مقاله پژوهشی

تأثیر الیسیتور سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیکوشیمیایی و مولکولی بومادران معمولی (*Achillea millefolium* L.)

ساناز سیاهلو[۱]، عنایت‌اله یزدان‌پناه*[۱]، حمید سبحانیان[۱]، پیمان آقایی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، علوم پایه، پیام‌نور واحد تهران شرق، تهران

[۲] گروه زیست‌شناسی، سازمان مرکزی دانشگاه پیام‌نور- مرکز امور بین‌الملل دانشگاه، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۲۷)

چکیده

با توجه به نقش سالیسیلیک‌اسید و متیل‌جاسمونات در تنظیم فرایندهای متابولیکی مهم و پتانسیل آنها در افزایش تولید ترکیبات زیستی مهم، تأثیر تیمار این دو هورمون بر صفات مختلف بومادران معمولی مورد بررسی قرار گرفت. نشاءهای حاصل از بذور تحت شرایط گلخانه در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار و متیل جاسمونات با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار به طور مجزا و ترکیبی، سه دفعه با فاصله ۱۵ روز یکبار بر روی برگ‌ها محلول‌پاشی شدند. بعد از اعمال آخرین تیمار، غلظت فنول‌ها و فلاونوئیدها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی، بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدها یعنی فنیل‌آلانین آمونیالیاز (***PAL***) و کالکون سنتاز (***CHS***) و در نهایت عملکرد اسانس در گیاهان تیمار و شاهد مقایسه شدند. تجزیه واریانس گویای تأثیر معنی‌دار این دو هورمون بر صفات موردبررسی بود. به جزء تأثیر منفی متیل‌جاسمونات بر زیست‌توده (وزن خشک و ارتفاع) و کلروفیل و همچنین تأثیر منفی سالیسیلیک اسید بر کارتنوئیدها، تأثیر این دو هورمون بر سایر صفات مثبت بود. جالب اینکه در تیمار ترکیبی، اثر هم‌افزائی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر اغلب صفات بوته‌های بومادران مشاهده شد. اثر تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات بر صفات مختلف تا حدودی متفاوت بود؛ با این حال، بیشترین عملکرد اسانس و بیان ژن‌های ***PAL*** و ***CHS*** با تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بدست آمد. در کل، تأثیر متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر بومادران وابسته به نوع صفت بود. با توجه به عملکرد اسانس، غلظت فنول‌ها و فلاونوئیدها و بیان ژن‌های ***PAL*** و ***CHS***، تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید برای تقویت رشد بومادران معمولی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه، هورمون

مقدمه

بومادران معمولی (*Achillea millefolium* L.)، یک گیاه دارویی با ترکیبات مهمی نظیر کامفور، سمبرن، سینئول، آلفا پینن و لینالول است (Ali *et al.*, 2017). وجود این ترکیبات فعال زیستی، خصوصیات درمانی متعددی نظیر فعالیت ضدتوموری، ضدعفونی‌کننده، ضددرد و مسکن، محرک گوارشی و کاهنده پرفشاری خون به بومادران اعطا کرده است. این ارزش‌های بالینی بومادران منجر به جلب توجه محققان به

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

سمت ایده تقویت رشد و افزایش تولید ترکیبات فعال زیستی مهم آن شده است (Bashir *et al.*, 2022). تاکنون، تکنیک‌های مختلفی به منظور تقویت شاخص‌های رشدی و افزایش غلظت ترکیبات فعال زیستی فلاونوئیدی و فنلی انجام شده است. در این میان، الیسیتورها با سازوکار تعدیل بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها و تغییر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Yadav *et al.*, 2020).

الیسیتورها عوامل غیرزیستی و زیستی متنوعی را در بر می‌گیرند که سبب بروز تغییرات چشمگیری در فرایندهای گوناگون فیزیولوژیکی و متابولسیم متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Naik and Al-Khayri, 2016). تعدیل بیوسنتز و تجزیه متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها در پی تیمار الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی بدان خاطر می‌باشد که این زیست‌ترکیبات، کارکردهای دفاعی در گیاهان بر عهده دارند و درنتیجه سطح آن‌ها در پی اعمال الیسیتورها با تغییر محسوسی مواجه می‌شود (Dias *et al.*, 2016). سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات از مهمترین الیسیتورهای شیمیایی به شمار می‌آیند که با مسیر پیام‌رسانی اختصاصی خود منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و متعاقباً فعال‌سازی مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی می‌شوند که پیامد آن، افزایش سطح ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی است (Hou and Tsuda, 2022). در واقع، سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات، به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی و الیسیتورهای مؤثر شناخته می‌شوند که در پیام‌رسانی سلولی طی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انجام وظیفه می‌کنند. تأثیر این الیسیتورها بر فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه وابسته به گونه گیاهی، مرحله نموی، غلظت به‌کاررفته و زمان تیمار است (Gilroy and Breen, 2022).

جهت تقویت رشد و افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه‌ای همچون فنیل‌پروپانوئیدها توسط الیسیتورها، نیاز به شناخت مسیر بیوسنتزی آن و شناسایی ژن‌های کلیدی درگیر در این مسیر است. فلاونوئیدها از طریق مسیر فنیل‌پروپانوئید بیوسنتز می‌شوند که اسیدآمینه فنیل‌آلانین را به ۴-کوماروئیل-CoA تبدیل می‌کند (Naoumkina *et al.*, 2010). فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) این مسیر را برای تولید متابولیت‌های مختلف از جمله فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌ها و کومارین‌ها کاتالیز می‌کند. در واقع، این آنزیم دآمیناسیون فنیل‌آلانین را برای تولید اسید ترانس سینامیک کاتالیز می‌نماید. در ادامه، سینامات ۴-هیدروکسیلاز و لیگاز ۴-کومارات کوآنزیم‌آ، تبدیل سینامیک اسید را به ترتیب به پی-کوماریول‌کوآ و ۴- کوماریول‌کوآ کاتالیز می‌کنند. این واسطه‌ها به‌نوبه‌خود می‌توانند به عنوان پیش‌ساز برای تولید ترکیبات فنیل‌پروپانوئید استفاده شوند (Anwar *et al.*, 2021). آنزیم کالکون سنتاز (CHS)، اولین مرحله بیوسنتز فلاونوئیدها را با هدایت جریان کربن از مسیر عمومی فنیل‌پروپانوئید به مسیر فلاونوئید کاتالیز می‌کند. در واکنش کاتالیزشده توسط CHS، ستون فقرات کالکون با تبدیل ۴-کوماروئیل-CoA تولید می‌شود تا به عنوان پیش‌ماده برای بیوسنتز فلاونوئیدها استفاده شود (Anwar *et al.*, 2021).

تاکنون، پژوهش‌های محدودی در حوزه محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات و تعیین اثرات آنها بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی انجام شده است. برای مثال، Capite و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که کاربرد خارجی هورمون سالیسیلیک اسید می‌تواند باعث افزایش دو برابری غلظت گلیکوزیدهای ترپنوئیدی در گیاه دارویی کوهوش سیاه (*Actaea racemosa*) شود. همچنین، Yang و همکاران (۲۰۱۲) مدارکی دال بر این امر ارائه دادند که استفاده از محلول‌پاشی متیل‌جاسمونات می‌تواند باعث افزایش زیست‌ترکیب تانشینون در گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia miltiorrhiza*) شود. از میان سازوکارهای مختلف الیسیتوری، افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی بیشتر مورد توجه محققان بوده است. برای مثال، Anjalani و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که متیل جاسمونات بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در گیاه ژینورا (*Gynura pseudochina*) اثر مثبت می‌گذارد. علاوه‌براین، Khattab و همکاران (۲۰۲۲) دریافتند که اسید سالیسیلیک بیان کالکون سنتاز را در گیاه خار مریم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

(*Silybum marianum*) افزایش می‌دهد.

علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه، الیسیتورها بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی نظیر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی تأثیر می‌گذارند. در پژوهشی بر روی بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر مورفولوژیکی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)، DASTYAR و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که تیمار برگی اسید سالیسیلیک ۲ میلی‌مولار سبب افزایش صفات مورفولوژیکی مثل ارتفاع می‌شود درحالی‌که متیل‌جاسمونات تأثیر منفی بر صفات موردنظر دارد. همچنین، Ghasimi و همکاران (۲۰۱۸)، دریافتند که سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات سبب افزایش غلظت فنل کل و ترکیبات فنولیک در گیاه دارویی نوروزک (*Salvia lerrifolia*) شدند. در مطالعه‌ای دیگر، Hashemyan و همکاران (۲۰۲۰) نیز آشکار ساختند که الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید موجبات تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره نمدی (*Teucrium polium*) را فراهم می‌کنند. در نهایت، Zare-Hassani و همکاران (۲۰۱۹) هم به این نتیجه رسیدند که اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات میزان کلروفیل و کاروتنوئیدهای را در برگ‌های کاکوتی (*Ziziphora persica*) افزایش می‌دهد.

با توجه به آنچه گفته شد، این مطالعه با هدف تعیین اثر سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی، فیزیکوشیمیایی و مولکولی بومادران معمولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آزمایش: بذرهای بومادران معمولی از شرکت پاکان بذر تهیه شد. روش ضدعفونی Kanatas و همکاران (۲۰۲۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. جهت ضدعفونی، بذر بومادران به‌مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳٪ قرار گرفته و سه بار با آب‌مقطر شستشو شدند. در ادامه، بذرها در سینی نشاء کشت شدند و بعد از گذشت یک ماه، نشاءهای حاصل (سه نشا به ازای هر کیسه) در کیسه‌های پلاستیکی دارای خاک‌برگ پوسیده، خاک باغچه، ماسه‌بادی با نسبت ۱:۱:۱ (Salimi *et al.*, 2017) تحت شرایط گلخانه در قالب فاکتوریل طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی بستر کشت بذر عبارت بودند از: اسیدیته ۷/۴، هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) ۰/۷۹، نیتروژن ۰/۱٪، پتاسیم ۲۳۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و فسفر ۱/۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم. بر اساس پیشنهاد مطالعات گذشته، شرایط گلخانه به شکل فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (Shafie *et al.*, 2021)، دمای میانگین ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب شبانه و روزانه (عموی و همکاران، ۱۳۹۵)، رطوبت نسبی ۶۰ درصد (Dehghan and Rahimmalek, 2018) (با استفاده از رطوبت‌سنج و بهره‌گیری از مه‌پاش و کنترل تهویه گلخانه) تنظیم شد.

تیمارهای آزمایشی: غلظت‌های هورمونی (Dastyar *et al.*, 2019)، زمان اولین تیمار بعد از استقرار گیاه، تعداد دفعات و فواصل زمانی تیمارها (Bayat *et al.*, 2021) بر اساس مطالعات گذشته انتخاب شدند. یک ماه بعد از انتقال نشاها به گلدان‌ها، تیمار سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار و متیل جاسمونات با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار به طور مجزا و ترکیبی در سه دفعه با فاصله ۱۵ روز یکبار بر روی برگ گیاهان بومادران معمولی محلول‌پاشی شدند. ۳۰ شبانه روز بعد از اعمال آخر تیمار، نمونه‌گیری از برگ‌ها صورت گرفت. برگ گیاهان بدون تیمار (شاهد) نیز با آب‌مقطر استریل تحت محلول‌پاشی قرار گرفت. تا زمان اجرای آنالیز مولکولی، نمونه‌های برگی در دمای۷۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگه‌داری شدند.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و فیزیکوبیویشیمیایی: ۳۰ شبانه‌روز بعد از اعمال آخر تیمار، تمام ارزیابی‌ها مورفولوژیکی و فیزیکوبیویشیمیایی انجام شد چرا که بومادران هم به اندازه کافی فنول‌ها و فلاونوئیدها را تولید می‌کند و هم به اندازه کافی رشد کرده است که صفات مورفولوژیکی و فیزیکوبیویشیمیایی معیار سنجش پاسخ بومادران به تیمار هورمونی باشند (Afshari and Rahimmalek, 2017).

صفات مورفولوژیکی: صفات مرتبط با زیست‌توده نظیر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاه به ترتیب با استفاده از ترازو و خط‌کش اندازه‌گیری شدند.

صفات فیزیکوبیویشیمیایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) تعیین شد. این روش بر اساس کاهش کمپلکس فریک تری‌پیریدیل تری‌آزین (TPTZ) به فروس در مجاورت آنتی‌اکسیدان‌ها است. به طور خلاصه، ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن سه‌آبه، ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در ۴۰ میلی‌مولار HCl و ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم باهم ترکیب شدند. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی مخلوط شد. در ادامه، جذب محلول در ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. محتوی آنتی‌اکسیدانی بر اساس میلی‌گرم محلول سولفات‌آهن II در گرم وزن خشک توسط منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف محلول سولفات‌آهن II (۱۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برآورد شد.

عصاره‌گیری ترکیبات فنلی: جهت تهیه عصاره فنولی، ۰/۱ گرم از پودر برگی خشک هر نمونه با ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و تحت دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

محتوی فنل کل: محتوی فنل‌های کل با تکنیک Singleton و همکاران (۱۹۹۹) تعیین شد. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر عصاره متانولی برگ با ۱ میلی‌لیتر فولین سیوکالچو و ۲ میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط شده و بعد از گذشت سه دقیقه، ۱ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد Na_2Co_3 (وزنی/حجمی) به آن افزوده شد. بعد از ۴۵ دقیقه، جذب نوری در ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. محتوی فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه توسط منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های گالیک اسید مختلف (۱۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برآورد شد.

محتوی فلاونوئید کل: محتوی فلاونوئیدهای کل بر مبنای سنجش کالریمتری آلومینیوم کلرید بررسی شد (Zhishen *et al.*, 1999). محتوی کل فلاونوئیدها بر حسب میلی‌گرم کاتچین در گرم وزن خشک نمونه توسط منحنی استاندارد غلظت‌های کاتچین مختلف (۱۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برآورد شد.

محتوی رنگدانه‌های فتوسنتزی: غلظت کلروفیل و کاروتنوئید بر اساس روش Arnon (۱۹۴۹) سنجش شد. برای تعیین جذب نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. اسپکتروفتومتر با استون ۸۰ درصد کالیبره و میزان جذب عصاره در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر تعیین شد تا متعاقباً میزان کلروفیل و کاروتنوئید محاسبه شود.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها از طریق نرم‌افزار Excel انجام شد. آنالیز واریانس به طریق ANOVA و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و کالکون سنتاز (CHS)، استخراج RNA و سنتز cDNA: لازم به ذکر است که به دلیل اختصاصیت کیت‌ها برای گیاهان، تغییراتی در رویه اجرایی آنها (برای مسائلی مثل حضور فنل‌ها) اعمال نشد. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA ستونی دنازیست و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. برای اطمینان از خلوص RNA، نسبت‌های جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد. همچنین، برای اطمینان از یکپارچگی RNA، الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد صورت پذیرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA دنازیست و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. جهت تأیید سنتز cDNA، PCR با استفاده از آغازگرهای ژن کنترل داخلی فاکتور گسترش (Elongation Factor) (EF Forward: GCTTTACCTCCCAAGTCATCATC و EF Reverse: GGCTCCTTCTCAATCTCCTTACC) و مطابق با برنامه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) انجام شد.

