فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱، شماره ۲، سال ۱۳۹۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶/۰۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۹/۱۳

بررسی اثر جاسمونیک اسید بر ترکیبات ترپنوئیدی در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa L.*) در مرحله‌ی رویشی

فاطمه سالاری[۱]* و حکیمه منصوری[۱]
[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده:

در این مطالعه به بررسی اثر جاسمونیک اسید بر ترکیبات ترپنوئیدی مشتق شده از مسیر پلاستیدی سنتز ترپنوئیدها در گیاه شاهدانه با نام علمی *Cannabis sativa* L. که در مرحله رویشی بررسی گردید، پرداخته شد. غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید برای تیماردهی گیاهان استفاده شد. تیمارهای جاسمونیک اسید منجر به افزایش محتوی کلروفیل a و کلروفیل کل در مقایسه با گیاهان کنترل شد. اما محتوی کلروفیل b فقط در تیمار ۵ میکرومولار افزایش یافت. همچنین محتوی کاروتنوئیدها در همه‌ی تیمارها نسبت به گیاهان کنترل افزایش یافت و بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقدار α-توکوفرول هم تحت تأثیر تیمار های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافت. تیمارهای ۱و ۵ میکرومولار جاسمونیک اسید باعث افزایش سطح تتراهیدروکانابینول (Δ^9-Tetrahydrocannabinol) (مهمترین ترکیب دارویی این گیاه) شد که این افزایش سطح در تیمار ۵ میکرومولار مؤثرتر از تیمار ۱ میکرومولار بود. سطح کانابیدیول Cannabidiol در همه گیاهان تیمار شده کاهش یافت. نسبت THC/CBD در گیاهان شاهد حدود ۰.۴ بود که این نسبت در تیمارهای ۱ و ۵ میکرومولار افزایش یافت و به حدود ۱۴.۵۸ و ۱۵ رسید. نتایج نشان می‌دهد که جاسمونیک اسید انباشت ترپنوئدهای اولیه و ثانویه را در کلروپلاست تحریک می‌کند.

کلمات کلیدی: تتراهیدروکانابینول (THC)، α-توکوفرول، ترپنوئید، جاسمونیک اسید ، شاهدانه، کانابیدیول (CBD)،

مخفف‌ها:

THC	Δ^9- Tetrahydrocannabinol
CBD	Cannabidiol
IPP	isopenthenylpyrophosphate

مقدمه:

ترپنوئیدها یک خانواده بزرگ از محصولات طبیعی را تشکیل می‌دهند و نقش‌های مختلفی در گیاهان ایفا می کنند. از جمله این ترکیبات هورمون‌های گیاهی (ژیبرلیک اسید، آبسیزیک اسید)، پیگمان‌های فتوسنتزی (کاروتنوئید، دم فیتولی کلروفیل)، ناقل‌های الکترون (یوبی کینون و پلاستوکینون) و ترکیبات ساختاری غشا (فیتواسترول) می باشند. ترپنوئیدها شامل طیف وسیعی از تولیدات مفید تجاری از جمله حلال ها، چاشنی ها، مواد معطر و مواد چسبنده هستند. همچنین پلیمرهای مفید صنعتی (لاستیک و کائوچو) و داروها در این گروه قرار می‌گیرند. ترکیبات ترپنوئیدی در روابط و دفاع گیاه مانند جلب گرده‌افشان‌ها،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: salari_2565@yahoo.com

پراکنش دانه، فیتوکسین‌های رقابتی، آنتی بیوتیک‌ها، دفع علف‌خواران و توکسین‌ها نقش دارند (McGarvey and Croteau, 1995).

ایزوپرنوئیدها به وسیله‌ی واکنش‌ها و ترکیب پیاپی پیش‌ساز ۵ کربنه‌ی ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP، isopenthenylpyrophosphate) و ایزومر آن، دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) تولید می‌شوند. در گیاهان دو مسیر بیوسنتزی متفاوت برای ترپنوئیدها وجود دارد. مسیر سیتوپلاسمی موالونات (MVA) که در حیوانات و قارچ‌ها مشترک است، و سنتز سزکوئی‌ترپن و تری‌ترپن‌هایی مانند استرول‌ها و همچنین پیش‌سازهای لازم برای تولید یوبی کینون و پرنیل‌دار شدن پروتئین‌ها و تولید Heme A در میتوکندری بوسیله این مسیر انجام می شود. اخیرا مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP، 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphate) نیز شناسایی شده است که در پلاست‌های گیاهان و همچنین در پروتوزوا، اغلب باکتری‌ها و جلبک‌ها نیز انجام می شود. این مسیر IPP لازم برای تولید ایزوپرن، مونوترپن‌ها (مانند لیمونن)، دی‌ترپن‌ها، کاروتنوئید، پلاستوکینون، فیتول (مثل دم فیتولی کلروفیل) و توکوفرول‌ها را فراهم می‌کند (Estevez *et al*., 2001).

