زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹٤

تغییرات آنـــزیمی و آنتـــی‌اکسیـــدانی کالـوس کنـگـــرفـــرنگـــی (*Cynara scolymus* L.) تحت تاثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات

صبا صمدی*[1]، عظیم قاسم نژاد[2] و مهدی علیزاده[3]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۶

چکیده

در پژوهش حاضر توانمندی آنتی اکسیدانی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، محتوای فلاونوئیدی و میزان اسید کلروژنیک و اسید کافئیک کالوس کنگرفرنگی، تحت تاثیر الیسیتورهای اسید سالیسیلیک (SA) و متیل جاسمونات (MeJA) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور SA و MeJA در پنج سطح، در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی، در محیط کشت کالوس مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج حاصله تغییرات فعالیت آنزیم PAL، توانمندی آنتی اکسیدانی، اسید کلروژنیک و اسید کافئیک و محتوای فلاونوئیدی تحت تاثیر تیمار نسبت‌های مختلف الیسیتورهای استفاده شده همبستگی مثبتی نشان دادند که بیانگر نقش مستقیم آنزیم PAL در تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و نقش الیسیتورهای به کار برده شده در تحریک تولید این آنزیم بوده است. مقدار MeJA و SA به ترتیب در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار حداکثر میزان توانمندی آنتی اکسیدانی و محتوای فلاونوئیدی را در کالوس داشتند. همبستگی مثبت فعالیت آنزیمPAL و تجمع ترکیبات فلاونوئیدی بیانگر نقش کلیدیPAL در بیوسنتز ترکیبات فلاونوئیدی در کنگرفرنگی است.

واژگان کلیدی: الیسیتور، القاء تنش، فنیل آلانین آمونیالیاز، متابولیت ثانویه

[1،2،3] گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

فلاونوئیدها شناخته شده‌ترین گروه ترکیبات فنلی موجود در میوه‌ها، سبزیجات و سایر غذاهای گیاهی هستند. این ترکیبات ۳ حلقه‌ای دارای خواص دارویی بسیار بوده (رفیعی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Rice-evanset al.,1993; Frankel et al., 1993) و سبب محافظت بدن در برابر ابتلا به بیماری‌های قلبی (Hertog et al., 1995) و سرطان ریه (Knekt et al., 1997) می‌شوند. بیشترین تاثیر حفاظتی فلاونوئیدها در سیستم‌های بیولوژیکی به توان آنتی اکسیدانی آن‌ها، ظرفیت انتقال الکترون و دفع رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود (Amzad Hossain et al., 2009).

استفاده از کنگرفرنگی (*Cynara scolymus*) یکی از رژیم‌های غذایی محبوب در نواحی مدیترانه و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی جهان است که سرشار از ترکیبات پلی فنلی، اینولین، فیبر و عناصر معدنی بوده و نقش مهمی در کاهش کلسترول و مشکلات کبدی، کاهش ابتلا به سرطان و بیماری‌های قلبی دارد. در واقع کنگرفرنگی غذایی گیاهی است که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای فراوان نقش مهمی در پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها دارد (Cecarlietal., 2010؛ ضیایی و همکاران، ۱۳۸۳).

اسیدهای کلروژنیک و کافئیک دو نمونه از عمده‌ترین فلاونوئیدهای موجود در گیاه کنگرفرنگی هستند. این ترکیبات به عنوان آنتی اکسیدان عمل کرده و سبب جذب رادیکال‌های آزاد می‌شوند. کلروژنیک اسید خاصیت ضد دیابتی داشته و احتمالا یکی از دلایل کاهش قند خون در اثر مصرف کنگرفرنگی مربوط به این ترکیب می‌باشد (Arion et al., 1997).

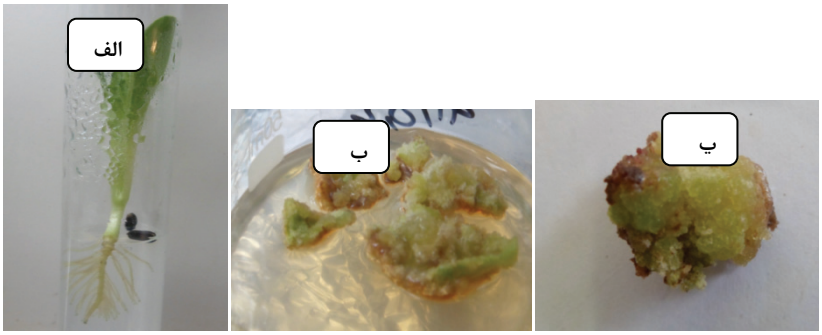
فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) یک آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانوئیدها بوده که در تولید چندین ترکیب حفاظتی قوی مانند فلاونوئیدها، فیتوالکسین‌ها و ترکیبات دیواره سلولی نقش دارد و اولین مرحله از بیوسنتز فنیل پروپانوئید که نقطه انشعاب متابولیت‌های اولیه و ثانویه است را کاتالیز می‌کند (شعبانی و همکاران ۱۳۸۸، Bagal et al., 2012). در شرایط بهینه کشت، استفاده از الیسیتورها (محرک‌های تولید متابولیت ثانویه) روش مناسبی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه است (Ahmadi Moghadam et al., 2013).

تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر الیسیتورهای طبیعی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات بر توانمندی آنتی‌اکسیدانی و آنزیمی کالوس کنگرفرنگی انجام شد.

مواد و روش‌ها

استقرار ریزنمونه در محیط کشت

به منظور تهیه مواد گیاهی بذرهای کنگرفرنگی (*Cynara scolymus*) واریته Green globe از مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جمع آوری شده و پس از استرلیزاسیون با هیپو کلریت سدیم ۲۰ درصد (۳۰ دقیقه) و اتانول ۷۰ درصد (۱۰ ثانیه) در محیط MS 1/2 کشت گردید. پس از تشکیل گیاهچه، برگ‌های کوتیلدونی، به عنوان ریز نمونه استفاده شده و به محیط کشتMS (Murashige and Skoog., 1962) حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید جهت کالوس‌زایی انتقال داده شد (شکل ۱) و با انجام عمل واکشت، کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های دمبرگ کنگرفرنگی (سبزرنگ) به محیط‌های کشت حاوی تیمارهای MeJA و SA در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار انتقال یافت. پس از ۴ هفته اندازه گیری پارامترهای مورد نظر انجام شد.



شکل ۱- الف: کشت بذر در محیط MS ۱/۲ و تهیه ریزنمونه **ب:** استقرار ریزنمونه و کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی نفتالین اسید استیک ۵ mg/l و بنزیل آدنین۲ mg/l **پ:** کالوس آماده انتقال به محیط کشت MS حاوی مواد الیسیتور.

اندازه گیری کلروژنیک و کافئیک اسید

جهت اندازه گیری کلروژنیک و کافئیک اسید از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مدل هیتاچی مجهز به پمپ لاکروم مدل ال- ۷۱۰۰، دتکتور یو وی و ستون C-18 با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ میلی‌لیتر استفاده شد. نمونه‌ها با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۳۳۰ نانومتر اندازه گیری شدند. همچنین از فاز متحرک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل، ۱ میلی لیتر اسید استیک و ۸۹ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد (Trajtemberg et al., 2006; Santos-games et al., 2002).

اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد به روش DPPH

برای تعیین درصد مهار رادیکال‌های آزاد ۱-دی فنیل پیکرازیل (DPPH) از روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. به این منظور ۲ میلی‌لیتر از DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به ۲ میلی‌لیتر از عصاره متانولی (۰/۵ گرم از کالوس تر با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد) تهیه شده از کالوس افزوده و سپس ۱۵دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. بلافاصله نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Camspec M501) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید (نمونه AS). یک نمونه به عنوان شاهد (AC) در نظر گرفته شد. که حاوی ۲ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی لیتر متانول بود. کالیبراسیون اسپکتروفتومتر با استفاده از متانول انجام شد. اعداد بدست آمده توسط فرمول (۱) به درصد مهار تبدیل شد. به این‌صورت‌که عدد جذب نمونه از عدد شاهد کم شده و بر عدد شاهد تقسیم می‌شود. بدین صورت پس از انجام این آزمایش میزان درصد مهار رادیکال توسط عصاره حاصل از ۰/۵ گرم وزن تازه کالوس مشخص شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (AC-AS)/AC\times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

فلاونوئید کل

سنجش محتوی فلاونوئیدی به روش آلومینیوم کلراید انجام شد (Chang et al., 2002). به این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی (۰/۵ گرم از کالوس تر با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد) تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلراید در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول و آب مقطر) ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس مخلوط نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد. برای شاهد به جای عصاره از متانول خالص استفاده شد. از این محلول برای صفر کردن دستگاه

اسپکتروفتومتر استفاده شد و در نهایت نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید.

