

بررسی اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی گیاه دارویی *Cynara scolymus* L. در شرایط درون شیشه‌ای

سحر زمانی^{۱*}، عظیم قاسم‌نژاد^۲، مهدی علیزاده^۲، مهران اعلمی^۳

^۱ کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲ عضو هیات علمی گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳ عضو هیات علمی گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۸

چکیده

در سال‌های اخیر با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، دست یابی به شرایطی که بتواند بیشترین اثرگذاری را در تولید اقتصادی این ترکیبات داشته باشد دارای اهمیت فراوان است. فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) به‌عنوان آنزیم کلیدی نقش اساسی در تشکیل ترکیبات فنیل پروپانوئیدی دارد. این تحقیق به منظور بررسی اثر شوری و اسیدسالیسیلیک (به‌عنوان الیسیتور) بر فعالیت آنزیم PAL و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی در کالوس گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با ۵ غلظت شوری و ۴ غلظت اسیدسالیسیلیک در ۴ تکرار در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این آزمایش، فعالیت آنزیم PAL با روش ساندرز و مکلر اندازه‌گیری شد. همچنین میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب با روش‌های فولین-سیوکالتیو و آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شدند. براساس نتایج به دست آمده، شوری، اسیدسالیسیلیک و اثر متقابل این دو الیسیتور اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم PAL، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی داشتند و همچنین با افزایش غلظت شوری بر میزان فعالیت آنزیم PAL، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزوده شد به طوری که در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار شوری بیشترین میزان این ترکیبات به ترتیب به میزان ۷/۹۵۶۴ نانومول بر گرم وزن تر در دقیقه، ۵/۴۲۹۲ و ۲/۷۳۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. کالوس‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک نیز بیشترین میزان ترکیبات مذکور را نسبت به شاهد داشتند. در کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک و ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مشاهده شد. با توجه به همبستگی مثبت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و نقش کلیدی این آنزیم در بیوسنتز این ترکیبات و نیز اثرگذاری مثبت الیسیتورهای مورد بررسی می‌توان با بهینه‌سازی نسبت شوری و اسیدسالیسیلیک، تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: اسیدسالیسیلیک، شوری، فنیل آلانین آمونیا لیاز، فنیل پروپانوئید، کنگر فرنگی *Cynara scolymus* L.

* نویسنده مسئول: s.zamani90@yahoo.com

دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی مطرح می‌شود (Vogt, 2010; Boudet, 2007).

استفاده از الیستورهای تنش‌زا (مانند شوری و اسیدسالیسیلیک) سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و تنش اکسیداتیو می‌گردد. در این شرایط گیاه برای مقاومت و کاهش اثرات تنش، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیرآنزیمی خود را فعال می‌نماید که نتیجه آن افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دفاعی نظیر فنیل آلانین آمونیا لیاز و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی نظیر فنیل پروپانویدها می‌باشد که در پژوهش‌های بسیاری گزارش شده است (Parida and Das, 2005). اثر شوری بر افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه دارویی زنجبیل (Dehghani and Mostajeran., 2010)، کنگر فرنگی (Rezazadeh et al., 2012)، شوید (Setayeshmehr et al., 2012)، سیاهدانه (Burgo et al., 2010) و اثر محرک اسیدسالیسیلیک بر آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه سیاهدانه (Kabiri Shabrangi and Mehri., 2014)، نعنا (et al., 2014)، همیشه‌بهار (Pacheco et al., 2013)، کنگر فرنگی (Samadi et al., 2014) و شیرین بیان (Shabani and Ehsanpoor., 2009) گزارش شده است.

کنگر فرنگی با نام علمی *Cynara scolymus* L. گیاهی دارویی از تیره Asteraceae و بومی جنوب اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جزایر قناری است. جوانه‌های گل این گیاه دارای ارزش غذایی و برگ‌های آن دارای خاصیت درمانی بسیاری می‌باشد. در این گیاه ترکیبات مهمی نظیر ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و لاکتون‌های سزکوئی‌تریپنی موجود است. کنگر فرنگی دارای اثرات مدر، صفرآور، پایین‌آورنده کلسترول چربی خون، ضد تهوع و سوءهاضمه

گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که میزان این ترکیبات اغلب کم، دارای وزن مولکولی پایین، منحصر به گونه یا حتی نژاد خاص و اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند (Oksman and Inze, 2004). با توجه به کندی تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، افزایش راندمان تولید متابولیت‌ها و مواد دارویی به راهکارهای جدیدی نیازمند است. استفاده از الیستورها یکی از مهم‌ترین روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. الیستورها ترکیباتی با منشاء زیستی و غیرزیستی‌اند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی سبب بیوستز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌گردند (Zhao et al., 2005). از شوری (نمک) و اسیدسالیسیلیک می‌توان به‌عنوان الیستورهای غیرزیستی جهت افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه بهره برد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و آغازگر مسیر فنیل پروپانوئید است که L فنیل آلانین را با دی‌آمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند. این مسیر اصلی بیوستز متابولیت‌های ثانویه در سلول است که سبب تولید متابولیت‌هایی نظیر کومارین‌ها، اسانس‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین، تانن و سایر ترکیبات فنلی می‌شود. این ترکیبات نقش مهمی در دفاع علیه گیاهخواران و عوامل بیماری‌زا، حفاظت مکانیکی، جذب عوامل گرده‌افشان و پراکنده کردن میوه دارند (Taiz and Zeiger, 2006). این آنزیم نقش اساسی در تشکیل ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان می‌باشند داشته و به‌عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی

موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شدند. در نمونه شاهد نیز به جای عصاره، از متانول ۸۰ درصد استفاده شد (Slinkard and Singleton., 1977).

سنجش فلاونوئید کل به روش آلومینیوم کلراید انجام شد. ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. در نمونه شاهد به جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده شد. مخلوط نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر عدد جذب قرائت شد. در نمونه شاهد نیز به جای عصاره، از متانول خالص استفاده گردید (Chang et al., 2002).

جهت سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) از روش ساندرز و مک لور (Saunders and McClure, 1974) با کمی تغییر استفاده شد. در ابتدا ۰/۱ گرم از بافت کالوس با استفاده از ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=7 کوبیده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ از عصاره رویی جهت سنجش آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، ۲۵۰ میکرو لیتر بافر بورات سدیم ۱۰ میلی مولار (pH=8.8)، ۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۲۵۰ میکرو لیتر سوبسترای فنیل آلانین (۵۰ میلی مولار) بود. جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از اسپکترومتر مدل UV2800 قرائت گردید. فعالیت آنزیم PAL با استفاده از قانون بیر و لامبرت و با ضرب خاموشی $9630 \mu\text{cm}^{-1}$ بر حسب نانومول بر گرم وزن تر در دقیقه محاسبه شد (Saunders and McClure, 1974). این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی در

می باشد (Ziaei et al., 2005). این آزمایش با هدف بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و تغییرات ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نظیر فنل و فلاونوئید تحت تیمارشوری و اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه ای صورت گرفت.

مواد و روش ها

گیاهان کنگرفرنگی در مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با متوسط دمایی ۲۳ درجه سانتی گراد، مجموعه بارندگی ۹۰ میلی متر، رطوبت نسبی ۶۶/۷۵ درصد با ۶۶۱ ساعت آفتابی طی ۴ ماه (اردیبهشت تا مرداد ۱۳۹۲) رشد یافتند. در مرداد ۱۳۹۲ بذرهای کنگرفرنگی از مزرعه جمع آوری و پس از سترون سازی، در محیط کشت $1/2\text{MS}$ (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. در ادامه از قسمت دمبرگ گیاهچه های استریل به عنوان ریزنمونه جهت تولید کالوس استفاده شد. ریزنمونه ها جهت کالوس زایی در محیط کشت MS با تیمار هورمونی $(5\text{mg/l})\text{NAA} + (2\text{mg/l})\text{BA}$ کشت شدند. سپس کالوس های سبز رنگ به محیط کشت حاوی غلظت های مختلف شوری (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی مولار) و اسیدسالیسیلیک (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرو مولار) در شرایط مشابه کالوس زایی انتقال یافتند و پس از ۴ هفته ترکیبات آن ها اندازه گیری شد.

اندازه گیری فنل کل به روش فولین سیوکالتیو انجام شد. به این منظور ابتدا ۲۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی (۰/۵ گرم در ۵ میلی لیتر متانول ۸۰٪) با ۱۰۰ میکرو لیتر فولین سیوکالتیو و ۱/۱۶ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از ۵ الی ۸ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرو لیتر کربنات سدیم یک مولار (۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به آن افزوده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه ها در طول

اسیدسالیسیلیک و اثر متقابل این دو عامل بر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه در سطح ۱ درصد معنی دار بود. همچنین شوری در سطح ۱ درصد، اسیدسالیسیلیک و اثر متقابل این دو عامل در سطح ۵ درصد بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز اثر معنی دار داشت (جدول ۱).

