

## تأثیر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان اسانس در گیاه آویشن باغی

شکوفه انتشاری<sup>۱\*</sup>، صغری رفیعی<sup>۱</sup> و عبدالله قاسمی پیر بلوطی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران و <sup>۲</sup> گروه گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۰۲)

### چکیده:

در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان و تغییرات اسانس در گیاه آویشن باغی مورد مطالعه قرار گرفت و اسانس بدست آمده از گیاه آویشن توسط دستگاه GC/MS آنالیز گردید. نتایج نشان داد که مهم‌ترین اجزای اسانس در آویشن باغی، تیمول، کارواکرول، پی سایمن، لینالول، گاما ترپینن و برنئول می‌باشند و غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان این ترکیبات اثرات متفاوتی داشت. همچنین میزان تیمول در تیمار ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید به طور معنی‌داری افزایش و در تیمارهای ۵۰ و ۴۰۰ میکرومولار کاهش یافت. میزان کارواکرول در تیمارهای ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید به طور معنی‌داری افزایش یافت. از طرفی تیمار ۴۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید باعث کاهش معنی‌دار لینالول گردید. جاسمونیک اسید ۵۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار گاما ترپینن و تیمار ۲۰۰ میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار میزان گاما ترپینن شد. میزان پی سایمن در تیمارهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید به طور معنی‌داری افزایش یافت در حالی که غلظت ۵۰ میکرومولار جاسمونیک اسید به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان بورنئول شد. بنابراین از نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۴۰۰ میکرومولار این ماده هیچ گونه اثر افزایشی بر میزان این ترکیبات نداشته در حالی که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار اسید جاسمونیک میزان سه ترکیب تیمول، کارواکرول و پی سایمن موجود در اسانس به طور معنی‌داری افزایش یافت. بنابراین دامنه غلظت بین ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار اثر تحریکی بیشتری بر تولید ترکیبات موجود در اسانس این گیاه دارد.

کلمات کلیدی: آویشن، جاسمونیک اسید، اسانس، کروماتوگرافی گازی.

### مقدمه:

ترکیبات فرار و اسانس آن می‌باشد (امیدبیگی، ۱۳۸۴). اسانس گل و سر شاخه‌های آویشن دارای خواص دارویی از جمله اثر ضد روماتیسم، ضد نفخ، ضد سیاتیک و ضد عفونی کننده قوی می‌باشد. همچنین از اسانس این گیاه برای تهیه دهان شویه و شربت‌های ضد سرفه استفاده می‌شود. گونه‌های مختلف آویشن دارای اثرات قوی ضد باکتری، ضد قارچ، ضد انگل، ضد اسپاسم و آنتی اکسیدانی می‌باشد. همچنین به میزان وسیع در مناطق مختلف جهان

سرد آویشن متعلق به تیره نعنائیان می‌باشد. نام علمی آویشن از واژه یونانی Thuo به معنای عطر گرفته شده است. این گیاه در نقاط مختلف ایران ۱۴ گونه دارد که برخی از آن‌ها انحصاری ایران می‌باشد. منطقه مدیترانه به عنوان مرکز گیاه آویشن معرفی شده است. این گیاه از جمله گیاهان دارویی معروف می‌باشد و اعتقاد بر این است که خواص دارویی و اثرات فیزیولوژیک آن مربوط به

با حمله پاتوژن‌ها یا زخمی شدن گیاه، القا بیوستنز آنها منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند آنیون‌های سوپر اکسید و رادیکال‌های پراکسید هیدروژن می‌شود (شبان‌ی و احسان پور، ۱۳۸۸؛ Creelman and Mullet, 1997).

هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان ترکیبات موجود در اسانس گیاه آویشن باغی می‌باشد تا بتوان جهت استفاده بهینه از سطح زیر کشت این گیاه غلظت بهینه این محرک را بر میزان ماده مؤثره اسانس این گیاه پیدا کرد.