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

برای سنجش فعالیت آنزیم PAL از روش پیشنهادی ساندرز و همکاران (۱۹۷۴) با کمی تغییر استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت کالوس با استفاده از ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار pH=۷ به خوبی کوبیده شده و نمونه کوبیده شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm در دمای $4\ ^0C$ سانتریفیوژ شد و پس از اتمام سانتریفیوژ از عصاره رویی برای سنجش آنزیم استفاده شد. محتوی نمونه برای سنجش آنزیم حاوی ۲۵۰ml عصاره آنزیمی ۲۵۰ ml بافربورات سدیم (۱۰ مولار ، pH= ۸/۸) ، ۲۵۰ ml آب مقطر به اضافه ۲۵۰ ml بافر سوبسترای فنیل آلانین (۵۰ میلی مولار) بود. سپس جذب آن با اسپکترفتومتر مدل(Camspec M501) در طول موج ۲۹۰nm قرائت شد. محاسبه فعالیت آنزیم PAL با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی (۹۶۳۰ μ -cm1-1) و بر حسب (µmol/g fw) انجام گردید. این آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آزمایش در شرایط کنترل شده اتاقک کشت و با ۵ تیمار اسید سالیسیلیک و متیل-جاسمونات در ۴ تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی-دار(LSD) در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج

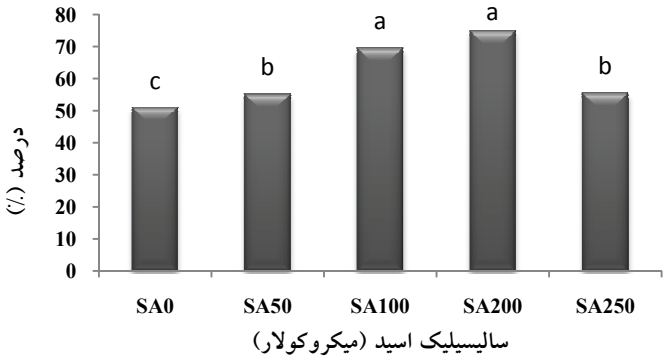
تاثیر تیمارهای MeJA و SA بر محتوی فلاونوئیدی، آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم PAL در سطح ۱ درصد(P< ۰/۰۰۱) کاملاً معنی‌دار بود.

جدول ۱-تجزیه واریانس اثر فاکتورها و اثر متقابل آن‌ها بر میزان فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

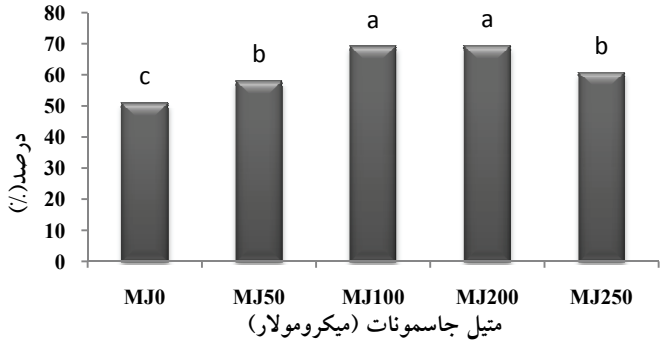
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فلاونوئید	آنتی اکسیدان	فنیل آلانین آمونیالیاز
سالیسیلیک اسید	۴	۱۰۶/۰۸۱**	۵۰/۲۶۱ **	۰/۲۸۹**
متیل جاسمونات	۴	۱۱۵/۶**	۱۶۸**	۰/۴۹**
سالیسیلیک اسید × متیل جاسمونات	۱۶	۳۰۷**	۲۱۴/۴**	۱/۶۴**
خطای آزمایش	۵۰	۸/۷۹۲	۱۲/۹۸	۰/۰۵۴

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

تغییرات توانمندی آنتی اکسیدانی تحت تاثیر متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید

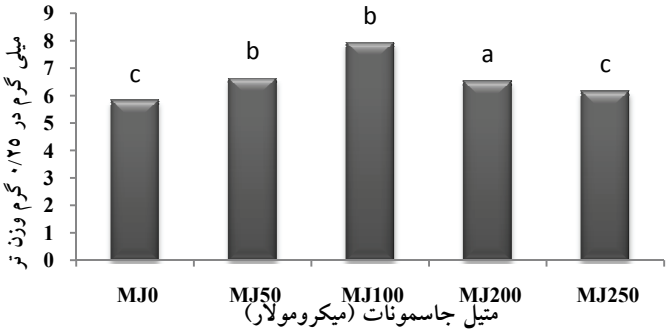


شکل ۲- تاثیر اسید سالیسیلیک بر توانمندی آنتی اکسیدانی

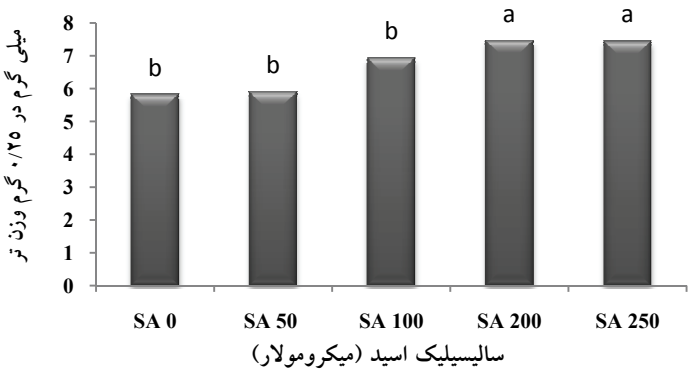


شکل ۳- توانمندی آنتی اکسیدانی تحت تاثیر متیل جاسمونات

بررسی اثر متیل جاسمونات (شکل ۳) بر توانمندی آنتی‌اکسیدانی کالوس بیانگر روند افزایشی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تا سطح ۱۰۰ میکرومولار و سپس کاهش آن است. البته بین غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در واقع متیل جاسمونات به عنوان یک الیسیتور تا سطح ۱۰۰ میکرو مولار به عنوان محرک عمل کرده و سبب افزایش فعالیت و پس از آن تاثیر بازدارندگی داشته و سبب کاهش توانمندی آنتی اکسیدانی شده است. روند مشابهی در مورد نمونه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک نیز مشاهده شد (شکل۲). به طوری که سطح ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار حداکثر توانمندی آنتی اکسیدانی را دارا بوده، و تیمارهای بالاتر از ۲۰۰ میکرو مولار به عنوان بازدارنده عمل کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس را کاهش می‌دهند.



شکل ۴- تغییرات محتوای فلاونوئیدی تحت تاثیر متیل جاسمونات

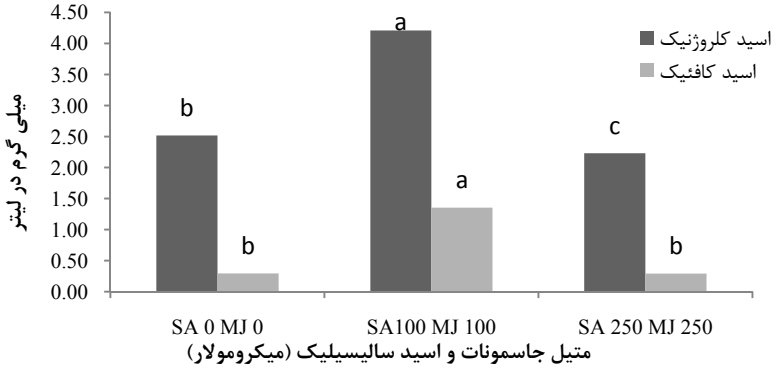


شکل ۵- تاثیر اسید سالیسیلیک بر محتوای فلاونوئیدی

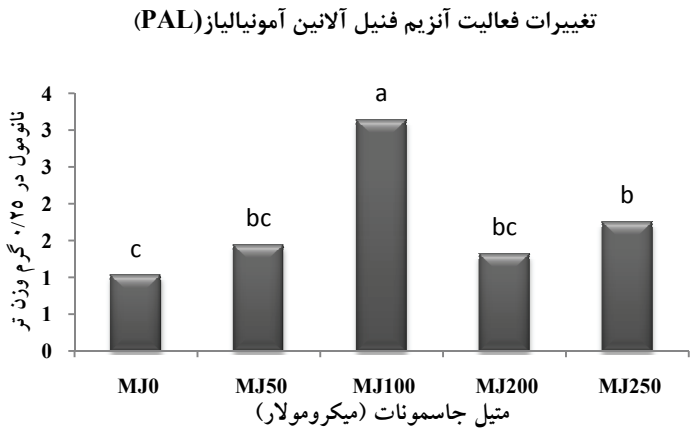
بررسی انجام شده نشان داد که افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات با افزایش محتوای فلاونوئیدی رابطه مثبتی داشته و با افزایش غلظت، محتوای فلاونوئید کل نیز افزایش می‌یابد (شکل ۴ و ۵). مشابه توانمندی آنتی‌اکسیدانی این روند تا سطح ۱۰۰ میکرومولار ادامه داشته و سپس کاهش می‌یابد. به طوریکه حداکثر محتوای فلاونوئیدی در سطح ۱۰۰ میکرو مولار مشاهده شد. البته در نمونه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک بین تیمار۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرو مولار تفاوت معنی‌داری وجود نداشته و روند افزایش الیسیتورها با محتوای فلاونوئیدی یکسان است (شکل ۵).

