

## اثرات متقابل اترل و مویولین بر ترپنوئیدهای پلاستییدی گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*)

حکیمه منصوری\*<sup>۱</sup> و حکیمه علمی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه باهنر کرمان، کرمان، ایران، گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی،

دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸)

### چکیده:

گیاهان تعداد زیادی از ترکیبات ترپنوئیدی را سنتز می کنند که برای فرایندهای ضروری و پاسخ تطابقی گیاه با محیط مورد نیاز هستند. این ترکیبات از دو مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) پلاستییدی و موالونات (MVA) سیتوپلاسمی سنتز می شوند. در این تحقیق، اثرات اترل بعنوان یک محرک پاسخ های دفاعی گیاه (در برابر تنش های محیطی زنده و غیر زنده محیط) و مویولین بعنوان بازدارنده مسیر MVA را روی مقدار کلروفیل، کاروتنوئیدها،  $\alpha$ -توکوفرول، پیرووات و کانابینوئیدهای اصلی (تتراهیدروکانابینول و کانابیدیول) در شاهدانه در مرحله رویشی مطالعه شد. تیمار گیاهان با  $10 \mu\text{M}$  اترل یا  $10 \mu\text{M}$  مویولین مقدار کلروفیل a و b نسبت به سایر تیمارها و گیاهان شاهد افزایش داد. بیشترین مقدار کاروتنوئید در گیاهان تیمار شده با  $0.1 \mu\text{M}$  مویولین دیده شد. بعضی تیمارهای همزمان اترل و مویولین هم مقدار کاروتنوئیدها را در گیاهان تیمار شده افزایش داد. غلظت های ۱ و  $10 \mu\text{M}$  اترل و مویولین مقدار  $\alpha$ -توکوفرول را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش دادند. بیشترین مقدار  $\alpha$ -توکوفرول در تیمار همزمان  $0.1 \mu\text{M}$  اترل و مویولین مشاهده شد. تیمار با اترل و مویولین مقدار تتراهیدروکانابینول را در گیاه شاهدانه افزایش نداد. همه غلظت های مویولین استفاده شده مقدار کانابیدیول را افزایش داد اما تیمارهای اترل و اترل - مویولین مقدار کانابیدیول را نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد. الگوی خاصی در تغییرات مقدار پیرووات در تیمار مویولین و اترل و تیمار توام مشاهده نشد. بر اساس نتایج ما، اثرات افزایشی تیمار همزمان اترل و مویولین در بالا بردن مقدار ترپنوئیدهای پلاستییدی در مقدار کلروفیل و  $\alpha$ -توکوفرول مشاهده شد.

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

### مقدمه:

کانابینول (CBN) هستند که ارزش دارویی کمتری دارند (Pellegrini et al., 2005). شاهدانه در علم طب مدرن بعنوان ضد تهوع در شیمی درمانی و همچنین در درمان گرفتگی عضله، درد، کم اشتها، صرع، آب مروارید و آسم استفاده می شوند (Guzman, 2003; Howlett et al., 2004).

کانابینوئیدها متعلق به گروه بزرگی از متابولیت های ثانویه به نام ترپنوئیدها هستند. پیش ساز بیوستز ترپنوئیدها ترکیب ۵ کربنه ای بنام ایزوپنتیل پیروفسفات است که در گیاهان از دو

شاهدانه (*Cannabis sativa*) یک گیاه یک ساله و دو پایه است. این گیاه استفاده های متفاوتی در زمینه تولید فیبر، روغن، دانه و دارو دارد. کانابینوئیدها یک گروه از ترکیبات ترپنوفنولیک موجود در شاهدانه هستند. بیشترین غلظت کانابینوئیدها در رزین ترشح شده از گل های ماده دیده می شود. تتراهیدروکانابینول (THC) مهمترین ترکیب دارویی گیاه شاهدانه است. کانابینوئیدهای دیگر شامل کانابیدیول (CBD) و

همزمان از مویولین به عنوان بازدارنده مسیر موالونات و اترل به عنوان تحریک کننده سنتز ترکیبات دفاعی مانند کانابینوئیدها می تواند اثرات قابل توجهی بر ترپنوئیدهای مسیر پلاستییدی از جمله کانابینوئیدها داشته باشد.

