تغییرات ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مراحل مختلف رشد ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد

سارا عبدخانی[1]*، محمود سلوکی[2]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوی کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
*آدرس مکاتبه: سیستان بلوچستان، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی
صندوق‌پستی: ۹۸۶۱۳۳۵۸۵۶،
تلفن: ۰۹۱۲۸۰۱۳۸۵۹، نمابر: ۳۱۲۳۲۰۸۸ (۰۵۴)
پست الکترونیک: abdekhanisara@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۲ **تاریخ تصویب:** ۹۴/۸/۳۰

چکیده

مقدمه: ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاهی از خانواده نعناعیان است که دارای اسانس و ترکیبات فنلی با خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بوده و سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نیز می‌باشد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی امکان افزایش تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه را دارند.

هدف: ارزیابی تغییرات محتوی فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و سیستم آنتی‌اکسیدان در مراحل مختلف رشد ریحان تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بود.

روش بررسی: این تحقیق در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل به صورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل: تنظیم‌کننده‌های رشد (اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر و تیمار شاهد شامل آب دیونیزه) و مراحل رشد گیاهی (گیاهچه‌ای، پیش‌گلدهی و گلدهی) بودند.

نتایج: نتایج نشان از اثرات مثبت و معنی‌دار تنظیم‌کننده‌های رشد و مراحل رشد بر محتوی فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشت. به طوری که بیشترین مقادیر برای محتوی فنل کل و فلاونوئید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسید جاسمونیک و جیبرلیک نسبت به نمونه شاهد و در مرحله گلدهی حاصل شد. محتوی آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز به طور قابل توجه‌ای در تیمار اسید سالیسیلیک و اسید جیبرلیک نسبت به شاهد در مرحله گلدهی افزایش معنی‌داری نشان داد ($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: افزایش محتوی فنلی، فلاونوئیدی، آنتوسیانین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نتیجه اعمال تنش اکسیداتیو حاصل از جذب این تنظیم‌کننده‌های رشد، فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان و نقش کلیدی آنزیم PAL در بیوسنتز ترکیبات فنلی در گیاه ریحان است.

گل‌واژگان: آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، تنظیم‌کننده رشد، فلاونوئید، محتوی فنل

مقدمه

استفاده از الیستورها (محرک‌های تولید متابولیت‌های ثانویه) روش مناسبی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه است. این ترکیبات نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند [۱]. متابولیت‌های ثانوی گروه متنوعی از مولکول‌هایی هستند که به سازگار شدن گیاه بخصوص در شرایط تنش‌های محیطی کمک می‌کنند. از جمله این ترکیبات فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشند که علاوه بر نقش‌های ساختاری در بافت‌های محافظ، نقش آنها در جذب حشرات گرده‌افشان، به عنوان سیگنال‌های ملکولی در برهمکنش گیاهان با محیط به اثبات رسیده است. همزمان با بیوسنتز فلاونوئیدها، ترکیبات متنوع دیگری از قبیل فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، آنتوسیانین‌ها بواسطه فعالیت آنزیم‌های مسیر سنتز می‌شوند [۲]. بیشتر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های درگیر در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانوی شناسایی و تعیین توالی شده‌اند [۳]. نقش ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آنهاست که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه‌کننده دارند [۴]. هورمون‌های گیاهی مانند اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات و غیره از محرک‌ها طبیعی بی‌خطری هستند که به عنوان ترکیبات محرک تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق القای تنش کاذب عمل می‌نمایند [۶، ۵].

جیبرلین‌ها متعلق به گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی به نام ترپنوئیدها (مثل کاروتنوئیدها) می‌باشند و از طریق مسیر اسید موالونیک در ساقه‌های با رشد سریع و بذرهای تکامل یافته تولید می‌شوند. جیبرلین‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی زیادی مانند: رشد ساقه، گلدهی، جوانه‌زنی بذر، رکود ظهور اندام‌های جنسی، پیری، پارتنوکارپی، تشکیل میوه و رشد دخالت دارند [۷]. کاربرد اسید جیبرلیک و EDTA و فلز سنگین سرب در گیاه یونجه باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌آکسیدان شده است [۸].

