مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و دو بهار ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تحریک تولید هایپرسین در گیاه گل راعی (perforatum Hypericum)

امیر رجبی*[۱]، حسین عباسپور[۱]، جعفر مسعود سینکی[۲]

۱ گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان،دامغان، ایران

۲ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان،ایران

چکیده

زمینه و هدف: در این پژوهش، اثر محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در محیط کشت پایه (MS) بر تحریک تولید هایپرسین در یک دوره ۴۲ روزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: ریز نمونه های برگ و ساقه به محیط MS حاوی محرک های متیل جاسمونات و محرک سالیسیلیک اسید منتقل شدند. عصاره های متانولی این گیاه به وسیله دستگاه HPLC به منظور بررسی تغییرات در میزان هایپرسین مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها : نتایج نشان دادند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به سایر غلظت ها بیش ترین میزان هایپرسین (۳۴/۶۶٪) را تولید می کند. هم چنین نیز استفاده از غلظت های بیشتر از ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید باعث از بین رفتن نمونه های کشت بافتی گیاه گل راعی می شود.

نتیجه گیری: محرک شیمیایی متیل جاسمونات در افزایش میزان هایپرسین در کشت بافت گل راعی بسیار تاثیر داشته است. اما محرک شیمیایی سالیسیلیک اسید تاثیر محسوسی در افزایش میزان هایپرسین در گیاه گل راعی نداشت.

کلمات کلیدی: هایپرسین؛ متیل جاسمونات؛ سالیسیلیک اسید؛ گل راعی؛ متابولیت های ثانویه

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیش گیری از بیماری ها برخوردار بوده و هستند.

این بخش از منابع طبیعی قدمتی هم پای بشر داشته و یکی از مهم ترین منابع تامین غذا و داروی بشر در طول نسل ها بوده اند. (۲۳) یکی از راه کارهای تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان دارویی کشت آنها در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی می باشد. کشت بافت روشی مناسب جهت تکثیر آسان برای تولید گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی و افزایش میزان ماده موثره می باشد . (۱۲) در شرایط آزمایشگاهی می توان متابولیت های با ارزش مورد نظر را در تمام فصول سال و با مقدار و کیفیت دلخواه تولید کرد. (۱۹)

گل راعی با نام علمی Hypericum perforatum از خانواده Hypericaceae، از گیاهان دارویی بسیار مهم است. (۱) گیاهی است علفی و چند ساله که بومی اروپا و آسیا می باشد. استفاده سنتی از این گیاه به بیش از ۲۰۰۰ سال پیش بر می گردد. در منابع فارسی به گل راعی، علف چای ، هوفاریقون و گل هزار چشم نیز گفته می شود. (۳۹) اجزای موثر بیولوژیکی مختلفی در این گیاه مانند هایپرسین وجود دارد. (۲۵) جنس Hypericum بیش از ۴۶۹ گونه در جهان دارد که ۱۷ گونه آن تا کنون از ایران گزارش شده است. گونه های مختلف این گیاه در بسیاری از کشور ها به عنوان عامل شفادهنده به کار می رود و دارای خواص مختلف پزشکی است. (۱۷) گل راعی به طور سنتی و مدرن برای درمان عارضه های عصبی و افسردگی استفاده می شود .(۱۱) هم چنین این گیاه دارای اثرهای فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثرهای ضد درد، ضد التهاب، ضد تومور، آنتی اکسیدان، ضد باکتریایی، ضد میکروبی و ضد سرطانی می باشد. (۷) ترکیب های موثر اصلی این گیاه شامل هایپرفورین (یک فلوروگلوسینول پرنیله شده) و هایپرسین (یک نفتودیانترون) می باشد. البته ترکیب های موثر بیولوژیکی دیگری نظیر فلاونویید و تانن نیز در این گیاه وجود دارد. (۱۵) در دهه ۱۹۶۰ جاسمونات به عنوان

*آدرس نویسنده مسئول : گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد دامغان
پست الکترونیکی: Amir.rajabi1368@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۰۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

