

## بررسی تأثیر تیمارهای اسید آزلانیک و فسفیت پتاسیم بر تغییرات بیوشیمایی و متابولیتی گیاه زولنگ (*Eryngium caucasicum*)

صابر بوالحق<sup>۱</sup>، علی دهستانی کلاگر<sup>۲\*</sup>، داود اکبری<sup>۳</sup>، مهیار گرامی<sup>۱</sup> و مصطفی حق پناه<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> مؤسسه آموزش عالی سنا ساری، ایران

<sup>۲</sup> پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

<sup>۳</sup> دانشگاه آزاد اسلامی قائمشهر، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰)

### چکیده

در این مطالعه به بررسی اثر تیمارهای اسید آزلانیک و فسفیت پتاسیم بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیرهای آنتی‌اکسیدان و سنتز لیگنین و همچنین تغییرات متابولیتی در گیاه زولنگ پرداخته شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در شرایط کاملاً کنترل شده اجراء شد. محلول پاشی تیمار فسفیت پتاسیم با غلظت دو گرم در لیتر و تیمار اسید آزلانیک با غلظت یک ملی‌مولار در مرحله سه برگ حقیقی انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار اسید آزلانیک منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و PAL گردید در حالی که تیمار فسفیت پتاسیم باعث افزایش معنی‌دار آنزیم‌های CAT و PAL همچنین باعث کاهش معنی‌دار آنزیم‌های SOD و POD شد. بررسی تغییرات متابولیتی گیاه زولنگ با استفاده از تکنیک GC-MS نیز نشان داد که این ترکیبات تأثیرات مختلفی بر میزان تجمع متابولیت‌های دارند به نحوی که میزان فیتول تحت تأثیر تیمار اسید آزلانیک به شدت افزایش یافت در حالی که تیمار فسفیت پتاسیم باعث افزایش ترکیبات Linoelaidic acid و n-Hexadecanoic acid شد. یافته‌های این تحقیق بیانگر عمل اختصاصی هر کدام از القاگرها در فعالسازی مسیرهای متابولیک متفاوت است و می‌توان با بکارگیری هوشمند این القاگرها، چرخه‌های متابولیک را جهت‌دهی و تجمع گروه خاصی از متابولیت‌های ثانویه را موجب شد.

کلمات کلیدی: القاءگر، الیستور، گیاه دارویی، مهندسی متابولیت

### مقدمه

شمالی ایران به‌عنوان ادویه، سبزی و طعم‌دهنده در محصولات لبنی استفاده می‌شوند و همچنین، به‌عنوان گیاه خوراکی و دارویی به‌خوبی در این مناطق شناخته شده هستند. خواص دارویی و درمانی آن شامل آرامش‌بخش اعصاب، تسکین‌دهنده بیماری رماتیسمی، رفع التهابات و دل درد مفید است (Aziz-UL-Ikram et al., 2015). ترکیبات موجود در

زولنگ با نام علمی *Eryngium caucasicum* از گونه‌های مهم از جنس *Eryngium* است که بصورت دو ساله یا چندساله و با پراکندگی در شمال ایران در مناطق جلگه‌ای از غرب تا شرق مازندران و ارتفاعات میانی البرز و در شیب‌های شمالی آن قابل رؤیت است (Khoshbakht and Hammer, 2006). در مناطق

\* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: dehestani.a4@gmail.com

فسفات، سرعت حرکت آن بسیار بیشتر بوده و طی مدت زمان کوتاهی، در سرتاسر اندام گیاهی انتشار می‌یابد و علاوه بر تحریک رشد رویشی و زایشی گیاه منجر به افزایش میزان طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی در گیاهان می‌گردد (Mofidnakhaei et al., 2016). مطالعات مختلف حاکی از نقش الیستوری فسفیت پتاسیم است به‌نحوی که استفاده از این ترکیب سبب فعال‌شدن ژن‌های دفاعی (PR) (Acimovic et al., 2021; Mohammadi et al., 2015)، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Oyarburo et al., 2015) و بهبود سیستم ایمنی در گیاهان می‌شود (Eshraghierson et al., 2011; Xi et al., 2020).

در تحقیقی Hirosse و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر فسفیت پتاسیم در جایگزینی با فسفات پتاسیم در محیط‌کشت سیب زمینی شیرین (*Ipomoea batatas* L.) بررسی کردند و عنوان داشتند که افزایش غلظت فسفیت پتاسیم سبب تغییر در خصوصیات‌های فیزیولوژیکی این گیاه می‌شود. همچنین مطالعات Mofidnakhaei و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) تیمار شده با فسفیت پتاسیم نسبت به شاهد افزایش می‌یابد. تغییر فعالیت آنزیم PAL گیاه خیار تحت تأثیر فسفیت پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت. در آن تحقیق نشان داده شد که فسفیت پتاسیم علاوه بر کاهش میزان شدت تنش زیستی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر CAT و SOD را افزایش می‌دهد (Ramezani et al., 2017b). Heidarzade و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه تغییرات در آنزیم‌های دفاعی گیاهان خیار تیمار شده با فسفیت پتاسیم تحت تنش بیان داشتند که فسفیت پتاسیم سبب کنترل معنی‌دار قارچ *Fusarium oxysporum* شده که به‌واسطه افزایش تولید آنزیم‌های دفاعی از جمله کاتالاز و گایاکول پراکسیداز بوده است (Heidarzade et al., 2018). همچنین مطالعات دیگر نشان داد که غلظت دو گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم سبب افزایش میزان فنل و فلاونوئید در گیاه می‌شود که این ترکیبات دارای خواص دارویی نیز هستند (Ramezani et al., 2017b).

اسانس این گیاه دارویی دارای خصوصیات ارزشمندی است به‌نحوی که در نتایج مطالعات متعددی در زمینه خواص اسانس گیاه زولنگ منتشر شده است. در بررسی Noshad و Behbahani (۲۰۲۱) مشخص شد که اسانس زولنگ دارای مقادیر قابل‌توجهی فنل و فلاونوئید است و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد را دارد (Noshad and Behbahani, 2021). همچنین فعالیت ضدسرطانی، ساپونین‌های جدا شده از اسانس این گونه گیاهی مورد تأیید قرار گرفته است (Wang et al., 2012). در شرایط *In vitro* عصاره روغنی گیاه زولنگ قابلیت کنترل پاتوژن‌های *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* نیز دارد (Thiem et al., 2010).

