

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

فاطمه رؤف فرد^۱، مظفر شریفی^{۲*}، رضا امیدبیگی^۳، فاطمه سفیدکن^۴، مهرداد بهمنش^۵ و نوراله احمدی^۶

۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، پست الکترونیک: msharifi@modares.ac.ir

۳- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۵- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

۶- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۱

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: متیل جاسمونات، آگاستاکه (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze)، فنیل آلانین آمونیولیز، ۴-کومارات کوالیگاز، مواد فنلی.

مقدمه

می‌شود. اسانس این گیاه رایحه‌ای شبیه انیسون دارد و اساساً در برگ‌ها و گل‌ها ساخته می‌شود (Omidbaigi et al., 2008). برگ‌ها و گل‌های این گیاه در تهیه چای گیاهی، کیک‌ها، شیرینی‌ها، سالادها و دسرهای مصرف می‌شوند. همچنین برگ‌ها برای درمان ناراحتی‌های قلبی، درد قفسه سینه، القای عرق کردن جهت کاهش تب بکار می‌روند (Mallavarapu et al., 2004). اسانس این گیاه فعالیت ضدقارچی و ضد میکروبی دارد (Omidbaigi &

آگاستاکه (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze) گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده نعناع (Lamiaceae) می‌باشد (امیدبیگی و محمودی سورستانی، ۱۳۸۹). این گیاه بومی آمریکا و کانادا است (Mallavarapu et al., 2004; Charles et al., 1991) که در ناحیه مدیترانه و شمال و مرکز اروپا کشت می‌شود. در حال حاضر این گیاه در ایران در مناطقی مثل گرگان و شمال تهران کشت

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

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

مواد و روشها

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

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

جاسمونیک اسید و متیل‌استر آن (متیل جاسمونات)، ترکیب‌هایی سیکلوپنتانونی (Cyclopentanone compounds) از مشتقات اسید لینولنیک (linolenic acid)

۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (pH) و ۳۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۲۰ میلی مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر HCl (۵M) متوقف گردید و سینامیک اسید تولید شده با ۱/۵ میلی لیتر اتیل استات در ۳ مرحله استخراج شد. فاز اتیل استاتی در معرض جریان هوا تبخیر شد و رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر متانول حل شد.

مقدار سینامیک اسید تولید شده، با استفاده از منحنی استاندارد آن، به کمک دستگاه HPLC (KNAUER, Germany) با دکتور UV/Vis و ستون C18-ODS3 PAL (۴ × ۲۵۰mm) محاسبه شد. در نهایت فعالیت آنزیم PAL بر حسب میکروگرم سینامیک اسید تولید شده بر میلی گرم پروتئین در ساعت ($\mu\text{gr cinnamic acid}/\text{mg protein}/\text{h}$) محاسبه گردید.

برای رسم منحنی استاندارد سینامیک اسید، ابتدا غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از سینامیک اسید به عنوان استاندارد آماده شد و به دستگاه HPLC تزریق شد. سپس با استفاده از سطح زیر منحنی هر یک از غلظت‌ها، منحنی استاندارد رسم شد. در نهایت، فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی مولار)، در ۴ مقطع زمانی (۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار) به طور مستقل از هم، در هر یک از زمان‌های ذکر شده، ارزیابی شد.

سنجش فعالیت آنزیم ۴-کومارات کوآلیگاز (4CL)

برای سنجش فعالیت 4CL به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۷۸۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار (pH ۷/۵)، ۵۰ میکرولیتر p-کوماریک اسید ۲۰ میلی مولار در متانول ۵۰٪، ۲۰ میکرولیتر آدنوزین تری فسفات (ATP) ۵۰ میلی مولار، ۲۰ میکرولیتر MgCl_2 ۱۲۵ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر دیتوتريتول ۰/۱ مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با افزودن ۲۰ میکرولیتر کوآنزیم آ (۵ میلی مولار) واکنش آغاز شد، و با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تغییرات جذب در طول موج ۳۲۳nm پس از ۱/۵ دقیقه بررسی شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر حسب میلی مول بر گرم پروتئین در دقیقه، به کمک ضریب

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

سنجش‌های بیوشیمیایی

سنجش پروتئین کل

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

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

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز مطابق شیوه‌نامه Wakabayashi و همکاران (۱۹۹۷) با کمی تغییر، بر اساس مقدار سینامیک اسید تولید شده سنجیده شد. برای این منظور، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده،

(جدول ۱). پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع تیمار، بیشترین فعالیت آنزیم PAL با استعمال ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات حاصل شد که این مقدار ۱/۳ برابر تیمار شاهد همین زمان بود. البته میزان فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات از نظر آماری با تیمار شاهد همین زمان اختلافی نداشت (شکل ۱).