شرایط استریل، با ۵ تیمار شوری و ۴ تیمار اسیدسالیسیلیک با ۴ تکرار صورت گرفت. نتایج با استفاده از آزمون LSD و نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس، تیمار شوری،

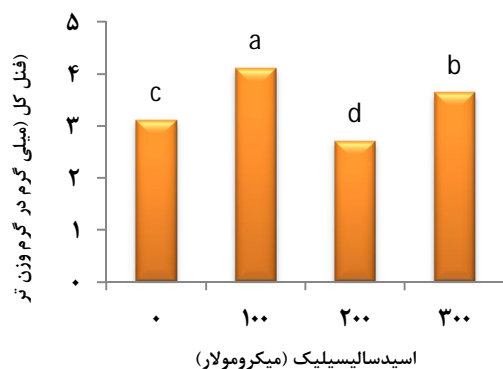
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

میانگین مربعات		فنل	df	منابع تغییرات
فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز	فلاونوئید			
۸/۷۱۵۲۶۹۶۹*	۷/۱۵۱۳۷۴۳۴**	۲۳/۷۱۵۸۴۸۹۶**	۴	شوری
۴/۸۶۷۰۸۵۶۵*	۰/۳۹۱۴۹۷۴۷**	۵/۶۴۱۶۷۷۰۸**	۳	اسید سالیسیلیک
۲/۴۵۷۶۷۱۴۹*	۰/۹۶۶۰۲۶۱۸**	۴/۱۷۶۵۹۸۹۶**	۱۲	شوری * اسیدسالیسیلیک
۱۵/۷۱۸۲۶	۱۱/۸۲۱۸۹	۱۱/۵۲۹۱۵	-	Cv

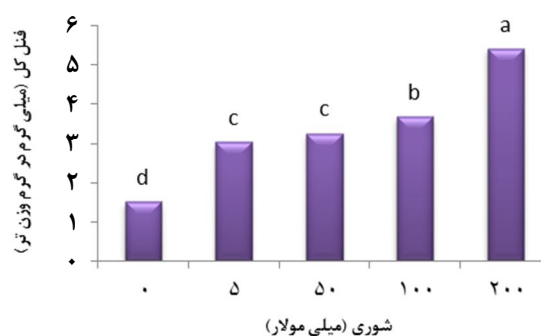
* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

اسیدسالیسیلیک نیز بر فنل کل گیاه اثرگذار بوده است. در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بیشترین میزان فنل وجود داشت که افزایش ۱/۳۲ برابری نسبت به شاهد داشت و پس از آن تیمار ۳۰۰ میکرومولار بیشترین میزان فنل را به خود اختصاص داده است. کمترین میزان فنل در تیمار ۲۰۰ میکرومولار و پس از آن در شاهد مشاهده شد (شکل ۲).

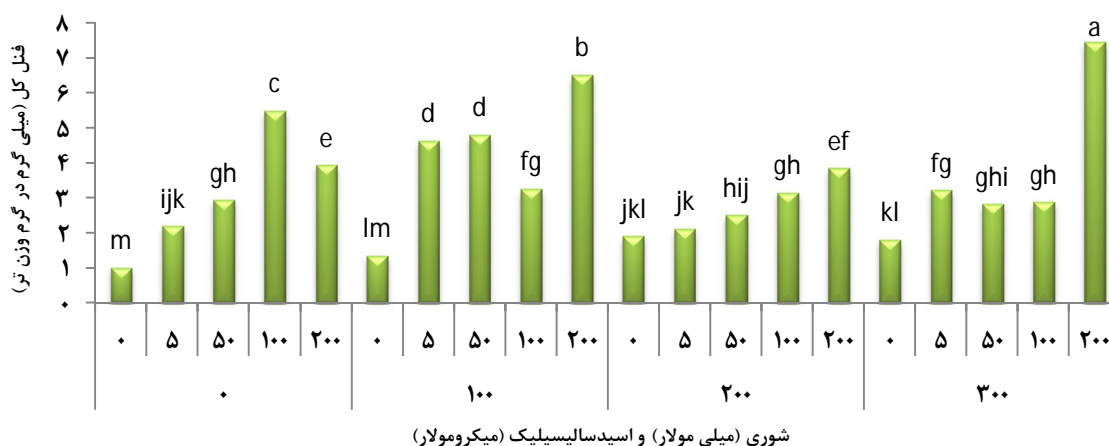
با توجه به شکل ۱، شوری اثر معنی داری بر میزان فنل کل در کالوس کنگر فرنگی داشت. با افزایش غلظت شوری بر میزان تجمع فنل کل افزوده شد. به طوری که کمترین میزان فنل کل در تیمار شاهد و بیشترین میزان ترکیبات فنلی در تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری مشاهده شد که ۳/۵۸ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته است.