تغییر میزان ترکیبات مؤثره گیاهان به‌خصوص گیاهان دارویی یکی از اهداف مهندسی متابولیت محسوب می‌شود. مهندسی متابولیت مجموعه روش‌هایی است که به‌منظور هدایت یک یا چند واکنش آنزیمی در راستای تولید ترکیبات جدید یا تغییر ترکیبات موجود تعریف می‌شوند. برخی روش‌های مختلف مورد استفاده در این راستا شامل استفاده از DNA نو ترکیب، پلی‌پلوئیدی و استفاده از الیستورها است (Raei et al., 2017). الیستورها محرک‌های فیزیکی یا ترکیبات شیمیایی با منشاء زیستی و غیرزیستی هستند که می‌توانند پاسخ‌هایی را در گیاه القاء کنند که سبب سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه مشابه و یا حتی جدید در سلول‌ها شوند. الیستورها برای گیاه یک‌سری از پیام‌های شیمیایی را می‌فرستند که سبب رها شدن پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی و تجمع فیتوالکسین می‌شود. طی پاسخ به سیگنال الیستور، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود و در نتیجه بیان ژن‌های دفاعی، برخی متابولیت‌ها تجمع می‌یابند. از ترکیبات شیمیایی که تأثیر به‌سزایی بر سیستم دفاعی گیاهان دارند می‌توان از فسفیت پتاسیم و اسید آزلائیک نام برد (Forster et al., 1998; Gadaga et al., 2017; Jung et al., 2009; Ramezani et al., 2017a).

فسفیت‌ها ترکیباتی با فرمول شیمیایی  $(\text{H}_2\text{PO}_3^-)$  هستند که از لحاظ تعداد اکسیژن و هیدروژن با فسفات  $(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$  کاملاً متمایز هستند. فسفیت به‌علت دارا بودن یک اکسیژن کمتر از

لیتر انجام شد و برای هر بوته (سه برگ حقیقی، ۲۱ روز پس از کاشت) به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محلول استفاده شد. تیمار اسید آزلائیک با غلظت یک میلی‌مولار (محلول در MES (2-[N-Morpholino]ethane-sulfonic acid) ۵ میلی‌مولار، pH ۵/۶) تهیه شد و برای هر بوته مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محلول‌پاشی شد (Jung *et al.*, 2009). انتخاب این غلظت از اسید آزلائیک نیز براساس نتایج حاصل تحقیق Jung و همکاران (۲۰۰۹) بود. برای گیاهان شاهد از محلول‌پاشی با آب مقطر به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر برای هر بوته استفاده شد. در این آزمایش از سه تکرار مستقل برای هر تیمار استفاده شد که هر تکرار شامل پنج بوته مجزا بود که پس از حذف اعداد غیر منطقی، برای هر تکرار هر تیمار حداقل چهار عدد در نظر گرفته شد.

#### شرایط کشت گیاه و اعمال تیمار: این آزمایش در شرایط

کنترل‌شده در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (E 53.0713° – N 36.6609°)، ۹ کیلومتر ۹ جاده دریا انجام شد. بذور گیاه مذکور از یک والد مشخص از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی تهیه شد و پس از جوانه‌دار شدن در ژرمیناتور با دمای ۱۸ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد به گلدان‌هایی حاوی خاکی با ترکیبات پرلیت، پیت‌ماس و کوکوپیت به نسبت ۱:۱:۲ که تمام این مواد در اتوکلاو استریل شده بودند منتقل شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با شدت ۸ هزار لوکس بر سطح برگ و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شد. آبیاری گیاهان با توجه شرایط رطوبتی گلدان‌ها و نیاز آبی گیاه انجام شد و محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) با ۱/۴ غلظت نیز همراه آبیاری به گیاهان داده شد (Haghpanah *et al.*, 2021). با توجه به اینکه هدف از این تحقیق بررسی تغییرات ایجادشده در سطح متابولیت‌های گیاه زولنگ متأثر از کاربرد این تیمارها بود، نمونه‌برداری از گیاهان با استفاده از ازت مایع و هشت روز پس از اعمال تیمار انجام

اسید آزلائیک در ساختار شیمیایی دارای ۹ کربن است و نوعی اسید دی‌کربوکسیلیک محسوب می‌شود. اگرچه مسیر بیوسنتز اسید آزلائیک تا حد زیادی ناشناخته است ولی می‌توان محققین اذعان می‌دارند که این ماده از مشتقات اسید اولئیک و یا مشتقات غیراشباع اسید لینولئیک و اسید لینولنیک است (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017). تیمار گیاهان با اسید آزلائیک سبب تجمع اسید سالیسیلیک و به‌واسطه آن تهییج قابل‌توجه سیستم Systemic acquired resistance (SAR) می‌شود (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2009). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که تیمار اسید آزلائیک سبب تغییرات اساسی در متابولیت‌های گیاهی می‌شود (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017). علی‌رغم تأثیر بسزای این تیمار بر فعل و انفعالات بیوشیمیایی گیاهان تا کنون تحقیق قابل‌استنادی در خصوص میزان اثر بخشی این دو تیمار بر تغییرات بیوشیمیایی و متابولیتی گیاهان داوریی به‌خصوص گیاه زلنگ منتشر نشده است. از این‌رو در این تحقیق اثر محلول‌پاشی تیمارهای فسفیت پتاسیم و اسید آزلائیک پس از هشت روز بر فعالیت برخی از آنزیم‌های دخیل در تنش و مواد مؤثره گیاه زولنگ مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**تهیه تیمار فسفیت پتاسیم و اسید آزلائیک:** برای تهیه استوک فسفیت پتاسیم (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ابتدا ۱۵ گرم از KOH و ۱۵ گرم اسید فسفرو در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و پس از تنظیم pH (۵/۶)، به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Mofidnakhai *et al.*, 2016; Ramezani *et al.*, 2017b). براساس نتایج آزمایش‌های انجام‌شده قبلی در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان که نشان می‌دهد غلظت چهار گرم بر لیتر فسفیت پتاسیم سبب سوختگی برگ گیاهان می‌شود و بهترین غلظت برای تهییج سیستم ایمنی گیاه دو گرم بر لیتر است (Heidarzade *et al.*, 2018; Mofidnakhai *et al.*, 2016; Ramezani *et al.*, 2018, 2017c) در این تحقیق نیز از محلول‌پاشی با غلظت دو گرم بر