گیاه شاهدانه برای انسان از جنبه‌های مختلف مورد توجه است. شاهدانه یکی از بهترین منابع فیبر طبیعی است. روغن دانه شاهدانه دارای اسیدهای چرب امگا 3 و 6 است و می‌تواند در تغذیه انسان جایگزین روغن ماهی شود. روغن دانه‌ها می‌تواند به ترمیم و مرطوب ماندن پوست کمک کند و به عنوان صابون، شامپو و لوسیون استفاده شود. استفاده‌های دارویی از شاهدانه تاریخچه‌ی طولانی دارد (Pinarkara *et al*., 2004; Hazekamp, 2009). به نظر می‌رسد که شاهدانه به عنوان یک منبع برای تولید متابولیت‌های ثانویه است. انواعی از آلکان‌ها، ترکیبات نیتروژن‌دار، فلاونوئیدها و دیگر ترکیبات در شاهدانه شناسایی شدند. ترپن‌ها در شاهدانه بسیار زیاد هستند و در مشخصات خاص گیاه مثل بو و رایحه‌ی آن نقش دارند. ترکیباتی که دارای ویژگی‌های فعال دارویی هستند منحصر به این جنس هستند و با نام کانابینوئیدها معرفی می‌شوند. کانابینوئیدها ترکیبات ترپنوفنولیک هستند که توسط مسیر پلاستیدی سنتز می‌شوند. بیش از ۶۰ نوع کانابینوئید در شاهدانه شناسایی شده است (Pate, 1994). اما به هر صورت cannabis به دو تیپ فیبری و دارویی طبقه بندی می‌شود که تفاوت مهم بین این دو تیپ مربوط به محتوی ترکیبات فعال، تتراهیدروکانابینول (THC، Δ9-tetrahydrocannabinol) و پیش‌ساز آن تتراهیدرو کانابینولیک اسید (THCA، tetrahydrocannabinolic acid) است. گیاهی با محتوی بالای THC و THCA به عنوان نوع دارویی طبقه بندی می‌شود در حالی که گیاهی با محتوی THC و THCA پایین (زیر 0.2 تا 0.3 درصد وزن خشک) نوع فیبری است (Hazekamp, 2009).

جاسمونیک اسید و متیل‌جاسمونیک اسید خانواده جدیدی از هورمون‌های گیاهی هستند که در کل به آنها جاسمونیک اسیدها گفته می‌شود، و نقش مهمی در تنظیم فرآیند رشد و نمو دارد (Gao *et a*l., 2004).

در دهه ۱۹۶۰ برای اولین بار متیل‌استرجاسمونیک چپ گرد(−) به عنوان متابولیت‌های ثانویه در اسانس گیاه گل یاس (*Jasminum grandiflorom*) یافت شدند (Wasternack and Parthier, 1997). دو دهه پس از شناسایی اولیه جاسمونیک اسیدها، نخستین تأثیرهای فیزیولوژیکی آن‌ها شناسایی شد و این مواد به عنوان پیش برنده‌ی پیری، بازدارنده‌ی رشد و محرک‌هایی برای متابولیسم ثانویه در گونه‌های مختلف گیاهی شناخته شدند(Balbi and Devoto, 2008). مطالعات انجام شده نشان داده است که جاسمونیک اسید باعث القاء مسیر بیوسنتزی پلاستیدی تنرپنوئیدها به خصوص مونوترپن‌ها می‌شود. از جمله این تحقیقات، مطالعه‌ای است که