شکل ۲: اثر اسیدسالیسیلیک بر فنل کل



شکل ۱: اثر شوری بر فنل کل



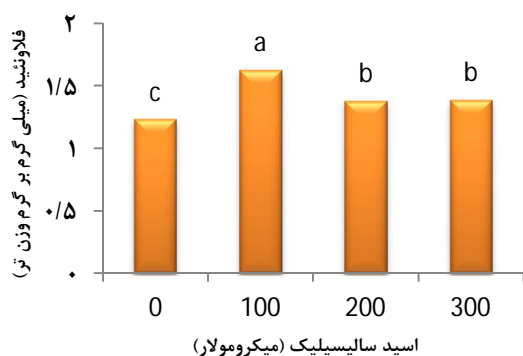
شکل ۳: اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر فنل کل

میزان فلاونوئید در تیمار شاهد و بیشترین میزان این ترکیب در تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری مشاهده شد که ۳/۶۳ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته است (شکل ۴).

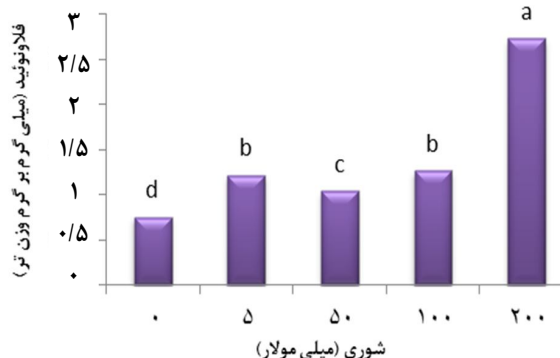
همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است اسیدسالیسیلیک بر ترکیبات فلاونوئیدی، روند مشابهی مانند تاثیر آن بر ترکیبات فنلی نشان داد، به طوری که بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد که نسبت به شاهد ۱/۳۱ برابر افزایش داشته است. تیمار ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک نیز پس از تیمار ۱۰۰، فلاونوئید قابل توجهی داشت که البته اختلاف معنی داری با سطح ۲۰۰ نداشت. شاهد کمترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی را به خود اختصاص داد.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک نیز بر ترکیبات فنلی معنی دار بود. بیشترین میزان ترکیب فنلی در تیمار ترکیبی ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. در این تیمار میزان فنل ۷/۳۹ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. همچنین تیمار ترکیبی ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک هم میزان فنل بالایی داشت. با این وجود نسبت به تیمار قبل به شکل معنی داری کمتر بود. در بین تیمارها، تجمع فنل در تیمار شاهد در کمترین مقدار بود.

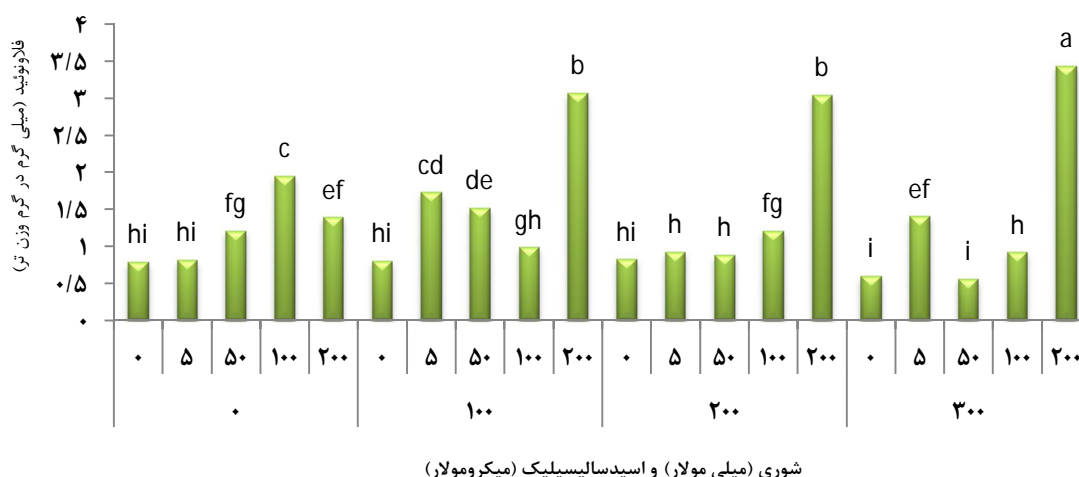
شوری همچنین اثر معنی داری بر میزان فلاونوئید موجود در کالوس کنگر فرنگی داشته است و با افزایش غلظت بر میزان آن افزوده شد به طوری که کمترین