متابولیت های ثانویه در اسانس گیاه گل یاس مشاهده شد. دو دهه پس از شناسایی اولیه جاسمونات ها تاثیر فیزیولوژیکی آنها شناسایی و به عنوان ترکیبات پیش برنده ی پیری، بازدارنده رشد و محرک هایی برای متابولیت ثانویه در گیاهان عالی، شناخته شدند (۳۰). جاسمونیک اسید و متیل استر آن (متیل جاسمونات) ترکیب های مشتق شده از سیکلوپنتان لینولنیک اسید می باشند، جاسمونات ها از مسیر اکتادکانوئید ساخته می شوند که در این مسیر لینولنیک اسید به جاسمونیک اسید تبدیل می شود. (۲۷) سالیسیلیک اسید (۲ هیدروکسی بنزونیک اسید) یک ترکیب فنلی طبیعی و از تنظیم کننده های رشد است که نقش های کلیدی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش های محیطی ایفا می‌کنند. نام سالیسیلیک اسید از کلمه سالیکس، نام علمی درخت بید گرفته شده است. (۱۳) سالیسیلیک اسید از نظر شیمیایی، متعلق به گروه بسیار متنوع فنل های گیاهی می باشد که دارای یک حلقه آروماتیک به همراه یک گروه هیدروکسیل با مشتقات وابسته به آن می باشد. (۳۴) یکی از آنالوگ های این ترکیب استیل سالیسیلیک اسید (آسپرین) است که پس از جذب به سرعت به سالیسیلیک اسید تبدیل می شود. (۱۴) یکی از مهم ترین انواع گیاهان دارویی، گل راعی می باشد و مهم ترین ویژگی این گیاه، دارا بودن هایپرسین به عنوان مهم ترین ماده مؤثره در برگ و گل های آن می باشد که نقش بسیار مهمی در درمان انواع بیماری ها دارد. (۳) موارد مصرف و خواص دارویی آن نیز به خوبی مطالعه شده است اما مطالعه های کشت بافت و تحریک تولید هایپرسین به کمک محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید انجام نشده است. بهترین و سریع ترین راه برای داشتن گیاه جهت مصارف صنعتی، کشت بافت است. هم چنین با در نظر گرفتن اهمیت و خواص دارویی این گیاه، مطالعات کشت بافت و بهینه سازی محیط کشت جهت اهداف مختلف برای این گیاه ضرورت دارد. فرضیه پژوهش این بود که محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید تحت شرایط کشت بافت تولید هایپرسین را تحریک می کنند یا نمی کنند. مقدار کلی هایپرسین می تواند از طریق تحریک زیستی و غیر زیستی افزایش یابد و این ممکن است منجر به اثبات آن شود که این متابولیت ها قسمتی از سیستم تدافعی گونه های Hypericum هستند. جاسمونات ها به عنوان ترکیب های پیام رسان کلیدی در فرایند القاء که منجر به تجمع متابولیت های ثانویه می شود، معرفی شده اند. (۱۶) مقدار کل هایپرسین در کشت های سوسپانسیون سلولی رشد یافته تحت شرایط نوری ۲/۴ برابر کم تر از کشت های سوسپانسیون سلولی رشد یافته تحت شرایط تاریکی است. مشاهده گردید که تزریق µ m ۲۵۰ جاسمونیک اسید باعث افزایش تجمع هایپرسین در سلول های رشد یافته تاریکی در مقایسه با کشت های رشد یافته تحت شرایط نوری و کنترل های مربوط می شود، اگر چه تزریقµ m ۲۵۰ جاسمونیک اسید باعث افزایش رشد و تولید هایپرسین در کشت های سوسپانسیون سلولی گل راعی می شود، اما غلظت های دیگر جاسمونیک اسید تحت شرایط نور و تاریکی همان تاثیر را دارند. (۱۳) در کشت سوسپانسیون سلول گونه Pueraria tuberosa (۸) تیمار ۴۰۰ میکرومول متیل جاسمونات در مقایسه با سایر تیمارها (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول) و شاهد بیش ترین تاثیر را در تولید ایزوفلاونوئید ها داشته است. هم چنین در همین غلظت نیز سالیسلیک اسید تأثیر مشابه با متیل جاسمونات داشته است. (۲۶) تیمار گیاه همیشه بهار با ۵۰ میکرومول متیل جاسمونات سبب سنتز سسکویی ترپن α Muureloene توسط گیاه و بروز آن در اسانس گردید. میزان این ماده در تیمار با ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات به دو برابر افزایش یافت. (۳۷) در مطالعه ا ی اثر محرک اسید سالیسیلیک و استخراج تولید متابولیت ثانویه از کشت سلولی گیاه جاتروفا Jatropha curcas L (۴) را مورد بررسی قرار دادند. محرک اسید سالیسیلیک نیز باعث تغییر محتوای شیمیایی و افزایش درصد ترکیبات گردید و هم چنین رفتار اسید سالیسیلیک باعث تولید درصد بالاتری از آلکان ها و اسید های چرب نیز شد (۲۱). غده های سیاه دارای هایپرسین و سودو هایپرسین در امتداد حاشیه برگ ها قرار می گیرند. غده های سیاه مشابه را بر روی برگ های جدید نهال های طبیعی مشاهده گردید و هایپرسین و سودو هایپرسین در عصاره های این نهال ها از طریق تحلیل HPLC آنالیز گردید (۳۲). با توجه به بررسی منابع، تاکنون مطالعه ای در خصوص اثر محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر روی ترکیب ثانویه هایپرسین در گیاه گل راعی تحت شرایط کشت بافت انجام نشده است. کاربرد محرک ها، تنظیم کننده ها و بازدارنده های رشد در گیاهان دارویی علاوه بر رشد نیز ممکن است باعث تحریک تولید متابولیت ثانویه شود. بنابراین هدف این مطالعه بررسی سطوح غلظت های مختلف محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تحریک تولید هایپرسین و هم چنین شناسایی بهترین غلظت محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید از نظر دارا بودن درصد بالای میزان هایپرسین در گیاه گل راعی می باشد.