Ament و همکاران (۲۰۰۴)در ارتباط با نقش ترکیبات ترپنوئیدی در پاسخ‌های دفاعی گیاه گوجه فرنگی، انجام دادند. آنها گزارش کردند که در موتانت def-1 گوجه فرنگی (نقص در انباشت جاسمونیک اسید القاء شده در پاسخ دفاعی) ترکیبات فرار ترپنوئیدی مختلف سنتز نمی شوند. نتایج حاصل از کار آنها نشان داد که جاسمونیک اسید یک تنظیم کننده کلیدی در القاء سنتز ترکیبات ترپنوئیدی است (Ament *et al*., 2004). گیاه کاج نوئل انواع اسیدهای رزینی دی ترپن، سزکوئی ترپن و مونو ترپن را تولید می‌کند. الئورزین‌ها در مجرای رزینی کرتکس و فلوئم ساقه گیاه انباشته می‌شوند. تشکیل مجرای رزینی در زایلم ثانویه هم پس از حمله حشرات، قارچ‌ها و آسیب های مکانیکی مشاهده می‌شود. مطالعه‌ای که Martin و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند نشان داد که متیل جاسمونات تشکیل مجرای رزینی در زایلم ساقه گیاه کاجل نوئل و همچنین بیوسنتز و انباشت رزین‌های ترپنوئیدی را در این گیاه القاء می‌کند. همچنین Ferrieri و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که جاسمونیک اسید بیوسنتز ایزوپرنوئیدها را در سپیدار افزایش می‌دهد.

در این آزمایش اثر جاسمونیک اسید بر کانابینوئیدهای اصلی گیاه شاهدانه و بعضی متابولیت‌های اولیه ترپنوئیدی بیوسنتز شده از مسیر پلاستیدی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

کشت گیاه: بذر گیاه شاهدانه در گلدان‌هایی به قطر ۱۰ سانتی‌مترحاوی پرلیت و در شرایط گلخانه‌ای کنترل شده کشت شد. پس از رویش تعداد گیاهان به یک گیاه در هر گلدان کاهش داده شد. گیاهان در گلخانه (۱۶ 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).

تیماردهی گیاهان: پس از این که گیاه به مرحله‌ی هفت جفت برگی رسید، تیمار جاسمونیک اسید در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار به صورت محلول‌پاشی و هفته‌ای دوبار به مدت ۴ هفته اعمال شد. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. از tween 20 به عنوان سورفاکتانت در مرحله‌ی محلول‌پاشی استفاده شد. محلول‌پاشی گیاهان در محفظه‌های مخصوص انجام شد. در گیاهان کنترل از آب مقطر به جای محلول هورمونی استفاده شد. یک هفته پس از آخرین تیمار برگ‌ها گیاهان جمع‌آوری و با ازت مایع فریز شد. پارامترهای مورد نظر با روش‌های ارائه شده اندازه‌گیری شد.

عصاره‌گیری THC و CBD: جهت اندازه‌گیری THC و CBD بافت تازه‌ی گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و دور از نور خشک شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر برگ در یک لوله‌ی آزمایش قرار داده شد و به آن ۱ میلی‌لیتر کلروفورم اضافه شد. عصاره به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد. سپس نمونه سانتریفیوژ شد. حلال خشک شد و باقیمانده در ۰/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد.

اندازه‌گیری THC و CBD با روش کروماتوگرافی مایع (HPLC): 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 C_{18} (RP_{18}) بود. فاز متحرک متانول-آب با نسبت ۸۰ : ۲۰ با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج ۲۳۰ nm برای آنالیز نمونه های استاندارد و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود.

تهیه‌ی محلول‌های استاندارد THC و CBD و رسم منحنی استاندارد: محلول‌های استاندارد THC و CBD تهیه شد. محلول‌های (ppm)۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ THC و CBD از محلول پایه تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از هر محلول

استاندارد به دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی استاندارد THC و CBD بر اساس سطح زیر پیک رسم شد.

اندازه‌گیری α-توکوفرول: توکوفرول‌ها به وسیله‌ی سائیدن ۰.۱ میلی‌گرم بافت تازه برگ در ۱ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد عصاره‌گیری شد. عصاره به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در rpm ۱۴۰۰۰ 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-توکوفرول به دستگاه HPLC تزریق شد.

اندازه‌گیری α-توکوفرول با روش کروماتوگرافی مایع (HPLC): اندازه‌گیری α-توکوفرول بوسیله‌ی دستگاه HPLC ساخت شرکت Agilent استرالیا با آشکار ساز فلوئورسانس انجام شد. ستون مورد استفاده برای جداسازی α-توکوفرول ستون C_{18} بود. متانول ۱۰۰ درصد به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج تحریک (excitation) ۲۹۵ nm و طول موج انتشار (emission) ۳۲۵ nm دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای آنالیز نمونه‌های استاندارد و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت (Sattler *et al*., 2003).

تهیه محلول استاندارد α-توکوفرول و رسم منحنی استاندارد: استاندارد α-توکوفرول {(±)-α-tocopherol} از شرکت sigma تهیه شد. محلول‌های (ppm) ۱، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ 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.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سطح برگ: برای اندازه‌گیری سطح برگ، از برگ‌های سوم گیاه کپی کاغذی تهیه شد. سپس وزن مربعی از کاغذ به ابعاد ۱*۱ سانتی‌متر را به دست آورده و با رابطه تناسبی سطح برگ بر اساس وزن آن مشخص شد و بر اساس سانتی‌متر مربع گزارش شد.

