

تأثیر تیمار متیل جاسمونات بر محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم PAL در گیاه شاهی (*Lepidium sativum*) تحت سمیت مس (Cu)

الهام اسدی کرم^۱، زهرا اسرار^۱ و بتول کرامت^{۱*}

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۰۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۷)

چکیده:

تجمع ترکیبات فنلی در بافت‌های گیاهی به عنوان یک ابزار مهم در محافظت از گیاه در برابر تنش‌های محیطی محسوب می‌گردد. در این پژوهش گیاه شاهی در شرایط استاندارد گلخانه‌ای تحت تیمار غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار متیل جاسمونات کشت داده شدند. سپس وزن خشک اندام هوایی، محتوای ترکیبات فنلی کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در نمونه‌ها سنجش شد. براساس نتایج، وزن خشک اندام هوایی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در تیمار ۵ میکرومولار متیل جاسمونات با ۵۰ میکرومولار مس به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش نشان داد. همچنین تیمار غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات همراه با تیمار ۵۰ میکرومولار مس موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و محتوای ترکیبات فنلی کل نسبت به شرایط شاهد گردید، نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که احتمالاً متیل جاسمونات به عنوان یک ملکول سیگنالی از طریق افزایش ذخیره آنتی‌اکسیدانی، گیاه را در برابر خسارات ناشی از سمیت مس در محیط حفظ می‌نماید. براساس این پژوهش غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات اثر مطلوبی بر بهبود تنش فلز سنگین مس در گیاه شاهی دارد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، شاهی، فنیل آلانین آمونیالیز، متیل جاسمونات، مس.

مقدمه:

شدند (Balbi and Devoto, 2008). در گیاهان عالی جاسمونات و استر متیلی آن، متیل جاسمونات به عنوان فیتوهورمون‌هایی در نظر گرفته می‌شوند که گلدهی و پیری گیاه را تنظیم می‌کنند و منجر به راه انداختن پاسخ‌های مربوط به دفاع و تنش می‌شوند (Wasternack and Parthier, 1997). چنان‌چه گزارش شده است کاربرد جاسمونات در غلظت ۰/۱ میکرومولار باعث کاهش صدمات ناشی از سمیت سرب در نوعی عدسک آبی گردیده است (Piotrowska et al., 2009).

جاسمونات‌ها شامل جاسمونیک اسید و استر متیله آن یعنی متیل جاسمونات از اسیدهای چرب اکسیژنه مانند لینولنیک اسید، از طریق مسیر اکتادکانوئید مشتق می‌شوند و از مشخصات آنها وجود ساختار ۵ ضلعی حلقوی می‌باشد (Nojavan-Asghari and Ishizawa, 1998). جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیش‌برنده پیری، بازدارنده رشد و محرک‌هایی برای متابولیسم ثانویه در گونه‌های مختلف شناخته

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: Bkeramat@uk.ac.ir

آلودگی خاک‌ها با فلزات سنگین پدیده‌ای است که به طور گسترده در نتیجه فعالیت‌های بشر، کشاورزی و صنعت اتفاق می‌افتد (Sharma and Dubey, 2005). اگرچه مس به طور گسترده در طبیعت انتشار یافته و یک عنصر ضروری برای رشد طبیعی گیاه به شمار می‌رود، اما غلظت زیاد آن برای گیاهان سمی است (Groppa and Benavides, 2007)، به طوری که ممکن است آزاد شده و به عنوان کاتالیزوری در ایجاد رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل عمل نماید (Gaetke and Cow, 2003). ترکیبات فنلی به عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل ربایش رادیکال‌های آزاد، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان گهرمایه آنزیم‌های پراکسیداز، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با انتقال سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید، از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها ممانعت می‌کنند (Chu and Chang, 2000). ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌گردند اما تنش‌های محیطی مقدار آنها را در سلول تغییر می‌دهد. تغییر در فعالیت آنزیم‌های بیوسنتز کننده یا تجزیه‌کننده این ترکیبات بر مقدار این ترکیبات در سلول تاثیر می‌گذارد. تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی مانند اشعه UV، دمای پائین، جراحات، کاهش تغذیه، حمله پاتوژن‌ها و خشکی گزارش شده است (Kovacik and Backor, 2007). فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی‌سینامیک‌استرها و لیگنین‌ها از ترکیبات فنلی و جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل‌پروپانویید می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیلایز آغازگر مسیر فنیل‌پروپانویید می‌باشد که L- فنیل‌آلانیل را با دامیناسیون به ترانس‌سینامیک‌اسید تبدیل می‌کند (Solecka, 1997). فلاونوئیدها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در میان گیاهان گسترش فراوانی دارند و دارای نقش‌های متعددی می‌باشند. علاوه بر نقش‌های ذکر شده در بالا،

ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان نیز در سلول عمل می‌نمایند. با توجه به نقش ترکیبات فنلی در کاهش یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی و یا تجزیه پراکسیدها این ترکیبات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداسیون و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Navarro et al., 2006). در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیبات فیتوفنولی به خصوص پلی‌فنل‌ها در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار کارا عمل کرده و به عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربات-گلوتاتیون در دفع رادیکال‌های پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند. افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیلایز که اولین آنزیم مسیر بیوسنتز فنل‌هاست نیز در بسیاری از تنش‌ها گزارش شده است (Kovacik et al., 2009). هدف کلی از پژوهش حاضر، تاثیر مقادیر مختلف متیل‌جاسمونات بر کاهش اثرات تنش مس در گیاه شاهی با تاکید بر تغییرات فنل‌ها و فعالیت آنزیم PAL می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه شاهی (*Lepidium sativum* L.) متعلق به خانواده Brassicaceae می‌باشد. بذرها از مرکز تحقیقات کشاورزی کرج تهیه شد. برای این منظور ابتدا بذره‌های یکسان با سدیم هیپوکلریت ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و سپس دو بار با آب مقطر شست‌وشو شدند. برای کشت گیاه، از گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۲ سانتی‌متر حاوی پرلیت استفاده شد. سپس بذره‌های خیس خورده به گلدان‌ها منتقل شدند. برای هر تیمار ۳ گلدان به عنوان ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در هر گلدان دو بذر به عنوان دو نمونه کاشته شد. گلدان‌ها پس از کشت در گلخانه، تحت شرایط نوری (۱۶:۸) (نور/تاریکی) با شدت نور حدود ۱۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، رطوبت ۷۵ درصد و دمای ۱۶

$$\text{Chla} = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{Chlb} = 21.21 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

$$\text{Chl a+b} = 7.15 A_{663.2} + 18.71 A_{646.8}$$

$$\text{Car} = (1000A_{470} - 1.8 \text{ chla} - 85.02 \text{ Chl b})/198$$

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای سنجش آنتوسیانین از روش Wanger (۱۹۷۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاهان را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسیدکلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً سائیده و عصاره در لوله‌های آزمایش سر پیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت با استفاده از ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ انجام و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

اندازه‌گیری مقدار فنل کل: برای این منظور از روش Sonald و Laima (۱۹۹۹) استفاده شد. از بخش ریشه و اندام هوایی، ۰/۱ گرم نمونه تر تهیه و در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ جوشانده شد. سپس عصاره‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و آن‌گاه فولن رقیق شده و کربنات سدیم اشباع اضافه گردید و دوباره سانتریفوژ شد. در نهایت اندازه‌گیری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ۶۴۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه صورت گرفت. رسم منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول صورت گرفت. محاسبه میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر صورت گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL: برای تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl (۸/۸ pH، ۵۰ میلی‌مولار) حاوی بتامرکاتواتانل (۱۵ میلی‌مولار) در هاون سرد شده سائیده شد. سپس عصاره به دست آمده با دور ۵۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. یک واحد از