برای اندازه گیری فلاونوئیدهای خاص و اصلی گیاه کنگرفرنگی برخی از نمونه‌ها با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شدند (شکل ۶) که موید این موضوع بوده که با افزایش غلظت الیسیتور محتوای فلاونوئیدی تا سطح خاصی افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد (شکل۶). به‌طوریکه تیمار اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میکرو مولار+ متیل جاسمونات ۱۰۰میکرومولار دارای حداکثر محتوای کافئیک و کلروژنیک اسید بوده و با افزایش غلظت الیسیتورها میزان ترکیبات مذکور کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که در صورت کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات تاثیر الیسیتوری هر یک بر دیگری موثر بوده به‌طوریکه که غلظت ۱۰۰ میکرو مولار از هر دو ترکیب به عنوان غلظت بهینه، بیشترین تاثیر را در تولید متابولیت‌های ثانویه ایفا کرده و در واقع در این تیمار اثر دو الیسیتور با هم جمع شده و سبب ایجاد تاثیری بیشتر از هر الیسیتور به صورت تکی داشته و غلظت‌های بالاتر دو ترکیب نیز با وجود دارا بودن تاثیر بازدارندگی بر یکدیگر، محتوای فلاونوئیدی بالاتری نسبت به تیمار شاهد داشتند. همچنین طبق نتایج بدست آمده

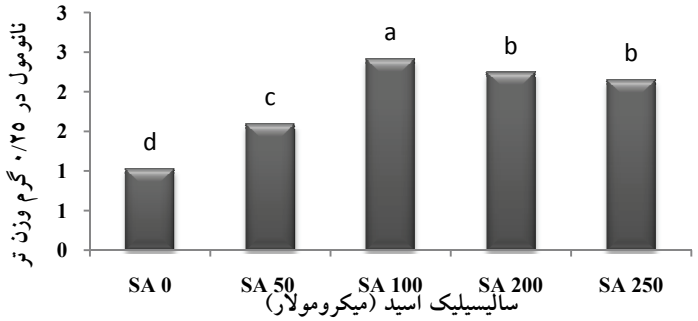
محتوای اسید کافئیک بسیار کمتر از اسید کلروژنیک بود. با توجه به اینکه اسید کافئیک به عنوان پیش‌ساز اسید کلروژنیک در مسیر بیوسنتز مشتقات اسید کافئیک نقش مهمی دارد، تغییرات این ترکیبات مبین اثرپذیری واکنش‌های بیوشیمیایی مذکور از الیسیتورهای مورد استفاده است.



شکل ۶- تاثیر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر میزان اسیدهای کافئیک و کلروژنیک



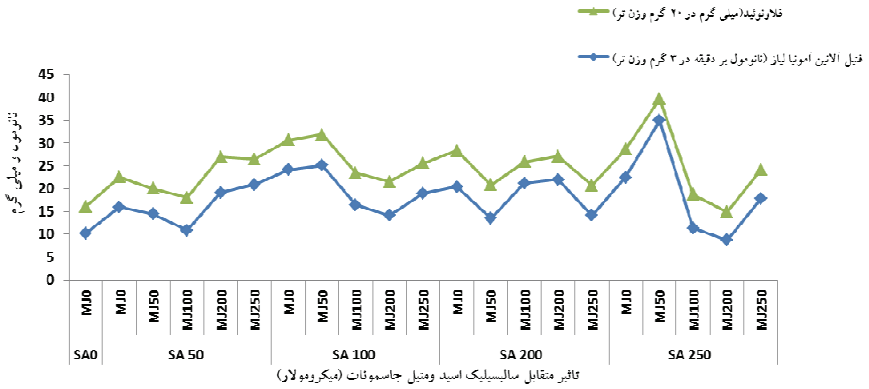
شکل ۷- تغییرات محتوای آنزیم PAL تحت تاثیر متیل جاسمونات



شکل ۸- تاثیر سالیسیک اسید بر محتوای آنزیم PAL

همانگونه که در شکل ۷ نشان داده شده است افزایش غلظت متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تا سطح ۱۰۰ میکرو مولار و سپس کاهش آن شده است. روند مشابهی در مورد اسیدسالیسیلیک نیز مشاهده می‌شود. به طوری که میزان فعالیت PAL در ۱۰۰ میکرو مولار در حداکثر

میزان بوده و با بالاتر رفتن غلظت کاهش می‌یابد(شکل ۸). روند تغییر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی با آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز همبستگی مثبتی داشته (شکل ۹) و با افزایش فعالیت آنزیم محتوای فلاونوئیدی نیز افزایش می‌یابد.