### مواد و روش‌ها:

تعداد ۵ دانه گیاه شاهدانه در گلدان‌هایی به قطر ۱۰ cm حاوی پرلیت کشت شدند. پس از رویش تعداد گیاهان به یک گیاه در هر گلدان کاهش داده شد. گیاهان در گلخانه با دوره نوری 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).

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

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

توکوفرولها بوسیله سائیدن ۰.۱ mg بافت تازه برگ در ۱۰۰۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰ درصد عصاره گیری شد. عصاره به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به یک لوله‌ی جدید انتقال یافت و باقیمانده دو بار با ۲۵۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰ درصد در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه عصاره گیری شد و هر سه محلول به هم اضافه شدند. ۱۰ میکرولیتر از این عصاره برای اندازه گیری کمی  $\alpha$ -

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

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

سولفات منیزیم ۵ میلی مولار با pH=۷.۵ ساییده شد. مخلوط هموژن را با کاغذ صافی در یک ارلن صاف نموده و محلول ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲ میلی لیتر بافر تریس ساکارز حل شد. این سوسپانسیون رقیق شده از کلروپلاست برای سنجش پیرووات نگه‌داری شد.

محلول ۰/۰۱۲۵ درصد ۲ و ۴- دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین (DNPH) بوسیله‌ی حل کردن ۰/۱۶۲۵ گرم پودر مرطوب DNPH (۳۰ درصد آب) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر HCL ۲ نرمال آماده شد. به ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آماده شده، یک میلی-لیتر محلول ۰/۰۱۲۵ درصد DNPH اضافه شد. این محلول به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبگرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر NaOH ۰/۶ نرمال به محلول‌ها اضافه شد و در نهایت جذب محلول‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Anthon and Barrett, 2003).

### نتایج:

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

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

توکوفرول به دستگاه HPLC تزریق شد.

اندازه‌گیری  $\alpha$ -توکوفرول بوسیله‌ی دستگاه HPLC ساخت شرکت Agilent استرالیا با آشکارساز فلئورسانس و با استفاده از روش ارائه شده بوسیله Sattler و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. ستون مورد استفاده ستون C<sub>18</sub> بود. متانول ۱۰۰ درصد به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه و طول موج تحریک (excitation) ۲۹۵ nm و طول موج انتشار (emission) ۳۲۵ nm و دمای ۲۸ درجه برای آنالیز نمونه های استاندارد  $\alpha$ -توکوفرول (شرکت سیگما) و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های ۱، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر  $\alpha$ -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  $\alpha$ -توکوفرول رسم شد.

جهت اندازه‌گیری THC و CBD بافت تازه‌ی گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و دور از نور خشک شد. صد میلی گرم از پودر برگ یا گل خشک شده در یک لوله‌ی آزمایش قرار داده شد و به آن ۱ میلی لیتر کلروفورم اضافه شد. عصاره به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد. سپس نمونه سانتریفیوژ شد. حلال خشک شد و باقیمانده در ۰/۵ میلی لیتر متانول حل شد.

اندازه‌گیری کانبینوئیدهای 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<sub>18</sub> (RP18) بود. فاز متحرک متانول-آب با شیب ۸۰ : ۲۰ با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج nm ۲۳۰ برای آنالیز نمونه‌های استاندارد CBD, THC و گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود.

یکی از سوبستراهای مورد استفاده در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدهای پلاستییدی پیرووات است. برای سنجش پیرووات، ابتدا کلروپلاست‌ها با روش زیر استخراج شدند. رگبرگ‌های بزرگ جداسازی شد. ۰/۵ گرم برگ با حدود ۳ میلی‌لیتر بافر تریس ساکارز (ساکارز ۰/۳ مولار، تریس اسیدی ۰/۲ مولار،

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر موثرترین، اثرل و اثرات معادل آنها بر مقدار، رنگدانه های فتوسنتزی، α-توکوفرول، THC و CBD و پیروات در گیاه شامدانه.

