بررسی اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی گیاه دارویی *Cynara scolymus* L. در شرایط درون شیشه‌ای

سحر زمانی*[1]، عظیم قاسم‌نژاد[2]، مهدی علیزاده[2]، مهران اعلمی[3]

[1] کارشناسی‌ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[2] عضو هیات‌علمی گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[3] عضو هیات‌علمی گروه صنایع‌غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/٤/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/٦/۲۸

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. فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) به‌عنوان آنزیم کلیدی نقش اساسی در تشکیل ترکیبات فنیل پروپانوئیدی دارد. این تحقیق به‌منظور بررسی اثر شوری و اسیدسالیسیلیک (به‌عنوان الیسیتور) بر فعالیت آنزیم PAL و ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی در کالوس گیاه کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.)، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با ٥ غلظت شوری و ٤ غلظت اسیدسالیسیلیک در ٤ تکرار در سال ۱۳۹۲در 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 به‌ترتیب با روش‌های فولین– سیوکالتیو و آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شدند. براساس نتایج به‌دست 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 به‌طوری‌که در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار شوری بیشترین میزان این ترکیبات به‌ترتیب به میزان ۷/۹٥٦٤ نانومول بر گرم وزن تر در دقیقه، ٥/٤۲۹۲ و ۲/۷۳۷٥ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر 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 حاوی۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک و ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی مشاهده شد. با توجه به همبستگی مثبت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی 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 فنیل‌پروپانوئیدی کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه‌ای را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: اسیدسالیسیلیک، شوری، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، فنیل‌پروپانوئید، کنگرفرنگی *Cynara scolymus* L.

*نویسنده مسئول: s.zamani90@yahoo.com

مقدمه

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 الیسیتورها یکی از مهم‌ترین روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است. الیسیتورها ترکیباتی با منشاء زیستی و غیرزیستی‌اند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی سبب بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌گردند (Zhao et al., 2005). از شوری (نمک) و اسیدسالیسیلیک می‌توان به‌عنوان الیسیتورهای غیرزیستی جهت افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه بهره برد.

آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و آغازگر مسیر فنیل پروپانوئید است که L فنیل‌آلانین را با دی‌آمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند. این مسیر اصلی بیوسنتز 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 فنیل‌پروپانوئیدی 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 دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی مطرح می‌شود (Vogt, 2010; Boudet, 2007).

استفاده از الیسیتورهای تنش‌زا (مانند شوری و اسیدسالیسیلیک) سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) وتنش 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 فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی نظیر فنیل‌پروپانوئیدها می‌باشد که در پژوهش‌های بسیاری گزارش شده است (Parida and Das, 2005). اثر شوری بر افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه دارویی زنجبیل (Dehghani and Mostajeran., 2010)، کنگرفرنگی (Rezazadeh et al., 2012)، شوید (Setayeshmehr et al., 2012)، سیاهدانه (Burgo et al., 2010) و اثر محرک اسیدسالیسیلیک بر آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه سیاهدانه (Kabiri et al., 2014)، نعنا (Shabrangi and Mehrabi., 2014)، همیشه‌بهار (Pacheco et al., 2013)، کنگرفرنگی (Samadi et al., 2014) و شیرین‌بیان (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 افریقا 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 سزکوئی‌ترپنی موجود است. کنگرفرنگی دارای اثرات مدر، صفراآور، پایین‌آورنده کلسترول چربی خون، ضدتهوع و سوءهاضمه

