



به زراعی کشاورزی

دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵

صفحه‌های ۱۱۵-۱۰۳

تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوی پروتئین کل ریحان

ابراهیم بروکی میلان^۱، لیلا حسنی^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}، رضا درویش‌زاده^۳، فاطمه خردمند^۴، عباس حسنی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲. دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳. استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۴. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰

چکیده

به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) بر فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز، فنیل‌آلانیل-آمونیا لیاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و میزان پروتئین کل در ریحان، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه ارومیه، در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. میزان فعالیت آنزیم‌ها صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی متیل جاسمونات بر برگ‌های گیاهان سالم در مرحله گلدهی کامل اندازه‌گیری شد. تجزیه آماری داده‌ها با در نظر گرفتن غلظت متیل جاسمونات به عنوان عامل اصلی و زمان بعد از محلول‌پاشی به عنوان عامل فرعی به صورت طرح اسپلیت پلات در زمان انجام گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز و گایاکول پراکسیداز به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌مولار و ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی می‌باشد. اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز و پروتئین کل معنی‌دار بود ($P \leq 0/01$). براساس نتایج مقایسات میانگین، غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پروتئین کل داشت. فعالیت آنزیم کاتالاز در زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P \leq 0/05$)، به‌طوری‌که ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی میزان فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌داری داشت. بنابراین، می‌توان بیان نمود که کاربرد متیل جاسمونات با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پروتئین کل مؤثر است.

کلیدواژه‌ها: آسکوربات پراکسیداز، ریحان، فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، گلدهی کامل

۱. مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) به راسته لامیالها^۱ و تیره نعناعیان تعلق دارد و به عنوان گیاه دارویی، ادویه‌ای و همچنین به صورت سبزی تازه مورد استفاده قرار می‌گیرد. مواد مؤثره پیکره رویشی این گیاه برای معالجه نفخ شکم و بی‌اشتهایی، کمک به هضم غذا و همچنین برای درمان برخی ناراحتی‌های قلبی استفاده می‌شود. اسانس ریحان خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی داشته و کنترل‌کننده حشرات نیز می‌باشد. همچنین، اسانس آن در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و عطرسازی کاربردهای فراوانی دارد [۲۲]. ریحان در میان گیاهان معطر به خاطر حضور ترکیبات فنیل پروپانوییدی نظیر استراگول، اوژنول و مشتقاتشان یا ترپنوئیدهایی مانند مونوترپن الکل لینالول، متیل سینامات و لیمونن از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است [۲۸]. بزرگترین محل تجارت اسیموم باسیلیکوم ایالات متحده، ژاپن و کشورهای اروپایی می‌باشد [۱۸].

هرگاه مسیر اصلی انتقال الکترون در مواجهه گیاه با تنش‌های محیطی مسدود گردد، انتقال الکترون در مسیر فرعی جریان یافته و سبب احیای ناقص اکسیژن و تولید انواع اکسیژن فعال می‌گردد. انواع اکسیژن فعال برخلاف اکسیژن اتمسفری از میل ترکیبی بسیار زیادی جهت واکنش با تمامی بیومولکول‌های حیاتی سلول برخوردارند [۱].

سلول‌های گیاهی جهت مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال از یک سری مکانیسم‌های دفاعی بهره می‌برند که آنها را قادر می‌سازد تا با جمع‌آوری کامل انواع اکسیژن فعال و احیای آنها به آب از آسیب به بیومولکول‌های حیاتی پیش‌گیری نمایند. مکانیسم‌های دفاعی سلول از آنتی‌اکسیدان‌ها (نظیر اسکوربات، گلوکاتیون، کاروتنوئیدها) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (نظیر، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز) تشکیل شده است [۵].

محرك‌ها، ترکیباتی با منشاء زیستی (پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها) و غیرزیستی (سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات) هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوستز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند [۲۸]. متیل جاسمونات به عنوان یک محرك می‌تواند تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را در گیاهان القاء کند. یک ویژگی تقریباً بی‌نظیر پاسخ‌های گیاهی به پاتوژن‌های ناسازگار یا محرك‌ها، فعال‌سازی متابولیسم فنیل پروپانوییدی می‌باشد که در آن فنیل آلانین آمونیالیاز^۲، اولین مرحله از مسیرهای کلیدی متابولیسم تولید فنیل پروپانویید را کاتالیز می‌کند. مسیرهای فرعی منجر به سنتز ترکیباتی می‌شود که عملکردهای متفاوتی در گیاهان دارند، به‌ویژه در دفاع نظیر تقویت و ترمیم دیواره سلولی، فعالیت ضد میکروبی و به عنوان ترکیبات پیام‌رسان مانند سالیسیلیک اسید عمل می‌کنند [۱۶]. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در اثر دامیناسیون به اسید ترانس سینامیک تبدیل می‌شود و سپس توسط سینامات ۴-هیدروکسیلاز، اسید p-کوماریک ایجاد می‌شود، اسید p-کوماریک طی مراحل به چاویکول و اوژنول تبدیل می‌شود که از اجزای تشکیل‌دهنده اسانس ریحان محسوب می‌شود. در حال حاضر، مطالعات وسیعی روی سیستم‌های دفاع ضد اکسند در زمان پیری و شرایط نامساعد محیطی صورت گرفته است، اما نتایج حاصل متفاوت می‌باشد. لذا فعالیت تعدادی از ضد اکسندها در بعضی از گونه‌ها کاهش می‌یابد، فعالیت همان ضد اکسندها در گونه‌های دیگر افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی می‌ماند. تیمار با متیل جاسمونات باعث تسریع تجمع هیدروژن پراکسید^۳ در برگ‌های گوجه‌فرنگی می‌شود [۲۵]. جاسمونیک اسید و مشتقات و پیش‌سازهای آن تحت عنوان جاسمونات‌ها شناخته می‌شوند. در دهه ۱۹۶۰،