Real-Time PCR: ابتدا، توالی ژن‌های *PAL* و *CHS* از سایت NCBI جمع‌آوری و آغازگرهای اختصاصی از طریق

جدول ۱- جفت آغازگرهای ژن‌های *PAL* و *CHS*

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

نام	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیری
PAL Forward	GCAAGGAAAGCCCGAGTTTAC	۷۶۰
PAL Reverse	GGACCTTTTTGGCTACTTGGC	
CHS Forward	CCCGATTACTATTTTCGGATCAC	۶۱۰
CHS Reverse	CGAGTGAATCAAGGTGAGTGTC	

نرم‌افزار PREMIER Biosoft AlleleID v7.7 برای هر ژن طراحی شدند. با توجه به Tm، درصد GC، وجود ساقه‌حلقه و دایمرها، بهترین آغازگرهای گزینش شدند (جدول ۱). جهت تعیین بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* در گیاهان تیمار و شاهد، از واکنش Real Time - PCR استفاده شد. از کیت مسترمیکس سایبرگرین ریل‌تایم دنازیست برای انجام واکنش به شرح ذیل استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از cDNA رقیق به عنوان الگو در واکنش (شامل ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشتی، ۶/۵ میکرولیتر آب DEPC و ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix) استفاده شد. چرخه حرارتی واکنش Real Time PCR عبارت بود از: واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای مربوطه برای ۱۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه. جهت بررسی تغییرات کمی بین نمونه تیمار و شاهد، از روش کمی‌سازی نسبی ΔΔCT (Livak's Method) استفاده شد.

تعیین میزان اسانس: جهت اسانس‌گیری از گیاه بومادران، نمونه‌های گیاهی در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. در ادامه، پیکره رویشی نمونه‌های گیاهی از طریق آسیاب سرامیکی خرد و مخلوط شد. برای هر تکرار و تیمار، عملیات اسانس‌گیری از نمونه‌های ۲۵ گرمی با دستگاه کلونجر و سه ساعت بعد از جوش‌آمدن انجام شد. بر مبنای وزن خشک نمونه‌ها، درصد اسانس (وزن اسانس/ماده خشک×۱۰۰) نمونه‌های بومادران برآورد شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه، اثر اصلی سالسیلیک اسید، اثر اصلی متیل جاسمونات و اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری بر صفات مورد مطالعه بوته‌های بومادران داشتند (جدول ۲ و ۳).

صفات ریخت‌شناسی: متیل‌جاسمونات سبب کاهش معنی‌دار وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران شد. این اثر کاهشی وابسته به دوز هورمون بود به‌طوری‌که با افزایش غلظت متیل‌جاسمونات، کاهش بیشتری در وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران مشاهده شد. در این راستا، غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات منجر به افت حدود ۵۰ درصدی وزن خشک و همچنین افت حدود ۳۰ درصدی ارتفاع بوته‌های بومادران شد (شکل ۱). سالسیلیک اسید اثر معکوس متیل جاسمونات را بر وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران به نمایش گذاشت و باعث افزایش این دو صفت زراعی شد. این اثر افزایشی وابسته به دوز سالسیلیک اسید بود به‌نحوی‌که با افزایش غلظت هورمون، افزایش بیشتری در وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران ثبت شد. در این راستا، غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید باعث افزایش حدود ۶۰ درصدی وزن خشک و ۵۵ درصدی ارتفاع بوته‌های بومادران شد (شکل ۱). در تیمار ترکیبی، اثر میانکنشی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر وزن خشک و ارتفاع بوته‌های بومادران مشاهده شد. به‌طوری‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) باعث کاهش ارتفاع بوته‌های بومادران شد درحالی‌که در غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات باعث افزایش ارتفاع بوته‌های بومادران شد. در حضور سالسیلیک اسید، هر دو غلظت متیل جاسمونات اثر منفی بر وزن خشک داشتند. ناگفته نماند که با افزایش غلظت سالسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار)، از اثر منفی متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی کاسته شد. بنابراین،

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و بیان ژن بومادران معمولی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		ارتفاع بوته	وزن خشک بوته	محتوی فنول	محتوی فلاونوئیدها	ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی
سالسیلیک اسید	۲	۱۲۸/۵۸**	۰/۴۷**	۱۴۴۲/۹۴**	۹۳۶/۱۵**	۸۶۰/۷۷**
متیل جاسمونات	۲	۹۶/۰۴**	۰/۳۱**	۲۶۸۸/۰۶**	۲۱۲۳/۸۷**	۵۶۶/۴۱**
سالسیلیک اسید × متیل جاسمونات	۴	۳۰/۶۰**	۰/۰۰۵*	۱۱۴/۳۳*	۳۸/۸۰**	۲۲۵/۲۰**
خطا	۱۸	۴/۱۹	۰/۰۰۱	۲۶/۳۳	۸/۰۳	۳۵/۷۹
ضریب تغییرات	–	۱۱/۰۰	۸/۵	۹/۶۶	۶/۲۳	۲۰/۷۹

*** و ** به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد است.**

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و بیان ژن بومادران معمولی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	اسانس	بیان ژن *PAL*	بیان ژن *CHS*
سالسیلیک اسید	۲	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۲۶**	۰/۰۰۶۴**	۰/۰۰۲۲**	۰/۰۸۲**	۹/۲۴**	۸/۶۴**
متیل جاسمونات	۲	۰/۰۰۰۵**	۰/۰۰۳۲**	۰/۰۰۶۳**	۰/۰۰۳۱**	۰/۱۳**	۱/۳**	۱/۰۷**
سالسیلیک اسید×متیل جاسمونات	۴	۰/۰۰۰۰۶*	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۰۵۶**	۰/۰۰۰۶*	۰/۰۹۸**	۰/۵۶**	۰/۳۷**
خطا	۱۸	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۲۲	۰/۰۱۹	۰/۰۱۳	۰/۰۵۶
ضریب تغییرات	–	۱۸/۲۸	۱۵/۹۵	۱۴/۱۰	۱۵/۰۴	۱۸/۳۰	۴/۵	۱۱/۰۶

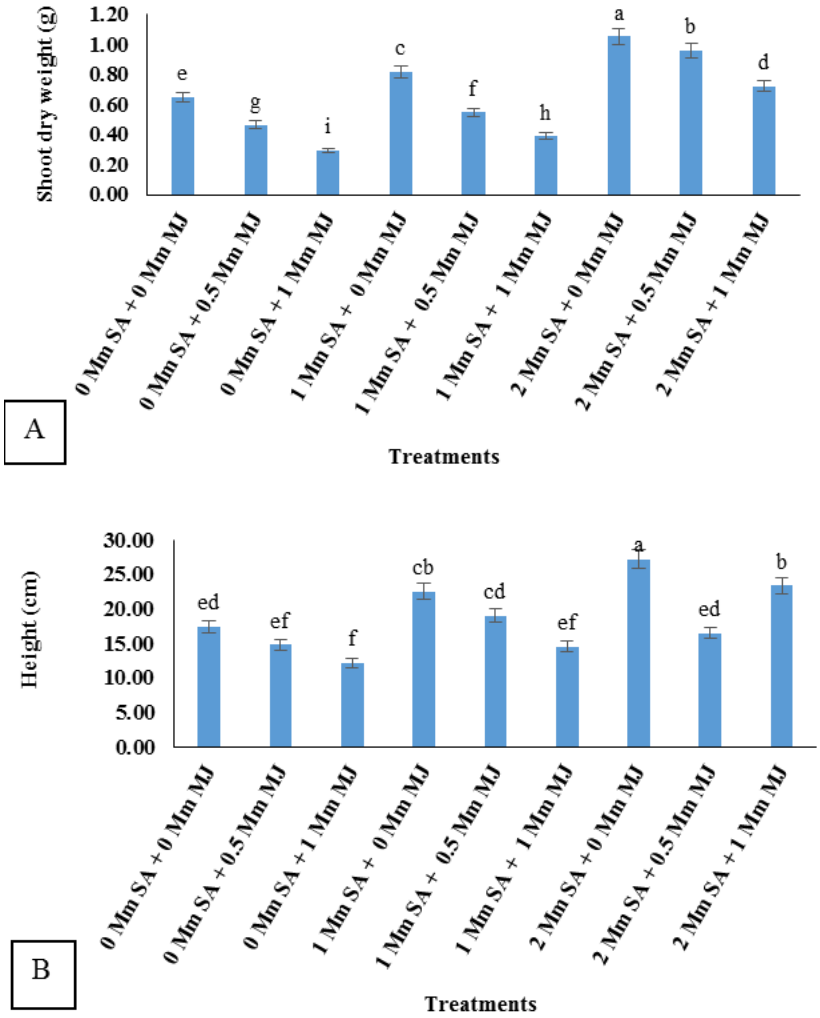
*** و ** به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد است.**

استفاده از غلظت بیشتر سالسیلیک اسید برای خنثی‌سازی اثر منفی متیل جاسمونات بر صفات مورفولوژیکی حائز اهمیت است (شکل ۱).