طرح آماری: این تحقیق در قالب یک طرح کاملا تصادفی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

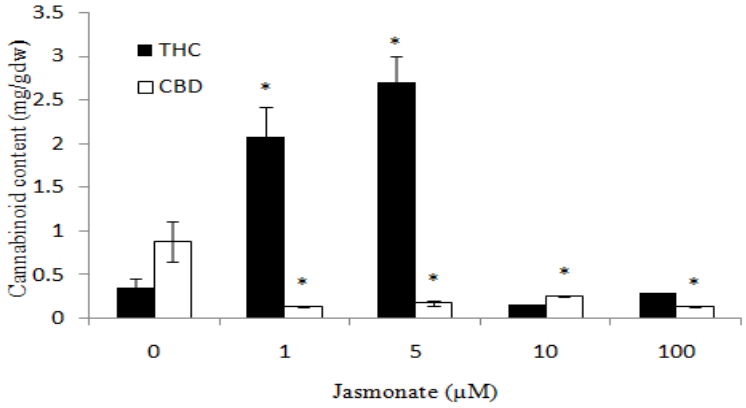
نتایج:

اثر جاسمونیک اسید بر مقدار ترکیبات ترپنوئیدی THC و CBD:

ترکیبات THC و CBD دو ترکیب ترپنوئیدی خاص گیاه شاهدانه هستند که از مسیر کلروپلاستی سنتز ترپنوئیدها مشتق می‌شوند. به منظور بررسی اثر هورمون جاسمونیک اسید بر بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی، تغییر مقدار این ترپنوئیدها مورد مطالعه قرار گرفت. تیمار جاسمونیک اسید باعث افزایش مقدار THC در دو غلظت ۱و ۵ میکرومولار شد. این دو تیمار به ترتیب مقدار THC را حدود ۵.۷ و ۷.۵ برابر در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد افزایش دادند (شکل۱). مقدار CBD در گیاهان شاهد حدود دو برابر مقدار THC بود. مقدار CBD تحت تأثیر تیمار جاسمونیک اسید در همه‌ی غلظت‌ها کاهش یافت (شکل ۱). نسبت THC/CBD در گیاهان شاهد حدود ۰.۴ بود که این نسبت در تیمارهای ۱و ۵ میکرومولار افزایش یافت و به حدود ۱۴.۸۵ و ۱۵ رسید.

اثر جاسمونیک اسید بر مقدار α-توکوفرول:

تیمار جاسمونیک اسید در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار



شکل ۱ - بررسی اثر جاسمونیک اسید بر مقدار THC و CBD در برگ‌های گیاه شاهدانه

اعداد میانگین ۴ تکرار هستند و علائم روی ستون‌ها SE را نشان می‌دهد. میانگین‌هایی که * دارند با حدود اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی دار دارند.ستون‌های سیاه مربوط به THCو ستون‌های سفید مربوط به CBD هستند.

باعث افزایش سطح α-توکوفرول شد. بیشترین مقدار α-توکوفرول مربوط به تیمار ۱۰ میکرومولار بود. در سطح تیمار های دیگر تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۲).

اثر جاسمونیک اسید بر مقدار کاروتنوئیدها:

تمام تیمارهای جاسمونیک اسید منجر به افزایش مقدار کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد شد. این افزایش مقدار وابسته به غلظت جاسمونات نبود و تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (شکل۳).

اثر جاسمونیک اسید بر مقدار کلروفیل‌ها:

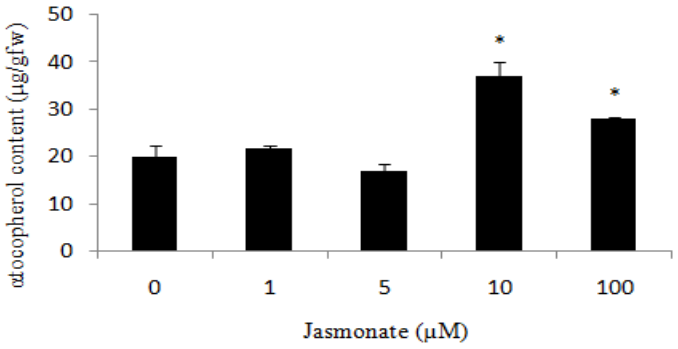
تیمار جاسمونیک اسید در تمام غلظت‌ها منجر به افزایش معنی‌دار سطح کلروفیل a شد. کلروفیل b هم تحت تأثیر تیمار غلظت ۵ میکرومولار جاسمونیک اسید افزایش و تحت تأثیر تیمار ۱۰۰ میکرومولار کاهش یافت (شکل ۴ الف). سطح کلروفیل کل هم در همه تیمارها افزایش یافت (شکل ۴ ب).

