Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

اثرات متقابل اترل و موینولین بر ترپنوئیدهای پلاستیدی گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*)

حکیمه منصوری*[۱و۲] و حکیمه علومی[۲]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه باهنر کرمان، کرمان، ایران، [۲]گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پشرفته، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۱۰/۲۸)

چکیده:

گیاهان تعداد زیادی از ترکیبات ترپنوئیدی را سنتز می کنند که برای فرایندهای ضروری و پاسخ تطابقی گیاه با محیط مورد نیاز هستند. این ترکیبات از دو مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) پلاستیدی و موالونات (MVA) سیتوپلاسمی سنتز می شوند. در این تحقیق، اثرات اترل بعنوان یک محرک پاسخ های دفاعی گیاه (در برابر تنش های محیطی زنده و غیر زنده محیط) و موینولین بعنوان بازدارنده مسیر MVA را روی مقدار کلروفیل، کاروتنوئیدها، α-توکوفرول، پیروات و کانابینوئیدهای اصلی (تتراهیدروکانابینول و کانابیدیول) در شاهدانه در مرحله رویشی مطالعه شد. تیمار گیاهان با ۱۰ µM اترل یا ۱۰ µM موینولین مقدار کلروفیل a و b نسبت به سایر تیمارها و گیاهان شاهد افزایش داد. بیشترین مقدار کاروتنوئید در گیاهان تیمار شده با ۰.۱ µM موینولین دیده شد. بعضی تیمارهای همزمان اترل و موینولین هم مقدار کاروتنوئیدها را در گیاهان تیمار شده افزایش داد. غلظت های ۱ و ۱۰ µM اترل و موینولین مقدار α-توکوفرول را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش دادند. بیشترین مقدار α-توکوفرول در تیمار همزمان ۰.۱ µM اترل و موینولین مشاهده شد. تیمار با اترل و موینولین مقدار تتراهیدروکانابینول را در گیاه شاهدانه افزایش نداد. همه غلظت های موینولین استفاده شده مقدار کانابیدیول را افزایش داد اما تیمارهای اترل و اترل – موینولین مقدار کانابیدیول را نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد. الگوی خاصی در تغییرات مقدار پیروات در تیمار موینولین و اترل و تیمار توام مشاهده نشد. بر اساس نتایج ما، اثرات افزایشی تیمار همزمان اترل و موینولین در بالا بردن مقدار ترپنوئیدهای پلاستیدی در مقدار کلروفیل و α-توکوفرول مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ترپنوئیدها، توکوفرول، کانابینوئیدها، کلروفیل، کاروتنوئید، موینولین.

مقدمه:

شاهدانه (*Cannabis sativa*) یک گیاه یک ساله و دو پایه است. این گیاه استفاده های متفاوتی در زمینه تولید فیبر، روغن، دانه و دارو دارد. کانابینوئیدها یک گروه از ترکیبات ترپنوفنولیک موجود در شاهدانه هستند. بیشترین غلظت کانابینوئیدها در رزین ترشح شده از گلهای ماده دیده می شود. تتراهیدروکانابینول (THC) مهمترین ترکیب دارویی گیاه شاهدانه است. کانابینوئیدهای دیگر شامل کانابیدیول (CBD) و کانابینول (CBN) هستند که ارزش دارویی کمتری دارند (Pellegrini *et al.*, 2005). شاهدانه در علم طب مدرن بعنوان ضد تهوع در شیمی درمانی و همچنین در درمان گرفتگی عضله، درد، کم اشتهایی، صرع، آب مروارید و آسم استفاده می شوند (Guzman, 2003; Howlett *et al.*, 2004).

کانابینوئیدها متعلق به گروه بزرگی از متابولیتهای ثانویه به نام ترپنوئیدها هستند. پیش ساز بیوسنتز ترپنوئیدها ترکیب ۵ کربنه‌ای بنام ایزوپنتنیل پیروفسفات است که در گیاهان از دو