به نظر می‌رسد که سالسیلیک اسید با تأثیرگذاری بر مسیرهای پیام‌رسانی سبب تحریک تقسیم سلولی و گسترش سلولی می‌شود و از این طریق منجر به افزایش زیست‌توده گیاهی در قالب ارتفاع و وزن اندام هوایی می‌شود (Hayat *et al.*, 2020). هم‌راستا با نتایج ما، Dastyar و همکاران (۲۰۱۹)، تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات را بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بررسی نمودند. محققان متوجه شدند که تیمار برگی اسید سالیسیلیک ۲ میلی‌مولار سبب افزایش ارتفاع می‌شود و متیل جاسمونات تأثیر منفی بر صفات موردنظر دارد. بنابراین، نویسندگان پیشنهاد کردند که کاربرد ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب بیشترین مقدار ارتفاع می‌شود.

صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، محتوی فنول: تأثیر هم‌راستا و هم‌افزا متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر محتوی فنول در بوته‌های بومادران مشهود بود. متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید هر دو باعث افزایش معنی‌دار محتوی فنول در بوته‌های بومادران شدند. این تأثیر افزایشی وابسته به دوز هر دو هورمون بود به شکلی که با افزایش غلظت آنها، افزایش بیشتری در غلظت فنول بوته‌های بومادران مشاهده شد. در این راستا، غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید به ترتیب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

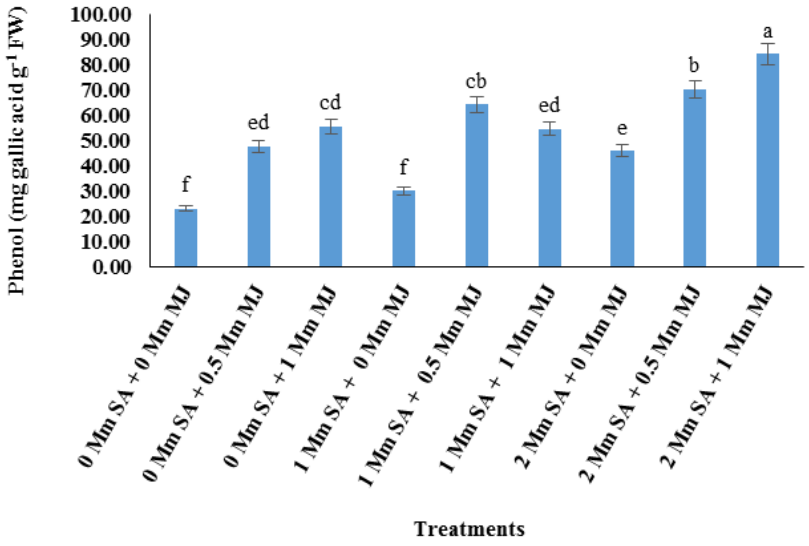


شکل ۱- وزن خشک (A) و ارتفاع (B) بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

منجر به افزایش ۱/۵ برابری و ۹۸ درصدی محتوی فنول در بوته‌های بومادران شدند (شکل ۲). در تیمار ترکیبی، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر محتوی فنول بوته‌های بومادران رخ داد. به‌طوری‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، افزایش غلظت سالسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار) باعث افزایش بیشتر غلظت فنول بومادران شد. بیشترین غلظت فنول در تیمار ترکیبی ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید مشاهده شد که گویای اثر هم‌افزایی قوی این دو هورمون با یکدیگر است. بنابراین اینگونه می‌توان استنباط کرد که استفاده از غلظت بیشتر سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات برای حصول حداکثر سطح ترکیبات فنولی حائز اهمیت است (شکل ۲).

هم‌راستا با مطالعه ما، Ghasimi و همکاران (۲۰۱۸)، اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات را بر تولید ترکیبات فنولیک در گیاه دارویی نوروزک (*Salvia lerrifolia*) بررسی کردند. بالاترین فنل با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بدست آمد. همچنین، افزایش سطح سالیسیلیک اسید سبب افزایش محتوی فنل کل شد. محققان پیشنهاد کردند که الیسیتورهای فوق سبب افزایش ترکیبات فنولیک می‌شود. در رابطه با مکانیزم‌های پشت پرده تأثیرگذاری متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر سطح ترکیبات فنولی می‌توان اینگونه استنباط کرد که آنها باعث تحریک سیستم ایمنی گیاه در مواجه با شرایط نامطلوب محیطی می‌شوند و بالطبع گیاه برای پاسخ به چنین شرایطی اقدام به تولید ترکیبات ثانویه‌ای همچون

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]



شکل ۲- محتوی فنول بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

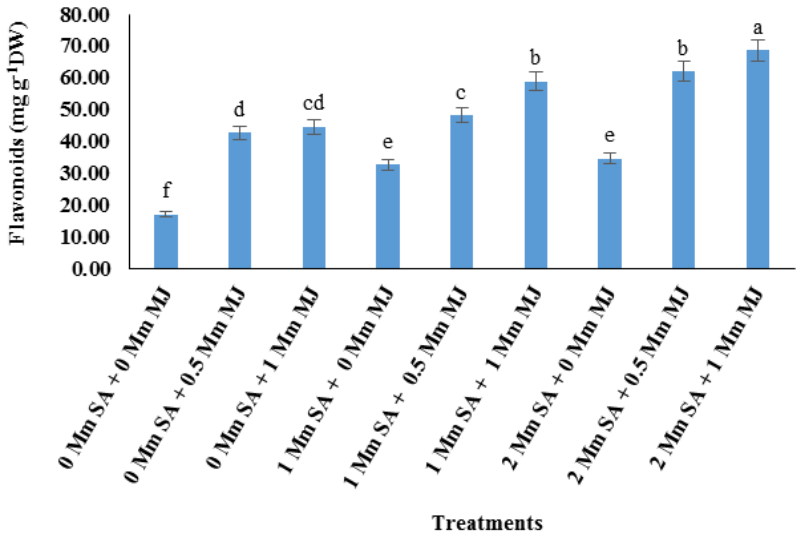
فنول‌ها می‌کند که نقش مهمی در پاسخ به محرک‌های داخلی و خارجی گیاه ایفا می‌کنند (Mendoza *et al.*, 2018).

محتوی فلاونوئیدها: در بوته‌های بومادران، اثر هم‌راستا و هم‌افزا متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر محتوی فلاونوئیدها واضح بود. هورمون‌های متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید هر دو منجر به افزایش معنی‌دار محتوی فلاونوئیدها شدند. چنین اثر افزایشی وابسته به دوز متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بود به صورتی که با افزایش سطح آنها، افزایش بیشتری در غلظت فلاونوئیدهای بوته‌های بومادران رخ داد. غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید به ترتیب سبب افزایش حدود ۱/۶ برابری و ۹۷ درصدی محتوی فلاونوئیدها شدند (شکل ۳). در کاربرد توأم هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر محتوی فلاونوئیدها بومادران مشاهده شد. به صورتی که در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، افزایش غلظت سالسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار) سبب افزایش بیشتر فلاونوئیدها بوته‌های بومادران شد. بیشترین غلظت فلاونوئیدها در تیمار ترکیبی ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید رخ داد که حاکی از اثر هم‌افزایی قوی این دو هورمون با یکدیگر است. در نتیجه، می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که کاربرد غلظت بیشتر سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات منجر به افزایش بیشتر سطح ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود (شکل ۳).