مواد و روش ها

تهیه، ضدعفونی و کشت بذور

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شد. جهت انجام تحقیق حاضر بذور گل راعی در سال زراعی ۹۲ ، ۹۳ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها پس از تهیه به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه انتقال داده و در کیسه های کاغذی در دمای اتاق (۲۵ °C، ۲۰ در تاریکی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

) تا زمان استفاده نگه داری شدند. ابتدا بذر ها به مدت ۱۰ دقیقه با آب روان شست و شو داده، سپس همراه با یک قطره مایع ظرف شویی در cc ۷۰ آب مقطر به مدت ۵ دقیقه شیک شدند و دوباره با آب مقطر به مدت ۱ دقیقه شست و شو داده شد و یک بار نیز بذرها با هیپوکلرید سدیم (وایتکس ۱٪) به مدت ۷ دقیقه در زیر محفظه دستگاه هود لامینار نیز شیک شدند و دوباره با آب مقطر استریل شده ۳ مرتبه با بازه های زمانی ۵، ۱۰ و ۷ دقیقه در زیر محفظه دستگاه هود لامینار شست و شو داده شد. (۵) سپس بذر ها بر روی محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم ساکاروز و ۷/۵ گرم آگار با pH ۵/۷ تا ۵/۸ قرار داده شد و در اتاقک رشد با شرایط نوری ۲۴۰۰ لوکس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۳ ± ۲۱ سانتی گراد نگه داری شدند. به منظور بررسی اثر محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر میزان هایپرسین، غلظت های مختلف محرک متیل جاسمونات (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرو مولار) و محرک سالیسیلیک اسید (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استقرار در محیط کشت حاوی محرک های متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید

به دلیل این که محرک متیل جاسمونات به صورت مایع روغنی است، ابتدا استوک از محرک متیل جاسمونات تهیه شد. ۰/۱۵ گرم محرک متیل جاسمونات وزن شد و در میکروتیوب ها ی حاوی cc ۵ اتانول ریخته و تکان داده شد تا به طور کامل حل شود و به کمک سمپلر میزان غلظت های مورد نیاز بر داشته شد. در حالی که محرک سالیسیلیک ماده ای پودری بود، ابتدا آن به اندازه میزان غلظت های مورد نیاز وزن شده و در میکروتیوب با چند قطره اتانول حل شد. سپس در زیر هود لامینار پس از فیلتر استریل شدن (فیلتر ۰/۲ میکرومتر) به محیط کشت اضافه گردیدند و در ادامه محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف محرک های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید را به درون ویال ها منتقل شد. هم چنین نیز تیمارهای فوق در سه تکرار و در هر تکرار با ۸ ریز نمونه انجام شدند. سپس نیز ریز نمونه های رشد یافته پس از ۶۰ روز به منظور تحریک هایپریسین از محیط کشت پایه در شرایط آزمایشگاهی از قسمت های مختلف گیاه (ساقه و انتهای بالای چهار یا شش برگی) بریده شده و به محیط کشت حاوی غلظت های مختلف محرک های متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید انتقال یافتند.

تهیه عصاره متانولی

برای تهیه عصاره متانولی ابتدا ۲ گرم نمونه داخل هاون چینی ریخته و cc ۲۰ متانول به آن اضافه و ساییده شدند، سپس محلول های حاصل سانتریفوژ شدند. فاز تشکیل شده بالا برداشته و جهت تغلیظ به دستگاه آون با دمای ۴۰ درجه ساتی گراد انتقال داده شد. عصاره تغلیظ شده به دست آمده تا زمان آزمایش در جای خشک، خنک و دور از نور قرار داده شد. عصاره گیاه مورد نظر پس از استخراج به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تزریق گردیدند.

اندازه گیری هایپرسین با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

اندازه گیری هایپرسین توسط دستگاه HPLC مدل KNAUER ساخت کشور آلمان، شامل پمپ K ۱۰۰۱، دتکتور UV (برای هایپرسین ۲۴۰ نانومتر)، ستون C ۱۸، نرم افزار EZChrom Elite انجام شد. فاز متحرک دستگاه شامل ۲ قسمت A و B می باشد. فاز متحرک A شامل بافر آمونیوم استات که تشکیل شده از mg ۷۷۱ آمونیوم استات جامد در ml ۱۰۰۰ آب که pH آن با استیک اسید روی ۵ تنظیم شده است. فاز متحرک B نیز از ml ۹۰۰ استونیتریل و ml ۱۰۰ متانول تشکیل شده است. ۲۰ میکرولیتر از نمونه های استخراج شده به دستگاه تزریق شدند و با سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه از ستون C ۱۸ به قطر ذرات mμ ۵ و ابعاد mm ۴/۶×۲۵۰ عبور کردند. هر نمونه در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای هایپرسین طی زمان ۲۰ ۲۵ دقیقه اندازه گیری و شناسایی شد. طیف های مربوط به هایپرسین با استاندارد مقایسه و مقادیر هر یک براساس طیف استاندارد محاسبه شد. (۲۴)

تهیه محلول استاندارد هایپرسین

برای به دست آوردن پیک استاندارد هایپرسین، ابتدا استاندارد هایپرسین که یک ماده ای پودری به میزان ۱ میلی گرم بود در cc۱۰ متانول حل شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد به دستگاه تزریق شدند.

محاسبه درصد هایپرسین در کروماتوگرامHPLCبه صورت زیر می باشد:

یافته ها

در این قسمت طیف های مربوط به کروماتوگرام استاندارد هایپرسین، نمونه شاهد و نمونه های تحت تیمار محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالسیلیک اسید در گیاه گل راعی مورد بررسی قرار گرفتند. جدول درصد هایپرسین (جدول ۱) و کروماتوگرام طیف نمونه استاندارد هایپرسین در دقیقه ۰۵:۳۸ نیز طیف مربوط به هایپرسین را نشان می دهد (شکل ۱). بنابراین میزان درصد هایپرسین در نمونه شاهد در زمان ۰۶:۰۲ برابر با ۱٪ می باشد (شکل ۲). کروماتوگرام طیف نمونه متانول که بدون متابولیت ثانویه هایپرسین می باشد را نشان می دهد (شکل ۳).