2. Phenylalanine ammonia lyase
3. Hydrogen peroxide

1. Lamiales

مواد و روشها

کشت گیاه و تیمار متیل جاسمونات

به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، فینیل آلانین آمونیالیزاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و میزان پروتئین کل در رقم 'کشکنی لولوی'^۴ ریحان (اسیموم باسیلیکوم) و بررسی فعالیت آنزیم‌ها در زمان‌های مختلف بعد از محلول‌پاشی، آزمایشی گلدانی به صورت طرح اسپلینت پلات در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار، در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، در تابستان سال ۱۳۹۲ اجرا گردید. گلدان‌های مورد استفاده از نوع پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر بودند. در کف گلدان‌ها به مقدار مساوی از شن درشت (جهت انجام زهکشی) ریخته شد و از سوراخ بودن ته گلدان اطمینان حاصل شد. سپس گلدان‌ها با نسبت دو نسبت خاک مزرعه الک شده، یک نسبت ماسه و یک نسبت گیاخاک پر شد. پس از یک آبیاری سطحی با اسپری که به منظور مرطوب شدن سطح خاک بود، تعداد ۲۰ تا ۳۰ سوراخ در سطح خاک ایجاد شد و بذرها در عمق یک سانتی‌متری فرو برده شد و پس از کشت، آبیاری انجام شد. تا زمان جوانه‌زنی، گلدان‌ها هر روز آبیاری می‌شدند و پس از جوانه‌زنی هر دو روز یک بار آبیاری انجام گرفت. دمای روزانه گلخانه ۲۵ تا ۳۰ و دمای شبانه ۲۰ تا ۲۵ و فشار حدود ۸۳۰ پاسکال و شدت نور ۸۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ لوکس بود. پس از سبز شدن، بوته‌ها در طی چند مرحله تنک گردیده و نهایتاً در داخل هر گلدان هفت بوته نگهداری شد.

۴۵ روز پس از رشد، هنگامی که گیاهان به مرحله گلدهی کامل رسیدند، سه غلظت از متیل جاسمونات (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) به‌طور جداگانه در بطری یک

جاسمونات به عنوان متابولیت‌های ثانویه در اسانس گیاه گل یاس (گونه‌ای از جنس جاسمین)^۱ شناسایی شد. متیل جاسمونات با فرمول شیمیایی $C_{13}H_{20}O_3$ به صورت مایعی بی‌رنگ می‌باشد که به عنوان یکی از هورمون‌های گیاهی در تنظیم بیان ژن، تنظیم مسیر متابولیت‌ها، ایجاد پاسخ‌های دفاعی و تولیدمثل مؤثر می‌باشند [۲۷].

در بررسی گیاه موریندا الیپتیکا^۲ در اثر تیمار با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار، فعالیت آنزیم کاتالاز بعد از یک روز افزایش و سه و شش روز بعد کاهش یافت، درحالی‌که فعالیت آسکوربات پراکسیداز روز اول بعد از محلول‌پاشی تغییر زیادی نشان نداد، ولی در روز سوم افزایش و در روز ششم فعالیت این آنزیم کاهش نشان داد. در گزارشی دیگر، در همین گیاه غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات تا روز سوم میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داد [۲۷]. همچنین، تیمار با متیل جاسمونات با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه پیوراریا میریفیکا^۳، فعالیت آنزیم کاتالاز را در روز سوم بعد از محلول‌پاشی به حداکثر میزان آن رساند [۲۹]. متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه آرابیدوپسیس، کلزا و بادام زمینی مؤثر بوده است [۵]. از آنجایی‌که تحقیقات اندکی در رابطه با نقش متیل جاسمونات‌ها به عنوان القاءکننده مقاومت و فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پروتئین کل در ریحان انجام شده است و متیل جاسمونات به عنوان یک مولکول حیاتی در گیاهان، بسیاری از واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه را تغییر می‌دهد. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پروتئین کل در زمان‌های مختلف بعد از محلول‌پاشی در گیاه ریحان می‌باشد.