### مواد و روش‌ها:

بذرهای گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد و جهت ضد عفونی نمودن بذرها از قارچ کش ریدومیل استفاده شد. بذرها در ۳۶ گلدان دو کیلو گرمی محتوی خاک مزرعه، کود پوسیده و ماسه بادی کشت داده شد و به مدت ۳ هفته روزانه آبیاری شدند. سپس گیاهان کشت داده شده با ارتفاع تقریبی ۷۰ میلی متر به ۴ گروه و هر کدام سه تکرار تقسیم شدند. گروه اول گیاهان شاهد که با آب مقطر محلول پاشی شدند. سایر گروه‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید ( $\Sigma$ ) محلول پاشی شدند انتخاب غلظت‌ها بر اساس مطالعات انجام شده در مورد اثر اسید جاسمونیک بر سایر گیاهان و در سه غلظت کم، متوسط و بالا انتخاب شد. محلول پاشی ۲ بار در ابتدای فاز نوری و با فاصله یک ماه انجام شد. میزان محلول استفاده شده در هر نوبت محلول پاشی حدوداً ۵۰۰ سی سی بود. پس از برداشت گیاهان، عمل خشکانیدن در محیط سایه تا رسیدن به وزن ثابت انجام شد. سپس گیاهان با کمک دستگاه مولینکس آسیاب و با استفاده از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شدند. اسانس بدست آمده با کمک دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شدند. تجزیه آماری داده‌ها نیز با کمک نرم افزار SSPS با ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

به عنوان نوشیدنی، طعم دهنده مواد غذایی و داروی گیاهی کاربرد دارد (اکبری نیا و همکاران، ۱۳۸۹؛ امید بیگی، ۱۳۸۴).

اسانس آویشن مایعی زرد رنگ یا قهوه‌ای مایل به قرمز تیره با بوی مطبوع قوی و طعم تند و پایدار و خنک کننده است که از تقطیر برگ‌ها و سر شاخه‌های گل‌دار تیموس استخراج می‌شود (مومنی و شاه‌رخی ۱۳۷۰). مهمترین ترکیبات فنلی این اسانس تیمول و کارواکرول و مهمترین ترکیبات غیر فنلی آن را لینالول و پی سایمن گزارش کرده اند (Ozcan and Chalchat, 2004). همچنین تحقیقات دیگر نیز نشان داده اند که اصلی ترین ترکیبات موجود در آویشن باغی تیمول، کارواکرول، پی سیمن، بورنتول و گاماترین می‌باشد که میزان آنها تحت تأثیر دو عامل محیط و ژنتیک است (Dababneh, 2007).

استفاده از متیل جاسمونات و ترکیبات مشابه راهکاری مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و پاتوژن‌ها محسوب می‌شود (Cheong and Choi, 2003; Avanci et al., 2010). اثرات فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها در گیاهان بسته به گونه گیاهی، مرحله نمو و غلظت به کار رفته در آن متفاوت است. این مواد دارای نقش تنظیمی در فعالیت‌های متابولسمی و فیزیولوژیکی گیاهان می‌باشند و در طول دوره نمو گیاه و سازگاری با تنش‌های زیستی و غیر زیستی به عنوان مولکول‌های پیام رسان عمل می‌کنند. همچنین این ترکیب در بعضی از تحقیقات برای القای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده می‌شوند (Kozłowski et al., 1999)؛ قاسمی پیر بلوطی، ۱۳۸۸). جاسمونات‌ها از مسیر لینولینیک اسید مشتق شده‌اند و مشابه سایر تنظیم کننده‌های رشد و نمو گیاهی اثرات متنوعی از جمله ممانعت از پیری زودرس، ریزش و پیچش برگ، بسته شدن روزنه دارند. از طرفی این ترکیبات به عنوان پیام رسان کلیدی معرفی شده و در فرآیند القا منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. جاسمونیک اسید و استر متیله آن (متیل جاسمونات) طیف وسیعی از پاسخ‌های نمو را در گیاه تنظیم می‌کند.

**نتایج:**

نتایج بدست آمده نشان داد، که مهم ترین ترکیبات موجود در آویشن باغی تیمول (۳۸- ۴۸/۸ درصد)، کارواکربول (۲/۲- ۱۳/۷۵ درصد)، پی سایمن (۱۲/۶- ۱۸/۸ درصد)، گاما ترپینن (۱۵/۲- ۲۴/۴ درصد)، لینالول (۲/۱- ۳/۱۱ درصد) و برنئول (۲- ۲/۸ درصد) می باشد.