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: h_mansouri@yahoo.com

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

مسیر سنتز می‌شوند: یکی مسیر پلاستیدی و دیگری مسیر سیتوپلاسمی. مسیر پلاستیدی ترپنوئیدهایی مانند آبسیسیک اسید، کاروتنوئیدها و زنجیره جانبی کلروفیل سنتز می کند و مسیر سیتوپلاسمی در بیوسنتز ترکیباتی مانند استرول ها، جیبرلین‌ها و فیتوآلکسین‌ها شرکت می‌کند. آزمایشات نشان داده که سنتز کانابینوئیدهای شاهدانه از مسیر پلاستیدی صورت می گیرد (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Estevez *et al.*, 2001). اگرچه این کده بندی زیر سلولی اجازه می‌دهد که دو مسیر بطور مستقل در گیاه فعالیت کنند، اما شواهدی وجود دارد که نشان می دهد دو مسیر با هم اثرات متقابل دارند. بازدارنده‌های خاص مسیر پلاستیدی (فوسمیدومیسین fosmidomycin) و سیتوپلاسمی (موینولین mevinolin) برای بررسی جریان بیوسنتزی استفاده می شود. بررسی این اثرات متقابل می‌تواند در سطح رونویسی ژن یا در سطح متابولیک از طریق اندازه‌گیری کلروفیل ها، کاروتنوئیدها و استرول ها صورت می‌گیرد (Laule *et al.*, 2003).

رشد و تولید متابولیت های ثانویه گیاهی تحت تأثیرتنظیم کننده های رشد گیاهی هستند. اتیلن یکی از این تنظیم کننده های رشد گیاهی است که فرایندهای فیزیولوژیکی متفاوتی را در گیاه کنترل می کند (Schaller and Kieber, 2002). اتیلن فرایندهایی مثل جوانه زنی (Lacher, 2001)، رشد (Tholen *et al.*, 2004)، فتوسنتز (Trebitsh *et al.*, 1993) و ریزش (Corbineau *et al.*, 1995) را در گیاه کنترل می کند. همچنین اتیلن در پاسخ گیاه به تنش های زنده و غیر زنده مثل زخم، فلزات، خشکی، دمای بالا و آلودگی بوسیله پاتوژنها دخالت دارد (Kende, 1993; Johnson and Ecker, 1998). از طرف دیگر ترپنوئیدها هم نقش های مهمی را در اثرات متقابل گیاه- گیاه، گیاه- محیط و گیاه- حیوان بازی می کنند. مطالعات قبلی نشان داده است که کانابینوئیدهای گیاه شاهدانه از مسیر پلاستیدی سنتز می شوند. از طرفی استفاده از بازدارنده های یک مسیر ترپنوئیدی باعث فعال تر شدن مسیر دیگر به منظور جبران کم کاری مسیر بازداشته شده می شود. بنابراین هدف از این مطالعه یافتن پاسخ این سوال است که آیا استفاده همزمان از موینولین به عنوان بازدارنده مسیر موالونات و اترل به عنوان تحریک کننده سنتز ترکیبات دفاعی مانند کانابینوئیدها می تواند اثرات قابل توجهی بر ترپنوئیدهای مسیر پلاستیدی از جمله کانابینوئیدها داشته باشد.

مواد و روش‌ها:

تعداد ۵ دانه گیاه شاهدانه در گلدان‌هایی به قطر ۱۰ cm حاوی پرلیت کشت شدند. پس از رویش تعداد گیاهان به یک گیاه در هر گلدان کاهش داده شد. گیاهان در گلخانه با دوره نوری ۱٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی رشد کردند و هفته‌ای دو بار با محلول غذایی هوگلند با رقت ۱/۲ آبیاری شدند (Hoagland and Arnon, 1950).

تیمار دهی روی گیاهان دارای هفت جفت برگ انجام شد. اترل به عنوان یک دهنده اتیلن در غلظت های ۰، ۱ و ۱۰ میکرومولار و موینولین در غلظت های ۰، ۰.۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار در این تحقیق برای تیمار گیاهان مورد استفاده قرار گرفت. هر دو ماده مورد استفاده از شرکت سیگما خریداری شدند. تیمار اترل بصورت محلول پاشی برگها و تیمار موینولین با اضافه کردن به گلدانها اعمال شد. تیمارها بصورت همزمان، در سه نوبت و به صورت یک روز در میان انجام شدند. بیست و چهار ساعت پس از آخرین تیمار گیاهان برداشت شدند و جفت برگ سوم آنها جهت انجام آنالیزها با نیتروژن مایع فریز و نگهداری شدند.

کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با روش Lichtenthaler (1987) اندازه گیری شد.