1. *Jusmin Sp.*
2. *Morinda elliptica*
3. *Pueraria mirifica*

4. Keshkeni luvelou

لیتری تهیه شد. تقریباً هر بطری یک لیتری برای محلول پاشی ۸ گلدان استفاده شد. محلول های تهیه شده به صورت اسپری بر روی برگ های گیاهان پاشیده شد، به طوری که کل بوته به محلول آغشته شد. برای محلول پاشی شاهد از آب دو بار تقطیر استفاده شد. نمونه برداری از برگ های انتهایی و جوان، در ۴ زمان صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی انجام گرفت و نمونه ها به دمای ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد [۲۷ و ۲۹].

سنجش میزان پروتئین کل

تعیین میزان پروتئین محلول با روش برادفورد انجام گردید [۱۰]. به منظور تهیه محلول استاندارد از آلبومین سرم گاوی استفاده شد و میزان جذب نمونه ها و محلول های استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان پروتئین خام پس از رسم منحنی استاندارد به دست آمده و به صورت میلی گرم درصد گرم وزن تر بیان گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم ها

برای تهیه عصاره گیاهی از روش کنگ و سالتیویت^۱ با اندکی تغییرات استفاده شد [۱۹]. از سه میلی لیتر بافر شامل (بافر تریس-اسید هیدروکلریک ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۷/۵، کلرید منیزیم سه میلی مولار و EDTA یک میلی مولار) و ۰/۵ گرم بافت برگ استفاده شد و هموژنات ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاصله به عنوان عصاره خام برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT; EC: 1.11.1.6) با

استفاده از روش آدیزل^۲ انجام گرفت [۶]. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷)، ۰/۲ میلی لیتر هیدروژن پراکسید یک درصد و ۰/۳ میلی لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی ۴۳/۶ میلی مولار بر سانتی متر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (1.14.18.1 : PPO;EC) با استفاده از روش اوپدهیا^۳ با اندکی تغییرات انجام شد [۳۰]. یک گرم از بافت تر برگ به همراه ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸/۶ در هاون سرد ساییده شد. هموژنات حاصل با استفاده از پارچه نظیف چهار لایه صاف و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد و در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس عصاره استخراج شده برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط سنجش فعالیت آنزیم محتوی ۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات با اسیدیته ۸/۶، یک میلی لیتر کافئیک اسید ۲۰ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر عصاره استخراج شده بود. جذب نمونه ها پس از اضافه کردن عصاره طی یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم ضریب خاموشی ۲۴/۹ میلی مولار بر سانتی متر در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (4.3.1.5: PAL;EC) با استفاده از روش کار و میشر^۴ با اندکی تغییرات انجام شد [۲۰]. دو گرم از نمونه های برگ به همراه هشت میلی لیتر بافر بورات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۸/۵، محتوی پنج میلی مولار بتا مرکاپتواتانول و پلی وینیل پیرولیدین دو درصد در هاون سرد ساییده شد. هموژنات

2. Adigzel
3. Upadhya
4. Kar and Mishra

1. Saltiveit and Kang

تجزیه داده‌ها

برای آنالیز داده‌ها غلظت متیل جاسمونات به عنوان فاکتور اصلی و زمان پس از محلول‌پاشی به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. بنابراین، تجزیه داده‌ها براساس طرح اسپلیت پلات در زمان انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده‌ها و اشتباهات مدل با استفاده از نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۴) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن، در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل غلظت در زمان بر میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلایز و گایاکول پراکسیداز معنی‌دار و بر سایر صفات معنی‌دار نیست (جدول ۱). اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز و پروتئین کل معنی‌دار بود. اثر زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار ($P \leq 0.05$) و بر سایر صفات تأثیر معنی‌داری نداشت.

در گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات، میزان پروتئین کل افزایش یافت. به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها وجود داشت. بیشترین میزان پروتئین کل در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات مشاهده شد (شکل ۱). افزایش میزان پروتئین کل ممکن است به خاطر تجمع پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به استرس یا تنش باشد، زیرا گیاه، متیل جاسمونات را به عنوان تنش یا استرس می‌شناسد و بسته به غلظت و اندازه تنش به آن پاسخ می‌دهد [۹].