جاسمونات‌ها و استر متیل آنها گروهی از هورمون‌های درون‌زای گیاهی و از مشتقات اسید لینولینیک محسوب می‌شوند که از طریق مسیر بیوسنتزی اکتادکانوئید سنتز می‌شوند [۹]. جاسمونات‌ها نقش کلیدی در واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی داشته و سبب تجمع برخی از پروتئین‌های درون سلولی موسوم به IIPS (پروتئین‌های غشای تیلاکوئید) شده که این پروتئین‌ها به پروتئین‌های حاصله از تنش‌های اسید آبسزیک و NaCl بسیار شبیه است [۱۰]. علاوه بر این قابلیت این ترکیبات در افزایش میزان بیان ژن‌های خاص گیاهی که در هنگام واکنش گیاه به ایجاد زخم صورت می‌پذیرد اثبات شده است [۱۱]. جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیام رسان کلیدی در فرآیند القاء که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود معرفی شده‌اند [۱۲]. اثر متیل جاسمونات بر مقدار آنتوسیانین در غده سیب‌زمینی گزارش شده است [۱۳]. همچنین کاربرد متیل جاسمونات بر محتوی آنتوسیانین در سلول‌های اپیدرمی برگ‌های گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) بررسی شده است [۱۴].

اسید سالیسیلیک از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت تأثیر قرار داده و تغییراتی را در ریخت‌شناسی برگ و ساختار کلروفیل ایجاد می‌کند [۱۰] و اسید سالیسیلیک سیستم دفاعی گیاه را از طریق القای رونویسی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. تأثیر اسید سالیسیلیک بر میزان فلاونوئیدها، آنتوسیانین در بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) بررسی شده است [۱۵]. در کشت درون شیشه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiz glabra* L.) القای آنزیم‌های آنتی‌آکسیدانت، ترکیبات فنولیکی و فلاونوئید با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک گزارش شده است [۱۶]. اثر متقابل اتیلن و سالیسیلیک بر القای تنش اکسیداتیو و مکانیسم‌های مقاومت به آن در گیاهان کلزا (*Brassica napus* L.) مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۷].

ریحان همانند سایر گیاهان خانواده نعناع منبع ترکیبات حلقوی و اسانس است که دافع حشرات بوده و عملکرد ضدانگلی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی دارد [۱۸]. فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و دی‌ترپن‌ها متابولیت‌های ثانویه موجود در این گیاه هستند. این ترکیبات باعث ایجاد رنگ، طعم و ویژگی‌های فیزیولوژیکی خاصی در گیاهان می‌شوند و

از گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی بخصوص علف‌کش‌ها محافظت می‌کنند [۱۹].

تصور می‌شود که استفاده خارجی از اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات می‌تواند به عنوان یک عامل استرس‌زا مؤثر باشد و سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردند که برآیند همه این فعالیت‌ها مقاومت به تنش است [۱۰]. این ترکیبات بخشی از راه کار دفاعی گیاه در برابر تنش محسوب می‌شوند و همچنین فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) آنزیم اصلی در اتصال مسیر سنتزی اسیدهای آمینه آروماتیک و ترکیبات فنلی است. فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر مرحله رشد، اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک افزایش داشته است [۲۲-۲۰] این پژوهش با هدف بررسی استفاده خارجی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک با غلظت (۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر) بر تغییرات محتوی فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و سیستم آنتی‌اکسیدان در مراحل مختلف رشد (گیاهچه‌ی، پیش گلدهی، گلدهی) ریحان انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت ریحان و نمونه‌برداری