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

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

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

خاموشی معادل ۲۱/۱ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر محاسبه گردید (Garden, 2003) و فعالیت آنزیم 4CL تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات (۰، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار)، ۲۴ ساعت پس از تیمار ارزیابی شد.

سنجش مقدار فنل کل

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

محاسبات آماری

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. از نرم‌افزار SAS برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده گردید و با مشاهده تفاوت معنی‌دار در تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p \leq 0.05$) انجام شد. نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

تأثیر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیاپاز
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در زمان‌های ۴، ۸ و ۱۲ ساعت بعد از شروع تیمار اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای متیل جاسمونات و تیمار شاهد مربوط به هر زمان وجود نداشت، اما بعد از گذشت ۲۴ ساعت از استعمال متیل جاسمونات اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL

در زمان‌های مختلف پس از شروع تیمار

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

ns و ***: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر مقدار فنل کل

در زمان‌های مختلف پس از شروع تیمار

میانگین مربعات برای مقدار فنل کل				درجه آزادی	منابع تغییرات
۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	۸ ساعت	۴ ساعت		
۱/۰۰۲۹ ns	۰/۱۴۵۷ ns	۰/۹۹۶۰ ns	۰/۰۹۴۷ ns	۲	تیمار (غلظت‌های مختلف MeJa)
۰/۵۰۰۳	۰/۲۹۹۹	۱/۱۶۹۷	۰/۰۵۲۶	۶	خطای آزمایشی

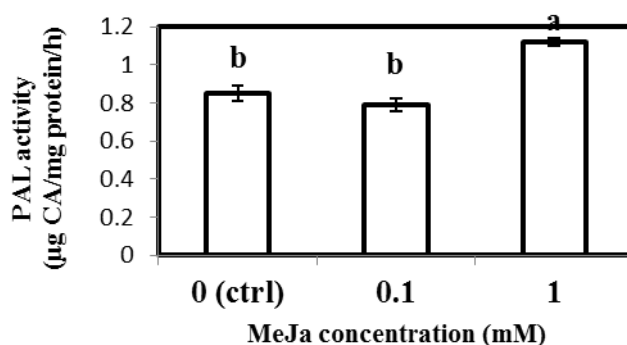
ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر مقدار پروتئین کل

در زمان‌های مختلف پس از شروع تیمار

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

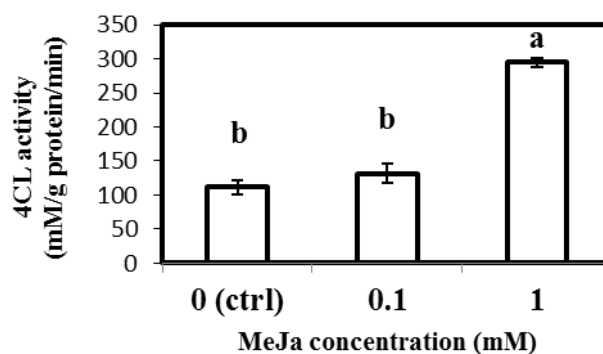
ns و *: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪



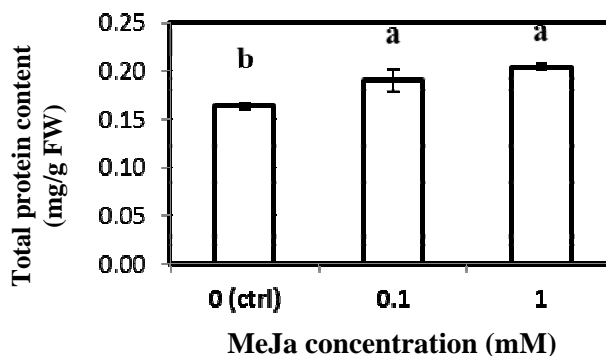
شکل ۱- اثر تیمار غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL در آگاستاکه، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار

(میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.)