حاصل با استفاده از پارچه نظیف چهار لایه صاف گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در ۱۰۰۰۰ دور سانتی‌فیوژ شد. سپس، عصاره استخراج شده برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. به پنج میلی‌لیتر از محلول رویی ۰/۵۵-L-فنیل آلانین ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و با تشکیل سینامیک اسید مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم با استفاده از تغییر جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی سینامیک اسید و برحسب میکرومولار ترنس سینامیک اسید در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

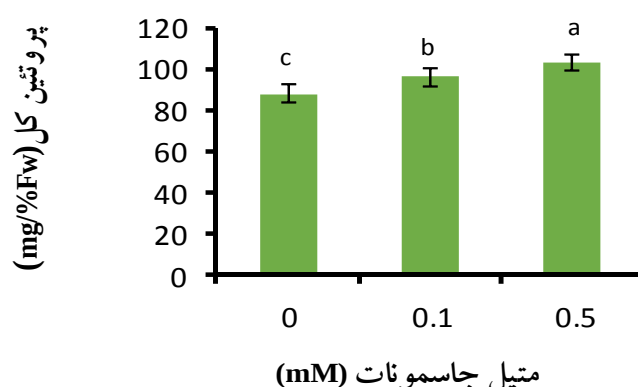
سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (ASC; EC: 1.11.1.11) با استفاده از روش آسادا و ناکانو^۱ انجام شد [۷]. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز ۲۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر بافر اسکوربات پراکسیداز، ۲۰۰ میکرولیتر کاتالاز و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی را در سل ریخته و میزان جذب طی مدت یک دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر محاسبه گردید. در این روش، ضریب خاموشی ۲/۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

برای بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (G-POX; EC 1.11.1.7) از روش آسادا استفاده شد [۸]. در این روش، از ۲۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول یک درصد، ۱۰۰ میکرولیتر کاتالاز یک درصد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی استفاده و میزان جذب در مدت یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر محاسبه شد. در این روش، ضریب خاموشی ۶/۲ میلی‌مولار بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات و زمان پس از محلول‌پاشی بر میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریحان

منبع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین کل	کاتالاز	پلی فنل اکسیداز	فنیل آلانین آمونیا لیاز	آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز
غلظت	۲	۵/۰۴**	۲/۰۶**	۶۵/۰۲**	۵۵/۲۴**	۰/۱۶**	۱۰/۸۶**
اشتباه اصلی	۶	۰/۰۱۸۹	۰/۰۰۳۴	۰/۱۸۸	۰/۰۸۲	۰/۰۰۰۶	۰/۱۶۳
زمان	۳	۰/۱۹۶ ^{ns}	۰/۰۱۶۶*	۰/۰۷۲ ^{ns}	۰/۱۴۴ ^{ns}	۰/۰۰۰۹ ^{ns}	۰/۷۱**
غلظت × زمان	۶	۰/۱۵۶ ^{ns}	۰/۰۰۷ ^{ns}	۱/۰۶ ^{ns}	۰/۰۱۷۸**	۰/۰۰۰۸ ^{ns}	۰/۵۵**
اشتباه فرعی	۱۸	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۰۱۳	۰/۰۵۵	۰/۰۰۹۱	۰/۰۰۰۴	۰/۱۳۳
ضریب تغییرات (%)	-	۱/۴۸	۳/۲	۱۰/۳۵	۱/۶۱	۱۲/۳۴	۱۲/۸۱

ns و ** و *** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج درصد، یک درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های متیل جاسمونات بر میزان پروتئین کل در ریحان

(حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).

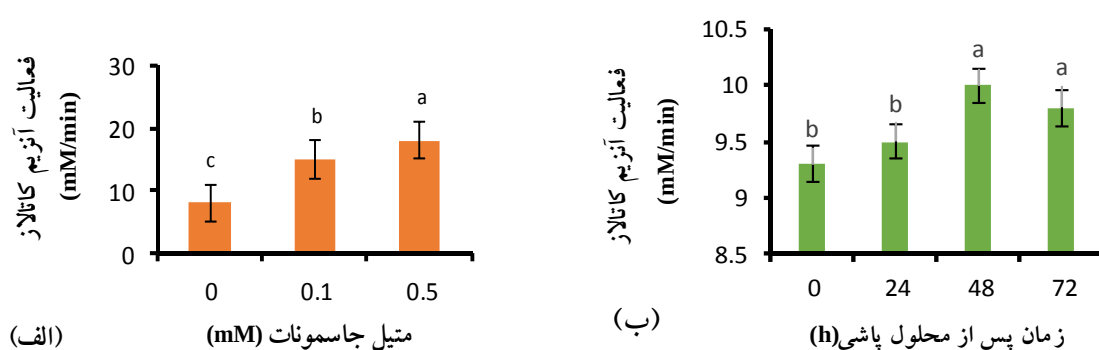
در سیستم دفاعی سلول باشد [۱۱]. بر طبق دیگر مطالعات، افزایش محتوای پروتئین به وسیله تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی نظیر متیل جاسمونات ممکن است به علت افزایش تشکیل شبکه آندوپلاسمی خشن باشد که محیط مناسبی را برای افزایش پلی‌ریبوزوم mRNA فراهم می‌کند [۲۱]. محلول‌پاشی با متیل جاسمونات فعالیت کاتالاز را نیز افزایش داد و بیشترین میزان فعالیت آن در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات مشاهده شد (شکل ۲ - الف)،