پیروات	CBD (mg g <sup>-1</sup> fw)	THC (mg g <sup>-1</sup> dw)	α-توکوفرول (μg g <sup>-1</sup> dw)	کاروتنوئید (mg g <sup>-1</sup> fw)	کلروفیل b (mg g <sup>-1</sup> fw)	کلروفیل a (mg g <sup>-1</sup> fw)	اثرل (μM)	موثرترین (μM)
۱/۴۳ ± ۰/۰۷ <sup>abc</sup>	۵۳/۹۹ ± ۱/۰۵ <sup>d</sup>	۱/۴۶ ± ۰/۱۸ <sup>a</sup>	۴/۹۰ ± ۰/۱۸ <sup>a</sup>	۱/۴۹ ± ۰/۰۷ <sup>def</sup>	۱/۶۶ ± ۰/۰۸ <sup>de</sup>	۳/۸۵ ± ۰/۲۰ <sup>e</sup>	۰	۰
۰/۵۱ ± ۰/۰۴ <sup>fg</sup>	۰/۲۴ ± ۰/۰۸ <sup>g</sup>	۰/۲۸ ± ۱/۰۱ <sup>ef</sup>	۱/۷۷ ± ۰/۰۵ <sup>cd</sup>	۱/۴۷ ± ۰/۰۹ <sup>ef</sup>	۱/۶۴ ± ۰/۰۸ <sup>fg</sup>	۴/۰۴ ± ۰/۲۶ <sup>e</sup>	۱	۰
۱/۳۵ ± ۰/۰۱ <sup>abcd</sup>	۰/۷۸ ± ۰/۱۱ <sup>e</sup>	۱/۳۵ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۷/۷۷ ± ۰/۲۸ <sup>bc</sup>	۱/۸۹ ± ۰/۰۹ <sup>bcde</sup>	۱/۹۸ ± ۰/۰۵ <sup>bcde</sup>	۵/۰۰ ± ۰/۱۰ <sup>bc</sup>	۱۰	۰
۱/۹۴ ± ۰/۱۰ <sup>e</sup>	۷۵/۲۹ ± ۲/۳۴ <sup>c</sup>	۰/۲۴ ± ۰/۰۳ <sup>ef</sup>	۶/۵۷ ± ۰/۴۹ <sup>cd</sup>	۲/۱۲ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۲/۴۴ ± ۰/۱۰ <sup>b</sup>	۵/۳۰ ± ۰/۱۷ <sup>ab</sup>	۰	۰/۱
۱/۷۴ ± ۰/۰۵ <sup>abcd</sup>	۰/۲۵ ± ۰/۰۷ <sup>g</sup>	۰/۸۴ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۶/۲۲ ± ۰/۲۲ <sup>cd</sup>	۱/۸۵ ± ۰/۰۷ <sup>abcd</sup>	۲/۱۹ ± ۰/۱۰ <sup>abcd</sup>	۴/۳۲ ± ۰/۱۷ <sup>cd</sup>	۱	۰/۱