کروماتوگرام های طیف تیمار مختلف محرک شیمیایی متیل

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

جاسمونات

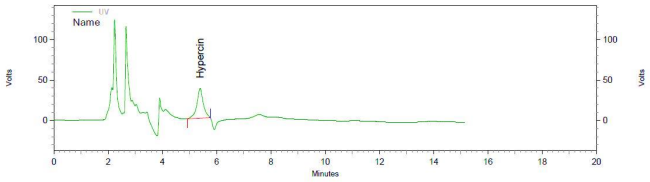
نتایج جدول درصد میزان هایپرسین (جدول ۲) و کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۵۰ میکرومولار در دقیقه ۰۶:۳۱ کم ترین میزان درصد هایپرسین (۱۹/۲۱٪) را نسبت به سایر غلظت ها نشان می دهد (شکل ۴). هم چنین کروماتوگرام طیف هایپرسین و جدول درصد هایپرسین در تیمار ۱۰۰ میکرومولار در زمان ۰۷:۱۱ مشاهده شد (جدول ۳) که بیشترین میزان هایپرسین را در این تیمار ایجاد نمود که برابر با (۳۴/۶۶٪) می باشد (شکل ۵) و در تیمار ۱۵۰ میکرومولار در زمان ۰۶:۰۹ میزان هایپرسین برابر با (۳۳/۳۷٪) بود (جدول ۴) (شکل ۶).

کروماتوگرام طیف های هایپرسین و جدول درصد میزان هایپرسین در تیمارهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرو مولار (جدول ۵ و جدول ۶)، میزان درصد هایپرسین را در زمان ۰۶:۰۶ دقیقه به ترتیب با میزان های (۲۷/۱۰٪ و ۳۰/۹۷٪) نشان می دهد (شکل ۷ و ۸).

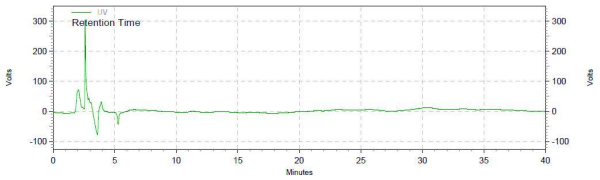
UV Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Concentration
1	Hypercin	5.383	610504	0.000
	0			0.000 BDL
	Peak @ 10.400 Minutes			0.000 BDL
	d			0.000 BDL
	d			0.000 BDL

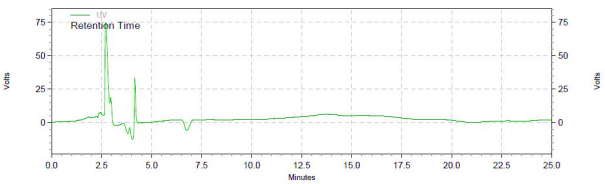
جدول ۱. درصد هایپرسین در نمونه استاندارد هایپرسین



شکل ۱. کروماتوگرام طیف نمونه استاندارد هایپرسین



شکل ۲. کروماتوگرام طیف هایپرسین در نمونه شاهد

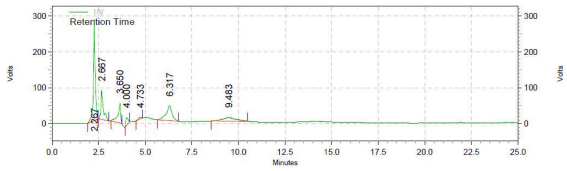


شکل ۳. کروماتوگرام طیف نمونه متانول

UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.267	1916627	39.44	281903	56.84
2.667	722616	14.87	80702	16.27
3.650	568203	11.69	55397	11.17
4.000	170229	3.50	22054	4.45
4.733	48111	0.99	4419	0.89
هایپرسین 6.317	933530	19.21	41542	8.38
9.483	500884	10.31	9981	2.01

جدول ۲. درصد هایپرسین در تیمار ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات

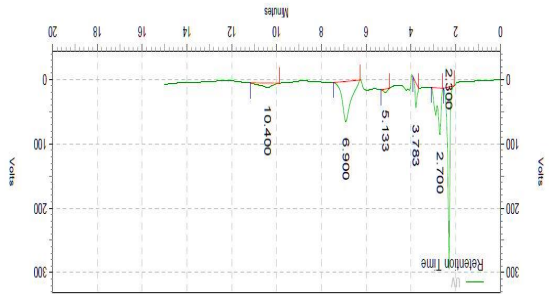


شکل ۴. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۵۰ µM متیل جاسمونات

UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.300	1684902	36.79	246846	61.44
2.717	680562	14.86	56566	14.08
3.800	221420	4.83	31219	7.77
4.333	33847	0.74	3823	0.95
5.300	72601	1.59	5427	1.35
هایپرسین 7.117	1587618	34.66	50685	12.61
10.717	299012	6.53	7219	1.80