می‌باشد (Ziaei et al., 2005). این آزمایش با هدف بررسی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تغییرات ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی نظیر فنل و فلاونوئید تحت تیمارشوری و اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه‌ای صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاهان کنگرفرنگی در مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با متوسط دمایی ۲۳ درجه سانتی‌گراد، مجموعه بارندگی ۹۰ میلی‌متر، رطوبت نسبی ٦٦/۷۵ درصد با ٦٦۱ ساعت آفتابی طی ٤ ماه (اردیبهشت تا مرداد ۱۳۹۲) رشد یافتند. در مرداد ۱۳۹۲ بذرهای کنگرفرنگی از مزرعه جمع‌آوری و پس از سترون‌سازی، در محیط‌کشت ½MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند. در ادامه از قسمت دمبرگ گیاهچه‌های استریل به‌عنوان ریزنمونه جهت تولید کالوس استفاده شد. ریزنمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در محیط‌کشت MS با تیمار هورمونی BA(۲mg/l)+NAA(۵mg/l) کشت شدند. سپس کالوس‌های سبز رنگ به محیط‌کشت حاوی غلظت‌های مختلف شوری (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌مولار) و اسیدسالیسیلیک (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) در شرایط مشابه کالوس‌زایی انتقال یافتند و پس از ٤ هفته ترکیبات آن‌ها اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فنل‌کل به روش فولین سیوکالتیو انجام شد. به‌این منظور ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی (۰/۵ گرم در ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪) با ۱۰۰ میکرولیتر فولین‌سیوکالتیو و ۱/۱٦ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از ۵ الی ۸ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم یک مولار (۱۰/٦ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن افزوده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها در طول موج ۷٦۵ 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 آلومینیوم‌کلراید انجام شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم یک مولار (۲/٤۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی‌لیتر 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 ٤۱۵ نانومتر عدد جذب قرائت شد. در نمونه شاهد نیز به‌جای عصاره، از متانول خالص استفاده گردید (Chang et al., 2002).

جهت سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) از روش ساندرز و مکلر (Saunders and Mcclure, 1974) با کمی تغییر استفاده شد. در ابتدا ۰/۱ گرم از بافت کالوس با استفاده از ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=7 کوبیده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ از عصاره رویی جهت سنجش آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲۵۰ میکرولیتر بافر بورات‌سدیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=8.8)، ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲۵۰ میکرولیتر سوبسترای فنیل‌آلانین (۵۰ میلی‌مولار) بود. جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از اسپکترفتومترمدل UV2800 قرائت گردید. فعالیت آنزیمPAL با استفاده از قانون بیر و لامبرت و با ضریب خاموشی $۹٦۳۰ \mu cm^{-1-1}$ بر حسب نانومول بر گرم وزن تر در دقیقه محاسبه شد (Saunders and Mcclure, 1974).این آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی در

شرایط استریل، با ۵ تیمار شوری و ٤ تیمار اسیدسالیسیلیک با ٤ تکرار صورت گرفت. نتایج با استفاده از آزمون LSD و نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس، تیمار شوری، اسیدسالیسیلیک و اثر متقابل این دو عامل بر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین شوری در سطح ۱ درصد، اسیدسالیسیلیک و اثر متقابل این دو عامل در سطح ۵ درصد بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز اثر معنی‌دار داشت (جدول ۱).

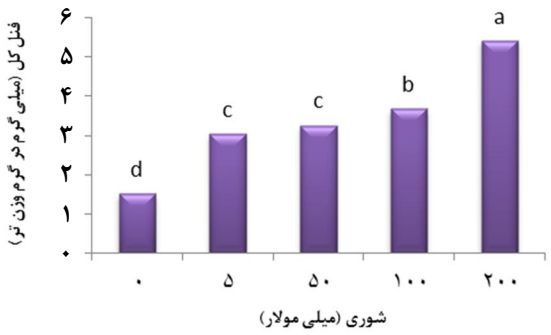
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات		
		فنل	فلاونوئید	فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز
شوری	٤	۲۳/۷۱۵۸٤۸۹٦**	۷/۱۵۱۳۷٤۳٤**	۸/۷۱۵۲٦۹٦۹**
اسید سالیسیلیک	۳	۵/٦٤۱٦۷۷۰۸**	۰/۳۹۱٤۹۷٤۷**	٤/۸٦۷۰۸۵٦۵*
شوری * اسیدسالیسیلیک	۱۲	٤/۱۷٦۵۹۸۹٦**	۰/۹٦٦۰۲٦۱۸**	۲/٤۵۷٦۷۱٤۹*
Cv	-	۱۱/۵۲۹۱۵	۱۱/۸۲۱۸۹	۱۵/۷۱۸۲٦

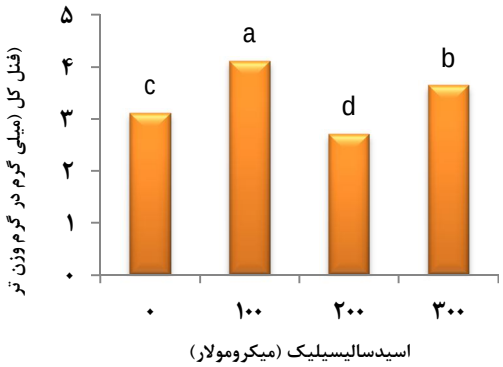
*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

با توجه به شکل ۱، شوری اثر معنی‌داری بر میزان فنل‌کل در کالوس کنگرفرنگی داشت. با افزایش غلظت شوری بر میزان تجمع فنل‌کل افزوده شد. به‌طوری‌که کمترین میزان فنل کل در تیمار شاهد و بیشترین میزان ترکیبات فنلی در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری مشاهده شد که ۳/۵۸ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته است.