۱/۰۷ ± ۰/۰۸ <sup>bcde</sup>	۰/۳۷ ± ۰/۰۹ <sup>d</sup>	۰/۶۵ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۵/۱۹ ± ۰/۱۹ <sup>e</sup>	۱/۴۳ ± ۰/۰۴ <sup>f</sup>	۱/۸۳ ± ۰/۰۸ <sup>efg</sup>	۴/۰۰ ± ۰/۲۰ <sup>e</sup>	۱۰	۰/۱
۱/۹۲ ± ۰/۰۷ <sup>abcd</sup>	۱/۶۰/۱۴ ± ۴/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۲۳ ± ۰/۰۱ <sup>ef</sup>	۸/۴۳ ± ۱/۰۲ <sup>b</sup>	۱/۸۱ ± ۰/۰۵ <sup>cd</sup>	۱/۴۴ ± ۰/۰۴ <sup>defg</sup>	۴/۱۶ ± ۰/۲۷ <sup>de</sup>	۰	۱
۱/۴۶ ± ۰/۰۲ <sup>abc</sup>	۰/۲۳ ± ۰/۰۰ <sup>fg</sup>	۰/۴۴ ± ۰/۰۰ <sup>d</sup>	۹/۱۶ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۱/۵۹ ± ۰/۰۵ <sup>def</sup>	۱/۷۸ ± ۰/۰۴ <sup>defg</sup>	۴/۲۰ ± ۰/۱۰ <sup>de</sup>	۱	۱
۰/۸۰ ± ۰/۱۱ <sup>efg</sup>	۰/۲۷ ± ۰/۰۵ <sup>de</sup>	۰/۱۵ ± ۰/۰۰ <sup>fg</sup>	۷/۴۷ ± ۰/۰۹ <sup>abcd</sup>	۲/۰۱ ± ۰/۰۹ <sup>abc</sup>	۲/۲۶ ± ۰/۰۲ <sup>bc</sup>	۵/۰۳ ± ۰/۱۹ <sup>bc</sup>	۱۰	۱
۱/۵۵ ± ۰/۱۱ <sup>ab</sup>	۱۴/۸۹ ± ۳/۹۵ <sup>b</sup>	۱/۴۸ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۱۵/۱۵ ± ۰/۵۳ <sup>a</sup>	۱/۶۹ ± ۰/۱۱ <sup>cd</sup>	۱/۹۵ ± ۰/۱۲ <sup>cd</sup>	۵/۳۴ ± ۰/۲۲ <sup>ab</sup>	۰	۱۰
۱/۰۱ ± ۰/۰۰ <sup>abcd</sup>	۰/۳۴ ± ۰/۰۰ <sup>g</sup>	۰/۳۵ ± ۰/۰۰ <sup>g</sup>	۵/۸۵ ± ۰/۴۵ <sup>de</sup>	۱/۷۸ ± ۰/۰۸ <sup>bcde</sup>	۲/۱۲ ± ۰/۱۰ <sup>bcde</sup>	۴/۸۴ ± ۰/۳۱ <sup>bcd</sup>	۱	۱۰
۱/۳۰ ± ۰/۰۰ <sup>g</sup>	۰/۳۰ ± ۰/۰۰ <sup>g</sup>	۱/۴۱ ± ۰/۰۰ <sup>e</sup>	۵/۳۵ ± ۰/۰۵ <sup>e</sup>	۲/۱۰ ± ۰/۰۸ <sup>ab</sup>	۲/۸۷ ± ۰/۱۷ <sup>a</sup>	۵/۱۷ ± ۰/۳۳ <sup>a</sup>	۱۰	۱۰