درجه سانتی‌گراد (تاریکی/نور) قرار گرفتند و به منظور تامین املاح مورد نیاز گیاه، گلدان‌ها هفته‌ای ۳ مرتبه با محلول غذایی هوگلدن ۱/۲ با pH تقریبی 5.7 ± 1 مدت ۳ هفته آبیاری شدند. پس از اینکه گیاهان به رشد کافی رسیدند (مرحله سه جفت برگ)، به مدت دو هفته به صورت یک روز در میان، تیمارهای مس و جاسمونات به طور هم‌زمان اعمال شد. به منظور تهیه محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس، مقدار مناسبی از سولفات مس به محلول هوگلدن اضافه گردیده و pH محلول‌ها با استفاده از اسیدکلریدریک و سود یک میلی‌مولار تنظیم شد. محلول‌ها به صورت یک روز در میان به حجم ۵۰ میلی‌لیتر به گلدان‌ها اضافه و در فواصل بین تیمارها به منظور مرطوب نگه داشتن خاک و ممانعت از تجمع بیش از حد نمک در گلدان‌ها از آب مقطر استفاده می‌شد. محلول‌پاشی گیاهان توسط متیل جاسمونات نیز با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار هم‌زمان با تیمار محلول‌های مس شروع و به مدت دو هفته ادامه داشت. پس از گذشت دو هفته نمونه‌ها برداشت شدند.

اندازه‌گیری وزن خشک: برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی گیاه، پس از خشک شدن نمونه‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک اندام هوایی، وزن هر یک از نمونه‌ها برحسب گرم با ترازوی Sartorius مدل BPSIID با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتنوئید و گزانثوفیل) با استفاده از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام پذیرفت. ۰/۲ گرم از برگ‌های فریز شده انتهای گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

فعالیت PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه می باشد (Wang *et al.*, 2006).

آنالیز آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج:

براساس نتایج، تنش فلز سنگین مس باعث کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a، b و کلروفیل کل در مقایسه با گیاهان شاهد شد. در حالی که تیمار متیل جاسمونات به تنهایی باعث افزایش کلروفیل a، b، کلروفیل کل گردید. کاربرد توام متیل جاسمونات (۵ و ۱۰ میکرومولار) و مس (۵۰ میکرومولار) موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a، b و کلروفیل کل نسبت به گیاه شاهد گردید. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس باعث کاهش محتوای کاروتنوئیدها در مقایسه با گیاه شاهد شده است. تیمار متیل جاسمونات به تنهایی، اثر معنی‌دار بر میزان کاروتنوئید گیاه شاهی نسبت به گیاه شاهد نداشت. تیمار توام گیاهان با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات و ۵۰ میکرومولار مس، مقدار کاروتنوئیدها را در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد تغییر نداده است (جدول ۱).

گیاهان تحت تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس کاهش معنی‌داری در میزان وزن خشک اندام هوایی نشان می‌دهند. تیمار گیاهان با متیل جاسمونات ۵ و ۱۰ میکرومولار در گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری بر مقدار وزن خشک اندام هوایی نداشت. در بررسی تیمار توام، تنها تیمار ۵ میکرومولار متیل جاسمونات با ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی نسبت به شرایط تنش بدون جاسمونات گردید (شکل ۱).

در این پژوهش میزان ترکیبات فنلی در غلظت‌های مختلف مس تغییر معنی‌داری نکرد (شکل ۲)، در حالی که

میزان آنتوسیانین‌ها در برگ گیاه در غلظت بالای مس به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱). این نتایج با نتایج حاصل از تغییرات فعالیت آنزیم PAL در برگ‌های گیاه نیز مطابقت نشان می‌دهد (شکل ۳). تیمار گیاه شاهی با هورمون متیل جاسمونات تنها در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات با غلظت ۵۰ میکرومولار مس اثر معنی‌داری در افزایش محتوای ترکیبات فنلی کل در برگ گیاه داشت. میزان آنتوسیانین در تیمار توام ۲۰ میکرومولار متیل جاسمونات با تیمار ۵۰ میکرومولار مس به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشت (جدول ۱). افزایش فعالیت آنزیم PAL در حضور مس و غلظت ۱۰ و ۲۰ میکرومولار متیل جاسمونات معنی‌دار نبود در حالی که این افزایش در غلظت ۵ میکرومولار متیل جاسمونات با ۵۰ میکرومولار مس کاملاً معنی‌دار بود و تیمار ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات در غلظت‌های مختلف مس تفاوت معنی‌داری را در میزان فعالیت PAL و میزان آنتوسیانین در برگ گیاه شاهی نشان نمی‌دهد (شکل ۳).