این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور، یکی تنظیم‌کننده‌های رشد (اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک در غلظت ثابت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر و تیمار شاهد شامل آب دیونیزه) و دیگری مراحل رشد گیاهی (گیاهچه‌ای، پیش گلدهی و گلدهی) با طرح پایه کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۲ در مرکز زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد. بذرهای ریحان سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و در گلدان‌های پلاستیکی (با ابعاد ۱۵×۲۰ سانتی‌متر) محتوی خاک تقریباً سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاه خاک و کود حیوانی به نسبت ۱:۱ کشت شد و سپس به گلخانه کنترل شده با شرایط محیطی یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۳۵ تا ۴۰ هزار لوکس تا انتهای مرحله گلدهی رشد منتقل و هر دو روز یکبار آبیاری شدند و هفته‌ای ۲ بار به آنها به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند داده شد. مقدار لازم از اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک وزن شد و در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل گردید. سپس به حجم رسانده شد. محلول پاشی مرحله گیاهچه‌ای اندام‌های هوایی ریحان ۶۰ روز پس از کشت در دو نوبت صبح و عصر به طوری که برگ‌ها کاملاً خیس شود، انجام شد و اندام‌های هوایی ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار برای سنجش پارامترهای موردنظر برداشت شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تیماردهی اندام‌های هوایی ریحان در مرحله پیش گلدهی ۱۰۰ روز پس از کشت و همچنین گیاهان مرحله گلدهی ۱۳۰ روز پس از کشت در دو نوبت صبح و عصر به طوری که برگ‌ها کاملاً خیس شود، انجام شد و اندام‌های هوایی ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار برای سنجش پارامترهای مورد نظر برداشت شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری محتوی فنل کل

برای اندازه محتوی ترکیبات فنل کل از روشی به شرح زیر استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از برگ تر گیاه را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و به مدت ۷۲ - ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به یک میلی‌لیتر از محلول رویی یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه شد و با آب مقطر دوبار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت ترکیبات فنلی کل بر حسب mg/gfw محاسبه شد [۲۳].

رسم منحنی استاندارد

غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید گالیک تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از غلظت‌های ذکر شده را در لوله آزمایش ریخته و بقیه مراحل طبق نمونه‌های مجهول انجام شد و جذب هر نمونه در طول

موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد [۲۳].

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئیدی

برای این منظور مقدار ۰/۱ گرم از برگ گیاهچه‌های تیمار شده با تنظیم‌کننده‌های مختلف در اتانول اسیدی (شامل اتانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) خوب ساییده، عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس میزان جذب عصاره در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد و ضریب خاموشی ε =۳۳۰۰$mM^{-1}cm^{-1}$ جهت محاسبه محتوی فلاونوئیدی مورد استفاده قرار گرفت و بر حسب µM/gfw گزارش شد [۲۴].

اندازه‌گیری محتوی آنتوسیانین

برای این منظور مقدار ۰/۲ گرم برگ در متانول اسیدی (شامل متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) ساییده، عصاره حاصل به مدت ۱۵ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و دمای آزمایشگاه قرار داده شد، میزان جذب نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای آنتوسیانین ضریب خاموشی ε =۳۳۰۰$mM^{-1}cm^{-1}$ و محتوی آنتوسیانین بر حسب µM/gfw گزارش شد [۲۵].

عصاره‌گیری و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مقدار نیم گرم از بافت تر در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵) حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) یک درصد، EDTA ۱ میلی‌مولار و فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) سائیده شد. محلول همگن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از محلول رویی (عصاره آنزیمی) برای مطالعه فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد [۲۶].

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم۵۰ میلی‌مولار (pH=۶)، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، H_2O_2 ۰/۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ε=۲/۸m $M^{-1}cm^{-1}$ و فرمول $A=\varepsilon bc$ محاسبه شد. A= جذب خوانده شده، ε= ضریب خاموشی، c= غلظت H_2O_2 و b= طول کوت می‌باشد [۲۷].

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، H_2O_2 ۲۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ nm انجام شد. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ε=۳۶$M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد [۲۸].

سنجش فعالت آنزیم گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، گایاکول ۵ میلی‌مولار، H_2O_2 ۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالت آنزیم پراکسیداز با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکول تشکیل شده از گایاکول در مدت زمان ۳ دقیقه در طول موج ۴۷۰ nm انجام گرفت. ضریب خاموشی تتراگایاکل ε= ۲۶/۶ m $M^{-1}cm^{-1}$ می‌باشد [۲۷].

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار مستقل و در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS v9 توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan test) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان

P ≤۰/۰۵ تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد (SE) گزارش شدند.