حاوی آب اکسیژنه دو میلی مولار مخلوط شدند و کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت دو دقیقه با اسپکتروفتومتر خوانده شد. از ضریب خاموشی ( $\epsilon=0.0366 \text{ mMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) و فرمول زیر برای محاسبه واحد آنزیمی استفاده شد.

$$A = \epsilon bc$$

**پروکسیداز (POD):** به منظور اندازه گیری آنزیم پروکسیداز ابتدا ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار را با ۱۰۰ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در کوت شیشه ای مخلوط شد. پس از بلانک کردن دستگاه با محلول مذکور، به واکنش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۲۵ میلی مولار اضافه شد و بلافاصله افزایش میزان جذب به مدت دو دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده و از ضریب خاموشی ( $\epsilon=0.0266 \text{ mMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) و فرمول  $A = \epsilon bc$  برای محاسبه واحد آنزیمی استفاده شد (Kavitha and Umesha, 2008).

**فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL):** برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، با ۵۰۰ میکرولیتر Tris-HCL ۵۰ میلی مولار (pH=۷) و ۶۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت. مواد حاصله به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای متوقف کردن واکنش از ۲۵۰ میکرو لیتر HCl چهار نرمال استفاده شد. سپس به هر واکنش مقدار یک میلی لیتر تلونن اضافه و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. در نهایت ماده به دست آمده به مدت دو دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و از لایه رویی و به منظور قرائت در طول موج ۲۹۰ نانومتر استفاده شد (El-Shora, 2002). مقدار فعالیت آنزیمی براساس میزان اسید سینامیک (صفر تا ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر،  $R^2=0.987$ ) تولید شده در واکنش بدست آمد.

**GC-MS:** مقدار دو گرم بافت برگ گیاه زولنگ به وسیله ۱۰۰ میلی لیتر اتانول به مدت ۴۸ ساعت به دور از نور در دمای اتاق قرار گرفت سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام التراسونیک نگهداری شد. مقدار ۲۰ میلی لیتر از محلول مذکور در پلت های مجزا ریخته و پس از خشک شدن در دو میلی لیتر اتانول حل

گرفت و نمونه ها تا زمان انجام آزمایش ها در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

**اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم ها:** برای سنجش فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پروکسیداز (POD) و فنل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) ابتدا عصاره آنزیمی با استفاده از بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار حاوی PVP یک درصد انجام شد (Haghpanah et al., 2021). بدین منظور ۲۰۰ میلی گرم از بافت برگ گیاه در هاون چینی با ۱/۸ میلی لیتر ساییده شد و به ویال های دو میلی لیتری منتقل گردید. پس از سانتریفیوژ (۱۲/۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس) از فاز مایه برای سنجش فعالیت آنزیم ها و میزان پروتئین کل استخراج شده به روش بردفورد (Bradford, 1976) استفاده شد.

**سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD):** برای اندازه گیری فعالیت آنزیم SOD از روش پیشنهاد شده توسط Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) استفاده شد. حجم نهایی مخلوط واکنش دو میلی لیتر محاسبه شد که حاوی بافر فسفات پتاسیم، ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، EDTA (اتیلن دی آمین اسید تترا استیک، ۰/۱ میکرومولار)، متیونین (۱۳ میکرومولار)، ریبولوین (۲ میکرومولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی بود. مخلوط واکنش به مدت پنج دقیقه در معرض نور نسبتاً شدید (۱۲ هزار لوکس) قرار گرفت. جذب نمونه ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. در یک واکنش به جای ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی بافر استخراج استفاده شد که به عنوان نمونه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در این آزمایش به عنوان مقدار آنزیمی قرار گرفت که سبب مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیتروبلوترازولیوم کلراید گردید (Zhang et al., 2008) و براساس فرمول زیر محاسبه شد.

جذب نمونه - جذب شاهد

جذب شاهد X

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** برای سنجش فعالیت آنزیم CAT از روش (Aebi, 1984) استفاده شد. ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۲۹۷۰ میکرولیتر از بافر فسفات

شاهد کاهش یافت درحالی که تیمار فسفیت پتاسیم تغییری در محتوای پروتئین برگ گیاه زولنگ ایجاد نکرد (شکل ۱-ا). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) تحت تأثیر تیمار اسید آزلائیک افزایش یافت (۱۵ درصد بیشتر از شاهد) ولی تیمار فسفیت پتاسیم سبب کاهش فعالیت این آنزیم شد (شکل ۱-ب). این در حالی است که دیگر آنزیم مسیر جاروب ROS، کاتالاز (CAT) تحت تأثیر تیمار فسفیت پتاسیم افزایش فعالیت داشت (۷۶ درصد بیشتر از شاهد) با این حال تیمار اسید آزلائیک تأثیر محسوسی بر میزان فعالیت این آنزیم نداشت (شکل ۱-ج). تغییر فعالیت آنزیم پروکسیداز (POD) مشابه با تغییر فعالیت آنزیم SOD مشاهده شد به نحوی که تحت تأثیر تیمار اسید آزلائیک فعالیت این آنزیم افزایش یافت (۲۰ درصد بیشتر از شاهد) ولی تحت تأثیر تیمار فسفیت پتاسیم فعالیت آن کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد (شکل ۱-د). فعالیت آنزیم PAL اما تحت تأثیر هر دو تیمار اسید آزلائیک و فسفیت پتاسیم افزایش معنی دار نسبت به شاهد داشت (شکل ۱-ه).