توکوفرول‌ها بوسیله‌ی سائیدن ۰.۱ mg بافت تازه برگ در ۱۰۰۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰ درصد عصاره‌گیری شد. عصاره به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس در ۱٤۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به یک لوله‌ی جدید انتقال یافت و باقیمانده دو بار با ۲۵۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰ درصد در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه عصاره‌گیری شد و هر سه محلول به هم اضافه شدند. ۱۰ میکرولیتر از این عصاره برای اندازه‌گیری کمی α-

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

توکوفرول به دستگاه HPLC تزریق شد.

اندازه‌گیری α-توکوفرول بوسیله‌ی دستگاه HPLC ساخت شرکت Agilent استرالیا با آشکارساز فلوئورسانس و با استفاده از روش ارائه شده بوسیله Sattler و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. ستون مورد استفاده ستون C_{18} بود. متانول ۱۰۰ درصد به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه و طول موج تحریک (excitation) ۲۹۵ nm و طول موج انتشار (emission) ۳۲۵ nm و دمای ۲۸ درجه برای آنالیز نمونه های استاندارد α-توکوفرول (شرکت سیگما) و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های۱، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر α-توکوفرول در متانول ۱۰۰ درصد تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از هر محلول استاندارد و هر کدام با سه بار تکرار به دستگاه HPLC تزریق شد. بر اساس میانگین سطح زیر پیک منحنی استاندارد α-توکوفرول رسم شد.

جهت اندازه‌گیری THC و CBD بافت تازه‌ی گیاهی به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق و دور از نور خشک شد. صد میلی گرم از پودر برگ یا گل خشک شده در یک لوله‌ی آزمایش قرار داده شد و به آن ۱ میلی لیتر کلروفورم اضافه شد. عصاره به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد. سپس نمونه سانتریفیوژ شد. حلال خشک شد و باقیمانده در ۰/۵ میلی لیتر متانول حل شد.

اندازه‌گیری کانابینوئیدهای THC و CBD بوسیله‌ی دستگاه HPLC ساخت شرکت merck hitachi با آشکارساز uv-visible انجام شد. ستون مورد استفاده برای جداسازی THC و CBD ستون C18 (RP18) بود. فاز متحرک متانول-آب با شیب ۸۰ : ۲۰ با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج nm ۲۳۰ برای آنالیز نمونه‌های استاندارد CBD, THC و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود.

یکی از سوبستراهای مورد استفاده در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدهای پلاستیدی پیروات است. برای سنجش پیروات، ابتدا کلروپلاست ها با روش زیر استخراج شدند. رگبرگ‌های بزرگ جداسازی شد. ۰/۵ گرم برگ با حدود ۳ میلی‌لیتر بافر تریس ساکارز (ساکارز ۰/۳ مولار، تریس اسیدی ۰/۲ مولار، سولفات منیزیم ۵ میلی مولار با pH=۷.۵) ساییده شد. مخلوط هموژن را با کاغذ صافی در یک ارلن صاف نموده و محلول ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲ میلی لیتر بافر تریس ساکارز حل شد. این سوسپانسیون رقیق شده از کلروپلاست برای سنجش پیروات نگه‌داری شد.

محلول ۰/۰۱۲۵ درصد ۲ و٤- دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین (DNPH) بوسیله‌ی حل کردن ۰/۱٦۲۵ گرم پودر مرطوب DNPH (۳۰ درصد آب) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر HCL ۲ نرمال آماده شد. به ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آماده شده، یک میلی-لیتر محلول ۰/۰۱۲۵ درصد DNPH اضافه شد. این محلول به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبگرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر NaOH ۰/٦ نرمال به محلول‌ها اضافه شد و در نهایت جذب محلول‌ها در طول موج ٤۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Anthon and Barrett, 2003).

نتایج:

اثر اترل و مویونولین بر مقدار کلروفیل: در گیاهان تیمار شده با اترل غلظت ۱۰ میکرومولار اترل باعث افزایش معنی دار مقدار کلروفیل a در گیاهان شاهدانه شد (جدول ۱). در گیاهان تیمار شده با مویونولین غلظت های ۰.۱ و ۱۰ میکرومولار مویونولین باعث افزایش معنی دار کلروفیل a نسبت به گیاهان شاهد (بدون تیمار اترل و مویونولین) شد. اما گیاهان تیمار شده با غلظت ۱ میکرومولار مویونولین تفاوت معنی داری با گیاهان شاهد نشان ندادند. در تیمار همزمان مویونولین و اترل بیشترین افزایش در تیمار ۱۰ میکرومولار اترل و مویونولین مشاهده شد که این مقدار (۵.۸ میلی گرم بر وزن تر) بیشترین مقدار کلروفیل a در بین همه گیاهان مورد آزمایش بود. کمترین مقدار کلروفیل a در گیاهان شاهد مشاهده شد.