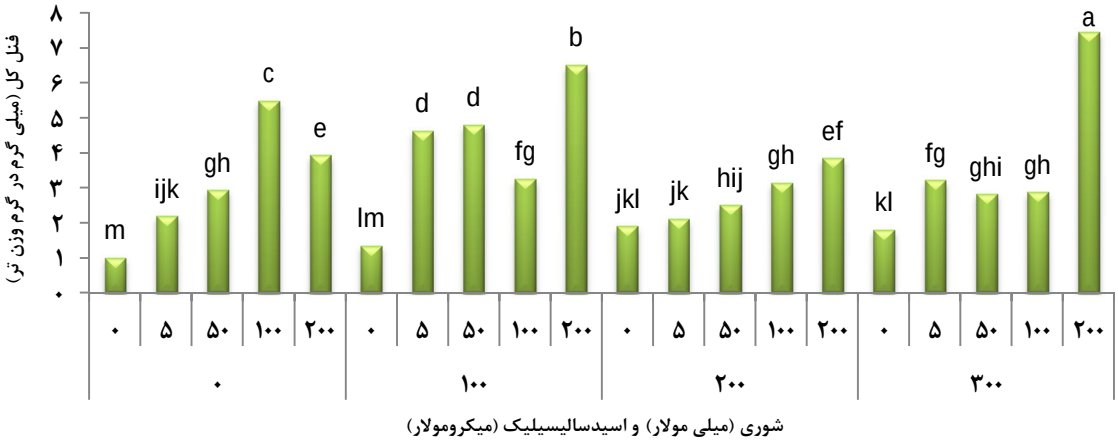
اسیدسالیسیلیک نیز بر فنل کل گیاه اثرگذار بوده است. در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بیشترین میزان فنل وجود داشت که افزایش ۱/۳۲ برابری نسبت به شاهد داشت و پس از آن تیمار ۳۰۰ میکرومولار بیشترین میزان فنل را به خود اختصاص داده است. کمترین میزان فنل در تیمار ۲۰۰ میکرومولار و پس از آن در شاهد مشاهده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



شکل ۱: اثر شوری بر فنل‌کل



شکل ۲: اثر اسیدسالیسیلیک بر فنل‌کل

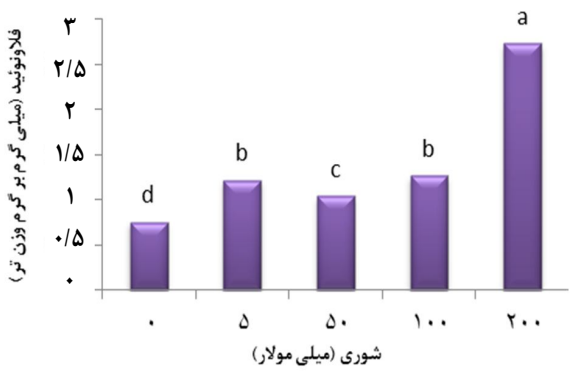


شکل۳: اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر فنل‌کل

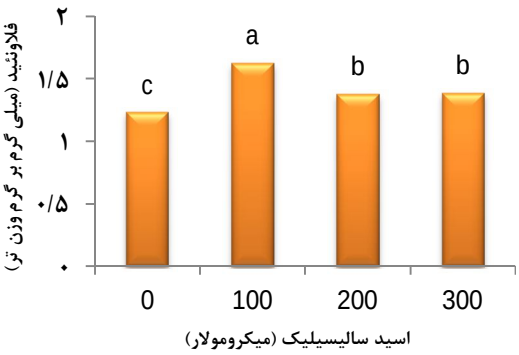
همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده‌است، اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک نیز بر ترکیبات فنلی معنی‌دار بود. بیشترین میزان ترکیب فنلی در تیمار ترکیبی ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک مشاهده شد. در این تیمار میزان فنل ۷/۳۹ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. همچنین تیمار ترکیبی ۲۰۰ میلی‌مولار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

شوری همچنین اثر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید موجود در کالوس کنگرفرنگی داشته‌است و با افزایش غلظت بر میزان آن افزوده شد به‌طوری‌که کمترین میزان فلاونوئید در تیمار شاهد و بیشترین میزان این ترکیب در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری مشاهده شد که ۳/٦۳ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته است (شکل ٤).