**تیمول:** آنالیز آماری نمونه‌ها نشان داد که تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید باعث افزایش معنی دار میزان تیمول و غلظت های ۵۰ و ۴۰۰ میکرومولار باعث کاهش معنی دار آن گردیده است (شکل ۱).

**کارواکربول:** آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که در بین تیمارهای جاسمونیک اسید غلظت ۲۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی دار میزان کارواکربول در حالی که تیمارهای ۵۰ و ۴۰۰ میکرومولار این ماده اختلاف معنی داری در میزان کارواکربول در مقایسه با نمونه شاهد ایجاد نکرد (شکل ۲).

**لینالول:** آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که در بین تیمارهای جاسمونیک اسید هیچ کدام از تیمارهای استفاده شده تفاوت معنی داری در میزان لینالول نسبت به شاهد نشان ندادند (شکل ۳).

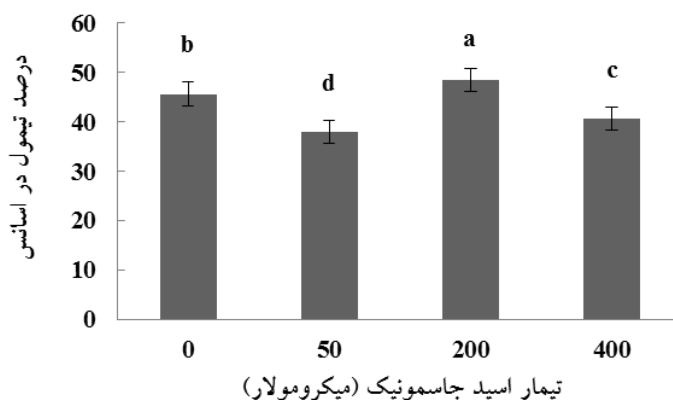
**ترپینن:** آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که در بین تیمارهای جاسمونیک اسید تیمار ۵۰ میکرومولار افزایش معنی دار و تیمار ۲۰۰ میکرومولار نیز کاهش معنی داری در میزان ترپینن نشان داد (شکل ۴).

**پی سایمن:** آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که تیمار جاسمونیک اسید ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی دار میزان پی سایمن نسبت به شاهد شد در حالی که اثر جاسمونیک اسید ۵۰ میکرومولار در این مورد بیشتر بود (شکل ۵).

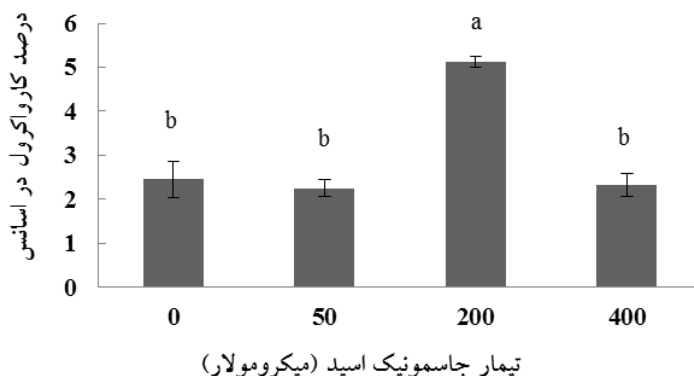
**بورنئول:** آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که در بین تیمارهای جاسمونیک اسید، غلظت ۵۰ میکرومولار باعث ایجاد کاهش معنی دار در میزان بورنئول شد در حالی که سایر تیمارها تفاوت معنی داری را در میزان این ماده نسبت به شاهد ایجاد نکردند (شکل ۶).