شکل ۵: اثر اسیدسالیسیلیک بر فلاونوئید



شکل ۴: اثر شوری بر فلاونوئید



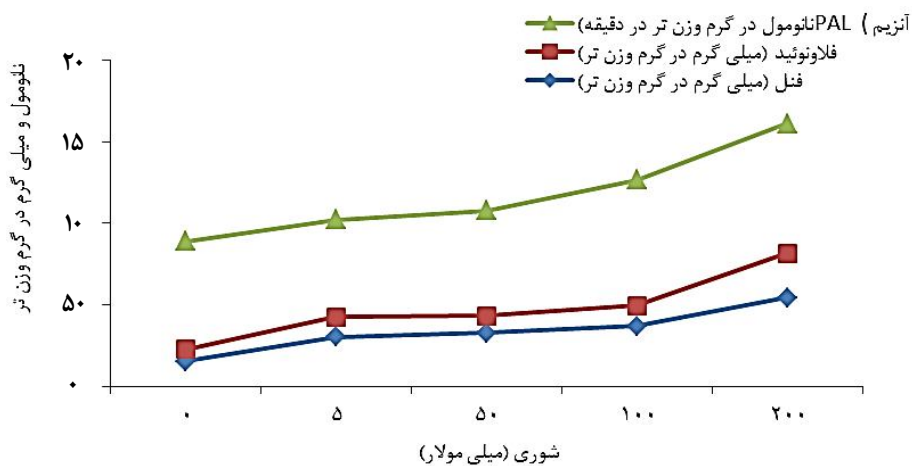
شکل ۶: اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر فلاونوئید

فنی و فلاونوئیدی در غلظت ۲۰۰ میلی مولار شوری حاصل شد (شکل ۷).

با توجه به شکل ۸، بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در تیمار ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک سبب کاهش فعالیت آنزیم شد. کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد مشاهده شد و نکته جالب توجه اینکه اختلاف معنی داری بین شاهد و سطح ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک مشاهده نشد. ترکیبات فنیل پروپانوئیدی با فعالیت آنزیم تحت تیمار اسیدسالیسیلیک نیز همبستگی مثبت نشان داد. همان گونه که در شکل ۷ نشان داده شده است بیشترین فعالیت آنزیم و همچنین تجمع متابولیت‌های اندازه‌گیری شده در نمونه‌های رشد یافته در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد که با شاهد اختلاف معنی داری نشان داد. اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک نیز بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز معنی دار بود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک مشاهده شد که اختلاف معنی داری با تیمار ۲۰۰ شوری و ۳۰۰ اسیدسالیسیلیک نداشت.

با توجه به شکل ۶، اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک بر ترکیبات فلاونوئیدی معنی دار بوده است. بیشترین میزان این ترکیبات در تیمار ترکیبی ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک می‌باشد. این تیمار توانست میزان فلاونوئید گیاه را تا ۴/۳۶ برابر نسبت به شاهد افزایش دهد. همچنین تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک هم میزان فنل بالایی داشتند که با تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۲۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک اختلاف معنی داری نداشت. کمترین مقدار این ترکیب در تیمار ۵۰ و ۰ شوری و ۳۰۰ اسیدسالیسیلیک دیده شد که با شاهد اختلاف معنی داری نداشت.

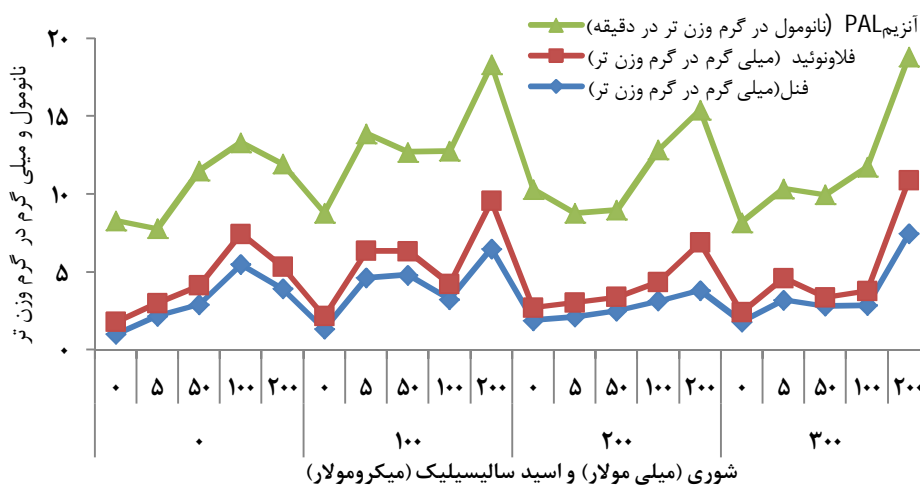
شوری اثر معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز داشت و با افزایش غلظت بر میزان آن افزوده شد. به طوری که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری مشاهده شد که با غلظت ۱۰۰ اختلاف معنی داری از لحاظ آماری نداشت. روند تغییر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی با تغییرات آنزیم همبستگی مثبت داشته است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم و تجمع ترکیبات