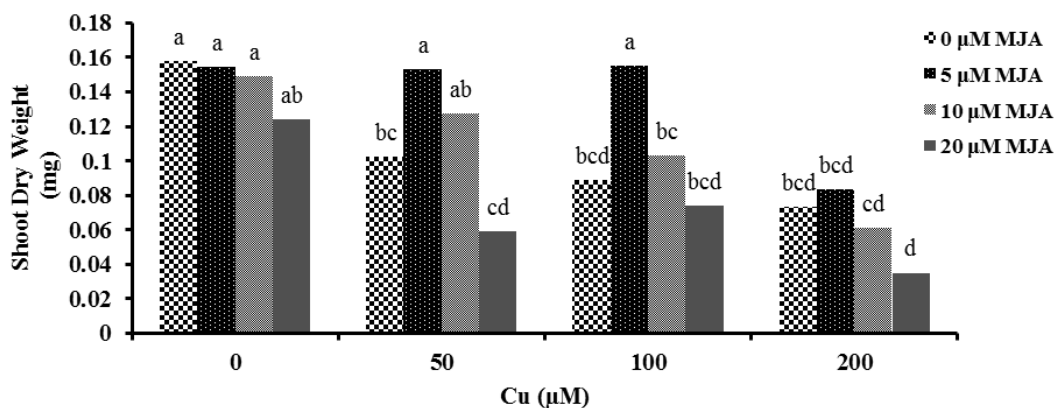
بحث:

در تحقیق صورت گرفته وزن خشک اندام‌های هوایی با افزایش غلظت مس در محلول غذایی کاهش یافت. افزایش توسعه پذیری دیواره و فراوانی مواد محلول برای ایجاد فشار اسمزی دو نیاز اساسی برای رشد و طول شدن سلول می‌باشند. تصور می‌شود که اتصال Cu^{+2} به صورت مستقیم یا با جایگزینی قسمتی از Ca^{+2} دیواره سلول انعطاف پذیری آن را کاهش می‌دهد که دلیلی بر اثبات کاهش رشد برگ در حضور مس اضافی می‌باشد (Sesse *et al.*, 2004). تیمار گیاه *Pharbitis nil* با غلظت‌های 10^{-3} و 10^{-4} مولار متیل جاسمونات باعث کاهش رشد ریشه و ساقه شده است در حالی که در غلظت 10^{-7} مولار اثر تحریک‌کنندگی بر رشد ریشه و ساقه داشته است، محققین دلیل این تاثیر را تشکیل مجدد مریستم ریشه دانستند (Maciejewska and Kopcewicz, 2002). عوامل ایجاد

جدول ۱- تأثیر متیل جاسمونات بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنتوسیانین در گیاه شاهی تحت تنش مس.