#### تجزیه و تحلیل GC-MS: نتایج تجزیه و تحلیل GC-MS

نشان داد که در مجموع تعداد ۱۱ ترکیب که بیش از ۹۰ درصد اطمینان از صحت شناسایی آنها بود در تیمار شاهد شناسایی شد (شکل ۲) و بیشترین سطح زیر منحنی متعلق به ماده n-Hexadecanoic acid (بیش از ۱۱ درصد) بود (جدول ۲). این در حالی است که ترکیبات trans-beta-Farnesene، beta-Tocopherol و Sesquiphellandrene تحت تأثیر تیمار فسفیت پتاسیم در عصاره برگ گیاه زولنگ یافت نشد و در عوض ترکیب Stigmastan-6,22-dien, 3,5-dedihiy... نمونه‌های تیمار شده با این ماده شناسایی شد که در گیاه شاهد نبود. مقدار دو ماده Linoleic acid ethyl ester و n-Hexadecanoic acid نیز تحت تأثیر این تیمار نسبت به شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت و بیشترین تجمع در ماده n-Hexadecanoic acid (۳۴/۲۱ درصد) تحت تأثیر این تیمار به دست آمده (جدول ۲). تیمار اسید آزلائیک نیز سبب عدم شناسایی ترکیبات trans-beta-Farnesene و beta-Tocopherol مانند تیمار فسفیت پتاسیم شد و همچنین دو ترکیب دیگر با

شد. و در نهایت با کمک فیلتر به دستگاه تزریق شد. دستگاه گاز کروماتوگراف Agilent the chechnology 7890A مجهز به ستون HP-5MS و طیف‌سنجی جرمی ۵۹۷۵ cmass بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون به نحوی بود که دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سلسیوس بدون توقف و دمای دستگاه ۱۰ درجه سلسیوس در هر دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس رسید و سپس به مدت ۵ دقیقه در این دما باقی ماند. سپس دمای ستون با سرعت ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۱۱ دقیقه در این دما باقی ماند. مدت زمان آنالیز GC/MS، ۴۵ دقیقه بود از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل و با سرعت ۱ میلی‌متر بر دقیقه و طیف‌سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ۵۰ تا ۷۵۰۰ استفاده شد. دمای محفظه تزریق کروماتوگرافی گازی ۲۷۰ درجه سلسیوس و حجم یک میکرولیتر بدون شکاف است. تجزیه عصاره‌ها و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده براساس اطلاعات موجود در کتابخانه GC/MS صورت گرفت.

تجزیه واریانس فعالیت آنزیمی مورد بررسی بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD محافظت شده در حدود اطمینان ۹۹ درصد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۱۹ محاسبه گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excell نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

#### نتایج

نتایج تجزیه واریانس میزان پروتئین کل برگ حاکی از اختلاف معنی دار به احتمال ۹۵ درصد بین تیمارها بود همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پروکسیداز (POD) و فنیل آلانین آمونیا لیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف به احتمال ۹۹ درصد اختلاف معنی دار داشت (جدول ۱).

مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون LSD نشان داد که محتوای پروتئین کل تحت تأثیر تیمار اسید آزلائیک نسبت به

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای فسفیت پتاسیم و اسید آزلائیک بر میزان پروتئین کل برگ و فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POD و PAL در گیاه زولنگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین کل	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پروکسیداز	فنیل آلانین آمونیاپاز
تیمار	۲	۱/۵۳ *	۰/۰۲۱ **	۰/۰۴ **	۱۷/۸۵ **	۶/۶۸ **
خطا	۶	۰/۲۸	۰/۰۰۰۱۷	۰/۰۰۴۳	۰/۰۱	۰/۳۹
ضریب تغییرات	درصد	۴/۵۲	۲/۰۳	۱۲/۷۹	۱۰/۸۳	۸/۶۲

\* و \*\* به ترتیب تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطوح احتمال پنج درصد، یک درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۲- ترکیبات شناسایی شده از برگ گیاه زولنگ تحت تأثیر تیمار فسفیت پتاسیم (Kphi) و اسید آزلائیک (Aza) با استفاده از تکنیک GC-MS