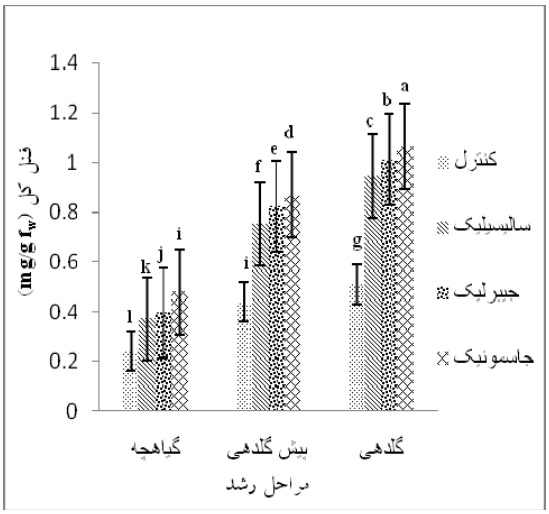
نتایج

اندازه‌گیری محتوی فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوی فنل کل در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که محتوی فنل کل در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل شماره ۱). بیشترین محتوی فنل کل در تیمار اسید جاسمونیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۲/۰۸ برابر افزایش نشان داد. و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). همچنین محتوی فنل کل در تیمار جیبرلیک با ۱/۹۸ و سالیسیلیک با ۱/۸۴ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل شماره ۱).

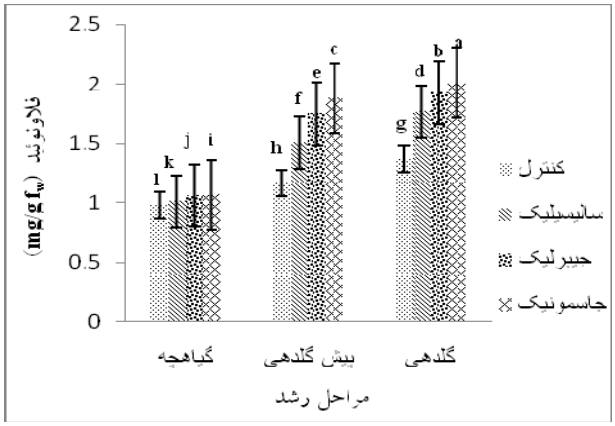
نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فلاونوئید کل در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که مقدار ترکیبات فلاونوئید کل در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل شماره ۲). بیشترین مقدار فلاونوئید کل برای هورمون اسید جاسمونیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۴۶ برابر افزایش نشان داد. و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). همچنین محتوی فلاونوئید در تیمار جیبرلیک با ۱/۴۰ و سالیسیلیک با ۱/۲۹ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل شماره ۲).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوی آنتوسیانین در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که محتوی آنتوسیانین در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل شماره ۳). بیشترین مقدار محتوی آنتوسیانین برای هورمون اسید سالیسیلیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۵۲ برابر افزایش نشان داد. و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). همچنین محتوی آنتوسیانین در تیمار جیبرلیک با ۱/۱۸ و جاسمونیک با ۱/۰۴ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل شماره ۳).

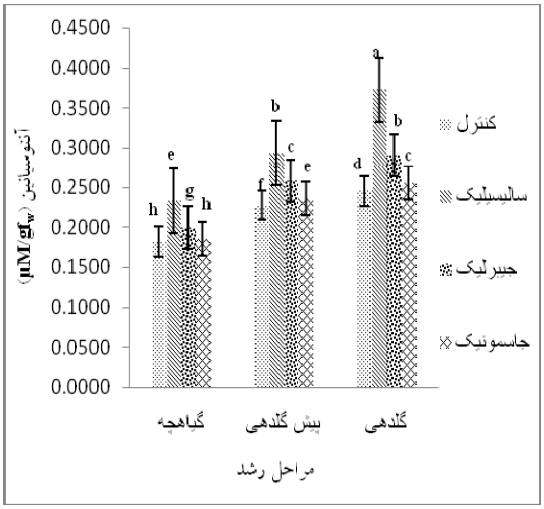


شکل شماره ۱- بررسی محتوای فنل کل در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تنظیم‌کننده‌های رشد جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک اسید.

تکرار مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد **(SE)** می‌باشند حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) می‌باشد.



شکل شماره ۲- بررسی محتوی فلاونویید در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تنظیم‌کننده‌های رشد اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک. تکرار مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشند حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) می‌باشد.