در گیاهانی که تنها با اترل تیمار شدند غلظت ۱۰ میکرومولار اترل و در گیاهانی که تنها با مویونولین تیمار شدند غلظت ۰.۱ میکرومولار مویونولین باعث افزایش معنی دار مقدار کلروفیل b شد (جدول ۱). در تیمارهای توام غلظت ۱۰

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر موینولین، اترل و اثرات متقابل آنها بر مقدار رنگدانه های فتوسنتزی، α-توکوفرول، THC و CBD و پیروات در گیاه شاهدانه.

موینولین (μM)	اترل(μM)	کلروفیل a (mg g^{-1}fw)	کلروفیل b (mg g^{-1}fw)	کاروتنوئید (mg g^{-1}fw)	α-توکوفرول (μg g^{-1}dw)	THC (mg g^{-1}dw)	CBD (mg g^{-1}dw)	پیروات (mg g^{-1}fw)
۰	۰	۳/۸۵ ±۰/۲۰^{e}	۱/٦٦±۰/۰۸^{fg}	۱/٤۹±۰/۰۷^{ef}	٤/۹۰±۰/٦۸^{e}	۱/٤٦ ±۰/۱۸^{a}	۵۳/۹۹±۱/۰۵^{d}	۱/٤۳ ±۰/۰۷^{bc}
۰	۱	٤/۰٤±۰/۲٦ ^{e}	۱/٦٤±۰/۰۸^{fg}	۱/٤۷±۰/۰٦^{ef}	٦/٦۷±۰/۵۷^{cde}	۰/۲۸ ±۱/۰۱^{ef}	۰/۲٤±۰/۰۸^{g}	۰/۵٦±۰/۰٤^{fg}
۰	۱۰	۵/۰۰±۰/۱۰^{bc}	۱/۹۸±۰/۰۵^{bcde}	۱/۷۹±۰/۰۹^{bcde}	۷/۷۷±۰/۳۸^{bc}	۱/۳۵ ±۰/۱۰^{a}	۰/۷۸±۰/۱۱^{e}	۱/۳۵±۰/۰٦^{bcd}
۰/۱	۰	۵/۳۰±۰/۱۷^{ab}	۲/٤۲±۰/۱۰^{b}	۲/۱۳±۰/۰۲^{a}	٦/۵۷±۰/٤۹^{cde}	۰/۲٤±۰/۰۳^{ef}	۷۵/۳۹±۲/۳٤^{c}	۱/۹٤±۰/۱۵^{a}
۰/۱	۱	٤/۳۲±۰/۱۵^{cde}	۲/۱۹±۰/۱۵^{bcd}	۱/۸۵±۰/۰۷^{abcd}	٦/۲۲±۰/۲۲^{cde}	۰/۸٤±۰/۰۵^{b}	۰/۲۵±۰/۰۷^{g}	۱/٤۲±۰/۰۵^{bcd}
۰/۱	۱۰	٤/۰۰±۰/۲۰^{e}	۱/۷۳±۰/۰۸^{efg}	۱/٤۳±۰/۰٤^{f}	۵/۱۹±۰/۱۹^{e}	۰/٦۵ ± ۰.۰^{c}	۰/۳۷ ±۰/۰۹^{c}	۱/۰۷±۰/۰۸^{bcde}
۱	۰	٤/۱٦±۰/۲۷^{de}	۱/٤۹±۰/۲۳^{g}	۱/۷۱ ±۰/۰۵^{cdef}	۸/٤۳±۱/۰۲^{b}	۰/۲۳ ± ۰/۰۱^{ef}	۱٦۰/۱٤±٤/۵۰^{a}	۰/۹۲ ±۰/۰۳^{defg}
۱	۱	٤/۲۰±۰/۱۰^{de}	۱/۷۸±۰/۰٤^{defg}	۱/۵۹ ±۰/۰۵^{def}	۹/۱٦ ±۰/۵۰^{b}	۰/٤٤ ± ۰/۰^{d}	۰/۳۲ ± ۰/۰۳^{g}	۱/٤٦ ±۰/۰۲^{abc}
۱	۱۰	۵/۰۳±۰/۱۹^{bc}	۲/۲٦ ± ۰/۰۲ ^{bc}	۲/۰۱ ±۰/۰۹^{abc}	۷/٤۷ ±۰/۵۹^{bcd}	۰/۱۵ ± ۰/۰۳^{f}	۰/۲۷ ± ۰/۰۵^{de}	۰/۸۰ ±۰/۱۱^{efg}
۱۰	۰	۵/۳±۰/۲۲^{ab}	۱/۹۵±۰/۱۳^{cdef}	۱/٦۹±۰/۱۱^{cdef}	۱۵/۱۵ ±۰/۵۳^{a}	۱/٤۸±۰/۰۴^{a}	۱٤۸/۹۳±۳/۹۵^{b}	۱/۵۵ ±۰/۱۱^{ab}
۱۰	۱	٤/۸±۰/۳۱^{bcd}	۲/۱۲±۰/۱۶^{bcde}	۱/۷۸±۰/۰۸^{bcde}	۵/۸۵ ±۰/٤۵^{de}	۰/۳۵±۰/۰^{de}	۰/٦٤±۰/۰۹^{f}	۱/۰۱ ±۰/۰۹^{cdef}
۱۰	۱۰	۵/۸۱±۰/۳۳^{a}	۲/۸۳±۰/۱۷^{a}	۲/۱۰±۰/۲۴^{ab}	۵/۳۵ ±۰/۰۵^{e}	۱/٤۱±۰/۰٤^{a}	۰/۲۰±۰/۰۵^{g}	۰/٤٤ ±۰/۰٤^{g}