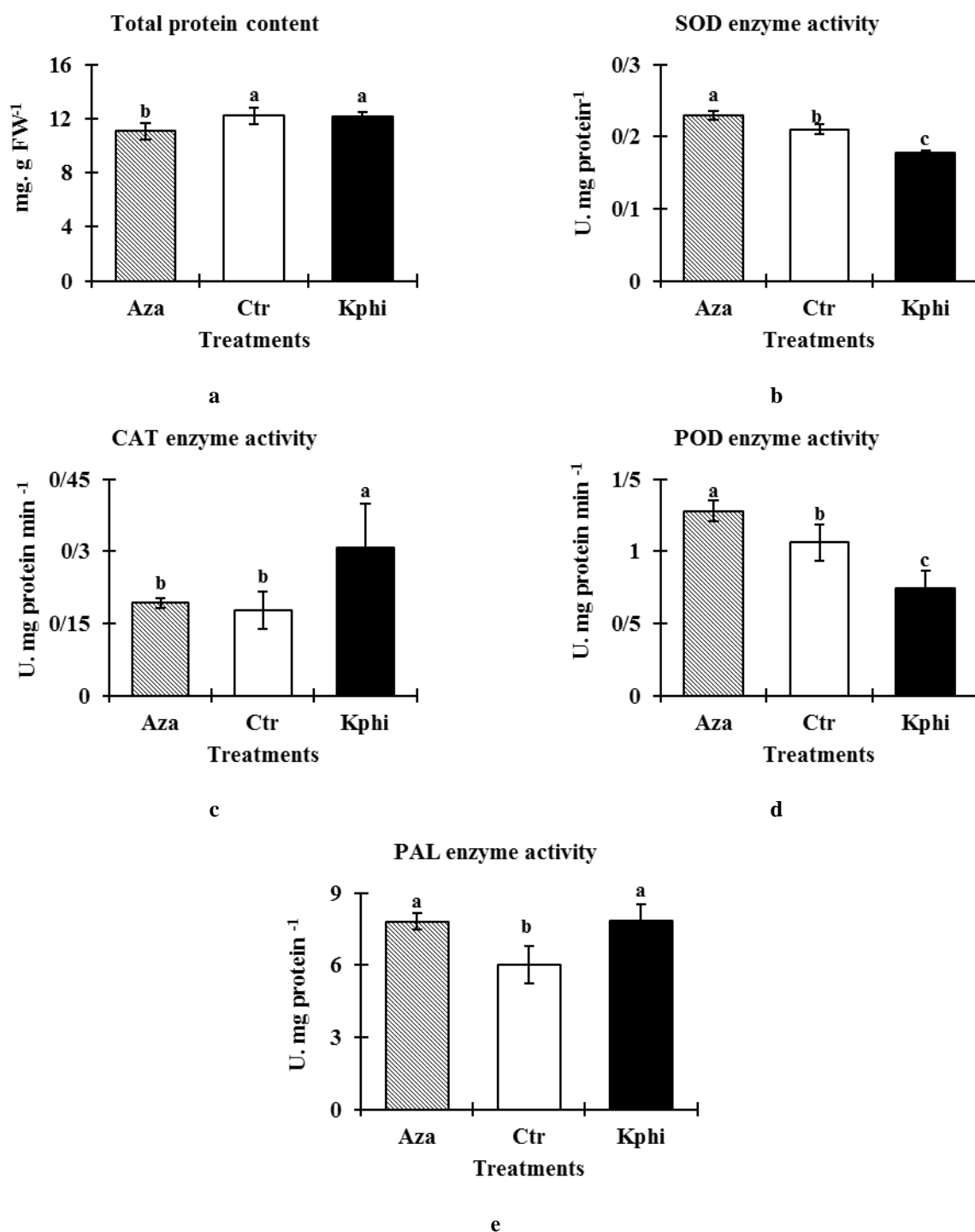
Comp	RT	Ctr%	Aza%	Kphi%	Classification
trans-beta-Farnesene	۹/۴۴۱	۰/۹۲	-	-	Terpenes
beta.-Sesquiphellandrene	۱۰/۳۲۴	۲/۳۲	۳/۳۱	-	Prenol lipids
beta-Tocopherol	۱۱/۶۱	۰/۳۶	-	-	Vitamins
Tetradecanoic acid	۱۲/۹۳۱	۰/۶۴	-	۱/۳۶	Fatty acid, saturated
Phytol	۱۳/۷۹۹	۷	۱۷/۴۸	۳/۹۹	Diterpene alcohol
Neophytadiene	۱۴/۱۰۵	۱/۵۲	۳/۴۱	۱/۵۹	
Linoleic acid ethyl ester	۱۴/۳۵۴	۳/۰۹	۲/۰۱	۸/۴۴	Fatty Acids, Unsaturated
n-Hexadecanoic acid	۱۵/۶۵۶	۱۱/۰۱	۶/۶۲	۳۴/۲۱	Fatty acid, saturated
Linoelaidic acid	۱۹/۲۵۴	۱/۴۶	-	۳/۱۶	Fatty acids, unsaturated
Ethyl linolenate	۲۰/۰۰۹	۳/۳۷	۱/۸۹	۶/۴۴	
Stigmastan-6,22-dien, 3,5-dedihi...	۳۴/۵۴۳	-	-	۲/۴۷	Steroid
Stigmasterol	۳۸/۳۲۶	۳/۵۸	۴/۳۱	۳/۱۱	Sterol lipids
تعداد ترکیبات شناسایی شده		۱۱	۷	۹	

تیمار اسید آزلائیک سبب تجمع هورمون اسید سالیسیلیک و به دنبال آن تهیج سیستم دفاعی گیاه می‌شود (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2009). در این مطالعه نیز تیمار اسید آزلائیک و فسفیت پتاسیم سبب برانگیخته شدن فعالیت آنزیم PAL شد. این آنزیم نقشی کلیدی در سنتز ترکیبات فنلی و تشکیل لیگنین (Mehrabanjoubani *et al.*, 2019) در پاسخ به تنش‌های محیطی دارد و می‌تواند سبب تغییر دیواره سلولی نیز شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تیمار اسید آزلائیک با تأثیر بر بیان ژن PAL سبب فعال شدن مسیر phenylpropanoid و

نام‌های Tetradecanoic acid و Linoelaidic acid نیز تحت تأثیر این تیمار نسبت به شاهد شناسایی نشد. تحت تأثیر این تیمار بیشترین میزان تجمع در ماده Phytol (۱۷/۴۸ درصد) برآورد شد (جدول ۲).

#### بحث

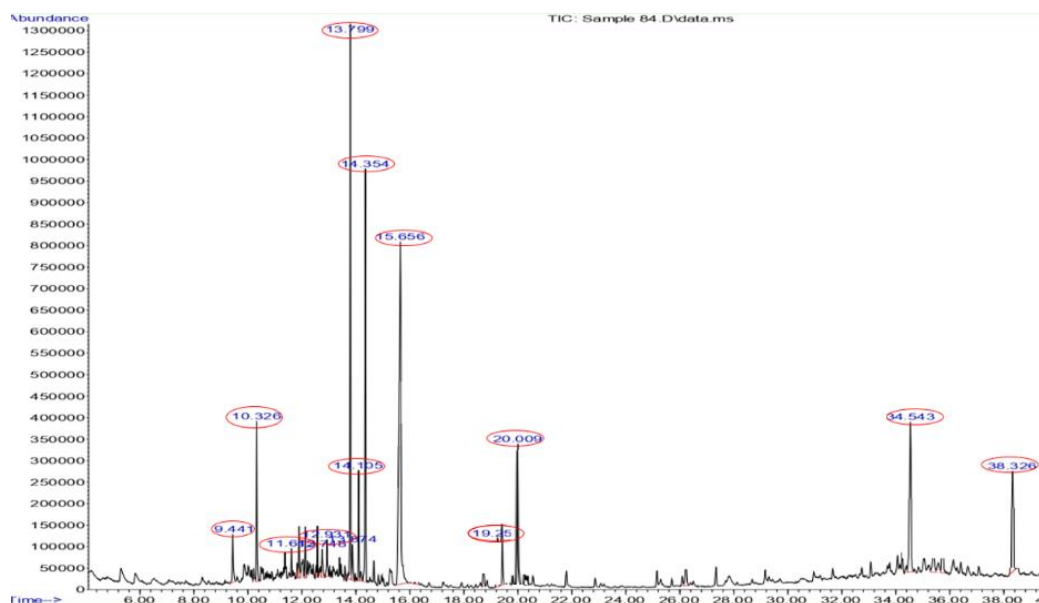
القاگرها با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی سبب پدیدار شدن گوناگونی متابولیتی در گیاهان می‌شوند که این امر می‌تواند پتانسیل مهمی در مهندسی متابولیت باشد (Raei *et al.*, 2017).