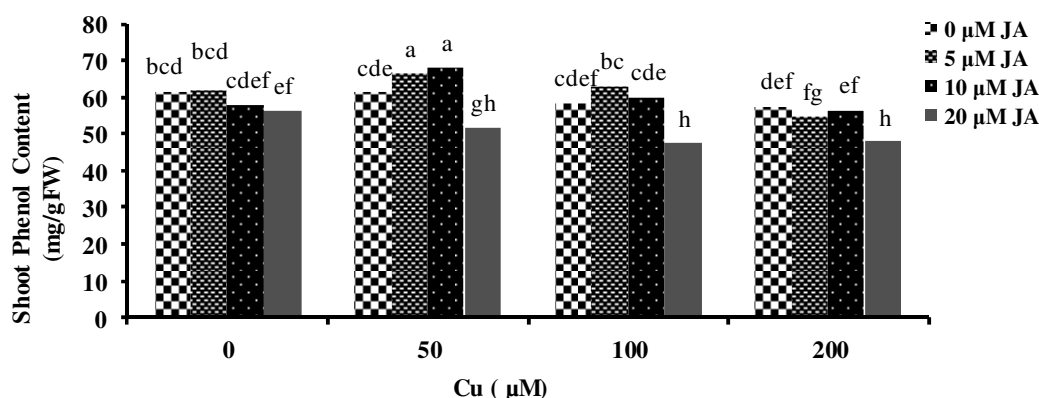
متیل جاسمونات (μM)	مس (μM)	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)	آنتوسیانین (نانومولار بر گرم وزن تر)
۰	۰	۱۲/۹۶ ^{bcd}	۳/۹۷ ^{cdefg}	۱۶/۹۵ ^{bcd}	۳/۷۱ ^a	۶/۱۲ ^{def}
۰	۵۰	۱۲/۱۵ ^{cde}	۳/۴۴ ^{efg}	۱۵/۵۹ ^{cdef}	۳/۷۹ ^a	۵/۷۵ ^{efgh}
۰	۱۰۰	۷/۹۶ ^{gh}	۲/۶۹ ^g	۱۰/۶۵ ^{fg}	۲/۴۱ ^{bcd}	۴/۵۵ ^j
۰	۲۰۰	۸/۵۰ ^{gh}	۳/۶۴ ^{defg}	۱۲/۱۵ ^{bcd}	۲/۶۶ ^{bc}	۴/۸۹ ^{ij}
۵	۰	۱۶/۶۶ ^a	۷/۵۷ ^a	۲۴/۲۳ ^a	۳/۹۳ ^a	۶/۰۹ ^{def}
۵	۵۰	۱۴/۲۶ ^{bc}	۶/۱۲ ^{ab}	۲۰/۳۸ ^{abc}	۳/۱۶ ^{ab}	۵/۵۱ ^{fghi}
۵	۱۰۰	۱۰/۲۱ ^{efg}	۵/۲۸ ^{bc}	۱۵/۴۹ ^{cdef}	۲/۲۴ ^{bc}	۶/۰۴ ^{def}
۵	۲۰۰	۸/۸۰ ^{fgh}	۳/۱۸ ^{bcd}	۱۱/۹۹ ^{defg}	۲/۴۶ ^{bcd}	۴/۹۴ ^{hij}
۱۰	۰	۱۵/۳۳ ^{ab}	۷/۲۵ ^a	۲۲/۵۸ ^a	۳/۷۳ ^a	۷/۴۸ ^b
۱۰	۵۰	۱۳/۲۱ ^{bcd}	۶/۳۲ ^{ab}	۱۹/۵۴ ^{abc}	۳/۱۲ ^{ab}	۶/۵۶ ^{cde}
۱۰	۱۰۰	۸/۸۴ ^{fgh}	۴/۴۲ ^{cdef}	۱۳/۲۶ ^{defg}	۲/۲۱ ^{bcd}	۵/۹۳ ^{defg}
۱۰	۲۰۰	۸/۶۴ ^{fgh}	۴/۷۴ ^{bcd}	۱۳/۳۸ ^{defg}	۲/۰۰ ^{cd}	۶/۷۶ ^{bcd}
۲۰	۰	۱۴/۱۱ ^{bc}	۷/۰۸ ^a	۲۱/۱۹ ^{ab}	۳/۰۱ ^{abc}	۸/۷۵ ^a
۲۰	۵۰	۱۱/۰۶ ^{def}	۵/۲۲ ^{bcd}	۱۶/۳۰ ^{bcd}	۲/۳۳ ^{bcd}	۷/۲۴ ^{bc}
۲۰	۱۰۰	۶/۴۲ ^h	۲/۸۷ ^{fg}	۹/۲۹ ^g	۱/۵۸ ^d	۵/۰۳ ^{hij}
۲۰	۲۰۰	۸/۲۷ ^{gh}	۳/۱۳ ^{efg}	۱۱/۴۱ ^{efg}	۲/۲۵ ^{bcd}	۵/۱۳ ^{ghij}

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.