اعداد میانگین سه تکرار± SE هستند. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

میکرومولار اترل و موینولین بیشترین تأثیررا در افزایش مقدار کلروفیل b داشت و مقدار کلروفیل b این گیاهان از سایر گیاهان بیشتر بود. کمترین مقدار کلروفیل b در گیاهان تیمار شده با ۱ میکرومولار اترل مشاهده شد.

اثر اترل و موینولین بر مقدار کاروتنوئیدها: تیمار اترل به تنهایی تأثیرچندانی بر مقدار کاروتنوئیدها نداشت فقط افزایش ناچیزی در غلظت ۱۰ میکرومولار اترل مشاهده شد (جدول ۱). غلظت ۰.۱ میکرومولار موینولین باعث افزایش قابل توجه کارتنوئید شد. در تیمارهای توام غلظت های ۱ و ۱۰ میکرومولار موینولین همراه با ۱۰ میکرومولار اترل باعث افزایش معنی دار مقدار کارتنوئیدها شد اما این افزایش بیش از تیمار ۰.۱ میکرومولار موینولین نبود.

اثر اترل و موینولین بر مقدار α- توکوفرول: غلظت ۱۰ میکرومولار اترل باعث افزایش قابل توجه مقدار α- توکوفرول گیاهان شد. تیمار موینولین با افزایش غلظت مقدار α- توکوفرول را افزایش داد. بیشترین افزایش در غلظت ۱۰ میکرومولار مشاهده شد که مقدار توکوفرول را تا حدود سه برابر افزایش داد. در تیمارهای توام بیشترین مقدار توکوفرول در غلظت های ۱ میکرومولار موینولین و اترل مشاهده شد. در بقیه تیمارهای توام هم افزایش جزعی مقدار توکوفرول نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد.

اثر اترل و موینولین بر مقدار THC: غلظت ۱ میکرومولار اترل کاهش قابل توجهی در مقدار THC ایجاد کرد (جدول ۱). همچنین تیمار موینولین با غلظت ۰.۱ و ۱ میکرومولار هم باعث کاهش مقدار THC شد. اکثر تیمارهای توام موینولین و اترل مقدار THC را نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد به غیر از تیمار ۱۰ میکرومولار موینولین و اترل که تغییر معنی داری در مقدار THC ایجاد نکرد. کمترین مقدار THC در تیمار توام ۰.۱ میکرومولار موینولین و ۱۰ میکرومولار اترل مشاهده نشد.