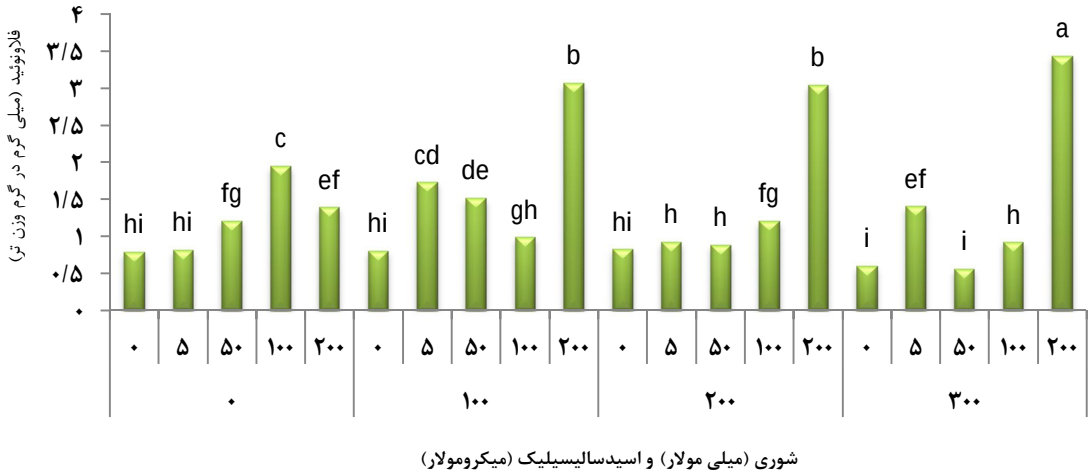
همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده‌شده است اسیدسالیسیلیک بر ترکیبات فلاونوئیدی، روند مشابهی مانند تاثیر آن بر ترکیبات فنلی نشان داد، به‌طوری‌که بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد که نسبت به شاهد ۱/۳۱ برابر افزایش داشته‌است. تیمار ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک نیز پس از تیمار ۱۰۰، فلاونوئید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