اثر جاسمونیک اسید بر سطح برگ:

سطح برگ گیاهان تیمار شده با جاسمونیک اسید تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نداشت (شکل ۵).

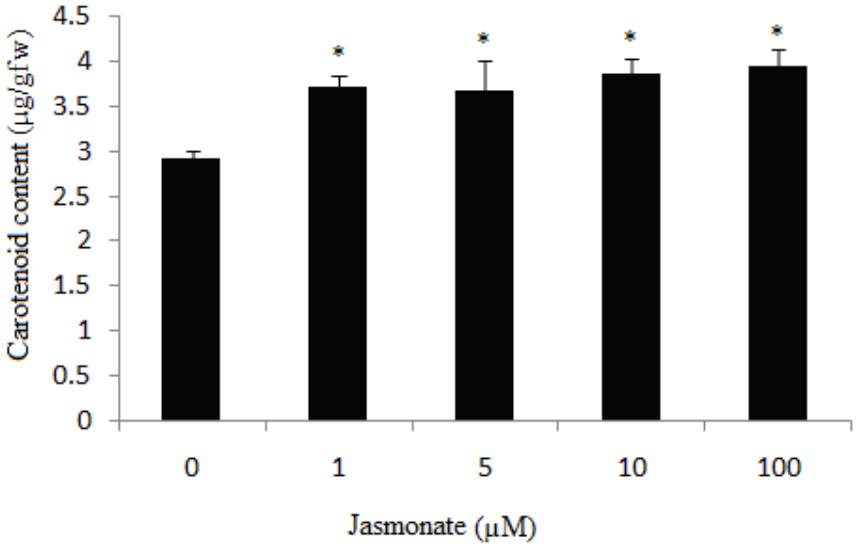
بحث:

با توجه به اهمیت و منحصر به فرد بودن کانابینوئید های موجود در شاهدانه تحقیقات کاملی در مورد بیوسنتز این ترکیبات انجام شده است و مسیر بیوسنتزی و آنزیم های دخیل در بیوسنتز آن‌ها شناسایی شده است ولی در مورد مکانیسم‌های تنظیم کننده‌ی بیوسنتز این ترکیبات و تأثیر عوامل مختلف بخصوص تأثیر هورمون‌های گیاهی بر مقدار آن‌ها کمتر مطالعه شده است. در مطالعه حاضر اثر هورمون جاسمونیک اسید بر ترکیبات ترپنوئیدی اولیه و ثانویه سنتز شده از مسیر پلاستیدی در گیاه شاهدانه مورد بررسی قرار گرفت. جاسمونیک اسید منجر به افزایش سطح ترکیب ترپنوئیدی THC شد. گزارشات متعددی در زمینه بررسی اثر جاسمونیک اسید بر ترکیبات ترپنوئیدی بخصوص مونوترپن‌ها که عمدتا از مسیر پلاستیدی سنتز ترپنوئیدها مشتق می‌شوند، وجود دارد که نتایج این مسیر