اثر اترل و موینولین بر مقدار CBD: تیمار گیاهان با اترل باعث کاهش معنی دار CBD شد ولی بر عکس تیمار با موینولین مقدار CBD را به مقدار زیادی افزایش داد (جدول ۱). بیشترین مقدار CBD در تیمار ۰.۱ میکرومولار موینولین مشاهده شد. تیمارهای همزمان موینولین و اترل باعث کاهش قابل توجه CBD در گیاهان در مقایسه با گیاهان شاهد شد. کمترین مقدار CBD در تیمار ۱۰ میکرومولار موینولین و اترل مشاهده شد.

اثر اترل و موینولین بر مقدار پیروات: غلظت ۱ میکرومولار اترل مقدار پیروات را که یکی از سوبستراهای مسیر پلاستیدی بیوسنتز ترپنوئیدهاست کاهش داد (جدول ۱). تیمار گیاهان با ۰.۱ میکرومولار موینولین مقدار پیروات را افزایش و تیمار با ۱ میکرومولار موینولین پیروات را کاهش داد. اکثر تیمارهای توام موینولین و اترل تأثیرمعنی داری بر مقدار پیروات نداشت تنها تیمارهای ۰.۱ و ۱۰ میکرومولار موینولین همراه با تیمار ۱۰ میکرومولار اترل باعث کاهش معنی دار پیرووات شد.

بحث:

اتیلن بعنوان یک سیگنال اصلی در دفاع و تنش عمل می‌کند و ممکن است باعث تغییر جهت متابولیت ها بین رشد و سنتز متابولیت‌های ثانویه و تغییرات در تخصیص منابع شود. از طرفی استفاده از بازدارنده مسیر موالونات (موینولین)، احتمالا باعث فعال شدن مسیر پلاستیدی جهت جبران سنتز ترپنوئیدهای سیتوپلاسمی می شود. بنابراین تحقیق حاضر برای پاسخ گویی به این سوال که آیا استفاده همزمان از بازدارنده مسیر موالونات و اترل (دهنده اتیلن) می تواند باعث تحریک بیشتر سنتز متابولیت‌های ثانویه پلاستیدی از جمله کانابینوئیدهای مخصوص شاهدانه شود؟ انجام شد.

کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها از جمله متابولیت‌های اصلی ترپنوئیدی مسیر پلاستیدی هستند که تغییرات مقدار آنها می تواند تغییرات در متابولیسم گیاه را آشکار کند. بر خلاف انتظار نتایج آزمایش نشان داد که اترل با غلظت بالا باعث افزایش مقدار کلروفیل شد. افزایش کلروفیل در تیمارهای موینولین قابل پیش‌بینی بود چون توقف مسیر سیتوپلاسمی باعث تحریک مسیر پلاستیدی می شود و کلروفیل ها و کاروتنوئیدها از محصولات مسیر پلاستیدی هستند. اثر افزایشی مورد انتظار اترل و موینولین در غلظت ۱۰ میکرومولار هر دو تیمار مشاهده شد. اثرات مفید اتیلن و دهنده‌های اتیلن روی مقدار کلروفیل در تعدادی از گیاهان مشاهده شده است

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

(Puech *et al.*, 1974; Li, 2004; Alscher and Castelfranco, 1972).

اترل تأثیری در مقدار کاروتنوئید نداشت. مشابه با این نتایج یک کاهش در مقدار کاروتنوئیدهای برگهای جدای آرابیدوپسیس تیمار شده با اتیلن گزارش شده است (Alexieva *et al.*, 2004). در مواردی اثرات مثبت اتیلن در افزایش مقدار کاروتنوئیدها گزارش شده است (Nagar, 1933; Puech *et al.*, 1974). تیمار موینولین به تنهایی باعث افزایش کاروتنوئیدها شد اما اثر افزایشی اترل و موینولین مشاهده نشد. اثرات مثبت اترل و موینولین بر مقدار α-توکوفرول یکی دیگر از نتایج بدست آمده در این تحقیق بود. توکوفرول ها از جمله آنتی اکسیدانهای موثر گیاهان هستند که در شرایط تنش نقش مهمی را به عهده دارند. گزارش شده است که اتیلن بعنوان یک سیگنال در بیوسنتز توکوفرول ها نقش دارد (Cela *et al.*, 2009).تا کنون تحقیقی در مورد اثر بازدارنده موینولین بر مقدار رنگدانه های پلاستیدی و توکوفرول‌ها صورت نگرفته است. می‌توان تصور کرد بازدارندگی مسیر موالونات باعث فعال شدن مسیر پلاستیدی و در نتیجه افزایش سنتز ترپنوئیدهای پلاستیدی از جمله کاروتنوئیدها و توکوفرول ها شده است. اما نتایج آزمایشات تبادل پیش سازهای بیوسنتز ترپنوئیدها (ایزوپنتنیل پیروفسفات) را بین پلاستیدها و سیتوپلاسم اثبات کرده است (Rodriguez-Concepción *et al.*, 2004; Kasahara *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2002; Hemmerlin *et al.*, 2003).