در توافق با مشاهدات ما، Mendoza و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر افزایش تولید ترکیبات فلاونوئیدی را در کشت‌های سوسپانسیون سلول گیاهی خرزهره (*T. peruviana*) مطالعه کردند. بر مبنای یافته‌ها، بالاترین سطح ترکیبات فلاونوئیدی تحت تیمارهای ۳ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۳۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک به دست آمد. مکانیزم‌های تأثیرگذاری متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر سطح ترکیبات فلاونوئیدی شبیه به ترکیبات فنلی هستند چرا که مسیرهای بیوسنتزی آنها با هم همپوشانی دارد. اما اینکه چگونه اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات با هم در القا پاسخ افتراقی گیاهان فعالیت می‌کنند خود موضوعی بحث‌برانگیز است که شامل تلاقی آبشارهای پیام‌رسانی مختلف باهم می‌شود (Monte, 2023).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی: در بوته‌های بومادران، اثر هم‌راستا و گاهی غیرهم‌راستا متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مشاهده شد. هورمون‌های متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید هر دو موجبات افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی را در بومادران فراهم کردند با این اختلاف که این اثر افزایشی وابسته به دوز بود. به‌طوری‌که با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]



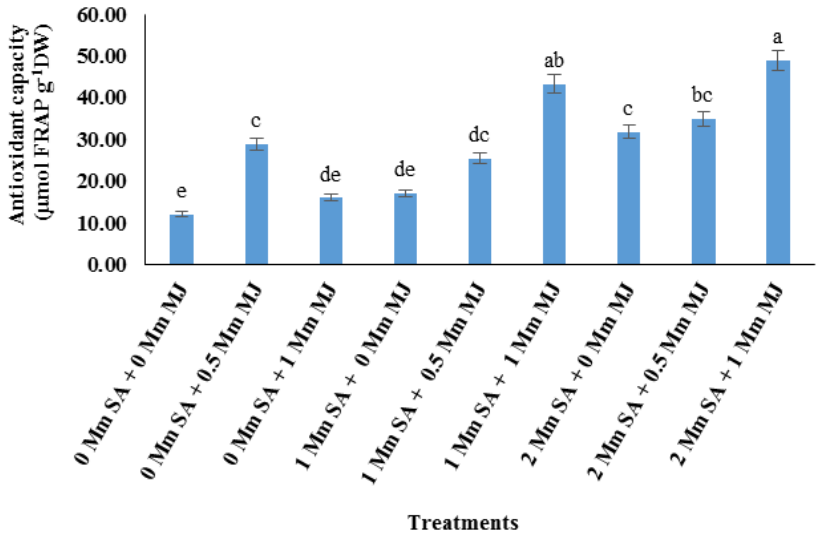
شکل ۳- محتوی فلاونوئیدهای بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

افزایش سطح متیل جاسمونات، روند افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بوته‌های بومادران متوقف شد. این درحالی است که اثرگذاری سالیسیلیک اسید به نحوی دیگر بود یعنی با افزایش سطح آن، بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی افزوده شد (شکل ۴). در استفاده همزمان از هورمون‌ها، متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید اثر هم‌افزا بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بوته‌های بومادران داشتند. در ترکیب تیماری، در غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید (از ۱ به ۲ میلی‌مولار) منجر به افزایش بیشتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بوته‌های بومادران شد. بر این اساس، تیمار ترکیبی ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید منجر به حصول بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی شد که نشان از اثر هم‌افزایی قوی این دو هورمون گیاهی دارد. بنابراین، استفاده از غلظت بالاتر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات سبب افزایش بیشتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی می‌شود (شکل ۴).

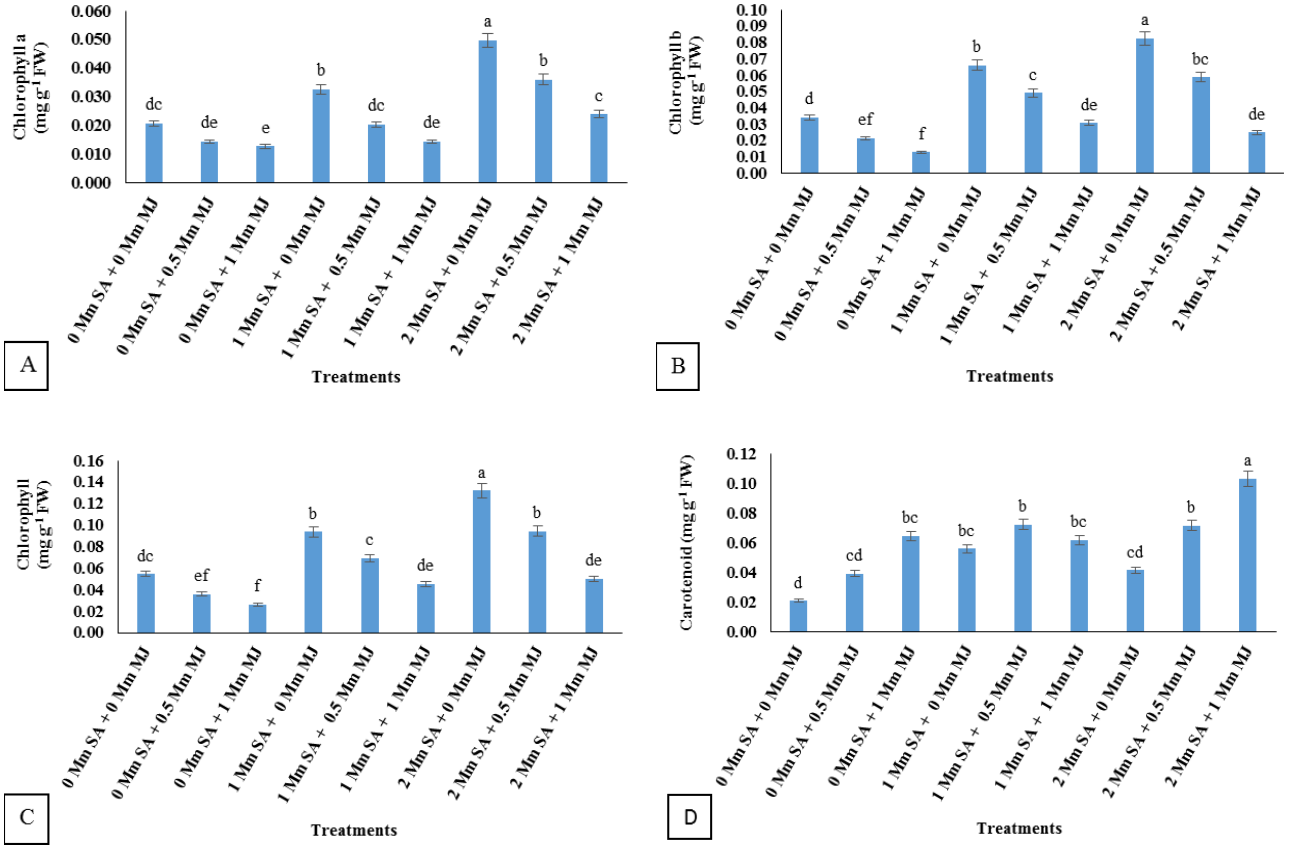
در مطالعه‌ای مشابه، Hashemyan و همکاران (۲۰۲۰)، تأثیر الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید را بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره نمدی (*Teucrium polium*) بررسی کردند. نویسندگان پیشنهاد کردند که استفاده از غلظت بالاتر سالیسیلیک اسید و متیل‌جاسمونات نقش مفیدی در تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارد. در رابطه با مکانیزم تأثیر این هورمون‌ها باید گفت که تیمار با مولکول‌های سیگنالینگی مثل متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک اسید تولید H_2O_2 را القا می‌کند که به نوبه خود باعث سنتز یا فعال‌کردن فاکتورهای رونویسی درگیر در بیان سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Jeyasri *et al.*, 2023).

کلروفیل: سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنی‌دار محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بوته‌های بومادران شد. این اثر افزایشی وابسته به دوز هورمون بود بدین صورت که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، افزایش بیشتری در محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بوته‌های بومادران مشاهده شد. غلظت ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید منجر به افزایش حدود ۱۲۰ درصدی محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بومادران شد (شکل ۵). متیل جاسمونات اثر معکوس سالیسیلیک اسید را بر محتوی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل بومادران به نمایش گذاشت و باعث کاهش این سنجش‌ها شد. این اثر کاشی وابسته به دوز متیل جاسمونات بود به نحوی‌که با افزایش غلظت هورمون، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل کاهش بیشتری یافت. در این راستا، غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات سبب کاهش ۷۰ درصدی کلروفیل‌ها شد (شکل ۵). در کاربرد توأم هورمون‌ها، اثر تقابلی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر مقدار کلروفیل a،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]



شکل ۴- ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات



شکل ۵- رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کارتنوئید (D) بوته‌های بومادران تحت اثر سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات

کلروفیل b، کلروفیل کل بومادران مشاهده شد. این تقابل به گونه‌ای بود که افزایش غلظت متیل جاسمونات تأثیر مثبت سالیسیلیک اسید را بیشتر خنثی کرد. با تمام این اوصاف، غلظت بیشتر سالسیلیک اسید منجر به ارمغان سطح بالاتری از مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل می‌شود که باید با غلظت کمتر متیل جاسمونات (یعنی ۰/۵ میلی‌مولار) استفاده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

شود (شکل ۵).