شکل ۱- تغییرات بیوشیمیایی برگ گیاه زولنگ تحت تأثیر تیمارهای اسید آزلائیک (Aza)، فسفیت پتاسیم (Kphi) و شاهد (Ctr). (a) محتوای پروتئین کل، (b) فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، (c) فعالیت آنزیم کاتالاز، (d) فعالیت آنزیم پروکسیداز و (e) فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم معنی‌داری با احتمال ۹۹ درصد براساس آزمون LSD است.

تیمار فسفیت پتاسیم نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL در گیاه خیار می‌شود (Ramezani *et al.*, 2017b). در مطالعات

تجمع متابولیت‌ها می‌شود (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017). در گزارش Ramezani و همکاران (۲۰۱۷) نیز مشاهده شد که



شکل ۲- کروماتوگرام GC-MS عصاره برگ گیاه زولنگ تحت تأثیر تیمار شاهد. در این شکل پیک‌هایی که با دایره‌های قرمز رنگ مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده ۱۱ ترکیبی است که با بیش از ۹۰ درصد صحت شناسایی شده‌اند.

محققین معتقد هستند که القاگرها نوعی تنش شبیه‌سازی شده در گیاهان ایجاد می‌کنند و از این رو سیستم دفاعی گیاه تهیج می‌شوند (Anjum *et al.*, 2011). در این مطالعه پاسخ آنزیمی‌های آنتی‌اکسیدان به دو القاگر متفاوت بود به نحوی که فعالیت آنزیم‌های SOD و POD تحت تأثیر تیمار اسید آزلائیک افزایش یافت ولی تیمار فسفیت پتاسیم سبب کاهش فعالیت این آنزیم‌ها و افزایش فعالیت آنزیم CAT شد. بر خلاف اسید آزلائیک که مطالعات اندکی در مورد پاسخ گیاهان به تیمار با این ماده منتشر شده ولی مطالعات متعددی نشان می‌دهد که فسفیت پتاسیم سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان مختلف می‌شود (Almeida *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2014; Mofidnakhai *et al.*, 2016). همچنین مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد تحت تأثیر فسفیت پتاسیم فعالیت آنزیم CAT افزایش می‌یابد (Mofidnakhai *et al.*, 2016). همچنین مطالعات Woodward و Bartel (۲۰۰۵) حاکی از تغییرات هورمونی در گیاهان تحت تأثیر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بخصوص POD است (Woodward and Bartel, 2005). به نظر می‌رسد تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در بوجود آمدن تغییرات متابولیتی داشته باشد (Ho *et al.*, 2020).

مختلف دیگر دیده شده است که تیمار القاءگرها باعث افزایش فعالیت این آنزیم می‌شود برای مثال بررسی سلول‌های توتون نشان داد که تیمار اسید آزلائیک سبب افزایش بیان ژن PAL می‌شود (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017) همچنین مطالعه Modarres و Taghavizadeh Yazdi (۲۰۲۱) حاکی از تأثیرپذیری آنزیم PAL نسبت به القاگر اسید سالیسیلیک که مرتبط با اسید آزلائیک است دارد (Modarres and Taghavizadeh Yazdi, 2021). با این حال برخی القاگرها سبب کاهش فعالیت آنزیم PAL می‌شوند، مانند نتایج مشاهده شده در مطالعه Yan و همکاران (۲۰۰۶) که نشان داد استفاده از القاگر (اسید رزمارینیک) سبب کاهش فعالیت آنزیم PAL در ریشه موئین گیاه *Salvia miltiorrhiza* می‌شود (Yan *et al.*, 2006). این امر نشان می‌دهد که نوع القاگر و گونه گیاهی مورد مطالعه در پاسخ آنزیم PAL به القاگر مؤثر هستند.

سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهان که بخش آنزیمی و غیرآنزیمی تشکیل شده است (Gupta *et al.*, 2018) در پاسخ به تنش‌های محیطی (Hasanuzzaman *et al.*, 2020) و القاگرها (Haghpahanah *et al.*, 2021; Ramezani *et al.*, 2018) فعال می‌شود و سبب ایجاد تغییرات متابولیتی بعدی می‌شود. برخی



این تیمار فسفیت وجود ماده 3,5-dien, 6,22-Stigmastan dedihy. فقط تحت تأثیر تیمار فسفیت پتاسیم دیده شد و مقدار n-Hexadecanoic acid و Linoelaidic acid نیز نسبت به شاهد افزایش یافت.

### نتیجه‌گیری

تیمارهای اسید آزلانیک و فسفیت پتاسیم سبب ایجاد دگرگونی بیوشیمیایی و متابولیتی گیاه زولنگ می‌شوند. تغییرات متابولیتی بوجود آمده از این دو ترکیب با یکدیگر متفاوت است. این نتایج نشان‌دهنده این واقعیت است که تیمار اسید آزلانیک احتمالاً در فعال‌شدن مسیر لیگنین در این گیاه مؤثر است درحالی‌که تیمار فسفیت پتاسیم سبب افزایش فعالیت آنزیم CAT که نوعی آنتی‌اکسیدان کلیدی است می‌شود، از این رو بسته به هدف موردنظر می‌توان از این ترکیبات در ایجاد تغییرات متابولیتی گیاه زولنگ بهره برد.