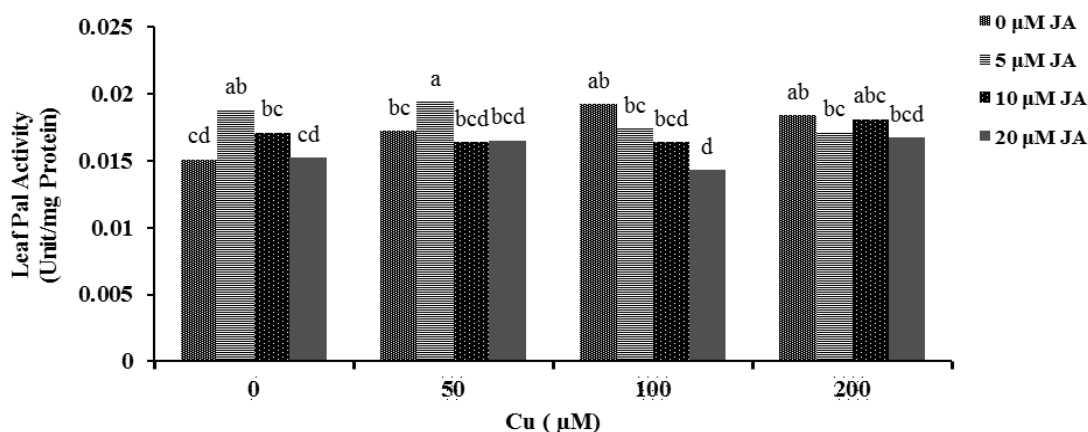


شکل ۱- برهم کنش مس و متیل جاسمونات بر وزن خشک اندام هوایی در گیاه شاهی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.

کننده تنش اکسیداتیو مانند تنش فلزات سنگین ممکن است پروتئین‌های کمپلکس فتوسیستم II کاهش دهند محتوای کلروفیل را از طریق برهم زدن تعادل در بازگشت (Laspina *et al.*, 2005). به نظر می رسد کاهش معنی دار



شکل ۲- برهم کنش مس و متیل جاسمونات بر میزان پلی فنل کل اندام هوایی در گیاه شاهی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.



شکل ۳- برهم کنش مس و متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز اندام هوایی در گیاه شاهی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.

انجام گرفته است که نشان دهنده اثرات متفاوت غلظت های گوناگون این ترکیب در گیاهان است. مشاهده شده که در پایه پیاز لاله در حضور نور و با استفاده از متیل جاسمونات تشکیل کلروفیل a و b افزایش یافت (Udea and Saniewski, 2006). این محققین اظهار نموده اند که متیل جاسمونات در بیان یک سری از ژن های آنزیم های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل از طریق تشکیل آمینولولینیک اسید دخالت دارد. البته این امر در غلظت های پایین متیل جاسمونات مشاهده شده است. در این پژوهش متیل جاسمونات به ویژه در غلظت ۵ میکرومولار تا حدودی خسارات ناشی از کاربرد مس را در گیاه شاهی

رنگیزه های فتوسنتزی گیاهان تحت تنش مس عموماً به علت تجزیه فزاینده آنها باشد (Vassilev *et al.*, 2003)، که موجب کاهش فتوسنتز می شود. کاهش کلروفیل پس از تیمار مس ممکن است مربوط به توقف عمل آنزیم های دخیل در سنتز کلروفیل یا تجزیه کلروفیل باشد (Yruela, 2005). تصور می شود که مس از طریق تغییر ساختار پروتئین ها و رنگیزه ها در امر فتوسنتز تداخل ایجاد می کند. مس اضافی در گیاهان جایگزین آهن در جایگاه فعال آن شده و از این طریق باعث کمبود آهن و در نتیجه رنگ پریدگی شدیدتر برگ می شود (Boycheva and Babalakova, 2008). در ارتباط با اثر متیل جاسمونات بر محتوای کلروفیل نیز تحقیقات زیادی