**بحث و نتیجه گیری:**

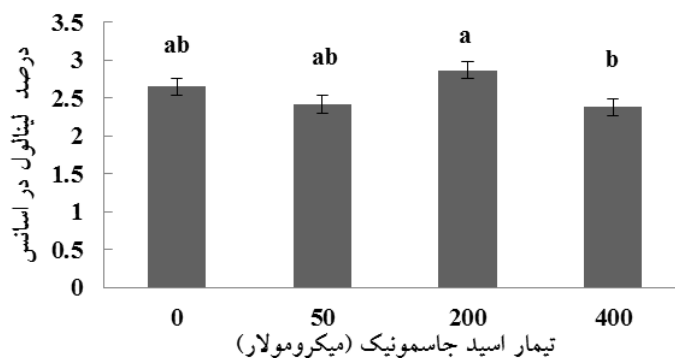
جاسمونات‌ها از تنظیم کننده‌های رشد و نمو گیاهی می‌باشند که نقش‌های متفاوت تحریک کننده و یا بازدارنده بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی و رشد گیاهان دارند. جاسمونیک اسید یکی از ترکیبات سیکلوپنتان مشتق شده از اسید لینولنیک می‌باشد که از مسیر اکتا دکانوئید سنتز می‌شود و در قلمرو گیاهی پراکنش گسترده‌ای دارند. کاربرد جاسمونیک اسید اثرات متنوع فیزیولوژیکی و آناتومیکی بر گیاهان داشته و بنابراین به عنوان تنظیم کننده رشد در گیاه عمل می‌کند. امروزه مطالعات زیادی بر روی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد به خصوص جاسمونیک اسید بر گیاهان دارویی در حال انجام است که نتایج آن نشان می‌دهد این مواد آثار متفاوتی بر تعداد و نوع ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی داشته‌اند (Goyal, and Ramawat, 2008; Stahl- Biskup, 2002). گزارش شده است که در گیاه شیرین بیان غلظت‌های ۱ و ۲ میلی مولار متیل جاسمونات باعث افزایش میزان ترکیبات فنولیک و فلاونوئید شد. همچنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی در این گیاه نشان داد که غلظت‌های بیشتر از ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات در طی ۲۴ ساعت پس از تیمار فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیز را نسبت به گیاه شاهد تا دو برابر افزایش داد (شبانلی و احسان پور، ۱۳۸۸). در این تحقیق دیده شده که تجمع ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تحت تیمار با متیل جاسمونات افزایش یافته است. با توجه به اینکه فعالیت این آنزیم در اولین مرحله از بیوسنتز فنیل پروپانوئید است و این مرحله نقطه انشعابی میان متابولیسم اولیه و ثانویه را کاتالیز می‌کند. می‌توان نتیجه گرفت که غلظت مناسب متیل جاسمونات توان تحریک تولید متابولیت‌هایی که از این مسیر تولید می‌شوند را دارد. همچنین گزارش شده است این آنزیم نقش مهمی در بیوسنتز فلاونوئیدها، لیگنین‌ها و بسیاری از ترکیبات دیگر ایفا می‌کند (قناتی و همکاران، ۱۳۸۹). اسپولانسکی و



شکل ۱- بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان تیمول در گیاه آویشن باغی (حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح  $P \leq 0/05$ ).



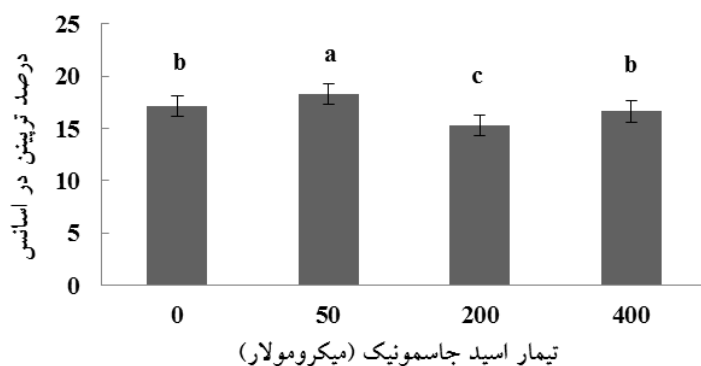
شکل ۲- بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان کارواکرول در گیاه آویشن باغی (حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح  $P \leq 0/05$ ).