از تجزیه و تحلیل GC-MS مشخص شد که تیمار اسید آزلانیک سبب افزایش قابل‌ملاحظه Phyltol در برگ زولنگ می‌شود که از گروه ترپنوئیدها است. ترپنوئیدها نقش مهمی در مسیرهای مختلف سلولی مانند بیوستنز sesquiterpenoid و بیوستنز متابولیت‌های ثانویه در واکنش به القاگرها ایفاء می‌کند (Abeed *et al.*, 2021). علاوه بر این، برخی از ترپن‌های خاص نظیر مشتقات ایزوپروپونوئیدها مانند جیبرلین و براسینواستروئیدها نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان دارند (Ninkuu *et al.*, 2021) و از این رو به‌عنوان متابولیت‌های اولیه در نظر گرفته می‌شوند (Tholl, 2006). مطالعات نشان می‌دهد که جیبرلین در رشد و توسعه میوه و دانه گیاهانی همچون گوجه‌فرنگی (Chen *et al.*, 2016)، خیار (Liu *et al.*, 2016) و گندم (Pearce *et al.*, 2013) مؤثر است. براسینواستروئیدها در برنج به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد شناخته می‌شوند (Zhao *et al.*, 2013) و در گیاه خیار سبب تولید گل ماده و به‌واسطه آن افزایش عملکرد می‌گردند (Papadopoulou and Grumet, 2005). همچنین تیمار فسفیت پتاسیم سبب تغییر در متابولیت‌های برگ گیاه زولنگ می‌شوند به‌نحوی که تحت تأثیر

### منابع

- Abeed, A., Ali, M., Ali, E. F., Majrashi, A. and Eissa, M. A. (2021) Induction of *Catharanthus roseus* secondary metabolites when calotropis procera was used as bio-stimulant. *Plants* 10: 1623.
- Acimovic, S. G., Zeng, Q., Mc Ghee, G. C., Sundin, G. W. and Wise, J. C. (2015) Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science* 6: 16.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105: 121-126.
- Almeida, G. M., Silva, A. A., Batista, P. F., Moura, L. M. F., Vital, R. G. and Costa, A. C. (2020) Hydrogen sulfide, potassium phosphite and zinc sulfate as alleviators of drought stress in sunflower plants. *Agricultural Sciences* 44.
- Anjum, S. A., Wang, L., Farooq, M., Khan, I. and Xue, L. (2011) Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defence system and yield in soybean under drought. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 296-301.
- Aziz-UL-Ikram, N. B. Z., Shinwari, Z. K. and Qaiser, M. (2015) Ethnomedicinal review of folklore medicinal plants belonging to family Apiaceae of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 47: 1007-1014.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chen, S., Wang, X., Zhang, L., Lin, S., Liu, D., Wang, Q., Cai, S., El-Tanbouly, R., Gan, L., Wu, H. and Li, Y. (2016) Identification and characterization of tomato gibberellin 2-oxidases (GA2oxs) and effects of fruit-specific SIGA2ox1 overexpression on fruit and seed growth and development. *Horticulture Research* 3: 16059.
- Djami-Tchatchou, A. T., Ncube, E. N., Steenkamp, P. A. and Dubery, I. A. (2017) Similar, but different: Structurally related azelaic acid and hexanoic acid trigger differential metabolomic and transcriptomic responses in tobacco cells. *BMC Plant Biology* 17: 227-242.
- El-Shora, H. M. (2002) Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. *Plant Science* 162: 1-7.
- Eshraghierson, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. E. S. and O'Brien, P. A. (2011) Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected

- with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 60: 1086-1095.
- Fernandes, L. H. M., Oliveirasilveira, H. R., Souza, K. R. D., Resende, M. L. V. and Alves, J. D. (2014) Inducers of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. American Journal of Plant Sciences 5: 3710.
- Förster, H., Adaskaveg, J. E., Kim, D. H. and Stanghellini, M. E. (1998) Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. Plant Disease 82: 1165-1170.
- Gadaga, S. J. C., Abreu, M. S. Resende, M. L. V. and Ribeiro, P. M. (2017) Phosphites for the control of anthracnose in common bean. Pesquisa Agropecuária Brasileira 52: 36–44. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2017000100005>
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.
- Gupta, D. K., Palma, J. M. and Corpas, F. J. (2018) Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Springer International Publishing, Berlin.
- Haghpannah, M., Jelodar, N. B., Zarrini, H. N., Pakdin-Parizi, A. and Dehestani, A. (2021) Silicon foliar exogenous altered the activity of crucial ROS pathway enzymes in tomatoes (*Solanum lycopersicum*). Russian Agricultural Sciences 47: 485-489.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. Al, Fujita, M. and Fotopoulos, V. (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. Antioxidants 9: 681.
- Heidarzade, S., Gharanjik, S., Dehestani, A. and Shahriari, D. (2018) Study on enzymatic and biochemical changes in cucumber plant treated with potassium phosphite under *Fusarium oxysporum* f. sp. *radiciscucumerinum* stress. Iranian Journal of Horticultural Science 48: 601-611.
- Hirosse, E. H., Creste, J. E., Custodio, C. C. and Machado-Neto, N. B. (2012) In vitro growth of sweet potato fed with potassium phosphite. Acta Scientiarum Agronomy 34: 85-91.
- Ho, T., Murthy, H. N. and Park, S. Y. (2020) Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. International Journal of Molecular Sciences 21: 716.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, California.
- Jung, H., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J. and Greenberg, J. T. (2009) Priming in systemic plant immunity. Science 324: 89-91.
- Kavitha, R. and Umesha, S. (2008) Regulation of defense-related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato. Phytoparasitica 36: 144-159.
- Khoshbakht, K. and Hammer, K. (2006) Savadkouh (Iran)—an evolutionary centre for fruit trees and shrubs. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 641-651.
- Liu, B., Liu, X., Yang, S., Chen, C., Xue, S., Cai, Y., Wang, D., Yin, S., Gai, X. and Ren, H. (2016) Silencing of the gibberellin receptor homolog, CsGID1a, affects locule formation in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. New Phytologist 210: 551-563.
- Mehrabanjoubani, P., Abdolzadeh, A., Sadeghipour, H. R., Aghdasi, M., Bagherieh-Najjar, M. B. and Barzegargolchini, B. (2019) Silicon increases cell wall thickening and lignification in rice (*Oryza sativa*) root tip under excess Fe nutrition. Plant Physiology and Biochemistry 144: 264-273.
- Modarres, M. and Taghavizadeh Yazdi, M. E. (2021) Elicitation improves phenolic acid content and antioxidant enzymes activity in salvia leriifolia cell cultures. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science 45: 849-855.
- Mofidnakhai, M., Abdossi, V., Dehestani, A., Pirdashti, H. and Babaeizad, V. (2016) Potassium phosphite affects growth, antioxidant enzymes activity and alleviates disease damage in cucumber plants inoculated with *Pythium ultimum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 49: 207-221.
- Mohammadi, M. A., Cheng, Y., Aslam, M., Jakada, B. H., Wai, M. H., Ye, K., He, X., Luo, T., Ye, L. and Dong, C. (2021) ROS and oxidative response systems in plants under biotic and abiotic stresses: Revisiting the crucial role of phosphite triggered plants defense response. Frontiers in Microbiology 12.
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T. and Zeng, H. (2021) Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. International Journal of Molecular Sciences 22: 5710.
- Noshad, M. and Behbahani, A. (2021) *Eryngium campestre* essential oil: Total phenol and flavonoids contents, antioxidant power, antimicrobial activity and its interaction with nalidixic acid antibiotic in vitro. Journal of Food Science and Technology (Iran) 18: 263-271.
- Oyarburo, N. S., Machinandiarena, M. F., Feldman, M. L., Daleo, G. R., Andreu, A. B. and Olivieri, F. P. (2015) Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. Plant Physiology and Biochemistry 88: 1-8.
- Papadopoulou, E. and Grumet, R. (2005) Brassinosteroid-induced femaleness in cucumber and relationship to ethylene production. HortScience 40: 1763-1767.