شکل ۹- اثر متقابل متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر روند تغییرات فلاونوئیدی و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

بحث

ترکیبات فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی و تنش‌های وارده به گیاه سنتز می‌شوند. بسیاری از گزارش‌ها بیانگر نقش اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات به عنوان یک مولکول پیام‌رسان و القاءکننده در تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به هنگام تنش می‌باشد (BabarAli., 2007). اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات باعث بیان ژن‌های مربوط به تولید آنزیم PAL شده و این آنزیم همراه با چالکون‌سنتتاز و چالکون ایزومراز یک جریان کربنی از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی تا تولید فلاونوئید را فراهم می‌کنند (فهیمی، ۱۳۸۷؛ ابراهیم زاده و صبورا ، ۱۳۸۶). افزایش توان آنتی‌اکسیدانی و محتوای فلاونوئید با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات نشانگر پتانسیل مقاومت درونی گیاه کنگرفرنگی در مقابل تنش‌های اکسیداتیو وارده از محیط و یا میکروارگانیسم‌ها است. کاهش فلاونوئید با افزایش فشار تنش ممکن است ناشی از درگیر شدن مکانیسم-های دیگری در تنش و یا کاهش توان مقاومتی و مغلوب شدن گیاه در مقابل تنش باشد که کاهش درصد مهار رادیکال آزاد و فعالیت آنزیم PAL نیز تائیدی بر این مطالب می‌باشند. در واقع متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سبب فعال‌سازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی در گیاه کنگرفرنگی می‌شوند (مهربانی و همکاران، ۱۳۹۱ Wen et al., 2005; Wang et al., 2009).

مطالعات اخیر بیانگر این موضوع‌اند که متیل جاسمونات می‌تواند به عنوان یک تنظیم کننده رشد، ایفای نقش کرده و با بیان ژن و تحریک تولید کلسیم و لیپواکسیژناز سبب ایجاد شرایطی مشابه تنش شود (Creelman et al., 1997). همچنین در رونویسی ژن‌های بازدارنده‌ی پروتئینازها، آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز فلاونوئیدها و لیپواکسیژنازها که همه‌ی آن‌ها سبب ایجاد مقاومت گیاه در برابر انواع استرس‌ها می‌شوند، موثر بوده و سنتز آنزیم PAL و چالکون سنتاز را فعال می‌کند (Leonard et al., 2003).

اسید کلروژنیک و اسید کافئیک به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی قوی در زمان افزایش تنش با کاهش آستانه تحمل گیاه به منظور کاهش خسارت اکسیداتیو وارده و افزایش مقاومت در گیاه تولید می‌شوند. با این وجود به نظر می‌رسد اسید کافئیک به

عنوان یک ترکیب فنلی و پیش‌ساز اسید کلروژنیک و سایر ترکیبات از جمله سینارین همواره در مقدار بسیار کم در گیاه وجود داشته و افزایش این ترکیب اغلب در شرایط غیر طبیعی که بیانگر تاثیر گذاری استرس بر فعالیت طبیعی بیوشیمیایی گیاه است مشاهده می‌شود (Babar Ali et al., 2007).

مطالعات نشان می‌دهند که متیل جاسمونات‌ها و با تحریک تولید PMT (پوترسین N-متیل ترانسفراز) یا m RNA PMT سبب ایجاد مکانیسم دفاعی در گوجه فرنگی می‌گردد(Deng,2005). همچنین نقش موثر این ترکیبات در افزایش تروپان آلکالویید در داتوره (Deng,2005)، تجمع ترپن ایندول آلکالوییدهای پروانش(Riuz-mayetal,2009)، تحریک بیوسنتز آلکالوییدهای شقایق کالیفرنیایی(Choet al,2008) و بدرالبنج (Jaber-vazdekis et al,2008)، افزایش آنتوسیانین *Melastoma malabathricum* (Suan see,2011)، جنسینوساید جنسینگ (Thanh et al,2005)، گلیسیریزین در شیرین بیان (Wongwicha,2011)، کافیول پوتریسین در گوجه فرنگی (Chen et al,2006)، افزایش فعالیت آنزیم PAL در محیط کشت تنباکو (اندی وهمکاران ۲۰۰۱)، سویا (Gundluch et al., 1992)، گواوا (Gonzataet al., 2004) و همچنین افزایش فعالیت آنزیم PAL، فنل کل، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سطح آنتی‌اکسیدانی در بلو بری(Wang et al., 2009) گزارش شده است.