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

قابل توجه CBD در گیاهان در مقایسه با گیاهان شاهد شد. کمترین مقدار CBD در تیمار ۱۰ میکرومولار مویولین و اترل مشاهده شد.

#### اثر اترل و مویولین بر مقدار پیرووات: غلظت ۱ میکرومولار

اترل مقدار پیرووات را که یکی از سوبستراهای مسیر پلاستییدی بیوستنز ترپنوئیدهاست کاهش داد (جدول ۱). تیمار گیاهان با ۰.۱ میکرومولار مویولین مقدار پیرووات را افزایش و تیمار با ۱ میکرومولار مویولین پیرووات را کاهش داد. اکثر تیمارهای توام مویولین و اترل تأثیر معنی داری بر مقدار پیرووات نداشت تنها تیمارهای ۰.۱ و ۱ میکرومولار مویولین همراه با تیمار ۱۰ میکرومولار اترل باعث کاهش معنی دار پیرووات شد.

#### بحث:

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

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

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

#### اثر اترل و مویولین بر مقدار کاروتنوئیدها: تیمار اترل به

تنهایی تأثیر چندانی بر مقدار کاروتنوئیدها نداشت فقط افزایش ناچیزی در غلظت ۱۰ میکرومولار اترل مشاهده شد (جدول ۱). غلظت ۰.۱ میکرومولار مویولین باعث افزایش قابل توجه کاروتنوئید شد. در تیمارهای توام غلظت های ۱ و ۱۰ میکرومولار مویولین همراه با ۱۰ میکرومولار اترل باعث افزایش معنی دار مقدار کاروتنوئیدها شد اما این افزایش بیش از تیمار ۰.۱ میکرومولار مویولین نبود.

#### اثر اترل و مویولین بر مقدار $\alpha$ -توکوفرول: غلظت ۱۰

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

#### اثر اترل و مویولین بر مقدار THC: غلظت ۱ میکرومولار

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

#### اثر اترل و مویولین بر مقدار CBD: تیمار گیاهان با اترل

باعث کاهش معنی دار CBD شد ولی بر عکس تیمار با مویولین مقدار CBD را به مقدار زیادی افزایش داد (جدول ۱). بیشترین مقدار CBD در تیمار ۰.۱ میکرومولار مویولین مشاهده شد. تیمارهای همزمان مویولین و اترل باعث کاهش

THC در گیاهان تیمار شده با مویولین ثابت می کند فعال شدن مسیر پلاستییدی باعث افزایش سنتز همه ترکیبات این مسیر نمی شود و کنترل بیشتری در مورد بیوستز هر ترکیب وجود دارد. کاربرد اترل باعث کاهش قابل توجه CBD نسبت به گیاهان شاهد و گیاهانی شد که تنها تحت تأثیر مویولین بودند. تیمار مویولین روی سنتز دو کانابینوئید THC و CBD اثرات متضادی را نشان داد که این می تواند نشان دهنده نقش متفاوت این دو ترکیب در گیاه باشد.

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

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

### تشکر و قدر دانی:

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان و با شماره قرارداد ۱/۴۲۱۶ انجام شده است.

(Puech *et al.*, 1974; Li, 2004; Alscher and Castelfranco, 1972). اترل تأثیری در مقدار کاروتنوئید نداشت. مشابه با این نتایج یک کاهش در مقدار کاروتنوئیدهای برگهای جدای آراییدوپسیس تیمار شده با اترلین گزارش شده است (Alexieva *et al.*, 2004). در مواردی اثرات مثبت اترلین در افزایش مقدار کاروتنوئیدها گزارش شده است (Nagar, 1933; Puech *et al.*, 1974). تیمار مویولین به تنهایی باعث افزایش کاروتنوئیدها شد اما اثر افزایشی اترل و مویولین مشاهده نشد. اثرات مثبت اترل و مویولین بر مقدار  $\alpha$ -توکوفرول یکی دیگر از نتایج بدست آمده در این تحقیق بود. توکوفرول ها از جمله آنتی اکسیدانهای موثر گیاهان هستند که در شرایط تنش نقش مهمی را به عهده دارند. گزارش شده است که اترلین بعنوان یک سیگنال در بیوستز توکوفرول ها نقش دارد (Cela *et al.*, 2009). تا کنون تحقیقی در مورد اثر بازدارنده مویولین بر مقدار رنگدانه های پلاستییدی و توکوفرولها صورت نگرفته است. می توان تصور کرد بازدارندگی مسیر موالونات باعث فعال شدن مسیر پلاستییدی و در نتیجه افزایش سنتز ترپنوئیدهای پلاستییدی از جمله کاروتنوئیدها و توکوفرول ها شده است. اما نتایج آزمایشات تبادل پیش سازهای بیوستز ترپنوئیدها (ایزوپنتنیل پیروفسفات) را بین پلاستیدها و سیتوپلاسم اثبات کرده است (Rodriguez-Concepción *et al.*, 2004; Kasahara *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2002; Hemmerlin *et al.*, 2003).