دلیل کاهش محتوی کلروفیل ناشی از تیمار متیل جاسمونات را می‌توان اینگونه توجیح کرد که این هورمون سبب القا فعالیت آنزیم کلروفیلاز می‌شود که این آنزیم نقش کلیدی در تجزیه کلروفیل بر عهده دارد. همچنین، متیل جاسمونات باعث کاهش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل (*CHLD, CHLH, CHLI, PORB*) می‌شود (Kim *et al.*, 2023). در مقابل، اسید سالیسیلیک نقش آنتی‌اکسیدانی مهمی ایفا می‌کند و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌دهد و در نتیجه سنتز کلروفیل را افزایش می‌دهد (Arruda *et al.*, 2023).

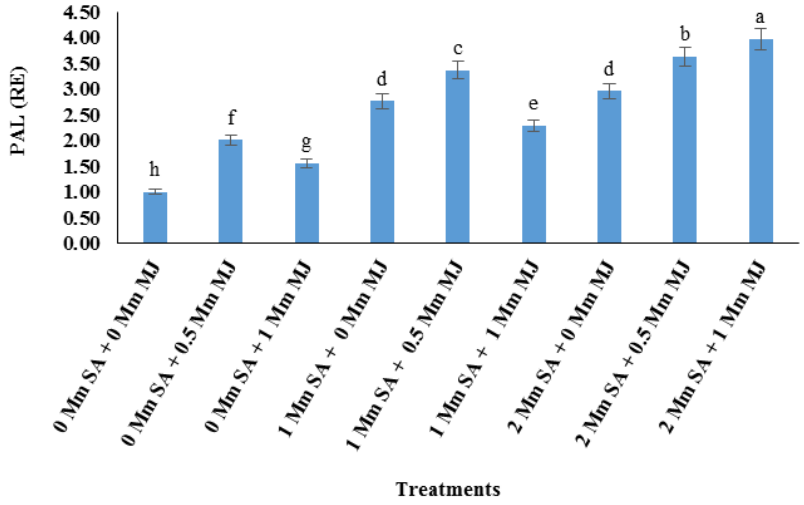
کاروتنوئید: متیل جاسمونات اثر معکوس سالسیلیک اسید بر غلظت کاروتنوئیدهای برگی به نمایش گذاشت و سبب افزایش غلظت کاروتنوئیدها شد. این اثر افزایشی وابسته به دوز متیل جاسمونات بود به‌نحوی‌که با افزایش غلظت هورمون، غلظت کاروتنوئیدها افزایش بیشتری یافت. غلظت ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات سبب افزایش ۲/۹ برابری کاروتنوئیدها شد (شکل ۵). در کاربرد توأم هورمون‌ها، معلوم شد که غلظت سالسیلیک اسید در اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید مهم است. در غلظت ۱ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، محتوی کاروتنوئیدها با افزایش غلطت متیل جاسمونات کاهش یافت درحالی‌که در غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، با افزایش غلظت متیل جاسمونات، سطح کاروتنوئیدها افزایش یافت (شکل ۵).

در پژوهشی مشابه، Zare-Hassani و همکاران (۲۰۱۹)، تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل‌جاسمونات را بر کلروفیل و کاروتنوئیدهای برگ‌های کاکوتی (*Ziziphora persica*) بررسی کردند. محققان پیشنهاد کردند که اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات از پتانسیل بالایی در تحریک بیوسنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی برخوردار هستند. یافته‌های ما با مشاهدات این مطالعه مطابقت دارد به‌طوری‌که غلظت پایین متیل جاسمونات برای کلروفیل و غلظت پایین اسید سالیسیلیک برای کاروتنوئیدها مناسب‌تر است. دلیل تأثیر منفی سالسیلیک اسید و تأثیر مثبت متیل جاسمونات بر محتوی کاروتنوئیدها را می‌توان اینگونه توجیح کرد که این هورمون‌ها به واسطه نقش کلیدی خود در مسیرهای پیام‌رسانی، بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئیدها را تغییر می‌دهند و از این طریق سبب کاهش یا افزایش سطح آنها در گیاه می‌شوند. متیل‌جاسمونات با افزایش بیان ژن‌های *PSY, PDS, BKT* و سالسیلیک اسید با کاهش بیان آنها سبب تغییر غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شوند (Ali, 2021).

سطح رونوشت‌های ژن‌های *PAL* و *CHS*، بیان ژن *PAL*: فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) یکی از آنزیم‌های شناخته‌شده است که اولین مرحله مسیر فنیل پروپانوئید را برای تولید متابولیت‌های مختلف از جمله فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌ها و کومارین‌ها کاتالیز می‌کند. در بوته‌های بومادران، اثر هم‌راستا و هم‌افزا متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر بیان ژن *PAL* مشاهده شد. هورمون‌های متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید هر دو منجر به افزایش بیان ژن *PAL* در بومادران شدند. با این تفاوت که افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار باعث کاهش بیان ژن *PAL* شد درحالی‌که افزایش غلظت سالسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار همچنان به افزایش بیان ژن *PAL* ختم شد. غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید سبب افزایش حدود ۳/۸ برابری بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز در بومادران شد (شکل ۶). در کاربرد توأم هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز بومادران در غلظت بالای سالسیلیک اسید مشاهده شد. به صورتی‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب کاهش بیان ژن *PAL* شد. در حالی‌که، در غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب افزایش بیان ژن *PAL* شد. علاوه بر این، غلظت ۲ میلی‌مولار نسبت به ۱ میلی‌مولار تأثیر مثبت بیشتری بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز داشت (شکل ۶).

هم‌راستا با یافته‌های ما، Chen و همکاران (۲۰۰۶) تأثیر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]



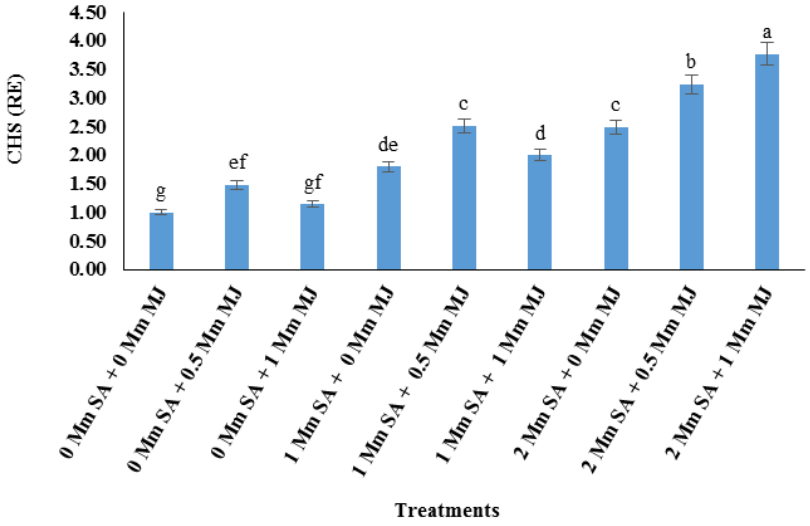
شکل ۶- بیان ژن *PAL* در بوته‌های بومادران تحت تیمار سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات

سالسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز را در گیاه انگور (*Vitis vinifera*) مورد بررسی قرار دادند. محققان دریافتند که سالسیلیک اسید می‌تواند تجمع mRNA PAL را القا کند و در نتیجه، میزان پروتئین PAL و فعالیت را افزایش دهد. چنین مجموعه‌ای از حوادث به نوبه‌خود سبب تجمع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌شود. همچنین، Anjalani و همکاران (۲۰۲۴) تأثیر متیل جاسمونات بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز را در گیاه ژینورا (*Gynura pseudochina*) مورد بررسی قرار دادند. محققان نشان دادند که کاربرد متیل جاسمونات ۱۵۰ میکرومولار منجر به بیان بیشتر ژن *PAL* نسبت به گیاهان کنترل می‌شود. بنابراین، MeJA به طور بالقوه تولید ترکیبات فلاونوئیدی را توسط القای بیان *PAL* افزایش می‌دهد. از نظر مکانیزم درگیر در تأثیرگذاری متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز می‌توان اینگونه استنباط کرد که این هورمون‌ها سبب القا آبشارهای پیام‌رسانی مربوط به پاسخ گیاه به شرایط تنش می‌شوند و با القا بیان ژن *PAL* سبب تحریک بیوسنتز ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی می‌شوند (Chen *et al.*, 2006).