THC و CBD دو کانابینوئید مهم در گیاه شاهدانه هستند. تیمار توام اترل با موینولین باعث افزایش مقدار THC نسبت به گیاهانی شد که تنها تحت تأثیرموینولین بودند، ولی این افزایش بیشتر از مقدار THC گیاهان شاهد نبود. کاهش مقدار THC در گیاهان تیمار شده با موینولین ثابت می کند فعال شدن مسیر پلاستیدی باعث افزایش سنتز همه ترکیبات این مسیر نمی شود و کنترل بیشتری در مورد بیوسنتز هر ترکیب وجود دارد. کاربرد اترل باعث کاهش قابل توجه CBD نسبت به گیاهان شاهد و گیاهانی شد که تنها تحت تأثیرموینولین بودند. تیمار موینولین روی سنتز دو کانابینوئید THC و CBD اثرات متضادی را نشان داد که این می تواند نشان دهنده نقش متفاوت این دو ترکیب در گیاه باشد.

پیروات یکی از گوهرمایه های بکار رفته در مسیر پلاستیدی بیوسنتز ترپنوئیدها است. تغییر مقدار گوهرمایه ها یکی از راههای تنظیم مسیرهای متابولیسمی است. به این منظور مقدار پیروات تحت تیمارهای اترل و موینولین مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات متفاوتی در مقدار پیروات گیاهان تیمار شده مشاهده شد که این تغییرات متضاد مانع از نتیجه گیری روشن در مورد تأثیراین تیمارها بر مقدار گهرمایه شد. شاید با اندازه گیری گهرمایه دیگر یعنی فسفو گلیسرآلدئید همزمان با پیروات بتوان به نتایج بهتری دست یافت.

تحقیق حاضر اندکی از پیچیدگی موجود در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها و اثرات فیتوهورمونها را آشکار کرد. بدیهی است برای دست یافتن به اطلاعات بیشتر به تحقیقات بیشتر در این زمینه نیاز است.

تشکر و قدر دانی:

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان و با شماره قرارداد ۱/٤٢١٦ انجام شده است.

منابع:

Alexieva, V. S., Sergiv, I. G., Todorova, D. A., Karanov, E. N., Smith, A. R. and Hall, M. A. (2004). Effect of ethylen and its antagonist 1-MCP on the senescence of detached leaves of *Arabidopsis thaliana*. Biological Plantarum 48: 293–295.

Alscher, R. G. and Castelfranco, P. A. (1972) Stimulation by ethylene of chlorophyll biosynthesis in dark-grown Cucumber cotyledons. Plant Physiology 50:400-403.

Anthon, G. and Barrett, D. M. (2003) Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. Science of Food and Agriculture 83: 1210-1213.

Cela, J., Falk, J. and Munné-Bosch, S. (2009) Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in Arabidopsis thaliana. FEBS Letter 583: 992–996.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

Corbineau, F., Rudnicki, R.M., Goszczynska, D.M. and Come, D. (1995) The effect of light quality on ethylene production in leaves of seedlings (*Avena sativa L.*). Enviromental and Experimental Botany 35: 227-233.

Estevez, J. M., Cantero, A., Reindi, A., Reichler, S. and Leon, P. (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoperenoid biosynthesis in plants. Biological Chemistry 276: 22901-22909.

Guzman, M. (2003). Cannabinoids: Potential anticancer agents. Nature Reviews 3:745-755.

Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A. and Grosdemange-Billiard, C. (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco Bright Yellow-2 cells. Journal of Biological Chemistry 278: 26666–26676.

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station Circular 347: 1-32.

Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E. and Porrino, L. Y. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. Neuropharmacology 47:345-358.

