید نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان این ماده در تیمار پنج میکرومولار اسید جاسمونیک (5 ja) و ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک (0.5 sa) به‌ترتیب با میانگین‌های ۰/۰۶۳ و ۰/۰۶۱ درصد وزن تر مشاهده شد. مقدار آن در شاهد برابر با ۰/۰۳۳ درصد وزن تر بود. فلانوییدها یکی از بزرگترین گروه‌ها از مجموع فنل‌های گیاهی هستند. اسکت کربنی یک فلانوییید، دارای ۱۵ کربن است که در دو حلقه آروماتیک توسط پل سه کربنی، آرایش یافته‌اند؛ حضور قندها نیز در اسکلت کربنی معمول است و در واقع عمده فلانوییدها به شکل طبیعی گلیکوزیدی یافت می‌شوند. بنابراین افزایش قندهای محلول سبب افزایش میزان فلانوییدها می‌گردد. انواع مختلف فلانوییدها کارکردهای متنوعی را در گیاهان بروز می‌دهند از جمله رنگیزه‌دار شدن (آنتوسیانین‌ها فلانوییید رنگی)، فلانوییدها ممکن است به‌عنوان ترکیبات حفاظت کننده در برابر خسارت اشعه ماورای بنفش عمل نمایند. ایزوفلانوییدها فعالیت ضد میکروبی دارند که جنبه دارویی دارند (۳۷ و ۳۹).



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت فلانویید در سرخارگل، LSD= ۱/۲۶۱.

Figure 8. Mean comparison of jasmonic acid and salicylic acid effects onFlavonoid concentration in *Echinacea purpurea*, LSD=1.261

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در سطح مزرعه‌ای توانست تولید و تجمع فنل کل، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات گیاه دارویی سرخارگل را تحریک و افزایش دهد. این ترکیبات در شرایط تنش تولید می‌شوند (١٤). اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتز ترکیبات فنیل پروپانوییدی از جمله NADPH اکسیداز، گلوتاتیون S-ترانسفراز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (داده‌ها نشان داده نشد) سبب افزایش فنل کل شدند. در این آزمایش تیمار ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک بیشترین میزان فنل کل را نسبت به شاهد نشان داد که با توجه به آسان و ارزان بودن دسترسی به اسید سالیسیلیک، می‌توان کاربرد آن را برای رسیدن به میزان ترکیبات فنلی بیشتر پیشنهاد نمود. غلظت‌های پایین الیسیتورها شامل ۵ میکرو مولار اسید جاسمونیک، ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و یا هر دوی آن‌ها، اثر القایی بهتری بر صفت‌های مورد بررسی ایجاد نمودند. در غلظت‌های بالاتر محرک‌ها، تولید متابولیت ثانویه کمتر شد که این خود یادآور این مطلب است که هورمون‌ها به عنوان ترکیباتی تعریف می‌شوند که در غلظت کم یا ناچیز، اثرات فیزیولوژیکی بزرگی را سبب می‌شوند.

منابع

1.Ardakani, M., and Nadvar, A. 2008. Practical principles and technique for plant science proficient. Tehran University Press, 145p. (In Persian)

2.Ament, K., Kant, M., Sabelis, M.W., Haring, A.H. and Schuurink, R.C. 2004. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyle salicylate emission. Plant Physiol. 135: 2025-2037.

3.Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. Rockville 24: 1-24.

4.Barra, L., Pica, N., Gouffi, K., Walker, G.C., Blanco, C. and Trautwetter, A. 2003. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiology Letters 229: 183–188.

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.Blumenthal, M., Lindstrom, A., Lynch, M.E., and Rea, P. 2011. Herb sales continue growth-up 3.3% in 2010. Herbal Gram. 90: 64-67.
7.Boada, J., Roig, T., Perez, X., Gamez, A., Bartrons, R., Cascante, M. and Bermudez, J. 2000. Cells overexpressing fructose-2, 6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress. FEBS Letters 480: 251–264.
8.Chaichana, N. and Dheeranupattana, S. 2012. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on alkaloid production from *in vitro* culture of *Stemona* sp. Int. J. Biosc. Biochem. Bioinform. 2: 122-131.
9.Cheryl Kaiser, C., Geneve, R. and Ernst, M. 2015. Echinacea. University of Kentucky college Agricultur, Food Environment. 1-5.
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.Couee, I., Sulmon, C., Gouesbet., G., and Amran, A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 36: 449-459.
12.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 P2 isoform of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. Plant J. 38: 49–59.
13.Du, Z. and Bramlage, W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. J. Agric. Food Chem. 40: 1566-1570.
14.Esmaeilzadeh-Bahabadi, S. and Sharifi, M. 2013. The increasing of secondry metabolits in plant with use of biological elicitors. J. Cells Tissue 4: 119-128.
15.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
16.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. (Translated in Persian)
17.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. Medicinal Plant 8: 145-152. (In Persian)
18.Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated choloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 12: 198-189.
19.Huang, B., Hong, Q., Jin, L., Zhang, Y., Cai, P. and Lin, Y. 2010. Effects of SNP, PA and SA on cell growth and physiological activities of suspension-cultured protocorn-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. Plant Physiol. Communic. 46: 423-426.
20.Jana, S. and Choudhuri, M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submereged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Bot. 12: 342-354.
21.King, C. 2005. Commercial Echinacea production. Alberta Agric. Food Rural Sevelop. 13, 24, 27, 40.
22.Koreapaz, S. 2001. Investigation the possibility and domestication of herb medicine Echinacea in Mashhad climat conditions. M.Sc. Thesis. Ferdowsi University of Mashhad, 35p. (In Persian)
23.Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiol. Plantarum 103: 1-7.
24.Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C. and Merillon, J.M. 1998. Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. Plant Cell Rep. 17: 946–950.

25.Liu, L., Sonbol, F.M. and Dong, X. 2016. Salicylic acid receptors active jasmonic acide signalling through a non-canonical pathway to promoe effector-triggered immunity. Nature Communic. 7: 13099.
26.Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. and Navari- Izzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat sultivars subjected to drought. Plant Physiol. 119: 1091-1099.
27.McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical Chemist. 22: 1156-1158.
28.Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin those are inducible by sugars. Plant J. 11: 841-851.
29.Miller, S.C. 2004. Echinacea. CRC Press. London., Pp: 93 - 109, 116.
30.Munne-Bosch, S., and Penuelas, J. 2003. Photoand antioxidant protection during summer leaf senescence in *Pistscia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. Ann. Botan. 92: 385-391.
31.Omokolo, D., Ndoumou, G., Ndzomo, T. and Djocgoue, P.F. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. Ann. Bot. 77: 153-158.
32.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. Iranian J. Med. Arom. Plants. 30: 361-369. (In Persian)
33.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.
34.Razavinia, C.M., Aghaalykany, M. and Naghdabadi, H. 2015. The effect of vermicomposting and chemicl fertilizer on quantitive, and qualitative characteristics of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Iranian J. Med. Arom. Plants, 31: 373-357. (In Persian)
35.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.
36.Soltani, A. 2014. Design and analysis of agricultural experiment with SAS. Mashhad University Press, 431p.
37.Kafi, M., Zand, A., Kamkar, B., Mahdavi Damghani, A., Abbasi, F. and Sharifi, H.R. 1388. Plant Physiology. Mashhad University Press, 600p. (Translated in Persian)
38.Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z. and Zheng, Y. 2009. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chines bay berries. J. Agric. Food Chem. 57: 5809-5850.
39.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.
40.Zhao, J.L., Davis, C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotec. Adv., 23: 283–333.