شکل ۷: اثر شوری بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز



شکل ۸: اثر اسید سالیسیلیک بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز



شکل ۹: اثر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که شوری بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کالوس کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای موثر است، به طوری که میزان این ترکیبات در بالاترین غلظت شوری (۲۰۰ میلی مولار) نسبت به شاهد به ترتیب ۱/۳۳، ۳/۵۸ و ۳/۶۳ برابر افزایش نشان داد.

تنش یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان است. در حقیقت یکی از مهم‌ترین نقش‌های متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش حافظی آنها در شرایط تنش است. این ترکیبات با کمک به گیاهان سبب مقاومت آنها در برابر عوامل مزاحم خارجی و شرایط نامساعد محیطی می‌شوند که نتیجه آن افزایش چندبرابری متابولیت‌های ثانویه تحت تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری است که در پژوهش‌های بسیاری گزارش شده است (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). شوری یکی از تنش‌های مهم محیطی است که رشد، نمو، باروری و فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاهان در معرض تنش رخ می‌دهد تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از جمله رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌باشد که می‌توانند باعث تخریب عمده غشاء، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند (Garratt et al., 2002; Bailly, 2004). در این شرایط دفاع آنتی‌اکسیدانی جهت محافظت از سلول‌ها در برابر تاثیرات خطرناک گونه‌های اکسیژن فعال وارد عمل می‌شود. گیاهان سیستم‌های سلولی خود را از تاثیرات گونه‌های اکسیژن فعال به وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دفاعی مانند فنیل آلانین آمونیا لیاز و آنتی

اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر ترکیبات فنیل- پروپانوئیدی محافظت می‌کنند (Agarwal and Pandey, 2004).

آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که دارای نقش دفاعی در گیاهان می‌باشد. این آنزیم حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان بوده و به عنوان اولین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید L فنیل آلانین را با دی‌آمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند و در ادامه منجر به بیوسنتز متابولیت‌های ارزشمندی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانین، لیگنین، تانن و سایر ترکیبات فنلی می‌شود. PAL به عنوان آنزیم کلیدی نقش اساسی در تشکیل ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان می‌باشند ایفا می‌کند و یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌باشد (Vogt, 2010; Boudet, 2007). فعالیت آنزیم PAL در گیاهان تحت تاثیر عواملی مانند هورمون‌ها، مواد غذایی، نور، تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌یابد. در شرایط تنش، بیان ژن مربوط به آنزیم PAL افزایش یافته و به دنبال افزایش ساخت این آنزیم، متابولیت‌های ثانویه مسیر فنیل پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی جهت مواجهه و مقابله با تنش افزایش می‌یابند. ترکیبات فنلی می‌توانند به عنوان خاموش‌کننده و یا جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا سایر گونه‌های فعال اکسیژن عمل نمایند (Solecka, 1997). با توجه به نقش ترکیبات فنلی در کاهش و یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، خاموش نمودن اکسیژن یکتائی یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداتیو و دفاع علیه

ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات شناخته شده است. نتایج اثرگذاری مثبت اسیدسالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کنگرفرنگی با آزمایشات بسیاری مطابقت دارد. در گیاه کنگرفرنگی تحت تیمار اسیدسالیسیلیک میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای افزایش معنی‌داری داشته‌است (Samadi et al., 2014). اسیدسالیسیلیک سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL و تولید بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در سیاهدانه شد (Kabiri et al., 2014). گل همیشه بهار نیز در پاسخ به تیمار اسیدسالیسیلیک، محتوی فلاونوئیدی خود را افزایش داد (Pacheco et al., 2013). اسیدسالیسیلیک سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشت درون شیشه‌ای گیاه شیرین بیان گردید (Shabani and Ehsanpoor, 2009). اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک نیز بر پارامترهای اندازه‌گیری شده مثبت بود. در واقع اسیدسالیسیلیک با فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیبات دفاعی سبب افزایش مقاومت گیاهان در شرایط شوری می‌شود (He and Zhu, 2008). در این آزمایش، کاربرد توام این دو تیمار سبب افزایش قابل توجه در فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شد که این نتیجه در گیاه دارویی پروانش (Momeni et al., 2014)، ذرت (Neelam et al., 2014) و نیز (2012)، ریحان سبز (Delavari parizi, 2010) گزارش شده است. لازم به ذکر است که افزایش اسیدسالیسیلیک تا حدی فرآیند بیوستنز را بهبود می‌بخشد. بسته به نوع بافت و شرایط فیزیولوژیکی سلول افزایش بیش از حد آستانه تحمل این ترکیب نه تنها سبب افزایش بیوستنز آنزیم و ترکیبات موثره مرتبط نمی‌شود، بلکه سبب کاهش تولید این ترکیبات

گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Ksouri et al., 2007).