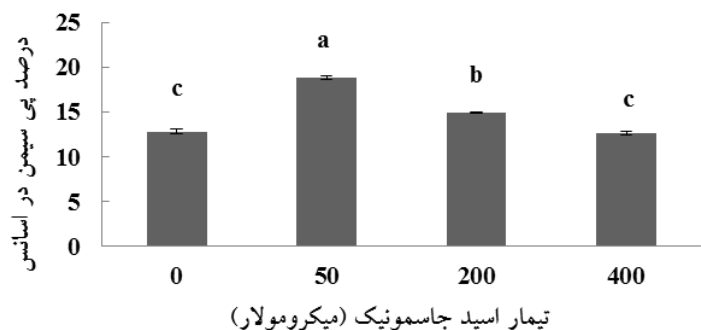
شکل ۳- بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان لینالول در گیاه آویشن باغی (حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح  $P \leq 0/05$ ).

این گیاه میزان ماده خشک و تر و میزان آلکالوئیدهای تروپان در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به

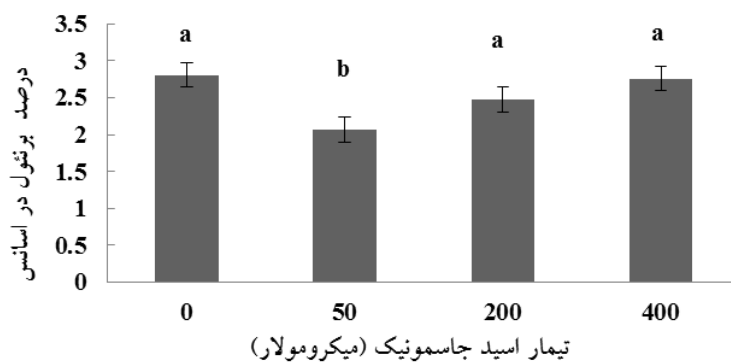
همکاران در سال ۲۰۰۰ طی مطالعه‌ای بر روی گیاه *Brugmansia candida* مشاهده کردند که در کشت ریشه



شکل ۴- بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان ترپین در گیاه آویشن باغی (حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح  $P \leq 0/05$ ).



شکل ۵- بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان پی‌سپین در گیاه آویشن باغی (حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح  $P \leq 0/05$ ).



شکل ۶- بررسی اثر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان بورتول در گیاه آویشن باغی (حروف مشابه نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح  $P \leq 0/05$ ).

دیده شد که متیل جاسمونات باعث افزایش تولید ماده کپساسین در این شرایط شد (Sudha and Ravishankar, 2003). در تحقیقی دیگر، Goyal و Ramawat (۲۰۰۸) با

بیشترین مقدار خود رسید، در حالی که در غلظت ۴۰۰ میکرومولار این مقدار کاهش یافت (Spollanesky *et al*, 2000). در کشت سلولی گیاه فلفل

اسانس شامل کارواکرول و تیمول افزایش یافتند. قابل توجه است که ترکیب لینالول در هیچ کدام از این تیمارها افزایش معنی داری نداشت. با توجه به اینکه این ترکیب از نظر ساختار شیمیایی غیر فنلی می‌باشد اما دیده می‌شود که غلظت‌های ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید بر تولید پی سایمن که آن هم از دسته ترکیبات غیر فنلی می‌باشد اثر تحریکی دارد. پس می‌توان نتیجه گیری کرد که غلظت‌های متفاوت اسید جاسمونیک بر فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی و سایر مسیرهای تولید اسانس در گیاه آویشن اثرات متفاوتی دارد و تحقیقات بیشتری با دامنه غلظتی بیشتر برای نتیجه گیری دقیق تر در مورد تأثیر اسید جاسمونیک بر مسیرهای مختلف تولید مواد موجود در اسانس گیاه آویشن لازم است. اما با توجه به آزمایش طرح شده در این پژوهش و با در نظر گرفتن این موضوع که بیشترین درصد مواد موجود در اسانس آویشن مربوط به دو ماده کارواکرول و تیمول است استفاده از غلظت ۲۰۰ میکرومولار این ماده باعث تحریک مسیر بیوستزی ترکیبات کارواکرول و تیمول و افزایش بازده اسانس در گیاه آویشن می‌شود.