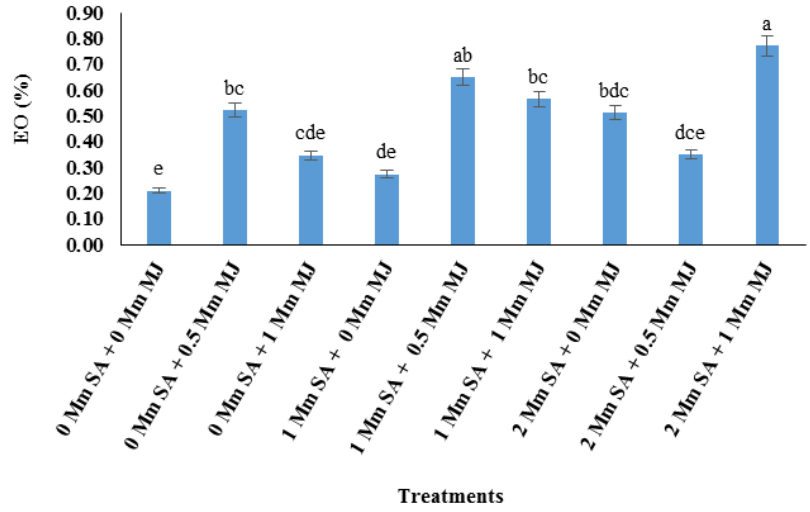
بیان ژن *CHS*: آنزیم کالکون سنتاز (CHS)، به عنوان اولین آنزیم‌های کلیدی مسیر فلاونوئید است. آنزیم CHS اولین مرحله بیوسنتز فلاونوئید را با هدایت جریان کربن از مسیر عمومی فنیل پروپانوئید به مسیر فلاونوئید کاتالیز می‌کند. اثر هم‌راستا سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر بیان ژن *CHS* در بوته‌های بومادران مشاهده شد. هورمون‌های سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات هر دو سبب افزایش بیان ژن کالکون سنتاز شدند. با این تفاوت که افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار باعث کاهش بیان ژن *CHS* شد. این در حالی است که افزایش غلظت سالسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار همچنان به افزایش بیان ژن *CHS* ختم شد. سطح ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید باعث افزایش حدود ۲/۵ برابری بیان ژن کالکون سنتاز در بومادران شد (شکل ۷). در استفاده همزمان از هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر بیان ژن کالکون سنتاز مشاهده شد. به صورتی که در هر دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب افزایش بیان ژن *CHS* شد (شکل ۷).

هم‌راستا با مشاهدات ما، Khattab و همکاران (۲۰۲۲) تأثیر اسید سالیسیلیک را بر بیان ژن CHS در گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که هر دو غلظت اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان همزمان ژن‌های CHS۱، ۲ و ۳ شدند. همچنین، He و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر متیل جاسمونات بر بیان رونوشت *CtCHS2* و *CtCHS4* توسط qRT-PCR را بررسی کردند. بیان *CtCHS4* در پاسخ به MeJA به طور قابل توجهی افزایش یافت، درحالی‌که بیان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]



شکل ۷- بیان ژن *PAL* در بوته‌های بومادران تحت تیمار سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات



شکل ۸- عملکرد اسانس در بوته‌های بومادران تحت تیمار سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات

CtCHS2 روند کاهشی را پس از القاء نشان داد. در نتیجه، نویسندگان پیشنهاد کردند که *CtCHS4* یک ژن کلیدی برای تشکیل کار تأمین است و نقش مهمی در تجمع چالکون‌ها طی القا با متیل جاسمونات ایفا می‌کند.

عملکرد اسانس: اثر هم‌راستا سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات بر عملکرد اسانس در بوته‌های بومادران مشاهده شد. هورمون‌های سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات هر دو سبب افزایش عملکرد اسانس شدند. با این تفاوت که افزایش غلظت متیل جاسمونات از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار باعث کاهش عملکرد اسانس شد. این در حالی است که افزایش غلظت سالسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار همچنان به افزایش عملکرد اسانس ختم شد. سطح ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید باعث افزایش حدود ۱/۵ برابری عملکرد اسانس در بومادران شد (شکل ۸). در استفاده همزمان از هورمون‌ها، اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر عملکرد اسانس مشاهده شد. به‌صورتی‌که در غلظت ۱ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب کاهش عملکرد اسانس شد درحالی‌که در غلظت ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید، افزایش غلظت متیل جاسمونات (از ۰/۵ به ۱ میلی‌مولار) سبب افزایش عملکرد اسانس شد. در کل، بیشترین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

عملکرد اسانس در تیمار ۱ میلی‌مولار متیل جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید به دست آمد (شکل ۸).

هم‌راستا با یافته‌های ما، Dastyar و همکاران (۲۰۱۹)، تأثیر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات را بر میزان و درصد اسانس گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بررسی نمودند. محققان پیشنهاد کردند که کاربرد برگی ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب بیشترین میزان و درصد اسانس موردبررسی می‌شود. افزایش عملکرد اسانس در پی تیمار هورمونی طبیعی است چراکه از یک طرف اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات باعث القا تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و از طرف دیگر بخش قابل توجهی از اسانس مربوط به ترپن‌ها است که به شدت از سیگنالینگ اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات تأثیر می‌پذیرند (Gutjahr and Paszkowski, 2009).

نتیجه‌گیری

به جز تأثیر منفی متیل جاسمونات بر زیست‌توده و کلروفیل و تأثیر منفی سالسیلیک اسید **بر** کارتنوئیدها، تأثیر این دو هورمون بر سایر صفات مثبت بود. اثر هم‌افزایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید بر اغلب صفات در بوته‌های بومادران مشاهده شد. بیشترین عملکرد اسانس و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS* در تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید به دست آمد. با توجه به اهمیت عملکرد اسانس، محتوی فنول‌ها- فلاونوئیدها و بیان ژن‌های *PAL* و *CHS*، تیمار ۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات و ۲ میلی‌مولار سالسیلیک اسید برای افزایش رشد بومادران توصیه می‌شود.

منابع

عمویی، علی محمد، مجاهد، مریم، و مجاهد، مژگان (۱۳۹۵). بسته کارآفرینی تولید بومادران. انتشارات اسرارعلم.

Afshari, M, & Rahimmalek, M. (2017). Measurement of phenolic compounds, essential oil content and antioxidant activity in *Achillea millefolium* at different growth stages. *Journal of Plant Process and Function, 6*(21), 15-26.