THC و CBD دو کانابینوئید مهم در گیاه شاهدانه هستند. تیمار توام اترل با مویولین باعث افزایش مقدار THC نسبت به گیاهانی شد که تنها تحت تأثیر مویولین بودند، ولی این افزایش بیشتر از مقدار THC گیاهان شاهد نبود. کاهش مقدار

### منابع:

- Alexieva, V. S., Sergiv, I. G., Todorova, D. A., Karanov, E. N., Smith, A. R. and Hall, M. A. (2004). Effect of ethylene and its antagonist 1-MCP on the senescence of detached leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Biological Plantarum* 48: 293–295.
- Alscher, R. G. and Castelfranco, P. A. (1972) Stimulation by ethylene of chlorophyll biosynthesis in dark-grown Cucumber cotyledons. *Plant Physiology* 50:400-403.
- Anthon, G. and Barrett, D. M. (2003) Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. *Science of Food and Agriculture* 83: 1210-1213.
- Cela, J., Falk, J. and Munné-Bosch, S. (2009) Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letter* 583: 992–996.

- Corbineau, F., Rudnicki, R.M., Goszczynska, D.M. and Come, D. (1995) The effect of light quality on ethylene production in leaves of seedlings (*Avena sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany* 35: 227-233.
- Estevez, J. M., Cantero, A., Reindi, A., Reichler, S. and Leon, P. (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Biological Chemistry* 276: 22901-22909.
- Guzman, M. (2003). Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nature Reviews* 3:745-755.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A. and Grosdemange-Billiard, C. (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 26666–26676.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental Station Circular* 347: 1-32.
- Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E. and Porrino, L. Y. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47:345-358.
- Johnson, P. R. and Ecker, J. R. (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Review of Genetic* 32: 227–254.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S. (2002) Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 45188–45194.
- Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 283–307.
- Lacher, W. (2001) *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Germany 103: 1-7.
- Laule, O., Furholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X. and Heifetz, P. B. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 100:6866–6871.
- Li, Y. R. (2004) Beneficial effects of ethephon application on sugarcane under sub-tropical climate of China. *Sugarcane Agriculture* 6: 235-240.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. and Schwender, J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 101:643–652.
- Nagar, P.K. (1993). Effect of plant growth regulators on the natural and ethylene induced pigmentation in *Kinnow mandarin* peels. *Biologia Plantarum* 35: 633–636.
- Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S. and Muranaka, T. (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* 216, 345–350.
- Pellegrini, M., Marchei, E., Pacifici, R. and Pichini, S. (2005) A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis* 36:939–946
- Puech, A. A., Rebeiz, C. A. and Crane, J. C. (1974). Pigment changes associated with application of ethephon ((2-chloroethyl)phosphonic acid) to fig (*Ficus carica* L.) fruits. *Plant Physiology* 57: 504–509.
- Rodriguez-Concepcion, M., Fores, O., Martinez-Garcia, J. F., Gonzalez, V., Phillips, M. A., Ferrer, A. and Boronat, A. (2004) Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* 16:144-156.
- Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J. and Dellapenna, D. (2003) Characterization of tocopherol cyclase from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *American Society of Plant Biologists* 132: 2184-2195.
- Schaller, G. and Kieber, J. (2002) Ethylene. *American Society of Plant Biologists* 10: 1-17.
- Tholen, D., Voesenek, L. and Poorter, H. (2004) Ethylene insensitivity does not increase leaf area or relative growth rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum* and *Petunia x hybrida*. *Plant Physiology* 134: 1803-1812.
- Trebitsh, T., Goldschmidt, E. E. and Riov, J. (1993) Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. *Proceeding of the National Academy Science* 90: 9441-9445.

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

Hakimeh Mansouri\*<sup>1</sup> and Hakimeh Olomi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

<sup>2</sup>Department of Ecology, International Center for Science, High Technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran

(Received: 23 August 2014, Accepted: 18 January 2016)

### Abstract:

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

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

\*corresponding author, Email: h\_mansouri@yahoo.com