شکل ۲- بررسی اثر جاسمونیک اسید بر مقدار α-توکوفرول در برگ‌های گیاه شاهدانه

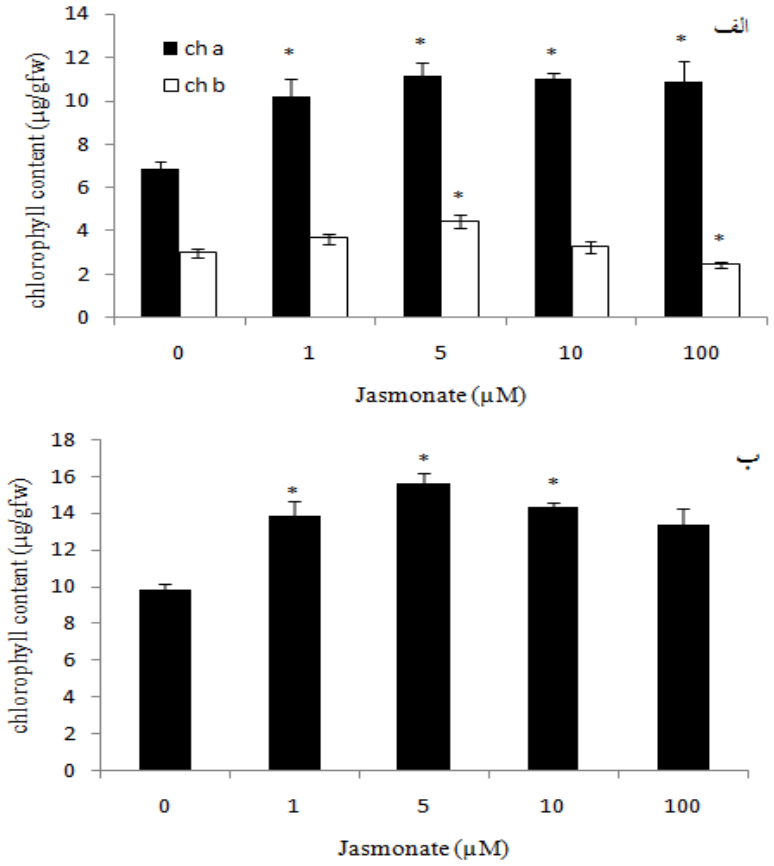
اعداد میانگین ۴ تکرار هستند و علائم روی ستون‌ها SE را نشان می‌دهد. میانگین‌هایی که * دارند با حدود اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار دارند.



شکل ۳- بررسی اثر جاسمونیک اسید بر مقدار کارتنوئیدها در برگ‌های گیاه شاهدانه.

اعداد میانگین ۴ تکرار هستند و علائم روی ستون‌ها SE را نشان می‌دهد. میانگین‌هایی که * دارند با حدود اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار دارند

بیوسنتزی ترپنوئیدها می‌شود. از جمله القای ژرانیل ژرانیل دی فسفات سنتتاز تحت تأثیر جاسمونیک اسید برونزا در گیاه گوجه فرنگی است که منجر به افزایش سطح ترکیبات ترپنوئیدی مانند 4,8,12-Trimethyl trideca-1,3,7-tetraene (TMTT)، لینالول و ترانس نرولیدول و ... می‌شود (Ament *et al.*, 2004). همچنین گزارش شده است که جاسمونیک اسید در تریکوم‌های گیاه گوجه فرنگی باعث القای ژن لینالول سنتتاز می‌شود (Schie and Haring, 2007). در گزارش دیگری عنوان شده است که جاسمونیک اسید برونزا بیوسنتز ایزوپرن‌ها را در سپیدار افزایش می‌دهد (Ferrieri *et al.*, 2005). ولی از طرفی در این مطالعه مقدار کانابینوئید دیگر یعنی CBD تحت تاثیر این تیمار

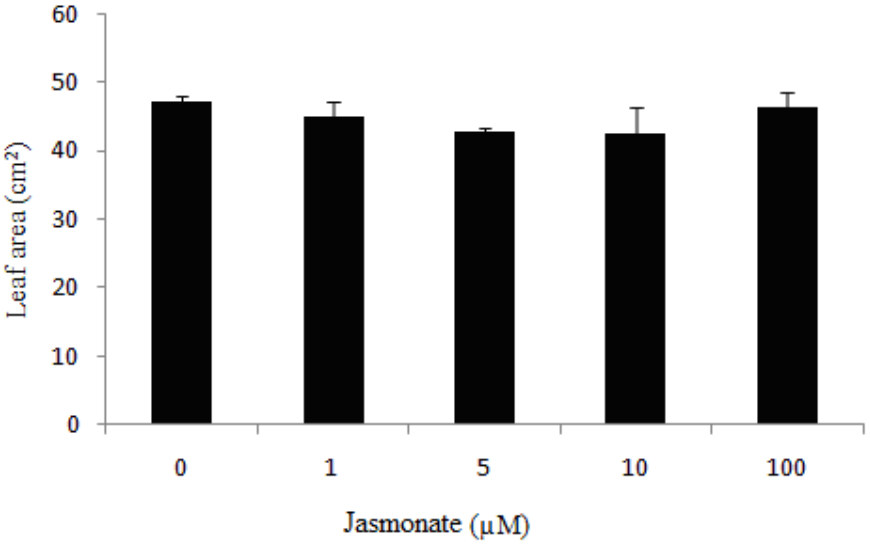


شکل ۴- بررسی اثر جاسمونیک اسید بر مقدار کلروفیل a و b (الف) و کلروفیل کل (ب) در برگ‌های گیاه شاهدانه.