Ali, B. (2021). Practical applications of jasmonates in the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 38*, 102205. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102205

Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2017). Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: A review. *Phytotherapy Research, 31(8)*, 1140-1161. https://doi.org/10.1002/ptr.5840

Anjalani, T. R., Rasmi, S. A., Rahayu, A. E., Ramadhani, M. R. N., Sholihah, M. F., Puspaningtyas, I., ... & Jadid, N. (2024). Methyl jasmonate stimulates growth and upregulates the expression of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* (PAL) gene in *Gynura pseudochina* in vitro micropropagation. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *25*(5). https://doi.org/10.13057/biodiv/d250512

Anwar, M., Chen, L., Xiao, Y., Wu, J., Zeng, L., Li, H., ... & Hu, Z. (2021). Recent advanced metabolic and genetic engineering of phenylpropanoid biosynthetic pathways. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(17), 9544. https://doi.org/10.3390/ijms22179544

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology, 24*(1), 1. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1

Arruda, T. F. D. L., Lima, G. S. D., Silva, A. A. R. D., Azevedo, C. A. V. D., Souza, A. R. D., Soares, L. A. D. A., ... & Saboya, L. M. F. (2023). Salicylic acid as a salt stress mitigator on chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and growth of precocious-dwarf cashew in the post-grafting phase. *Plants, 12(15)*, 2783. https://doi.org/10.3390/plants12152783

Bashir, S., Noor, A., Zargar, M. I., & Siddiqui, N. A. (2022). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of achillea millefolium: A comprehensive review. *Edible Plants in Health and Diseases, 1*, 457-481. https://doi.org/10.1002/ptr.5840

Bayat, H., Shafie, F., Aminifard, M. H., & Daghighi, S. (2021). Comparative effects of humic and fulvic acids as biostimulants on growth, antioxidant activity and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Scientia Horticulturae, 279*, 109912.

Benzie, I. F, & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry, 239*(1), 70-76.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., ... & Huang, W. D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, *40*(1), 64-72. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.017

Dehghan, A, & Rahimmalek, M. (2018). The effect of salt stress on morphological traits and essential oil content of Iranian and foreign yarrow (*Achillea millefolium* L.) genotypes. *Journal of Soil and Plant Interactions*, *9*(34), 23-38.

Dastyar, Y., Alaei, M., & Kheiry, A. (2019). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on morphological traits, enzymatic activity and essential oil percentage of purple coneflower plant (*Echinacea purpurea* L.). *Journal of Horticultural Science*, *50*(1).

De Capite, A., Lancaster, T., & Puthoff, D. (2016). Salicylic acid treatment increases the levels of triterpene glycosides in black cohosh (*Actaea Racemosa*) rhizomes. *Journal of Chemical Ecology*, *42*, 13-16. https://doi.org/10.1007/s10886-015-0655-x

Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, *82*, 9-22. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016

Ghasimi, Z., Jokar, S., Bodaghi, H., & Modarres, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth. *Journal of Plant Biology*, *10*(1), 67-80.

Gilroy, E, & Breen, S. (2022). Interplay between phytohormone signalling pathways in plant defence–other than salicylic acid and jasmonic acid. *Essays in Biochemistry*, *66*(5), 657-671. https://doi.org/10.1042/EBC20210089

Gutjahr, C, & Paszkowski, U. (2009). Weights in the balance: Jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(7), 763-772. https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0763

Hashemyan, M., Ganjeali, A., & Cheniany, M. (2020). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on the production of secondary metabolites and antioxidant capacity of *Teucrium polium* L. in-vitro. *Journal of Plant Biology*, *12*(2), 61-76.

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., & Ahmad, A. (2020). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, *68*(1), 14-25. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005

He, B. X., Xue, Y. R., Tu, Y. H., Gao, Y., & Guo, M. L. (2018). CtCHS4 induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 636-645.

Hou, S, & Tsuda, K. (2022). Salicylic acid and jasmonic acid crosstalk in plant immunity. *Essays in Biochemistry*, *66*(5), 647-656. https://doi.org/10.1042/EBC20210090

Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. (2023). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: An updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *153*(3), 447-458. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8

Kanatas, P., Dellaportas, V., Kakabouki, I., & Papastylianou, P. (2020). Seed priming effects on germination and first growth of the medicinal plant *Achillea millefolium* L. *Journal of Phytology*, *12*, 20-23.

Khattab, S., Yap, Y. K., & El Sherif, F. (2022). Salicylic acid foliar spray enhanced *Silybum marianum* growth and yield, as well as its chemical constituents and *Chalcone Synthase* gene activity. *Horticulturae*, *8*(6), 556. https://doi.org/10.3390/horticulturae8060556

Kim, S. J., Tran, B. Q., & Jung, S. (2023). Methyl jasmonate-induced senescence results in alterations in the status of chlorophyll precursors and enzymatic antioxidants in rice plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *671*, 38-45. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.06.006

Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J. P., Ruiz, O., & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, *19*, e00273. https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273

Monte, I. (2023). Jasmonates and salicylic acid: Evolution of defense hormones in land plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *76*, 102470. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102470

Naik, P. M, & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and future perspectives. *Rijeka: InTech*, 247-277.

Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L. I. N. A., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, *11*(6), 829-846. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00648.x

Shafie, F., Bayat, H., Aminifard, M. H., & Daghighi, S. (2021). Biostimulant effects of seaweed extract and amino acids on growth, antioxidants, and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the field and greenhouse conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *52*(9), 964-975. https://doi.org/10.1080/00103624.2021.1872596

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

Salimi, A., Rowshan, V., & Khanpoor, E. (2017). Effect of salinity on quality and quantity of essential oil components and antioxidant activity in yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 32*(6), 948-957. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109309

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Methods in Enzymology, 299*, 152-178.

Yang, D., Ma, P., Liang, X., Wei, Z., Liang, Z., Liu, Y., & Liu, F. (2012). PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Physiologia Plantarum, 146(2)*, 173-183. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01603.x

Yadav, V., Wang, Z., Wei, C., Amo, A., Ahmed, B., Yang, X., & Zhang, X. (2020). Phenylpropanoid pathway engineering: An emerging approach towards plant defense. *Pathogens, 9*(4), 312.

Zare-Hassani, E., Motafakkerazad, R., Razeghi, J., & Kosari-Nasab, M. (2019). The effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of secondary metabolites in organ culture of *Ziziphora persica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 138*, 437-444. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01639-x

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry, 64*(4), 555-559. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

The effect of elicitor salicylic acid and methyl jasmonate on the morphological, physicochemical and molecular properties of *Achillea millefolium* L.

Sanaz Siahloo[1], Enayatallah Yazdanpanah[1 *], Hamid Sobhaniyan[1], Peyman Aghaie[2]

[1] Biology, Basic Sciences, Payam Noor, Tehran Sharq, Tehran
[2] Biology, Central Organization of Payam Noor University - International Affairs Center of the University, Tehran
(Received: 2024/07/24, Accepted: 2024/07/19)

Abstract

Considering the role of salicylic acid and methyl jasmonate in regulating important metabolic processes and their potential in increasing the production of important biological compounds, the effect of the use of these two hormones was investigated on various traits of common yarrow. The seed-derived transplants were grown under greenhouse conditions in a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. Salicylic acid with a concentration of 1 and 2 mM and methyl jasmonate with a concentration of 0.5 and 1 mM were sprayed on the leaves separately and in combination three times with an interval of 15 days. The content of phenols, flavonoids, antioxidant capacity, photosynthetic pigments, the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenyl-propanoids, including phenylalanine ammonialyase (*PAL*) and chalcone synthase (*CHS*) genes, and also essential oil yield were compared in the treated and control plants. Variance analysis showed the significant effect of two hormones on the examined traits. Except for the negative effect of methyl jasmonate on biomass (dry weight and height) and chlorophyll, and also the negative effect of salicylic acid on carotenoids, the impact of these two hormones was positive on other traits. Interestingly, in the combined treatment, the synergistic effect of methyl jasmonate and salicylic acid was observed on most traits in yarrow plants. The effect of the combined treatment of salicylic acid and methyl jasmonate was somewhat different in the studied traits, however, the highest yield of essential oil and the expression of *PAL* and *CHS* genes were obtained in the treatment of 1 mM methyl jasmonate and 2 mM salicylic acid. In general, the effect of methyl jasmonate and salicylic acid on yarrow was dependent on the trait type. Considering the performance of the essential oil, the content of phenols and flavonoids, and the expression of *PAL* and *CHS* genes, the treatment of 1 mM methyl jasmonate and 2 mM salicylic acid is recommended to enhance the growth of yarrow.

Keywords: Gene expression, Medicinal plants, Secondary metabolites, Hormones

Corresponding author, Email: enayatallahyazdanpanah@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]