Johnson, P. R. and Ecker, J. R. (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. Annual Review of Genetic 32: 227–254.

Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S. (2002) Contribution of themevalonate andmethylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 277: 45188–45194.

Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44: 283–307.

Lacher,W. (2001) Physiological plant ecology. Springer-Veray Berlin Heidelberg New york. Germany 103: 1-7.

Laule, O., Furholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X. and Heifetz, P. B. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biology 100:6866–6871.

Li, Y. R. (2004) Beneficial effects of ethephon application on sugarcane under sub-tropical climate of China. Sugarcane Agriculture 6: 235-240.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyls and Caretenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. and Schwender, J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. Physiologia Plantarum 101:643–652.

Nagar, P.K. (1993). Effect of plant growth regulators on the natural and ethylene induced pigmentation in *Kinnow mandarin* peels. Biologia Plantarum 35: 633–636.

Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S. and Muranaka, T. (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in Arabidopsis lacking the non-mevalonate pathway. Planta 216, 345–350.

Pellegrini, M., Marchei, E., Pacifici, R. and Pichini, S. (2005) A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Pharmacology and Biomedicin Analysis 36:939–946

Puech, A. A., Rebeiz, C. A. and Crane, J. C. (1974). Pigment changes associated with appliccation of ethephon ((2-chloroethyl)phosphonic acid) to fig (*Ficus carica* L.) fruits. Plant Physiology 57: 504–509.

Rodrıguez-Concepcion, M., Fores, O., Martınez-Garcıa, J. F., Gonzalez, V,. Phillips, M. A., Ferrer, A. and Boronat, A. (2004) Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development. Plant Cell 16:144-156.

Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J. and Dellapenna, D. (2003) Characterization of tocopherol cyclase from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. American Society of Plant Biologists 132: 2184-2195.

Schaller, G. and Kieber, J. (2002) Ethylene. American Society of Plant Biologists 10: 1-17.

Tholen, D., Voesenek, L. and Poorter, H. (2004) Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacim* and *Petunia x hybrida*. Plant Physiology 134: 1803-1812.

Trebitsh, T., Goldschidt, E. E. and Riov, J. (1993) Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. Proceeding of the National Academy Science 90: 9441-9445.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 9:38 IRST on Friday September 22nd 2017

Interaction effects of ethrel and Mevinolin on plastidic terpenoids of *Cannabis sativa*

Hakimeh Mansouri*[1] and Hakimeh Olomi[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[2]Department of Ecology, International Center for Science, High Technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran
(Received: 23 August 2014, Accepted: 18 January 2016)

Abstract:

Plants synthesize a myriad of isoprenoid products that are required both for essential constitutive processes and for adaptive responses to the environment. These compounds were synthesized from two pathways the plastidial methylerythritol phosphate (MEP) and the cytosolic mevalonic acid (MVA). In this study, we investigated the effect of ethrel as one inducer of plant defence responses (against biotic and abiotic environmental stress) and mevinolin as one inhibitor of MVA pathway on chlorophyll, carotenoids, α-tocopherol, pyrovate and basic cannabinoids (tetrahydrocannabinol and cannabidiol) content in *Cannabis sativa* at vegetative stage. Treatment of plants with 10 µM mevinolin or 10 µM ethrel increased chlorophyll a and b than other treatments and control plants. The most carotenoid content observed in plants treated with 0.1 µM mevinolin. Some of contemporary treatments of mevinolin and ethrel also increased carotenoid content in treated plants. Concentrations of 1 and 10 µM ethrel or mevinolin increased α-tocopherol content in comparison to control plants. The most content of α-tocopherol observed in contemporary treatment of 0.1 µM ethrel and mevinolin. None treatment (ethrel, mevinolin and ethrel-mevinolin) incresead tetrahydrocannabinol in cannabis plants. All concentrations of utilized mevinolin increased cannabidiol content but ethrel and ethrel-mevinolin treatments decreased cannabidiol content than control plants. Special pattern in pyrovate content chenges was not observed in mevinolin, ethrel and contemporary treatments. Based on our results, enhancement effects of mevinolin and ethrel synchronic treatments in increasing of plastidic terpenoids content were observed in chlorophyll and α-tocopherol content

Key words:Terpenoids, Tocopherol, Chlorophyll, Carotenoids, Cannabinoids, Mevinolin.

*corresponding author, Email: h_mansouri@yahoo.com