جدول ۳. درصد هایپرسین در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات

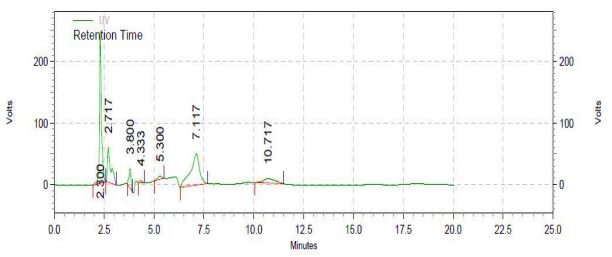


شکل ۵. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۱۰۰ µM متیل جاسمونات

UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.300	1811303	36.33	282685	60.42
2.700	954961	19.15	72145	15.42
3.783	230872	4.63	38718	8.28
5.133	64830	1.30	5587	1.19
هایپرسین 6.900	1663586	33.37	62069	13.27
10.400	260332	5.22	6676	1.43

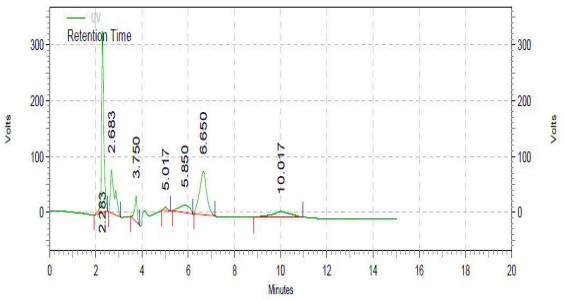
جدول ۴. درصد هایپرسین در تیمار ۱۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات



شکل ۶. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۱۵۰ µM متیل جاسمونات

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]



شکل ۷. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۲۵۰ µM متیل جاسمونات

UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.283	1927660	37.32	308155	59.95
2.683	855327	16.56	67984	13.23
3.750	276735	5.36	45534	8.86
4.967	140877	2.73	7982	1.55
5.883	260485	5.04	9846	1.92
6.650 هایپرسین	1599535	30.97	69786	13.58
10.033	104950	2.03	4732	0.92

جدول ۶. درصد هایپرسین در تیمار ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات

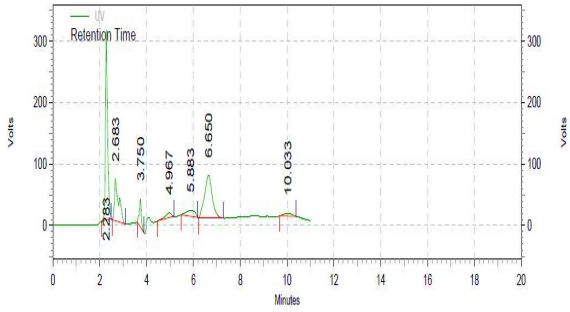
کروماتوگرام های طیف تیمار مختلف محرک شیمیایی سالیسیلیک‌اسید

کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۵۰ میکرومولار در زمان ۰۷:۵۶ دقیقه مشاهده شد که میزان هایپرسین در این تیمار برابر با (۱۱/۴۶٪) می باشد (شکل ۹) (جدول ۷) و در تیمار ۱۰۰ میکرومولار در زمان ۰۷:۰۸ میزان هایپرسین برابر با (۴/۱۱٪) می باشد (شکل ۱۰) (جدول ۸). در نتیجه نیز در بقیه غلظت ها ریز نمونه ها از بین رفتند (ریز نمونه ها خشک شده بودند).

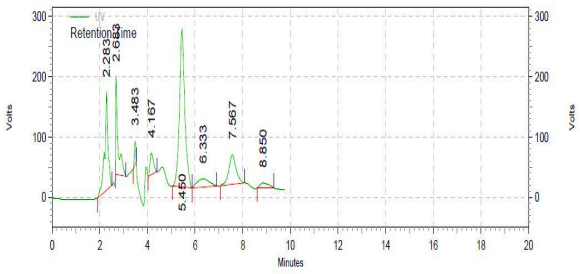
UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.283	1557881	17.44	161584	22.15
2.683	1100093	12.31	161419	22.13
3.483	151268	1.69	38016	5.21
4.167	352516	3.95	36177	4.96
5.450	4074975	45.61	261956	35.91
6.333	480761	5.38	13659	1.87
7.567 هایپرسین	1024203	11.46	48710	6.68
8.850	191809	2.15	7908	1.08

جدول ۷. درصد هایپرسین در تیمار ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید



شکل ۸. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۵۰۰ µM متیل جاسمونات

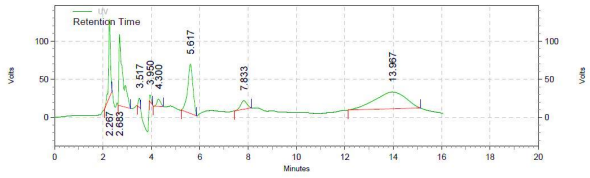


شکل ۹. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۵۰ µM سالیسیلیک اسید

UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.267	547013	11.12	102032	31.55
2.683	1021243	20.76	93144	28.80
3.517	63227	1.29	12159	3.76
3.950	42612	0.87	9053	2.80
4.300	96332	1.96	9239	2.86
5.617	980490	19.93	64548	19.96
7.833 هایپرسین	202132	4.11	11056	3.42
13.967	1966093	39.97	22138	6.85

جدول ۸. درصد هایپرسین در تیمار ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید



شکل ۱۰. کروماتوگرام طیف هایپرسین در تیمار ۱۰۰ µM سالیسیلیک اسید

بحث

در این مطالعه نتایج اثر غلظت های مختلف محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر تحریک تولید هایپرسین نشان دادند که محرک شیمیایی متیل جاسمونات در افزایش میزان هایپرسین در کشت بافت گل راعی بسیار تاثیر داشته است. شرایط نور و روش های تنظیم کننده رشد بر رشد کشت های سلولی H.perforatum در محیط کشت پایه تاثیر می گذارند که با نتایج ما مطابقت داشت. (۳۳) در کشت سوسپانسیون سلولی گل راعی غلظت ۲۵۰ میکرو مولار جاسمونیک اسید نسبت به سایر غلظت ها (۵۰ ، ۱۰۰ میکرو مولار)، میزان هایپرسین بیش تری تولید می کند (۲۶ میکرو گرم بر گرم وزن خشک). (۲۳) مطالعه های انجام شده نشان داده است که به طور معمول از متیل جاسمونات خارجی، در کشت سلولی گیاهی برای فعال کردن متابولیسم ثانویه استفاده می شود ، اما مطالعه هایی که در مورد تأثیر آن بر رشد گیاه گل راعی صورت گرفته است ، نشان می دهد که جاسمونات ها، فعالیت های زیستی گوناگونی مانند بازدارندگی رویش و جوانه زنی دانه و دانه گرده و مهار رشد ریشه و دستگاه های فتوسنتزی، دارند. (۳۵) مطالعه های انجام شده بر روی اثر متیل جاسمونات بر روی ترکیب های ثانویه ریحان شیرین نشان داده است که افزایش متیل جاسمونات از ۰/۱ به ۰/۵ میلی مولار سبب افزایش میزان فنل تام در ریحان شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

(۲۸) گزارش شده است که اسید جاسمونیک و متیل جاسمونات بر میزان ترکیبات و مواد موثره آویشن دنایی تاثیرگذار بوده به طوری که غلظت های مختلف به کار رفته نوع و مقدار ترکیبات ثانویه اسانس را کاهش یا افزایش دادند. (۱۰) آنتوسیانین ها و فنل ها متابولیت های ثانویه گیاهی است که از گیاه در برابر واکنش های فتودینامیک آسیب رساننده، با سرکوب کرد ن گونه های فعال اکسیژن، حفاظت می کنند . مطالعه های انجام شده ، مشخص کرده است که کاربرد ترکیب هایی که به طور طبیعی یافت می شوند، مانند متیل جاسمونات می تواند باعث افزایش متابولیت های ثانویه شود. برای مثال، تیمار گیاهان توت سیاه با متیل جاسمونات، محتوای فلا ونویید رابه طور معنی دار در این گیاهان افزایش داد. (۳۶) اثرهای دو محرک جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر رشد سلول و هم چنین در تجمع اسید رزمارینیک در کشت سوسپانسیون سلولی از پونه و نعناع را مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین تجمع اسید رزمارینیک ۱۱۷/۹۵ میلی گرم بر گرم (DW ۱ DW ۱۲٪) بود. علاوه بر این نیز پس از ۲۴ ساعت ۱۰۰ میکرو لیتر متیل جاسمونات اندازه گیری شد که مشابه غلظت ۱۱۰/۱۲ میلی گرم بر گرم پس از ۴۸ ساعت، استفاده از ۲۰۰ میکرو لیتر اسید جاسمونیک می باشد. ارزش آن بدون استخراج نزدیک به ۱/۵ برابر بیش تر نسبت به نمونه شاهد شد. تاثیر محرک ها بر ترشح اسید رزمارینیک در کشت قابل توجهی وجود -دارد. کشت سوسپانسیون سلولی نعناع تحت تاثیر با محرک -ها نشان داد که کاهش در تجمع زیست توده داشته است. (۳۱) در پژوهشی واکنش گیاهی مینا چمنی Bellis perennis L. (۹) از تیره کمپوزیته در پاسخ به تیمار سالیسیلیک اسید و میزان تجمع دو متابولیت ثانویه ساپونین و آنتوسیانین به ترتیب در ریشه ها و برگ های گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که مقدار ترکیب های ثانویه ساپونین و آنتوسیانین در گیاهان تیمارشده با غلظت های ۳ ، ۷ و ۱۱ -میکرومولار سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک اسید و بدون آلودگی (گیاهان کنترل) افزایش پیدا می کند (۶). سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیمر های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را در برگ ها و کشت های سوسپانسیون مریم گلی ممانعت می کند و از این طریق در شرایط این ویترو و این ویو ممانعت می شود، بنابراین پیشنهاد شده که مکانیسم عمل سالیسیلیک اسید به طور احتمال افزایش مقدار ROSاز طریق توقف توانایی کاتالاز برای تجزیه H۲O۲ می باشد (۱۸). سالیسیلیک اسید تحت تنش کادمیوم باعث افزایش محتوای کلروفیل و بیوسنتز آن در گیاه Arabidopsis thaliana (۲) می گردد (۳۸) محرک سالیسیلیک اسید وقتی به طور خارجی به کار برده شوند نیز با روشی معین در طول گیاه حرکت می کنند و باعث بیان شدن ژن‌های دفاعی خاصی در گیاه می‌شوند. (۲۲) برگ -های H.perforatum اصل و منبع استخراج هایپرسین بوده است. مقدار بالاتری از هایپرسین را که در کشت های سلولی رشد یافته در شرایط تاریکی نسبت به برگ هایی مشاهده شد که یک ماه زودتر در محیط پایه کشت داده بودند. (۲۰) با تحقیق هایی که برای بررسی میزان هایپرسین انجام گردید بیش ترین و کم ترین میزان هایپرسین ۶٪ و ۴٪ به ترتیب در برگ ها و گل ها به دست آمده است. هم چنین کاهش مدت زمان سایه به علت افزایش دسترسی به نور خورشید در دو مناطق رویشگاه های طبیعی گل راعی باعث فراهم شدن حرارت بیش تر در طول روز شده که در افزایش میزان هایپرسین نیز موثر می باشد. (۳۹) محرک منان تولید هایپرسین و سودو هایپرسین را با مقدار mg/ml ۰/۱ – ۰/۰۵ در اندام شاخه ای کشت ها تحریک می کند و محرک منان باعث افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت بافت گل راعی می شود. هم چنین نیز عوامل محرک زیستی و غیر زیستی می تواند باعث تنظیم رو به بالای بیوسنتز متابولیت های ثانویه در گیاهان سالم و کشت های سلولی شوند. (۲۹)