شکل شماره ۳- بررسی محتوی آنتوسیانین در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تنظیم‌کننده‌های رشد اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک. تکرار مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشند حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

آسکوربات پراکسیداز

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که فعالیت این آنزیم در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل شماره ۴). بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برای هورمون اسید سالیسیلیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۷۴ برابر افزایش نشان داد. و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). همچنین فعالیت آنزیم در تیمار اسید جیبرلیک با ۱/۲۰ و جاسمونیک با ۱/۱۱ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل شماره ۴).

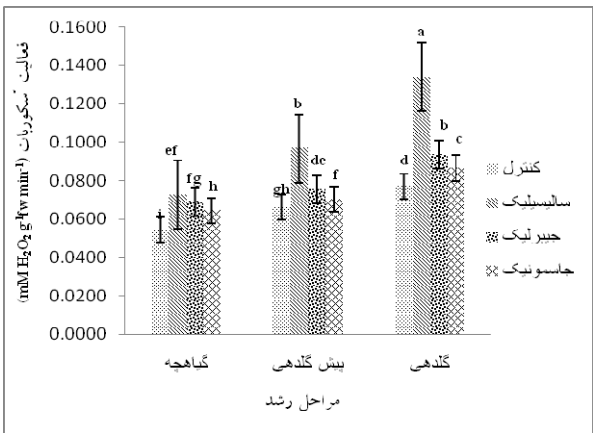
کاتالاز

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که فعالیت

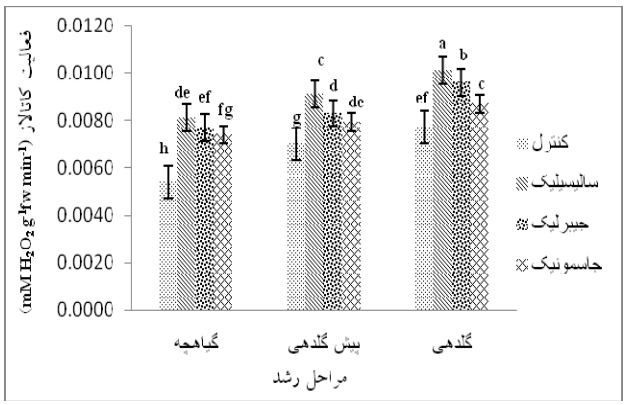
این آنزیم در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل شماره ۵). بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز برای هورمون اسید سالیسیلیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۳۱ برابر افزایش نشان داد. و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار اسید جیبرلیک با ۱/۲۸ و جاسمونیک با ۱/۱۲ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل شماره ۵).

گایاکول پراکسیداز

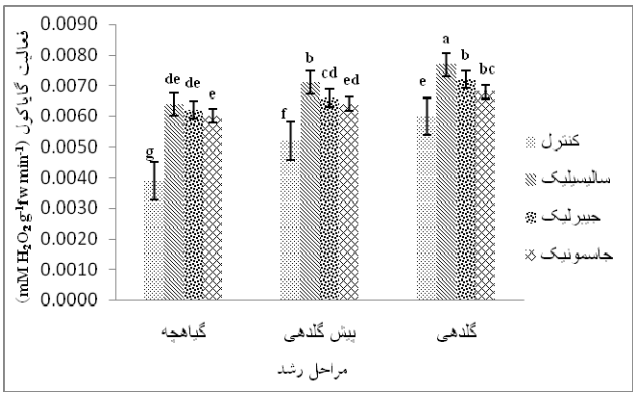
نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که فعالیت این آنزیم در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل شماره ۶). بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برای هورمون اسید سالیسیلیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۲۸ برابر افزایش نشان داد. و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (P≤۰/۰۵). همچنین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار جیبرلیک با ۱/۲۰ و جاسمونیک با ۱/۱ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل شماره ۶).



شکل شماره ۴- بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تنظیم‌کننده‌های رشد اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک. تکرار مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشند حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) می‌باشد.



شکل شماره ۵- بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تنظیم‌کننده‌های رشد اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک اسید. تکرار مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشند حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) می‌باشد.



شکل شماره ۶- بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تنظیم‌کننده‌های رشد اسید جیبرلیک، جاسمونیک و سالیسیلیک. تکرار مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد (SE) می‌باشند حروف غیرمشابه روی هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) می‌باشد.