- Pearce, S., Vanzetti, L. S. and Dubcovsky, J. (2013) Exogenous gibberellins induce wheat spike development under short days only in the presence of VERNALIZATION1. *Plant Physiology* 163: 1433-1445.
- Raei, M., Esna-Ashari, M. and Khodayari, M. (2017) Abiotic elicitors and medicinal plants biotechnology. *Cell and Tissue* 7: 333-342.
- Ramezani, M., Rahmani, F. and Dehestani, A. (2017a) The effect of potassium phosphite on PR genes expression and the phenylpropanoid pathway in cucumber (*Cucumis sativus*) plants inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*. *Scientia Horticulturae* 225: 366-372.
- Ramezani, M., Rahmani, F. and Dehestani, A. (2017b) Study of physio-biochemical responses elicited by potassium phosphite in downy mildew-infected cucumber plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50: 540-554.
- Ramezani, M., Rahmani, F. and Dehestani, A. (2017c) Comparison between the effects of potassium phosphite and chitosan on changes in the concentration of Cucurbitacin E and on antibacterial property of *Cucumis sativus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17: 295.
- Ramezani, M., Ramezani, F., Rahmani, F. and Dehestani, A. (2018) Exogenous potassium phosphite application improved PR-protein expression and associated physio-biochemical events in cucumber challenged by *Pseudoperonospora cubensis*. *Scientia Horticulturae* 234: 335-343.
- Thiem, B., Goslinska, O., Kikowska, M. and Budzianowski, J. (2010) Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba Polonica* 56: 52-58.
- Tholl, D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 297-304.
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G. and Li, S. (2012) Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops* 3: 99-120.
- Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Xi, Y., Han, X., Zhang, Z., Joshi, J., Borza, T., Aqa, M. M., Zhang, B., Yuan, H. and Wang-Pruski, G. (2020) Exogenous phosphite application alleviates the adverse effects of heat stress and improves thermotolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190: 110048.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Wu, J. Y. (2006) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science* 170: 853-858.
- Zhang, S. Z., Hua, B. Z. and Zhang, F. (2008) Induction of the activities of antioxidative enzymes and the levels of malondialdehyde in cucumber seedlings as a consequence of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) infestation. *Arthropod-Plant Interactions* 2: 209-213.
- Zhao, J., Wu, C., Yuan, S., Yin, L., Sun, W., Zhao, Q., Zhao, B. and Li, X. (2013) Kinase activity of OsBRI1 is essential for brassinosteroids to regulate rice growth and development. *Plant Science* 199: 113-120.

## Investigation of Azelaic acid and Potassium phosphite treatments effect on biochemical and metabolic changes of *Eryngium caucasicum*

Sabder Bolhagh<sup>1</sup>, Ali Dehestani kalagar<sup>2\*</sup>, Davood Akbari<sup>3</sup>, Mahyar Gerami<sup>1</sup>, Mostafa Haghpanah<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

<sup>2</sup> Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan - Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

<sup>3</sup> Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

(Received: 22/02/2022, Accepted: 19/04/2022)

### Abstract

In this study, the effect of exogenous Azelaic acid and potassium phosphite on some antioxidant enzymes activity, lignin synthesis and metabolic pathways were investigated in *Eryngium caucasicum*. This experiment was performed in a completely randomized design in controlled conditions. Plants at the three-leaf stage were treated with potassium phosphite (2 g/L) and azelaic acid (1 mM) by spraying method. Results showed that Azelaic acid treatment led to a significant increase in the activity of SOD, POD and PAL enzymes, while potassium phosphite caused a remarkable increase in CAT and PAL enzymes but a decrease POD and SOD enzymes activity. Also, metabolic outputs through GC-MS technique showed that the treatments had different effects on accumulation of some metabolites for example, the level of Phytol increased sharply under the influence of Azelaic acid treatment, while exogenous potassium phosphite increased n-Hexadecanoic acid and Linoelaidic acid. Metabolic cycles can be engineered with the precise use of these materials, which, in turn, can lead to the accumulation of a specific group of secondary metabolites.

**Keywords:** Inducer, Elicitor, Medicinal plant, Metabolic engineering

Corresponding author, Email: dehestani.a4@gmail.com