نتایج حاصل از افزایش فعالیت آنزیم PAL و افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به‌عنوان پاسخ دفاعی در شرایط شوری در این آزمایش با پژوهش‌های بسیاری مطابقت دارد. شوری بر افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه دارویی زنجبیل اثر معنی‌داری داشته‌است (Dehghani and Mostajeran, 2010). در گیاه دارویی شویید نیز میزان ترکیبات فنلی تحت شوری افزایش معنی‌داری نشان داده است (Setayeshmehr et al., 2012). رضازاده و همکاران (Rezazadeh et al., 2012) گزارش نمودند شوری سبب افزایش معنی‌داری در ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی گیاه دارویی کنگرفرنگی شده‌است. در گیاه دارویی سیاهدانه نیز شوری سبب افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مانند کوئرستین، اپی‌جنین و ترانس‌سینامیک اسید شده است (Burgo et al., 2010).

همان‌طور که انتظار می‌رفت اسیدسالیسیلیک به‌عنوان ترکیب محرک فعالیت‌های بیوشیمیایی تولید متابولیت، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در کالوس کنگرفرنگی افزایش داد. اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک جزء پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود و در جایگاه ترکیب القاکننده تنش، مسیر سیگنالینگ را فعال نموده و سبب افزایش رونویسی mRNA خاص آنزیم PAL شده که منجر به پاسخ‌های دفاعی گیاه و بیوستنز و تجمع ترکیبات فنولیک می‌گردد. در نتیجه استفاده از ترکیبات الیستوری مانند اسیدسالیسیلیک به‌عنوان راهکاری مؤثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند

شد و مطابق نتایج، بهترین تیمار در این آزمایش، غلظت ۲۰۰ میلی مولار شوری در بین سایر غلظت‌های شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بوده است. در تیمار ترکیبی نیز بهترین تیمار، در افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک و تیمار ۲۰۰ میلی مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بوده است. شوری و اسیدسالیسیلیک به عنوان محرک با ایجاد تنش با تحریک پاسخ دفاعی گیاه سبب افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم کلیدی فنیل آلانین آمونیا لیا ز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند فنل و فلاونوئید در کالوس کنگر فرنگی شدند. در نتیجه با توجه به همبستگی مثبت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL)، ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و نقش کلیدی این آنزیم در بیوسنتز ترکیبات مذکور و نیز اثرگذاری مثبت الیستورهای مورد بررسی می توان با بهینه سازی نسبت شوری و اسیدسالیسیلیک تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه ای را بهبود بخشید.

References

1. Agarwal, S. and Pandey, V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Journal of Biological Plant*, 48: 555-560.
2. Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Journal of Seed Science Research*, 14: 93-107.
3. Boudet, A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Journal of Phytochemistry*, 68: 2722-2735.
4. Bourgo, S., Kchouk, M.E., Bellila, A. and Marzouk, B. 2010. Effect of salinity on phenolic composition and biological activity of *Nigella sativa*. *Journal of Acta Horticulture*, 853:57-60.
5. Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two

نیز می شود. این مورد نه تنها در اسیدسالیسیلیک، بلکه در مورد سایر محرک‌ها از جمله متیل جاسمونات و شوری نیز صدق می کند (Samadi et al., 2014). در این آزمایش اسیدسالیسیلیک نیز بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کالوس کنگر فرنگی معنی دار بوده است و میزان این ترکیبات در نمونه های تیمار شده نسبت به شاهد افزایش معنی داری داشته است.

همبستگی مثبت فعالیت آنزیم PAL با تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تحت تاثیر تیمار شوری و اسیدسالیسیلیک بیانگر نقش کلیدی این آنزیم بر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است. با توجه به اهمیت تنش و ترکیبات تنش زا در تغییرات فعالیت آنزیم PAL و نیز نقش مهم این آنزیم در تولید ترکیبات ثانویه می توان از شوری و اسیدسالیسیلیک به عنوان الیستور در مدیریت تولید متابولیت‌ها در شرایط درون شیشه ای بهره برد. نکته مهم اینکه با مدیریت کشت و استفاده از محلول پاشی اسیدسالیسیلیک در زمین های شور، با ایجاد مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی ضمن کاهش اثرات تنش می توان به حفظ گیاه و تولید اقتصادی متابولیت های ارزشمند کمک نمود.