اعداد میانگین ۴ تکرار هستند و علائم روی ستون‌ها SE را نشان می‌دهد. میانگین‌هایی که * دارند با حدود اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

کاهش پیدا کرد. این موضوع احتمالاً نشان دهنده نقش متفاوت ترکیبات ترپنوئیدی در گیاه می‌تواند باشد. دو ترکیب THC و CBD در مسیر بیوسنتزی از یک پیش‌ساز مشترک سنتز می‌شوند. این احتمال وجو دارد که توقف یا کاهش سنتز یکی از این ترکیبات باعث افزایش سنتز دیگری می‌شود به این ترتیب در تیمارهای غلظت‌های ۱و ۵ میکرومولار سطح THC افزایش اما سطح CBD کاهش یافت. اما در مورد غلظت های بالاتر یعنی غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار سطح THC نسبت به گیاهان شاهد تغییر نکرد اما سطحCBD کاهش یافت، درست در همین تیمارها سطح α-توکوفرول افزایش یافت. یعنی افزایش سطح α-توکوفرول در تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار نسبت به تیمارهای ۱و ۵ میکرومولار ممکن است منجر به کاهش سطح THC شده باشد. یعنی در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها، احتمالا پیش‌سازها به سمت تولید α-توکوفرول بیشتر پیش می روند و سطح THC نسبت به تیمارهای ۱ و ۵ میکرومولار کاهش می یابد.

α-توکوفرول یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی است که از پراکسیداسیون اسیدهای چرب در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ممانعت می‌کند. α-توکوفرول در ساختمان خود دارای یک دم لیپوفیلیک ایزوپرنوئیدی است (Jaleel *et al.*, 2007). کاروتنوئیدها نیز تتراترپن



شکل ۵- بررسی اثر جاسمونیک اسید بر سطح برگ.

اعداد میانگین ۴ تکرار هستند و علائم روی ستون‌ها SE را نشان می‌دهد. میانگین‌هایی که * دارند با حدود اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

است (Jaleel *et al.*, 2007). کاروتنوئیدها نیز تتراترپن-های ۴۰ کربنه هستند که از مسیر کلروپلاستی سنتز می-شوند. در مطالعه حاضر تیمار جاسمونیک اسید منجر به افزایش سطح کاروتنوئیدها شد. در مطالعه‌ای که در دو گونه سیب زمینی انجام شده است نیز چنین نتیجه‌ای حاصل شد و مشخص شد که کاروتنوئید آنترازانتین تحت تأثیر تیمار جاسمونیک اسید افزایش یافته است (Kovac and Ravinkar, 1994).

در تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار ممکن است به دلیل ایجاد شرایط تنش و مواجهه شدن گیاه با ROS بیشتر، مسیر تولید ترپنوئیدها به سمت تولید α-توکوفرول بیشتر پیش رفته باشد. در واقع این احتمال وجود دارد که در تیمارهای ۱ و ۵ میکرومولار افزایش سطح کاروتنوئید (به عنوان یک ترکیب از بین برنده ROS) برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن کافی باشد و به همین دلیل افزایش مقدار α-توکوفرول اتفاق نمی‌افتد اما در عوض در تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار افزایش سطح کاروتنوئیدها جوابگو نیست و همزمان با افزایش سطح کاروتنوئیدها سطح α-توکوفرول نیز افزایش می‌یابد.

ساختار مولکول کلروفیل شامل حلقه‌ی پورفیرین، دم فیتولی و یون Mg^{+2} است. دم فیتولی یک دی‌ترپن ۲۰ کربنه است که از مسیر کلروپلاستی سنتز می‌شود. در این مطالعه مشاهده شد که جاسمونیک اسید سطح کلروفیل a را در تمام تیمارها افزایش می‌دهد. در مورد کلروفیل b نتایج متناقض حاصل شد. سطح کلروفیل b در تیمار ۵ میکرومولار افزایش و در تیمار ۱۰۰ میکرومولار کاهش نشان داد. در مطالعات انجام شده در زمینه تأثیر جاسمونیک اسید بر پیگمان‌های فتوسنتزی گزارشات متضادی وجود دارد. در مطالعه بررسی اثر جاسمونیک اسید بر پیگمان‌های فتوسنتزی در گیاه سیب‌زمینی مشخص شد که در سیب‌زمینی نوع cv. Snate جاسمونیک اسید باعث کاهش سطح پیگمان‌های فتوسنتزی شد اما در سیب‌زمینی نوع cv. Ulster کاهش معنی‌داری در سطح پیگمان‌ها مشاهده نشد و در هر دو

نوع گیاه سطح کاروتنوئید آنترازانتین افزایش یافت (Kovac and Ravnikar, 1994).