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت جزء پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش محسوب می‌شوند و افزایش غلظت آنها منجر به افزایش پروتئین کل می‌شود [۱۸]. در گیاه آگاستاکه تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱ و ۰/۱ میلی‌مولار بعد از ۲۴ ساعت محتوای پروتئین کل را نسبت به گیاه شاهد افزایش داد [۱]. همچنین افزایش محتوای پروتئین کل تحت تنش می‌تواند به علت افزایش سنتز بعضی آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و همچنین سنتز پروتئین‌های درگیر

تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوی پروتئین کل ریحان

بیشترین میزان فعالیت این آنزیم ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی بود (شکل ۲ - ب) که احتمالاً به خاطر بالا بودن میزان رادیکال‌های آزاد در گذر زمان، فعالیت آنزیم افزایش پیدا می‌کند. با اعمال تیمار متیل جاسمونات، میزان پراکسیداسیون غشاء افزایش یافته و رادیکال‌های آزاد زیاد می‌شوند [۴] و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، گیاه را از اثرات مضر آنها محفوظ نگه می‌دارد.

به‌طوری‌که در این غلظت میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به میزان ۴۳/۹ درصد نسبت به گیاه شاهد افزایش یافت. کاتالاز اولین آنزیم پاد اکساینده است که شناسایی شده است. آنزیم‌های کاتالاز به صورت هموترامریک هستند و باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شوند. کاتالازها به طور عمده در سیتوزول، میتوکندری و پراکسیزوم‌ها یافت می‌شوند [۱۲]. در تحقیق حاضر،

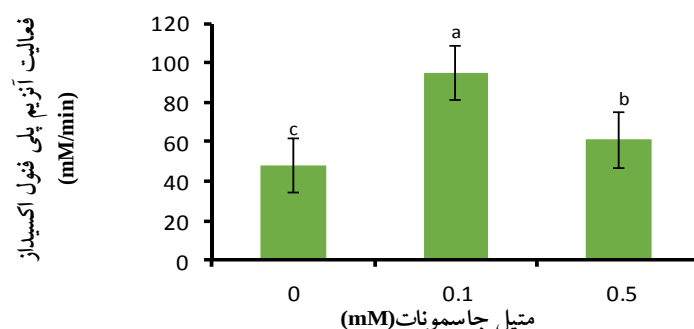


شکل ۲. الف: تأثیر غلظت‌های متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم کاتالاز

شکل ب: تأثیر زمان‌های مختلف پس از محلول‌پاشی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در ریحان (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.)

همه انواع مولکول‌های زیستی را مورد تهاجم قرار دهند [۱۳]. در گیاهچه‌های شیرین بیان، متیل جاسمونات با غلظت دو میلی‌مولار طی ۲۴ ساعت در اندام هوایی و غلظت یک و دو میلی‌مولار متیل جاسمونات در ۴۸ ساعت پس از تیمار در ریشه‌ها، فعالیت کاتالاز را افزایش می‌دهد [۴]. متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز اثر مثبت دارد و فعالیت آن را افزایش می‌دهد. بیشترین فعالیت این آنزیم، در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مشاهده شد و با افزایش غلظت، فعالیت آنزیم کاهش یافت (شکل ۳).

افزایش فعالیت این آنزیم به خاطر عملکرد آنتی‌اکسیدانتی آن نیز می‌باشد، زیرا هنگام تنش، میزان رادیکال‌های آزاد گیاه افزایش یافته و گیاه برای فرار از سیمت رادیکال‌های آزاد، فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. در شرایط تیمارهایی نظیر متیل جاسمونات، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای بالای آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی برای تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است تا گیاه را از اثرات مضر آن‌ها در امان نگه دارد [۲۳]. انواع اکسیژن‌های فعال تحت شرایط تنش و فعالیت اکسیداتیو قوی تولید می‌شوند و به طور معمول، می‌توانند

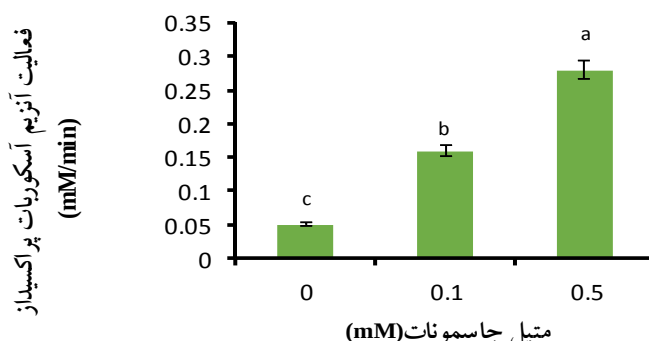


شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در ریحان (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).