نتیجه گیری نهایی

به دلیل اهمیت فراوان ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی و کاربرد این ترکیبات در صنایع مختلف، دستیابی به روش های مفید جهت تولید اقتصادی این ترکیبات بسیار حائز اهمیت می باشد. کاربرد الیستورها و ایجاد تنش به منظور تحریک بیوسنتز و تولید متابولیت های ثانویه، یکی از مهم ترین روش های افزایش متابولیت های ثانویه می باشند. در این آزمایش از شوری و اسیدسالیسیلیک به عنوان الیستور استفاده

- complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Anal*, 10: 178-182.
6. Dehghani, A. and Mostajeran, A. 2010. The effect of salinity on growth and activity of antioxidant and defense enzymes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Herbal Medicines*, 1:1-8.
 7. Delavari Parizi, M. 2010. The effects of Salicylic acid and salinity stress on the some physiological and biochemical changes in *Ocimum basilicum* L. Master thesis, Department of Biology, Payame Noor University.
 8. Garratt, L.C., Janagoudr, B.S., Lowe, K.C., Anthony, P., Power, J.B. and Davey, M.R. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, 33(4): 502-511.
 9. He, Y. and Zhu, Z.Y. 2008. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Biological Plantarum*, 52: 792-795.
 10. Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H. 2014. Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *nigellasativa* under hydroponic culture. *Journal of Plant Protection Science*, 50(1): 43-51.
 11. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, M., Grignon, C. and Abdely, C. 2007. Salinity effect on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 244-248.
 12. Momeni, N., Arvin, M.J., Khagoei nejad, G., Daneshmand, F. and Keramat, B. 2012. The effect of sodium chloride and salicylic acid on antioxidant defense system in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Biology*, 4(14): 23-34.
 13. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Journal of Physiology of Plant*, 15: 473-497.
 14. Neelam, M., Rahul, M., Ajiboye, M., Kafayat, Y. and Lateefat, Y., 2014. Salicylic acid alters antioxidant and phenolics metabolism in *catharanthus roseus* grown under salinity stress. *Journal of African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5): 118-125.
 15. Oksman-Caldentey, KM. and Inzé, D., 2004. Plant cellfactories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Journal of Trends Plant Science*, 9(9): 433-440.
 16. Pacheco, A.C., Cabral, C., Fermino, E.S. and Aleman, C.C. 2013. Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *Global Journal of Medicinal Plant Reserch*, 1(1):95-100.
 17. Parida, A.K. and Das, A.B. 2005. Salt Tolerance and salinity effects on plants: a review. *Journal of Ecotoxicology Environmental Safety*, 60: 324-349.
 18. Ramakrishna, A. and Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Journal of Plant Signaling and Behavior*, 6: 1720-1731.
 19. Rezazadeh, A., Ghasem nezhad, A. and Barani, M. 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of Artichoke (*cynara scolymus* L.) Leaves. *Journal of Medicinal Plant*, 63: 242-252.
 20. 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. *Journal of Plant Production Research*, 21 (4): 135-148.
 21. Saunders, J.A. and McClure, J.W. 1974. The suitability of a quantitative spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia lyase activity in barley, buckwheat and pea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 54: 412-413.
 22. Setayesh Mehr, Z., khajeh, H., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sabbagh, S.Z. 2012. Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum*

- graveolens* L. under salt stress. International journal of Agronomy and Plant Production, 3 (S): 710-715.
23. Shabani, L. and Ehsanpour, A.A. 2009. Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in in vitro culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. Journal of Biology of Iran, 22(4): 691- 703.
24. Shabrangi, A. and Mehrabi, L. 2014. Evaluation of Antioxidant Activity and Secondary Metabolites of *Mentha piperita* L. Under Effect of Acetylsalicylic Acid And Methyl Jasmonate. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8(3): 337-340.
25. Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
26. Solecka, D. 1997. Role of phenyl propanoid compounds in plant responses to different stress factor. Journal of Acta Physiologia Plantarum, 19(3): 257-268.
27. Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. USA, 690 pp.
28. Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. Journal of Molecular Plant, 3: 2-20.
29. Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Journal of Biotechnology Advances, 23: 283-333.
30. Ziaie, S.A., DastPak, A., NaghdBadi, S., PoorHoseini, L., Hemmati Moghadam, A. and Ghorori Naeini, M. 2005. Review on *Cynara scolymus*, Journal of Medicinal Plants, 13: 10-13.