بحث

گیاه ریحان طیف وسیعی از ترکیبات فنلی را تولید می‌کند و ترکیبات فنیل پروپانوییدی گیاهان باعث ایجاد رنگ، طعم و ویژگی‌های فیزیولوژیکی خاصی در گیاهان می‌شوند و از گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی بخصوص علف‌کش‌ها محافظت نموده و با جذب حشرات گرده افشان بقاء نسل گیاه را تضمین می‌کنند [۱۹]. فعالیت ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون- احیاء آنهاست که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه‌کننده دارد [۴]. در اکثر گونه‌های گیاهی مرحله کلیدی ساخت ترکیبات فنلی، تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک و به کمک آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) انجام می‌شود.

محرک یا الیسیتور اغلب عبارتند از ترکیبات ویژه‌ای که از طریق القای استرس کاذب سبب فعال شدن راهبرد دفاعی گیاه و در نتیجه تولید متابولیت ثانویه می‌شوند. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که افزودن اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات خارجی با اتصال به گیرنده‌های غشا سبب تولید اکسیژن‌های فعال، NO، پروتئین کینازها، اسید سالیسلیک و متیل جاسمونات می‌شود [۲۹]. با تأثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌شوند. در واقع متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سبب فعالسازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شوند [۳۰-۵].

بر اساس نتایج این تحقیق تغییرات محتوی فنل کل و فلاونوئید تحت تأثیر تیمار مراحل رشد گیاهی و تیمار اسید جاسمونیک، جیبرلیک و سالیسیلیک در غلظت ثابت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر قرار گرفت و بیشترین میزان محتوای فنل و فلاونوئید درتیمار مرحله گلدهی وتیمار اسید جاسمونیک و پس از آن تیمارهای جیبرلیک و سالیسیلیک نسبت به شاهد میزان فنل کل و فلاونوئید بیشتری حاصل شد. که این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران در بلوبری [۵]، گشنیز [۶]، گنگرفرنگی در شرایط درون شیشه‌ای [۲۱]، سیب [۳۱]، توت فرنگی [۳۲]، کشت بافت گیاه مریم گلی [۳۳]، گواوا [۳۴]، جوانه‌های بروکلی [۳۵] که میزان فنل کل و فلاونوئید با محلول پاشی اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات افزایش یافت، مطابقت دارد. همچنین بیشترین محتوی فنل کل با ۲/۰۸ و فلاونوئید با ۱/۴۶ واحد افزایش نسبت به شاهد در تیمار اسید جاسمونیک و در مرحله گلدهی حاصل شد که با نتایج پژوهش انجام شده روی غدد سیب زمینی [۱۳] که ترکیبات فنلی با محلول پاشی متیل جاسمونات تا حدود ۶۰ درصد افزایش و کشت درون شیشه ریشه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) [۱۶] تحت تیمارهای متیل جاسمونات و اسید سالیسیک ترکیبات فنولیک ۱/۴ واحد نسبت به شاهد افزایش داشت همسو است.

همچنین در پژوهش حاضر، هر دو تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد و مراحل رشد گیاهی، محتوی آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز را افزایش و تنش اکسیداتیو را القاء کردند. بیشترین میزان این صفات در مرحله گلدهی و در اسید سالیسیلیک حاصل شد که این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران در یونجه [۸]، سلول‌های اپیدرمی برگ‌های گیاهان آرابیدوپسیس [۱۴]، بابونه آلمانی [۱۵]، کشت درون شیشه شیرین‌بیان [۱۶]، هویج [۳۶]، گیاهان مختلف [۳۷]، گیاه باقلا سبز [۳۸]، ریشه آفتابگردان [۳۹] که میزان آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز با تیمارهای اسید جاسمونیک، جیبرلیک و سالیسیلیک افزایش یافت، مطابقت دارد. در این تحقیق بیشترین میزان آنتوسیانین با ۱/۵۱، آنزیم آسکوربات با ۱/۷۴، کاتالاز با ۱/۳۱ و گایاکول پراکسیداز با ۱/۲۸ واحد افزایش نسبت به شاهد در مرحله گلدهی و در تیمار اسید سالیسیلیک حاصل شد.