اسید سالیسیلیک نیز یکی از سیگنال‌های کلیدی و مهم درونی است که با تنظیم فعالیت PAL در سلول‌های کنگرفرنگی در سطح رونویسی سبب فعال-سازی بسیاری از پاسخ‌های دفاعی می‌گردد(Peng-fei wen et al, 2005). در واقع اسید سالیسیلیک به عنوان یک جز پیام رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ-های اختصاصی دفاعی گیاه شناخته می‌شود. این ترکیب بیوسنتز و تجمع انواع متابولیت‌های ثانویه را در گیاه افزایش می‌دهد. اسید سالیسیلیک به عنوان یک الیسیتور طبیعی سبب سنتز آنزیم‌های دفاعی گیاه از قبیل β-۱-۳- گلوکوناز (هضم دیواره سلولی قارچ ها) و لیپواکسیژناز (آنزیم اصلی مسیر بیوسنتزی اسید جاسمونیک) (آبشار پیام رسانی وابسته به یون ها Ca^{++} و MaP کینازها) می‌شود. بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر و همچنین مطالب گزارش شده در تحقیقات مشابه قبلی مصرف بهینه شده اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات در افزایش توانمندی آنتی اکسیدانی عصاره کالوس موثر بوده و می‌توان از آنها به عنوان تیمار همراه در محیط کشت بهینه شده استفاده کرد.

نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر نشان داد که متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به عنوان ترکیبات فیتوهورمونی مهم در اکثر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس کنگرفرنگی نقشی موثر ایفا می‌کنند. طبق نتایج حاصله تغییرات فعالیت آنزیم PAL و محتوای ترکیبات فنیل پروپانوئیدی تحت تاثیر نسبت‌های مختلف محرک قرار داشته و نسبت به هم همبستگی مثبتی نشان دادند. نتایج بدست آمده بیانگر نقش مستقیم PAL در تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی است. در واقع گیاه برای مقابله با تنش‌های اعمال شده یکسری از راه‌کارهای دفاعی را فعال می‌سازد که نتیجه آن تولید متابولیت‌های ثانویه است. تحت تاثیر تیمار ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات حداکثر تجمع فلاونوئید، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و محتوای آنتی اکسیدانی مشاهده شد. افزایش سطوح متیل جاسمونات از این مقدار،کاهش محتوای ترکیبات فلاونوئیدی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و میزان توان آنتی اکسیدانی را به همراه داشت. در نمونه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک نیز روند مشابهی مشاهده شد. همبستگی مثبت فعالیت آنزیم PAL و تجمع ترکیبات فلاونوئیدی بیانگر نقش کلیدی PAL در بیوسنتز ترکیبات فنلی در گیاه

کنگرفرنگی است. با توجه به نتایج بدست آمده بیان می‌شود که آنزیم PAL به عنوان اولین و مهم‌ترین آنزیم دخیل در تولید ترکیبات پلی‌فنلی تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده قرار داشته و با بهینه‌سازی غلظت الیستورها می‌توان به تغییر ترکیبات بیوشیمیایی در جهت حصول بیشتر به متابولیت‌های ثانویه کنگرفرنگی در شرایط درون شیشه‌ای دست یافت.

منابع

ابراهیم‌زاده، ح. و صبورا، ع. (۱۳۸۶). فیزیولوژی گیاهی. تایز و زایگر.ا (مولفئین) ترجمه هیئت مترجمین انجمن زیست شناسی ایران. نشرخانه زیست شناسی، ۷۸۰ ص.

شعبانی، ل. و احسان پور، ع. (۱۳۸۸). القا آنزیم‌های آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونویید در کشت در شیشه شیرین بیان(*Glycyrrhiza glabra* L.) با استفاده ازمتیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. مجله زیست شناسی ایران .۲۲(۴)، ۶۹۱-۷۰۳.

ضیایی، س. ع.، دست پاک، آ.، نقدی بادی، ح.، پورحسینی، ل.، همتی مقدم، ا. و غروی نایینی، م. (۱۳۸۳). مروری بر گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus*). فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۳، ۱۰-۱.

فهیمی، ح. (۱۳۸۷). تنظیم کننده‌های رشد گیاهی. ویراست ۲. تهران. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۱۴ ص.

مهربانی، ب.، ناظری، س و پیری، خ. (۱۳۹۱). بررسی میزان فنل کل در گیاه چای کوهی (*Stachys lavandulifolia avails*) از طریق کشت کالوس و امکان افزایش آن‌ها با استفاده از محرک ها. مجله بیوتکنولوژی گیاهی،۴ (۲)، ۷۷-۸۸.

AhmadiMoghadam, Y., Piri, K. H., Bahramnejad, B. and Habibi, P. (2013). Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea (*purslan). Bulletin on Environmental Pharmacology and Life Science, 2(6): 89-94.

Amzad Hossain, M., Salehuddin, S. M., Kabir, M. J., Rahman, S. M. M. and Vasantha Rupasinghe, H. P. (2009). Sinensetin, rutin 3-hydroxy-5, 6, 7, 4-tetramethoxy flavones and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. Food Chemistry, 113: 185-190.

Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, k., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2001). Effect of methyl jasmonate on Harpin induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured by-2 cells. Plant Cell Physiology, 24(2): 446-449.

Arion, W. J., Canfield, W. K., Ramos, F. C. and Schindler, P. W. (1997). Chlorogenic acid and hydroxyl nitrogen 2 aldehyde: new inhibitor of hepatic glucose 6-phosphatase. Archives of Biochemistry, 339(2): 315-322.

Babar Ali, M., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in. *panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Molecules, 12: 621-627.

Bagal, U. R., Leebensmack, J. H., Walter, L. and Wand Dean, J. F. D. (2012). The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. BMC Genomes, 13(3): 1471-2164.

Ceccarlli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C. and Giovannetti, M. (2010). Globe Artichoke as a functional food. Mediterranean Journal of Natural Metabolism, 3: 197-201.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Analisis, 10: 178-182.

Chen, H., Jones, A. D and Howe, G. A. (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling path way enhances the production of secondary metabolites in tomato. FEBS Letters, 580: 2540-25460.

Cho, H. Y., Son, S. Y., Rhee, H. S., Yoon, S. Y., Lee parsons, C. W and Park, J. M. (2008). Synergistic effects sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzo phenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtizia californica* suspension cultures. Biotechnology, 135: 117-122.

Creelman, A. R and Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant

Ruiz-may, E., Galaz- avalos, R. M and Loyala vargas, V. M. (2009). Differential secretion and accumulation of terpenindole alkaloids in hair roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. Modular Biology and Technology. 41: 278-285.

Santos- games, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B and Fernandes-ferreira, M. (2002). Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of Plant Physiology, 160: 1025-1032.

Saunders, J. A. and Mcclure, J. W. (1974). The suitability of a quantitive spectro photometric assay for phenyl alanine ammonia lyase activity inbarely, buckwheat and pea seedlings. Plant Physiology, 54: 412-413.

Schimoda, H., Kiyofumi, N., Norihisa, N., Tomoe, Y., Toshio, M., Hisashi, M and Masayuki, Y. (2003). Anti-hyper lipidemic sesquiterpenes and new sesqueterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus L*) structure requirement and mode of action. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13: 223-228.

Shabani, L., Ehsanpour, A. A. and Asghari Gand Emami, J. (2009). Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology, 56: 621-626.

Shimoda, K., Fujikawa, K., Yahara, K and Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthinon autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 40: 945-948.

Suan see, K., Bhatt, A and Laikeng, C. (2011). Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastomama labathricum* (Melastomaceae). Revista de Biologia Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 355-81.

Deng, F. (2005). Effect of glyphosate, chlor sulfuron and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimson weed (*Datura stramonium* L.). pesti cide. Biochemistry and Physiology, 82: 16-26.

Gonzata, Z., Aguilar,G. A., Tiznado-Hernandez, M. E., Zavaleta-Gatica, R and Martinez-tellez, M. A. (2004). Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313: 694-701.

Gundluch, H., Muller, 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 Sciences. USA, 98: 2389-2393

Hortog, M. G. I., Kromhout, D. and Aravanis, C. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Archives of International Medicine, 155: 381-386.

Jaber- vazdakis, N., Barres, M. L., Ravelo, A. G and Zarate, R. (2008). Effect of elicitors on tropane alkaloids and gene expression in *Atropa baetica* transgenic hairy roots. Journal of Natural Products, 71: 2026-2031.

Knekt, P., Jarvinen, R. and Seppanen, R. (1997). Dietry flavonoids and risk of lung cancer and other malignant neo plasms. American Journal of Epidemiology, 146: 223-230.

Muashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiology Plant, 15: 473-497.

Rice- evans, C. A., Miller, N. J and Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids Free Rad. Biology and Medicine, 20:933-956.

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. Journal of Agriculture Food Chemistry, 57: 5809-5850.

Wen, P. F., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. and Huang, W. D. (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Science, 169: 928-934.

Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y and Putalun, W. (2011). Methyl jasmonate elicitation enhances Glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflate* hairy roots cultures. Zetis Chrift Fur Natur Forschung, 66: 423-428. Tropical. (int). ISSN-0034-7744) 701, 59(2): 597-606.

Thanh, N. T., Murthy, H. N., Yu, K. W., Hahn, E. J and Peak, K. Y.(2005). Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-1 baloon type bubble bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology, 67: 197-201.

Trajtemberg, S. P.,Apstolo, N. M and Fernandez.G. (2006). Calluses of *Cynara cardunculus* var cardunculus cardoon (asteraceae): determination of cynarine and chlorogenic acid by auyomated high-performance capillary electrophoresis In vitro cellular developmental. Biology-Plant, 42: 537-537.