نتیجه‌گیری:

به طور کلی مشخص شد که جاسمونیک اسید تحریک کننده مسیر بیوسنتزی ایزوپرنوئیدهاست. سطح THC، CBD و α–توکوفرول به علت خواص دارویی مورد توجه هستند. مطالعه انجام شده نشان داد که جاسمونیک اسید می‌تواند جهت افزایش این ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد. هم سطح THC و α–توکوفرول و هم سطح رنگیزه های فتوسنتزی افزایش یافت. با توجه به این که جاسمونیک اسید اثر منفی بر سطح برگ نداشت می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از جاسمونیک اسید با غلظت های استفاده شده ، می‌توان مقدار بیشتری THC در بازده زمانی کمتر، فضای محدودتر و صرف هزینه‌های بسیار کمتر بدست آورد.

منابع:

Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, A. H. and Schuurink. R.C. (2004) Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission. Plant Physiology 135: 2025-2037.

Balbi, V. and Devoto, A. (2008) Jasmonate signaling network in *Arabidopsis Thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. New Physiologist 177(2): 301-309.

Estevez, J. M., Cantero, 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.

Ferrier, R. A., Gray, D. W., Babst, B. A., Schueller, M.J., Schlyer, D.J., Thorpe, M.R., Orians, C.M. and Lerdau, M. (2005) Use of carbon-11 in Populus shows that exogenous jasmonic acid increases biosynthesis of isoprene from recently fixed carbon. Plant Cell and Environment 25: 591-602.

Gao, X. P., Wang, X. F., Lu, Y. F., Hang, L. Y., Shen, Y. Y., Liang, Z. and Zhang, D. P. (2004) Jasmonjc acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves.Plant Cell and Environment 27: 447-507.

Hazekamp, A. (2004) Cannabis review. Depertment of plant metabolomics Leiden University. Leiden the Netherland.

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

Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A. and Panneerselvam, R. (2007) Antioxidant potentials and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus* after treatment with giberellic acid. Colloids and Surfaces B: Bionterfaces 60: 195-200.

Kovac, M. and Ravinkar, M., (1994) The effect of jasmonic acid on the photodynthetic pigments of Potato plants grown *in vitro*. Plant Science 103: 11-17.

Lichenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and caretenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J. and Bohlman, J. (2002) Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spurce stems. American Society of Plant Biologists 129: 1003-1018.

McGarvey, D. J. and Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. Plant Cell 7: 1015-1026.

Pate, D. W. (1994) Chemical ecology of cannabis. Internatonal Hemp Association 2(29): 32-37.

Pinarkara, E., Kayis, A. S., Hakki, E. and Sag, A. (2004) RAPD analysis of seizes marijuana (*Cannabis sativa L.)* in Turkey. Electronic Journal of Biotechnology 12: 1-13.

Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S.J. and penna, D. (2003) Characterization of tocopherol cyclase from higher plants and cyanobacteria. Evoluationary implication for tocopherol synthesis and function. American Society of Product 23: 88-89.

Schie, C. C. N., and Hering, M. A. (2007) Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. Plant Molecular Biology 64: 251-263.

Wasternack, C. and Partheir, B. (1997) Jasmonate-signalling plant gene expression. Trend in Plant Science 2(8): 302-309.

The effects of jamonate on plastidal terpenoids on *Cannabis sativa* L. at vegetative stage

Fatemeh Salari[*1] and Hakimeh Mansori[1]
[1]Department of Biology, Faculty of Science Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
***Corresponding Author: salari_2565@yahoo.com**

Abstract:

In this study, we investigated the effects of jasmonate on plastidial terpenoids on *Cannabis sativa* at vegetative stage. We used jasmonate solutions with 0, 1, 5, 10 and 100 µM concentrations for treating plants. Plant treated with Jasmonate showed an increase in chlorophyll a content in comparison with the control plants. However, chlorophyll b content was increased only in 5 µM jasmonate treatment. Also, carotenoid content increased in all treated plants but there was no significant difference between various concentrations of jasmonate. The amount of α-tocopherol was enhanced in plants treated with 10 and 100 µM jasmonate. Treatment with 1 and 5 µM jasmonate caused a considerable increase in tetrahydrocannabinol. 5 µM jasmonate solution was more effective in this regards. Cannabidiol content was decreased in all plants treated with jasmonate. These results showed that jasmonate triggered the accumulation of primary and secondary isoprenoids in chloroplasts.

Keywords: Cannabidiol Jasmonate acid, Tetrahydrocannabinol, Terpenoids, α-Tocopherolm.