(شکل ۴). از آنجایی که متیل جاسمونات می‌تواند تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در گیاهان القاء کند. بنابراین، یک سیستم آنتی‌اکسیدان مؤثر برای حفظ عملکردهای متابولیکی در شرایط تنش و غیرتنش مورد نیاز می‌باشد. هیدروژن پراکسید توسط آسکوربات پراکسیداز در سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست سم‌زدایی می‌گردد [۵]. فعالیت بالای آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به خاطر تولید هیدروژن پراکسید در طی زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی متیل جاسمونات می‌باشد، زیرا هیدروژن پراکسید سوبسترای آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌باشد. تیمار با متیل جاسمونات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در گیاهان آرابیدوپسیس و کلزا نیز افزایش داده است [۱۸].

احتمالاً این آنزیم در مراحل اولیه مسیر پاسخ به متیل جاسمونات در گیاه فعال شده و با افزایش غلظت متیل جاسمونات، آنزیم‌های دیگر شروع به فعالیت می‌کنند و از میزان فعالیت این آنزیم کاسته می‌شود [۱۵]. در قارچ خوراکی نیز غلظت ۰/۵ میلی‌مولار متیل جاسمونات فعالیت این آنزیم را افزایش داد [۲۴]. تیمار جاسمونیک اسید در گیاه توتون نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز و بازدارنده پروتئیناز شد. همچنین، جاسمونیک اسید مقاومت علیه پاتوژن‌ها را به میزان دو برابر در شرایط مزرعه افزایش می‌دهد [۱۴].

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مؤثر بوده است، به‌طوری‌که غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را بر فعالیت این آنزیم داشت



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریحان (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).

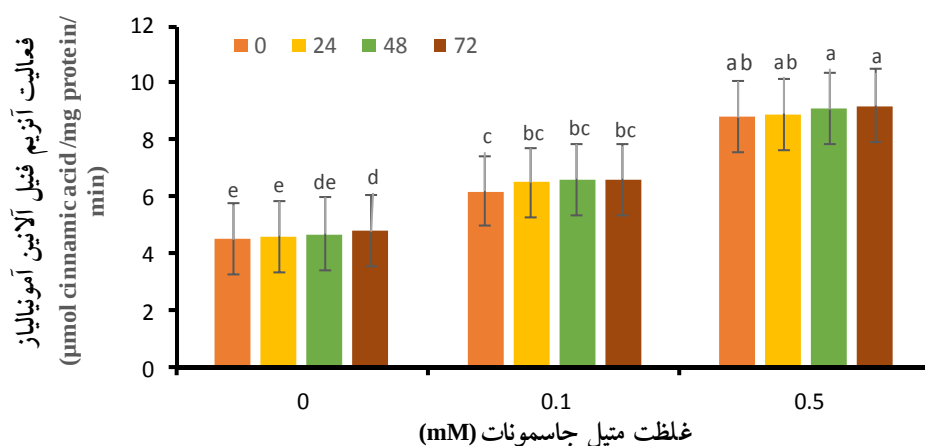
تأثیر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوی پروتئین کل ریحان

متیل جاسمونات افزایش یافت. اثر متقابل عامل غلظت در زمان برای این آنزیم نیز معنی‌دار بود و با افزایش غلظت متیل جاسمونات، فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد (شکل ۵)، اما در هر سطح غلظت متیل جاسمونات، بین زمان‌های مختلف نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. البته در سطح شاهد، بین زمان ۷۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی و زمان شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۵).

فنیل آلانین آمونیل‌یاز اولین آنزیمی است که در متابولیسم فنیل پروپانوییدی فعالیت می‌کند و در تولید اغلب ترکیب‌های دفاعی فنلی نقش کلیدی دارد [۱۷]. از آنجایی‌که این آنزیم اولین مرحله مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوییدها را کاتالیز می‌کند، اعمال تنش بر گیاه منجر به آزاد کردن ترکیبات دفاعی و سنتز ترکیبات مختلف برای مقاوم ساختن مسیرهای دفاعی می‌باشد. در گیاه شیرین بیان فعالیت این آنزیم به‌طور موقتی ۲۴ ساعت پس از تیمار با متیل جاسمونات افزایش یافت که با افزایش معنی‌دار مقدار ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئیدها پس از ۲۴ ساعت القاء، هماهنگ بود [۴].

تحقیقات بر روی تیمار گیاه جینسینگ با متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید ۲۰۰ میکرومولار نشان داد که متیل جاسمونات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در روزهای سوم، پنجم و هفتم بعد از تیماردهی نسبت به گیاه کنترل افزایش می‌دهد [۹]. همچنین در تحقیق حاضر، فعالیت این آنزیم بعد از محلول‌پاشی با متیل جاسمونات افزایش یافت، ولی این افزایش معنی‌دار نبود. شاید دلیل تفاوت بین نتایج تحقیق حاضر با نتایج حاصل از گیاه جینسینگ، به خاطر زمان‌های متفاوت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در دو تحقیق باشد. احتمالاً در صورتی‌که در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم پنج و هفت روز بعد از محلول‌پاشی نیز اندازه‌گیری می‌شد، افزایش معنی‌داری در فعالیت آن مشاهده می‌شد. در گیاه آگروپیرون کریستاتوم^۱ جاسمونات با اثر بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله آسکوربات پراکسیداز در ایجاد مقاومت گیاه مذکور به تنش خشکی مؤثر بود [۵].