شکل٤: اثر شوری بر فلاونوئید



شکل۵: اثر اسیدسالیسیلیک بر فلاونوئید

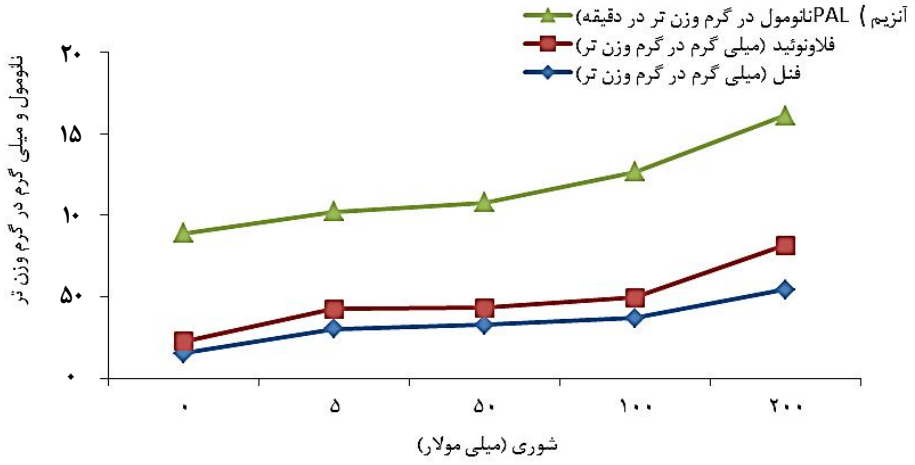


شکل ٦: اثر شوری و اسیدسالیسیلیک بر فلاونوئید

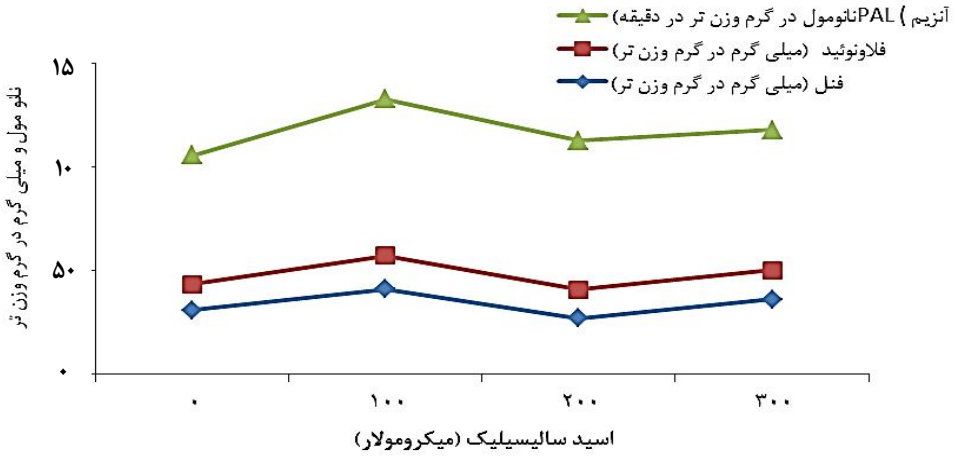
با توجه به شکل ٦، اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک بر ترکیبات فلاونوئیدی معنی‌دار بوده‌است. بیشترین میزان این ترکیبات در تیمار ترکیبی ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک می‌باشد. این تیمار توانست میزان فلاونوئید گیاه را تا ٤/٣٦ برابر نسبت به شاهد افزایش دهد. همچنین تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک هم میزان فنل بالایی داشتند که با تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۲۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین مقدار این ترکیب در تیمار ۵۰ و ۰ شوری و ۳۰۰ اسیدسالیسیلیک دیده شد که با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت.

شوری اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز داشت و با افزایش غلظت بر میزان آن افزوده شد. به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری مشاهده شد که با غلظت ۱۰۰ اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری نداشت. روند تغییر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی با تغییرات آنزیم همبستگی مثبت داشته است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم و تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار شوری حاصل شد (شکل ۷).

با توجه به شکل ۸ بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز 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 معنی‌داری بین شاهد و سطح ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک مشاهده نشد. ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی با فعالیت آنزیم تحت تیمار اسیدسالیسیلیک نیز همبستگی مثبت نشان داد. همان‌گونه که در شکل ۷ نشان داده شده است بیشترین فعالیت آنزیم و همچنین تجمع متابولیت‌های اندازه‌گیری‌شده در نمونه‌های رشد یافته در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد که با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک نیز بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز معنی‌دار بود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۲۰۰ شوری و ۳۰۰ اسیدسالیسیلیک نداشت.



شکل ۷: اثر شوری بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز



شکل ۸: اثر اسیدسالیسیلیک بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

شکل ۹: اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک بر فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که شوری بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کالوس کنگرفرنگی در شرایط درون‌شیشه‌ای موثر است، به‌طوری‌که میزان این ترکیبات در بالاترین غلظت شوری (۲۰۰ میلی‌مولار)نسبت به شاهدبه ترتیب ۱/۳۳، ۳/۵۸ و ۳/۶۳ برابر افزایش نشان داد.

تنش یکی از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در میزان متابولیت‌های ثانویه موجود درگیاهان است. درحقیقت یکی از مهم‌ترین نقش‌های متابولیت‌های ثانویه درگیاهان نقش حافظتی 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 شده‌است (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^-)، 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 به‌وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دفاعی مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز وآنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر ترکیبات فنیل-پروپانوئیدی محافظت می‌کنند (Agarwal and Pandy, 2004).

آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که دارای نقش دفاعی در گیاهان می‌باشد. این آنزیم حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان بوده و به‌عنوان اولین آنزیم مسیرفنیل 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 به‌عنوان آنزیم کلیدی نقش اساسی در تشکیل ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی که یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیرآنزیمی 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 تحت‌تاثیرعواملی مانند هورمون‌ها، مواد غذایی، نور، تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌یابد. در شرایط تنش، بیان ژن مربوط به آنزیم PAL افزایش یافته و به‌دنبال افزایش ساخت این آنزیم، متابولیت‌های ثانویه مسیر فنیل پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی جهت مواجه و مقابله با تنش افزایش می‌یابند. ترکیبات فنلی می‌توانند به‌عنوان 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، جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد، خاموش نمودن اکسیژن یکتائی یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداتیو و دفاع علیه