نتیجه‌گیری

ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی برای اهداف غذایی و درمانی دارای اهمیت‌اند. لذا هر عاملی که بتواند ضمن ایجاد کمترین تغییر در ساختار ژنتیکی گیاه تولید این ترکیبات را افزایش دهد با ارزش خواهد بود. با توجه که اینکه تیمارهای مراحل رشد و تنظیم‌کننده‌های رشد باعث افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در ریحان شد [۲۲] و نتایج تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد افزایش محتوی فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان ریحان تحت تیمار با تنظیم‌کننده‌های رشد احتمالاً به دلیل القای سنتز ROS ها و راه اندازی مسیرهای علامت‌رسان و درنتیجه فعال شدن ژن‌های درگیر در سیستم دفاعی می‌باشد.

منابع

1. Ahmadi Moghadam, Y, Piri KH, Bahramnejad B and Habibi P. Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (purslan). Bull. Env. Pharmacol. *Life. Science* 2013; 2: 6. 89 - 94.

2. Heller W and Forkmann G. Biosynthesis of flavonoids, in The Flavonoids: Advances in Research, Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London. 1986, pp: 499.

3. Ramawat KG and Merillon JM. Biotechnology;Secondary Metabolites. *J. Plant Science* 1999, 35: 561 - 6.

4. Javanmardi J; Khalighi A; Khashi A; Bais HP and Vivanco JM. Chemical characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J. Agricultural and Food Chem*. 2002; 50: 5878 - 83.

5. Wang K, Jin P, Cao S, Shang H, Yang Z and Zheng Y. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chines bay berries. *J. Agricultural and Food Chem*. 2009; 57: 5809 - 50.

6. Divya P, Puthusseri B and Neelwarne B. The effect of plant regulators on the concentration of caretonoids and phenolic compound in foliage of Coriander. *J. Food Science and Technol*. 2013; *http: //dx.doi/ .org/10. 1016/ j.lwt.* 110-20.

7. Rodway SJ, Gates DW and Brindle C. Control of early seedling growth in varietal lines of hexaplpid wheat (*Triticum aestivum*), durum wheat (*Triticum durum*), and barley (*Hrdeum vulgare*) in response to the phthalimide growth regulant, AC 94, 377″. *J. Pant Growth*. 1991; 10: 243-59.

8. Lopez M, Videa JP, Mchel HC, Martinez A and Gardea MD. Lead toxicity in alfalfa plants exposed

to phytohormones and ethylenediaminetetraacetic acid monitored by peroxidase, catalase, and amylase activities. *J. Environmental Toxicology and Chem*. 2007; 26: 2712 - 23.

9. Schaller F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J. Experimental Botany* 2001; 52: 11 - 23.

10. Popova L, Ananieva E, Hristova V, Christov K, Georgieva K, Alexieva V and Stoinova Zh. Salicylic Acid and Methyl Jasmonte induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulg. *J. Plant Physiol*. 2003; 133 - 52.

11. Staswick PE. Jasmonate, genes, and fragrant signals. *J. Plant Physiol*. 1992; 99: 807 - 892.

12. Yu KW, Gao W, Hahn EJ and Paek KY. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of C.A. Meyer. *J. Biochem*. 2002; 11: 211 - 5.

13. Reyes L and Cisneros-Zevallos F. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purplefles potatoes. *J. Agriculture and Food Chem*. 2003; 51: 5296 - 300.

14. Jung S. Effect of chlorophyll reduction in Arabidopsis thaliana by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *J. Plant Physiology and Biochem*. 2004; 42: 231 - 55.

15. Zarinkamar F, Abdollahzadeh Zaviehjak A, Sharifi M and Behmanesh M. Effect of salicylic acid on flavonoids, apigenin, anthocyanin and carbohydrate in *Matricaria chamomilla* L. *Iranian J. Plant Biol*. 2012; 17: 67 - 74. (In Persian).

16. Shabani L and Ehsanpour AA. Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. *Iranian J. Plant Biol*. 2009; 21 (3): 421 - 32. (In Persian).