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیل‌یاز به عنوان کلیدی‌ترین آنزیم مسیر سنتز فنیل پروپانوییدها تحت تیمار



شکل ۵. اثر متقابل غلظت در زمان بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیل‌یاز در ریحان

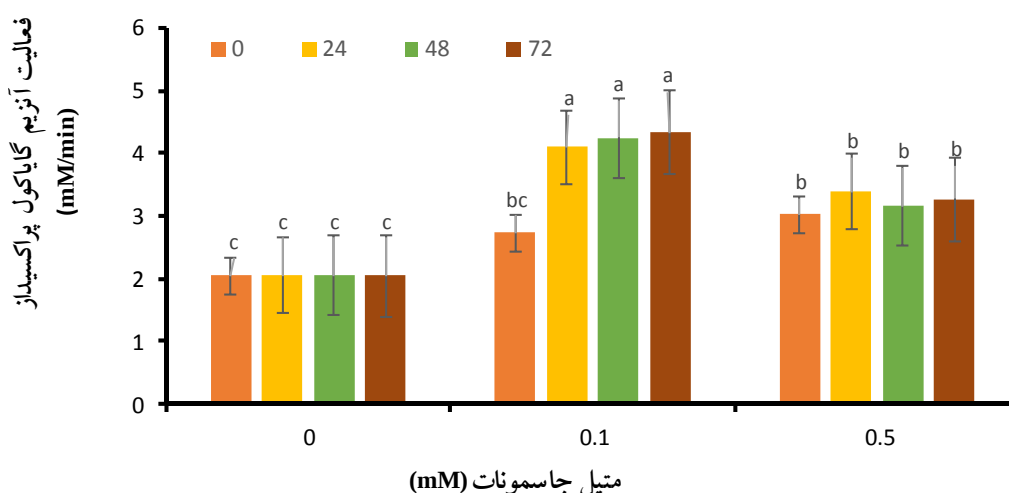
(حروف غیریکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).^۱

1. *Agropyron cristatum*

می‌کند و در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئل نیز دیده می‌شود. ترکیبات فنلی مثل گایاکول به عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند [۳ و ۲۶]. متیل جاسمونات باعث افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه آراییدوپسیس گردیده است [۱۸]. همچنین، در گیاه کرچک متیل جاسمونات فعالیت این آنزیم را ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی افزایش داد [۲۷]. تحقیقات روی غلظت‌های متفاوت متیل جاسمونات در گیاهچه‌های ذرت تحت تنش با علفکش پاراکوات نشان داد متیل جاسمونات باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در آپوپلاست سمپلاست ریشه‌های آفتابگردان می‌شود [۵]. تیمار با متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار در گیاه جینسینگ فعالیت این آنزیم را در روز سوم، پنجم و هفتم افزایش داد و در روز نهم به اوج فعالیت رسید [۹].

مه‌افشانی دانه رست‌های چهاربرگی برنج با متیل جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت، منجر به تجمع اسیدهای فنولیک و افزایش ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شده است [۲]. همچنین، مه‌افشانی متیل جاسمونات یک میلی‌مولار بر جوانه تربچه بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، موجب افزایش ۶۰ درصدی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز گردید [۲۱].

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تأثیر محلول‌پاشی متیل جاسمونات افزایش یافت. اثر متقابل بین غلظت و زمان برای این صفت معنی‌دار بود، به‌طوری‌که این آنزیم در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی بیشترین فعالیت را نشان داد و پس از آن، میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار در چهار زمان بیشترین افزایش را نشان داد (شکل ۶). گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی نظیر گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه آب اکسیژنه استفاده



شکل ۶. اثر متقابل غلظت در زمان بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریحان (حروف غیر یکسان نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد).

سیگنال‌دهی ROS و نقش آن در تنش‌های محیطی.
ژنتیک در هزاره سوم. ۲: ۳۵۸۸-۳۶۰۳.

۴. شبانی ل و احسان‌پور ع (۱۳۸۸) القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید در کشت در شیشه شیرین بیان با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. زیست‌شناسی ایران. ۲۲(۴): ۶۹۱-۷۰۳.

۵. کرامت ب و دانشمند ف (۱۳۹۱) نقش دوگانه متیل جاسمونات بر عملکردهای فیزیولوژیک در گیاه سویا. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۱: ۲۷-۳۸.

6. Adigzel A, Gulluce M, Sengul M, Ogutcu H and Karaman I (2005) Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae). Turkish Journal of Biology. 29: 155-160.