دفاعی گیاه نشان داده‌اند (Heredia & Cisneros- Zevallos, 2009). همچنین گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم PAL در کشت‌های سلولی بعد از استعمال متیل‌جاسمونات موجود است که از آن جمله می‌توان به کشت‌های سلولی توتون (Sharan *et al.*, 1998)، تاکسوس (Wu & Lin 2003)، فندق (رضایی و همکاران، ۱۳۹۰)، سویا (Gundlach *et al.*, 1992)، *Coleus blumei* (Szabo *et al.*, 1999) و *Lithospermum erythrorhizon* (Mizukami *et al.*, 1993) اشاره کرد که میزان فعالیت آنزیم PAL در نتیجه استعمال متیل‌جاسمونات افزایش یافته‌است. گزارش شده‌است که تیمار کاهوی روماین (Romaine) با متیل‌جاسمونات ۰/۵ میلی‌مولار موجب اختلاف معنی‌دار مقدار فنل کل با شاهد در زمان‌های ۲، ۶ و ۸ روز بعد از تیمار گردید، به طوری که در زمان ۲ روز بعد از تیمار حداکثر مقدار آن حاصل شد. همچنین در زمان‌های ۲ و ۶ روز بعد از تیمار، میزان فعالیت آنزیم PAL در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (Kim *et al.*, 2007). محققان دیگری نیز گزارش کردند که با مه‌افشانی دانه‌رست‌های ۴ برگی بونج با متیل‌جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت، شاهد تجمع اسیدهای فنولیک و افزایش ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL بودند (Bi *et al.*, 2007). همچنین گزارش شده‌است که مه‌افشانی متیل‌جاسمونات ۱ میلی‌مولار بر جوانه تربچه (*Raphanus sativus* L.) بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، موجب افزایش ۶۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL گردید (Kim *et al.*, 2006). متیل‌جاسمونات در میوه‌های گواوا نیز باعث افزایش فعالیت PAL شده است اما مقدار فنل کل را تحت تأثیر قرار نداده‌است (González-Aguilar *et al.*, 2004). Lee و Douglas (۱۹۹۶)، گزارش کردند که ژن‌های 4CL قابل القا توسط متیل‌جاسمونات هستند. همچنین گزارش شده‌است که در گیاه جعفری و نیز در کشت تعلیقی سلول‌های جعفری متیل‌جاسمونات باعث افزایش بیان ژن 4CL گردیده‌است (Ellard-Ivey & Douglas, 1996). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت از شروع تیمار، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های PAL و 4CL نسبت به تیمار ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و تیمار شاهد همین زمان گردید و به ترتیب باعث افزایش فعالیت ۳۰ درصدی و



شکل ۲- اثر تیمار غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر فعالیت آنزیم 4CL در آگاستاکه، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار (میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0/05$ می‌باشد).



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر مقدار پروتئین کل در آگاستاکه، ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار (میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0/05$ می‌باشد).

بحث

PAL اولین آنزیمی است که در متابولیسم فنیل پروپانوئیدی فعالیت می‌کند و در تولید اغلب ترکیب‌های دفاعی فنلی نقش کلیدی دارد (Heredia & Cisneros- Zevallos, 2009). 4CL نیز از دیگر آنزیم‌های مهم مسیر فنیل پروپانوئیدی است (Lee & Douglas, 1996) که با وجود اهمیت آن، در آزمایش‌ها کمتر مورد توجه قرار گرفته‌است. القای متابولیسم فنیل پروپانوئیدی می‌تواند توسط تیمار با الیستورها نیز حاصل شود. مطالعات وجود یک رابطه مثبت بین استعمال خارجی متیل‌جاسمونات و سنتز ترکیب‌های فنلی را، احتمالاً به‌عنوان بخشی از واکنش

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

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

منابع مورد استفاده

- امیدیه‌گی، ر. و محمودی سورستانی، م.، ۱۳۸۹. اثر تنش خشکی بر برخی صفات مرفولوژی، میزان و عملکرد اسانس گیاه گل‌مکزیکی *Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران)، ۴۱(۲): ۱۶۱-۱۵۳.
- رضایی، ا.، قناتی، ف. و بهمنش، م.، ۱۳۹۰. افزایش تولید و آزادسازی تاکسول توسط متیل‌جاسمونات، امواج فراصوت و دی‌بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.). زیست‌شناسی گیاهی، ۳(۷): ۷۱-۵۵.
- Bi, H.H., Zeng, R.S., Su, L.M., An, M. and Luo, S.M., 2007. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Journal of Chemical Ecology*, 33(5): 1089-1103.

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

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

F. Raouf Fard¹, M. Sharifi^{2*}, R. Omidbaigi³, F. Sefidkon⁴, M. Behmanesh⁵ and N. Ahmadi³

1- Ph.D. Student, Department of Horticulture, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: msharifi@modares.ac.ir

3- Department of Horticulture, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

5- Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: July 2012

Revised: October 2012

Accepted: October 2012

Abstract

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

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