17. Mazaheri tirani M, Kalantari KhM and Hasibi N. The study of the interactive effects of ethylene and salicylic acid on induction of oxidative stress and the mechanisms of tolerance in *Brassica napus* L. *J. Biol*. 2007; 21 (3): 421 -32. (In Persian).

18. Juliani HR, Simon JE, Ramboatiana, MMR, Behra O, Garvey A and Raskin I. Malagasy aromatic plants: essential oils, antioxidant and antimicrobial activities. XXVI International Horticultural Congress. *The Future for Medicinal and Aromatic Plants* 2002; 24: 641 - 50.

19. Boudet AM. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *J. Phytochem.* 2007; 68: 22 - 4.

20. Bagal UR, Leebens mack JH, Walter Lorenz W and Dean JFD. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. *BMC Genoms* 2012; 13 (3): 1471 - 2164.

21. Samadi S, Ghasemnezhad A and Alizadeh M. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. *J. Plant Prod Researchs* 2014; 21 (4): 135 - 48.

22. Abdekhani S, Solouki M and Shiri Y. The Effect of Different Growth Hormones on Gene Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) in *Ocimum basilicum* L. *J. Crop Biotech*. 2014, 8: 21 - 30. (In Persian).

23. Seevers DM, Daly JM and Catedral FF. The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. *J. Plant Physiol*. 1971, 48: 353 - 60.

24. Krizek DT, Kramer GF and Upadyaya A. Mirecki, R. M. UV-B response of cucumber seedling grown- under metal halide andhigh pressure sodium/deluxe lamps. *J. Plant Physiol*. 1993; 88: 350 - 8.

25. Masukasu H, Karin O and Kyoto H. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science* 2003; 164 (2): 259 - 65.

26. Gong Y, Toivonen PM, Lau OL and Wiersma AP. Antioxidant system level in "Braeburn" apple is related in its browning disorder. *J. Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 2001; 42: 259 - 64.

27. Nakano Y and Asada K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *J. Plant Cell Physiol*. 1987; 28: 131 - 40.

28. Beers RF and Sizer I. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen by catalase. *J. Biochemistry*. 1952, 195: 133-40.

29. Raman V and Ravi S. Effect of Salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of heamatococcus pluvialis. *Acta Physiol Plant*. 2011; 33: 1043 - 49.

30. Wen PF, Chen JY, Kong WF, Pan QH, Wan SB and Huang WD. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci*. 2005; 169: 928 - 34.

31. Rudell DR and Matteis JP. Methyl Jasmonate enhances antocyanin accumulation and modifies production of phenolics and pigments in fuji apples. *J. Horticulturae Sci*. 2002; 127: 435 - 41.

32. Ayala-Zavala JF, Wang SY, Wang CY and Gonzalez-Aguilar GA. Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, Volatile Compounds and Post Harvest life of straw berry fruit. Eur. *Food Res. Technol*. 2005; 221: 731-8.

33. Dong J, Wan G and Liang Z. Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in Salvia miltorrhiza cell culture. *J. Biotech*. 2010; 148: 99 - 104.

34. Gonzalez-Aguilar G, Tiznado-Hernandez ME and Zavaleta-Gaticar Martinez-Tellez MA. Methyljasmonat treatment reduce chilling injury and activate the defence of guava fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 313: 694 - 701.

35. Barrientos Carvacho H, Pérez C, Zúñiga G and Mahn A. Effect of methyl jasmonate, sodium selenate and chitosan as exogenous elicitors on the phenolic compounds profile of broccoli sprouts. *J. the Science of Food and Agriculture* 2014; 63 (1): 20 - 31.

36. Sudha G and Ravishankar GA. Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *J. Current Sci*. 2003; 85: 1212 - 17.

37. Chong TM, Abdullah MA, Fadzillah, NM, Lai OM and Lajis NH. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *J. Enzyme and Microbial Technol*. 2005; 36: 469 - 77.

38. Ozawa R, Bertea CM, Foti M, Narayana R, Arimura GI, Muroi A, Horiuchi JI and Nishioka T. Exogenous Polyamines Elicit Herbivore-Induced Volatiles in Lima Bean Leaves: Involvement of

Calcium, H_2O_2 and Jasmonic Acid. *J. Plant Cell Physiol*. 2009; 50 (12): 2183 - 99.

39. Lobato MC, Garcia NF and Olmos E. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 2009; 66: 7-9.