آنزیم PAL به عنوان کلیدی‌ترین آنزیم در مسیر سنتز ترکیبات فنلی، یکی از فاکتورهای اساسی در پاسخ گیاهان در برابر تنش‌های مختلف محیطی باشد. پس از تیمار متیل جاسمونات مشاهده شده که، متیل جاسمونات می‌تواند به طور معنی‌داری موجب افزایش مقدار کل ترکیبات فنلی در گیاه شود. علاوه بر این فعالیت PAL، به عنوان یک آنزیم کلیدی تنظیم کننده متابولیسم فنیل پروپانوئید در جوانه گیاه تریچه افزایش می‌یابد (Kim et al., 2006). این نتایج با گزارش پیشین که ترکیبات فنلی می‌توانند به طور معنی داری در میوه‌های بسیاری از گیاهان بعد از تیمار با متیل جاسمونات القا شوند، مطابقت دارد (Wang and Zheng, 2005). به نظر می‌رسد یکی از دلایل افزایش پارامترهای رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تاثیر تیمار متیل جاسمونات، اثر این تیمار بر فعالیت آنزیم PAL و افزایش فعالیت این آنزیم و افزایش ترکیبات مختلف فنلی (به عنوان یک جزء آنتی اکسیدان غیرآنزیمی) می‌باشد که می‌تواند کاهش‌دهنده اثرات تنش باشد.

نتیجه‌گیری کلی:

به طور کلی، نتایج ما نشان می‌دهند گیاه شاهی در غلظت های پایین فلز سنگین مس (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به وسیله ذخیره آنتی‌اکسیدانی خود تا حدی قادر به تحمل تنش می‌باشد در حالی که غلظت‌های بالای مس بر سیستم آنتی اکسیدانی گیاه غلبه نموده و تنها زمانی گیاه قادر به تحمل تنش می‌باشد که به وسیله ترکیباتی مانند متیل جاسمونات تیمار گردد چرا که متیل جاسمونات با افزایش محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله ترکیبات فنلی توانایی گیاه برای مقابله در برابر تنش‌ها را افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات در این پژوهش موجب مقاومت و رشد بهتر گیاه شاهی در شرایط تنش مس گردید.

تخفیف داده است. احتمال داده می‌شود که از طریق دخالت در مسیر بیوسنتز کلروفیل اثرات خود را اعمال کرده باشد. در پژوهش فوق، غلظت‌های به کار برده شده مس تاثیر معنی‌دار بر میزان ترکیبات فنلی کل نداشت و تیمار ۵ و ۱۰ میکرومولار متیل جاسمونات در غلظت ۵۰ میکرومولار مس باعث افزایش معنی‌دار محتوای ترکیبات فنلی گردید. مشاهده شده است که در برگ گیاه اسفناج تیمار غلظت های پایین مس باعث افزایش محتوای ترکیبات فنلی می‌شود در حالی که در غلظت‌های بالای مس محتوای ترکیبات فنلی کاهش می‌یابد (Caldwell, 2002). گزارش شده که در گیاه *Raphanus sativus* تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش معنی‌دار محتوای ترکیبات فنلی در شرایط آزمایش گردید (Kim et al., 2006). همچنین مشاهده شده است که سنتز ترکیبات فنلی در ساقه مخروطیان توسط متیل جاسمونات افزایش یافته است (Hudgins et al., 2003). با وجود القای سنتز ترکیبات فنلی در تنش‌های گوناگون مقدار واقعی آنها حاصل توازن بین سرعت سنتز آنها (Ks) و سرعت کاهش یا مصرف (Kd) آنهاست. افزایش مشاهده شده در میزان ترکیبات فنلی محلول، نشان دهنده بزرگ‌تر بودن Ks نسبت به Kd می‌باشد. یعنی فنلیک‌ها احتمالا به عنوان مکانیسم‌های دفاعی برای جمع‌آوری ROS تولید می‌شوند. از طرف دیگر کاهش مشاهده شده در این ترکیبات حاصل کوچک تر بودن Ks به Kd است که پیامد تشکیل ترکیبات فنلی نامحلول و یا پلیمریزاسیون فنلیک‌ها در نتیجه اکسیداسیون است (Anagnostopoulou et al., 2006)، بنابراین می‌توان احتمال داد که عدم تغییر ترکیبات فنلی در شرایط کاربرد مس در این پژوهش به دلیل فوق باشد.