نتیجه گیری

محرک شیمیایی متیل جاسمونات در افزایش میزان هایپرسین در کشت بافت گل راعی بسیار تاثیر داشته است. اما محرک شیمیایی سالیسیلیک اسید تاثیر محسوسی در افزایش میزان هایپرسین در گیاه گل راعی نداشت. از بین غلظت های محرک شیمیایی متیل جاسمونات مورد استفاده، غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بیش ترین میزان هایپرسین (۳۴/۶۶ ٪) را تولید کرد و در غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات کم ترین میزان هایپرسین مشاهده شده است. در غلظت ۵۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید میزان هایپرسین چند برابر شاهد شده است و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید نیز میزان درصد هایپرسین به طور تقریب دو برابر شاهد است. هم چنین تنها در غلظت های شاهد، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار محرک شیمیایی سالیسیلک اسید ریزنمونه ها سالم بوده و در بقیه غلظت ها نیز نمونه های کشت بافت زرد و خشک شدند، در نتیجه از بین رفتند. در این تحقیق سعی شد تا با کاربرد غلظت های مختلف محرک های شیمیایی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید، بهترین غلظت جهت به دست آوردن بیش ترین میزان هایپرسین برای کاربرد در محیط کشت بافت پیدا شود. تا با کاربرد اثر سایر القا کننده ها بتوان به مقدار بیش تری از ترکیبات ثانویه مفید دست یافت. کشور ایران از منابع مهم گیاه گل راعی به شمار می رود و با انجام تحقیق های بیش تر باید سعی در افزایش تولید و فرآوری این گیاه ارزشمند شود. لذا برای شناخت، بهره برداری و فرآوری این گیاه دارویی مهم و ایجاد اشتغال برای تحقیق های بیش تر پیشنهاد می شود که از سایر محرک های رشد بر روی گیاه گل راعی جهت افزایش تولید متابولیت های ثانویه استفاده شود و هم چنین تحقیق

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

های دیگری جهت شناسایی ترکیب های شیمیایی گونه های دیگر جنس Hypericum انجام شود.

سپاسگزاری

از مسؤلین محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و مسئول آزمایشگاه کشت بافت که ما را در انجام پژوهش فوق یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را می نمائیم.

.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

منابع

۱ امیدبیگی ر. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی، چاپ اول، جلد چهارم، چاپ اول، فصل نهم، ۱۳۸۹؛ ۴۲۳ صفحه.

۲ امیدبیگی ر. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی، جلد دوم، ۱۳۸۴؛ ۴۳۸ صفحه.

۳ امین غ ر. متداول ترین گیاهان دارویی سنتی ایران .معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران،۱۳۸۴ ؛ ۱۹۸ صفحه.

۴ امین غ ر. متداول ترین گیاهان دارویی سنتی ایران .انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، مرکز تحقیقات اخلاق و تاریخ پزشکی، چاپ دوم، ۱۳۸۷؛ ۳۰۰ صفحه.

۵ پورشفیعی انارکی ف. تولید و نگه داری کشت سلولی گیاه Nepeta persica Bioss و مقایسه متابولیت های شده در تولید کالوس با گیاه کامل پایان نامه دکترای عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۷۹؛ ۴۲ صفحه.

۶ خاوری نژاد ر ، اسدی ا. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر میزان برخی از متابولیت های ثانویه (ساپونین ها و آنتوسیانین ها) و القا مقاومت ضد میکروبی در گیاه داروی *Bellis perennis* L، تحقیق ها گیاهان دارویی و معطر ایران. ۱۳۸۴؛ ۲۱: (۵) ۵۵۳ – ۵۸۶.

۷ رضایی ع ، درستکار ک، پاشازاده م، احمدی زاده ج، جعفری ب . مقایسه اثرات تسکینی و ضد اضطرابی عصاره "علف چای" با دیازپام در موش صحرایی. مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان. ۱۳۸۹؛ ۱۳(۸): ۸ ۱۱.