تأثیر غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بر گیاه *Puerraria tuberosa* به این نتیجه رسیدند که تیمار ۴۰۰ میکرومولار این ترکیب بهترین تأثیر را بر افزایش تولید ایزوفلاونوئیدها در کشت سوسپانسیون داشت (Goyal and Ramawat, 2008). از طرفی قناتی و همکاران (۱۳۸۹) تأثیر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات را بر تولید متابولیت‌های ثانویه گل همیشه بهار بررسی کردند و نتایج نشان داد که محتوی کل فلاونوئید ریشه در تیمار ۵۰ میکرومولار در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی‌دار و در تیمار ۱۰۰ میکرومولار کاهش معنی‌دار را نشان داد، همچنین محتوی فنل‌های متصل به دیواره ریشه در تیمارهای متیل جاسمونات افزایش و در اندام هوایی کاهش یافت. طبق نظر این محققین متیل جاسمونات قدرت تغییر مواد تولید شده در مسیر فنیل پروپانوئیدی را دارد (قناتی و همکاران، ۱۳۸۹). در این پژوهش با توجه به نتایج بدست آمده، بهترین تیمار غلظت ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید می‌باشد، زیرا باعث افزایش تعداد بیشتری از متابولیت‌های ثانویه شد و به ویژه در این تیمارها ترکیبات فنلی اصلی

#### منابع:

- اکبری نیا، ا.، شریفی عاشور آبادی، ا. و میرزا، م. (۱۳۸۹) فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲: ۲۰۵-۲۱۴.
- امیدیگی، ر. (۱۳۷۴) کشت گیاهان دارویی و نکاتی مهم پیرامون آنها. ماهنامه دارویی رازی. سال پنجم ۷: ۲۴-۳۹.
- امید بیگی، ر. (۱۳۸۴) تولید و فراوری گیاهان دارویی، جلد سوم، انتشارات آستان قدس رضوی.
- امیدیگی، ر. (۱۳۸۴) رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات طراحان نشر.
- شبنانی، ل. و احسان پور، ع. ا. (۱۳۸۸) القاء آنزیم‌های آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک، فلاونوئید در کشت درون شیشه‌ای شیرین بیان با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. مجله زیست شناسی ایران ۴: ۶۹۱-۷۰۳.
- قاسمی پیر بلوطی، ع. (۱۳۸۸) گیاهان دارویی و معطر (شناخت و بررسی اثرات آنها)، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی.
- قناتی، ف.، بختیاران، س. و عبدالمالکی، پ. (۱۳۸۹) تأثیر متیل جاسمونات بر متابولیت‌های ثانویه گل همیشه بهار. علوم و فناوری زیستی مدرس ۱: ۲۱-۳۳.
- مومنی، ت و شاهرخی، ن. (۱۳۷۰) اسانس‌های گیاهی و اثرات درمانی آنها. انتشارات دانشگاه تهران.
- Avanci, N. C., Luche, D. D., Goldman G. H. and Goldman M. H. S. (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research* 1: 484- 505.
- Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997) Oligosacchins, brassinolides and jasmonates:

- Phythium ultimum*. Physiological, Molecular and Plant Pathology 55: 53- 58.
- Ozcan, M. and Chalchat, J. C. (2004) Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey, Bulgarian Journal of Plant Physiology 30:68-73
- Spollanesky, C., Pitta- Alvarez, S. and Giulietti, A. (2000) Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Electronic Journal of Biotechnology 1:72-75
- Sudha, G. and Ravishankar, G. A. (2003) Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. Current Science.8:1212-1217.
- nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. American Society of Plant Biology 9: 1211- 1223.
- Cheong, J. J. and Choi, Y. (2003) Methyl jasmonate is a vital substance in plants. Trends in Genetics 7:409-413
- Dababneh, B. F. (2007) Antimicrobial activity and genetic diversity of Thyme species on pathogenic microorganisms. Journal of Food, Agriculture and Environment 5:158-162
- Goyal, S. and Ramawat, K. G. (2008) Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* by elicitors, Indian Journal of Biotechnology 7 :378– 382.
- Kozłowski, G., Buchala, A. and Metraux, J. P. (1999) Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against