در این تحقیق، تیمار ۵ میکرومولار متیل جاسمونات فعالیت آنزیم PAL را به میزان زیادی افزایش داد. از آن جا که ترکیبات فنلی از سینامیک‌اسید مشتق می‌شوند که خود محصول عمل دامیناسیون آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیل‌از روی فنیل‌آلانیل می‌باشند، به نظر می‌رسد که تغییرات فعالیت

منابع:

- Navarro, J. M., Flores, P. Garrido, C. and Martinez, V. (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Journal Food Chemistry* 96: 66-73.
- Nojavan-Asghari, M. and Ishizawa, K. (1998) Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds. *Journal Plant Growth Regulation* 17: 13-18.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Zylkiewicz, B. and Czerpak, R. (2009) Jasmonic acid modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Journal Environmental and Experimental Botany* 66: 507-513.
- Sesse, B. A., Genet, P., Dunand, F. V., Toussaint, M. L., Epron, D. and Badot, P. M. (2004) Effect of copper on growth in cucumber plants and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion content. *Plant Sciences* 166: 1213-1218.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46: 209-221.
- Sonald, S. F. and Laima, S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Solecka, D. (1997) Role of phenyl propanoid compounds in plant responses to different stress factor. *Plant Physiology* 19: 257-268.
- Udea, J. and Saniewski, M. (2006) Methyl jasmonate-induced Stimulation of chlorophyll formation in the basal part of tulip bulbs kept under natural light conditions. *Journal Fruit Ornamental Plant Research* 14: 199-210.
- Vassilev, A., Lidon, F., Ramalho, J. C., Doceumatos, M. and Graca, M. (2003) Effects of excess cu on growth and photosynthesis of barley plants, implication with a screening test for cu tolerance. *Journal Central European Agriculture* 4: 225-236.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. X. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
- Wang, S. Y. and Zheng, W. (2005) Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *International Journal Food Science* 40: 187-195.
- Wanger, G.J. (1979) Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplast. *Plant physiology* 64: 88-93.
- Wasternack, C. and Parthier, B. (1997) Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends in Plant Sciences* 2: 302-307.
- Yruela, I. (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:145-146.
- Anagnostopoulou, M. A., P. Kefalas, V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou and Boskou, D. (2006) Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Journal Food Chemistry* 94: 19-25.
- Balbi, V. and Devoto, A. (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist* 177: 301-318.
- Boycheva, S. and Babalakova, N. (2008) Does chelated copper ameliorate the greening of iron-deficient cucumber plants through nitric oxide signaling? Comparison with chemical forms of Zinc. *Plant Physiology* 34: 295-308.
- Caldwell, C. (2002) Effect of elevated copper on the phenolic compounds of spinach (*Spinacea Oleracea L.*) leaf tissues. *Journal of Plant Nutrition* 26: 1725-1734.
- Chu, Y. H., Chang, C. L. and Hsu, H. F. (2000) Flavonoid contents of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal Agriculture and Food Science* 80: 561-566.
- Gaetke, L. M. and Chow, C. K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.
- Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Hudgins, J. W., Christiansen, E. and Franceschi, V. R. (2003) Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. *Journal Tree Physiology* 23: 361-371.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. and Chios, J. H. (2006) Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus*). *Journal Agriculture and Food Science* 54: 7263-7269.
- Kovacik, J. and Backor, M. (2007) Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. *Plant and Soil* 297: 255-265.
- Kovacik, J., Klejdus, B. and Backor, M. (2009) Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* roots. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 1686-1693.
- Laspina, N. V., Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sciences* 169: 323-330.
- Lichenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382.
- Maciejewska, B. and Kopcewicz, J. (2002) Inhibitory effect of methyl jasmonate on flowering and elongation growth in *Pharbitis nil*. *Journal Plant Growth Regulation* 21: 216-223.