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

نتایج حاصل ازافزایش 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 فنیل‌آلانین آمونیالیاز و افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه دارویی زنجبیل اثر معنی‌داری داشته‌است (Dehghani and Mostajeran, 2010). در گیاه دارویی شوید 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 فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی 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 سیگنالیگ را فعال نموده و سبب افزایش رونویسی mRNA خاص آنزیم PAL شده که منجر به پاسخ‌های دفاعی گیاه و بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنولیک می‌گردد. در نتیجه استفاده از ترکیبات الیسیتوری مانند اسیدسالیسیلیک به‌عنوان راهکاری مؤثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات شناخته شده است. نتایج اثرگذاری مثبت اسیدسالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کنگرفرنگی با آزمایشات بسیاری مطابقت دارد. در گیاه کنگرفرنگی تحت تیمار اسیدسالیسیلیک میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، 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 فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشت درون شیشه‌ای گیاه شیرین بیان گردید (Shabani and Ehsanpoor, 2009). اثر متقابل شوری و اسیدسالیسیلیک نیز بر پارامترهای اندازه-گیری شده مثبت بود. در واقع اسیدسالیسیلیک با فعال‌کردن 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 قابل‌توجه در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شد که این نتیجه در گیاه دارویی پروانش (Neelam et al., 2014)، ذرت (Momeni et al., 2012)، ریحان سبز (Delavari parizi, 2010) نیز گزارش شده است. لازم به ذکر است که افزایش اسیدسالیسیلیک تا حدی فرآیند بیوسنتز را بهبود می‌بخشد. بسته به نوع بافت و شرایط فیزیولوژیکی سلول افزایش بیش از حد آستانه تحمل این ترکیب نه تنها سبب افزایش بیوسنتز آنزیم و ترکیبات موثره مرتبط نمی‌شود، بلکه سبب کاهش تولید این ترکیبات

نیز می‌شود. این مورد نه تنها در اسیدسالیسیلیک، بلکه در مورد سایر محرک‌ها از جمله متیل‌جاسمونات و شوری نیز صدق می‌کند (Samadi et al., 2014). در این آزمایش اسیدسالیسیلیک نیز بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کالوس کنگرفرنگی معنی‌دار بوده است و میزان این ترکیبات در نمونه‌های تیمار شده نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری 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 فنیل‌پروپانوئیدی است. با توجه به اهمیت تنش و ترکیبات تنش‌زا در تغییرات فعالیت آنزیم PAL و نیز نقش مهم این آنزیم در تولید ترکیبات ثانویه می‌توان از شوری و اسیدسالیسیلیک به عنوان الیسیتور در مدیریت تولید متابولیت‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای بهره برد. نکته مهم اینکه با مدیریت کشت و استفاده از محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک در زمین‌های شور، با ایجاد مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ضمن کاهش اثرات تنش می‌توان به حفظ گیاه و تولید اقتصادی متابولیت‌های ارزشمند کمک نمود.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌دلیل اهمیت فراوان ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی و کاربرد این ترکیبات در صنایع مختلف، دستیابی به روش‌های مفید جهت تولید اقتصادی این ترکیبات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. کاربرد الیسیتورها و ایجاد تنش به‌منظور تحریک بیوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه، یکی از مهم‌ترین روش‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. در این آزمایش از شوری و اسیدسالیسیلیک به‌عنوان الیسیتور استفاده شد و مطابق نتایج، بهترین تیمار در این آزمایش، غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار شوری در بین سایر غلظت‌های شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک بوده‌است. در تیمار ترکیبی نیز بهترین تیمار، در افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۳۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک و تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار شوری و ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک یوده است. شوری و اسیدسالیسیلیک به‌عنوان محرک با ایجاد تنش با تحریک پاسخ دفاعی گیاه سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کلیدی فنیل‌آلانین آمونیالیاز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند فنل و فلاونوئید در کالوس کنگر فرنگی شدند. در نتیجه با توجه به همبستگی مثبت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و نقش کلیدی این آنزیم در بیوسنتز ترکیبات مذکور و نیز اثرگذاری مثبت الیسیتورهای مورد بررسی می‌توان با بهینه‌سازی نسبت شوری و اسیدسالیسیلیک تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی کنگرفرنگی در شرایط درون‌شیشه‌ای را بهبود بخشید.

References

1. Agarwal, S. and Pandy, 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 ofSeedScience 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. Bourgou, 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

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 *Lycopersicum 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 Abdelly, 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 toproduce 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 quantitive spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia lyase activity inbarely, 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. Amrican 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 biosyntesis. 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.