۸ زرگری ع. گیاهان دارویی، جلد ۵، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰؛ ۵۳۲ صفحه.

۹ قاسمی ع. گیاهان دارویی و معطر (شناخت و بررسی اثرات آن ها)،۱۳۸۹ ؛ انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد.

۱۰ قاسمی پیربلوطی ع، اشرافی م، رحیم ملک م، حامدی ب. اثر محلول پاشی اسید جاسمونیک بر درصد و ترکیبات اسانس آویشن دنایی. داروهای گیاهی،۱۳۹۱؛ ۷۵:۲ ۸۰.

11 Alali F, Tawaha K, Al Eleimat T. Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Tuna. (*Hypericaceae*) growing wild in Jordan. Natural Product Research. (2004). 18, 147 151.

12 Azizi M, Omidbeygi R. Effect of NP supply on herb yield, hypericin content and cadmium accumulation of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Acta Horticulturae, (2002). 576: 267 271, (full text in Persian).

13 Bais HP, Walker TS, McGrew JJ, Vivanco JM. Factors affecting the growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) and production of hypericin. In Vitro Growth & Development Plant. (2002). 38, 1–9.

14 Bari RJ, Jones, DG. Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology*. (2009). 69,473–488.

15 Barnes J, Anderson A, Phillipson D. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of pharmacy and pharmacology*.(2001). 53, 583 600.

16 Bruni R, Sacchetti G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). Molecules. (2009). 14, 682 – 725.

17 Çirak C, Aksoy HM, Ayan AK, Saglam B, Kevseroglu KEnhanced hypericin production in *Hypericum perforatum* and *Hypericum pruinatum* in Response to Inoculation with Two Fungal Pathogens. Plant protection Science . (2005). 3, 109–114.

18 Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch Mani B. Priming in plant–pathogen interactions. Trends in Plant Science.(2002). 7, 210 216.

19 Denath M, Malik CP, Bisen PS. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant – based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology. (2006). 7, 33 49.

20 DeSmet P, Nolen WA. St. John's wort as an antidepressant. Br. J. Med. (1996). 313, 241–242.

21 Eganathan P, Parida A, Mahalakshmi R. Salicylic acid elicitation on production of srcondray metabolite by cell cultures of *Jatropha curcas* L. (2013). Vol 5, Suppl 4.

22 Epple P, Apel K, Bohlmann H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

against Fusarium oxysporum. Plant Cell. (1997). 9, 509 – 520.
23 Gadzovska S, MauryN S, Delaunay A, Spasenoski M, Joseph J, Hage`ge D. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. Plant Cell Tissue Organ Culture. (2007). 89, 1 13.
24 Ganzera M, Zhao J, Khan IA. *Hypericum perforatum*chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2002). 91, 623–630.
25 Ghasemi Pirbalouti A, Fatahi M, Craker L, Shirmardi H. Chemical and composition bioactivity of essential oils of *Hypericum helianthemoides*, *Hypericum* and *perforatum Hypericum scabrum*. Pharmaceutical Biology. (2013). DOI:10.3109/13880209.82163. (full text in Persian).
26 Goyal SH, Ramawat. Ethrel treatment enhanced isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiologiae Plantarum*. (2008). 30(6), 849 – 853.
27 Leon J, & Sanchez Serrano J. J. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. Plant Physiology and biochemistry. (1999). 37, 373 380.
28 Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) Journal of Agricucture and Food Chemistry.(2005). 53, 3696 3701.
29 Kirakosyan A, Gibson DM, Kaufman PB. The production of dianthrones and philroglucinol derivatives in St. John's wort. In: Ramawat KG & Merillon JM (ed.) Bioactive Molecules and Medicinal Plants, pp: (2008). 151–164.
30 Koo A.J, Howe G.A. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*. (2009). 70, 1571–1580 .
31 Krzyzanowska J, Pecio L, Stochmal A, Oleszek W, Czubacka A, Przybys M, Doroszewska T. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in Mentha 3 piperita cell suspension cultures, Plant Cell Tiss Organ Cult .(2011). DOI 10.1007/s11240 011 0014 8.
32 Kornfeld A, Kaufman PB, Lu CR, Gibson DM, Bolling SF, Warber SL, Chang SC, Kirakosyan A. The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. Plant Physiology and Biochemistry. (2007). 45, 24 – 32.
33 Pretto RF, Santarem RE. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (2000). 62(2), 107 113.
34 Raskin I. Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol. (1992). 43, 439 446.
35 Rossato L, Le Dantec C, Laine P, Ourry A. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: identification, and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. J. Exp. Bot.(2002). 53, 265 275.
36 Wang SY, Bowman L, Ding D. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (Rubus sp.) and promotes anti proliferation and promotes anti proliferation of human cancer cells. Food Chemistry. (2008). 107, 1261 – 1269.
37 Wurster M, Ali NA, Arnold N, Lindequist U, Wessjohan L. Essential Oil Composition from Oleogum Resin of Soqotraen Commiphora kua. Rec. Nat. Prod, 2(3), 70 75.
38 Zawoznik MS, Gropp MD, Tomaro ML, Benavides MPEndogenous salicylic acid potentiates cadmium induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science. (2007). 173, 190 191.
39 Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John'swort. Plant Physiol Biochem. (2005). 43,977–984.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.6.1]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-02-24]