7. Asada K and Nakano Y (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiology. 22(5): 867-880.

8. Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 601-639.

9. Babar Ali M, Yu KW, Hahn EJ and Paek KY (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Biotic and Abiotic Stress. 25: 613-620.

10. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

برخلاف برخی گزارشات، در مطالعه حاضر اثر زمان برای صفات پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار نبود. شاید یکی از دلایل احتمالی آن تفاوت در گیاه مورد مطالعه، غلظت‌ها و زمان‌های مورد بررسی باشد. اگر زمان‌های بعد از محلول‌پاشی افزایش می‌یافت، احتمالاً اثر عامل زمان بر صفات مذکور معنی‌دار می‌شد. در بقیه آنزیم‌ها یا زمان معنی‌دار بوده و یا اثر مقابل غلظت در زمان معنی‌دار بوده است. به‌طور کلی، براساس نتایج حاصل از این تحقیق مشخص گردید که متیل جاسمونات ۰/۵ میلی‌مولار در افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پروتئین کل، آسکوربات پراکسیداز و فینیل آلانین آمونیلایز و تیمار ۰/۱ میلی‌مولار در افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز و گیاکول پراکسیداز مؤثر می‌باشد و احتمالاً متیل جاسمونات در گیاه ریحان نیز مانند سایر گیاهان به عنوان یک محرک عمل کرده و سیستم آنتی‌اکسیدانی مخصوصاً آنزیم فینیل آلانین آمونیلایز که آنزیم کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فینیل پروپانوییدی می‌باشد را در این گیاه فعال می‌کند.

منابع

۱. اسفندیاری ع، تاجیک ط، شکرپور م و برادران فیروزآبادی م (۱۳۸۹) اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال بر توان دفاعی سلول با افزایش سن برگ در گندم. تولید گیاهان زراعی. ۳: ۲۱۹-۲۲۷.
۲. رؤف فرد ف، شریفی م، امیدبیگی ر، سفیدکن ف، بهمنش م و احمدی ن (۱۳۹۳) اثر متیل جاسمونات بر آنزیم‌های متابولیسمی و مواد فنلی در گیاه دارویی (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze) آگاستاکه. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳: ۳۶۱-۳۶۹.
۳. سید رحمانی ر و معالی امیری ر (۱۳۹۲) مسیر

11. Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH and Ferjani E (1997) Cadmium and zinc of lipid peroxidation and effect on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science. 127: 139-14.
12. Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van M, Inzé D and Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Molecular Biology Life Science. 57: 779-795.
13. Drazkiewicz M, Skorzynska P and Krupa Z (2004) Copperinduced oxidative stress and antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. Biology of Metals. 17: 379-387.
14. Geyter N, Gholami A, Goormachtig S and Goossens A (2012) Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. Trends in Plant Science. 17: 1445-1457.
15. Hampel D, Mosandl A and Wust M (2005) Induction of de novo volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 2652-2657.
16. Hammerschmidt R (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? Annual Review of Phytopathology. 37: 285-306.
17. Heredia JB 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.
18. Jung S (2004) Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 42: 231-255.
19. Kang H and Saltveit M (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum. 115: 571-576.
20. Kar M and Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 57: 315-319.
21. Kim DY, Bovet M, Maeshima E and Lee Y (2007) The ABC transporter *AtPDR8* is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. Plant Journal. 50: 207-218.
22. Marotti M, Dellacecca V, Piccaglia R and Glovanelli E (1997) Agronomic and chemical evaluation of three varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. Acta Horticulturae. 331: 63-69.
23. Nasibi F (2010) Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant. Plant Biology. 9: 36-74.
24. Nejhad Askari K, Moradi P and Farzami Sepehr M (2013) Use of soluble Methyl jasmonate on increase of lifetime after harvesting mushroom (*Agaricusbisporus*). International Research Journal of Applied and Basic Sciences. 6(4): 424-427.
25. Orozco C, Narvaez V and Ryan C (2001) Hydrogen peroxide as a second messenger for the induction of defense genes in tomato to wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant and Cell. 13: 179-191.
26. Petrov VD and Breusegem FV (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. Cell Biology. 14: 1093-1206.
27. Saisavoey T, Thongchul N, Sangvanich P and Karnchanatat A (2014) Effect of methyl jasmonate on isoflavonoid accumulation and

- antioxidant enzymes in *Pueraria mirifica* cell suspension culture. Journal of Medicinal Plant Research. 8(9): 401-407.
28. Santos Soares AMA, Souza TF, Jacinto T and Machado OLT (2010) Effect of Methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. Brazilian Society of Plant Physiology. 22(3): 151-158.
29. Taile HA, Rahman S and Radwan S (2010) Potential Activity of Basil Plants as a Source of Antioxidants and Anticancer Agents as Affected by Organic and Bio-organic Fertilization. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 38: 119-127.
30. Upadhyaya H and Panda K (2004) Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration. Biology Plantarum. 48: 597-600.