

بررسی بیان ژن ژرماکران A سنتتاز در گیاه بابونه کبیر تحت تنش

شوری

Evaluation of Germacrene A Synthase gene expression under salinity stress in *Tanacetum parthenium*

لطیفه پوراکبر^{۱*}، آرین ساطعی^۲، منصوره احمدی لیوانی^۳، مهدی عبادی^۴، ابوالقاسم محمدی^۵

۱- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۲- دکترای فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه گرگان

۳- دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه

۴- دکترای شیمی تجزیه گرایش الکتروشیمی، دانشگاه گرگان

۵- دکترای ژنتیک، دانشگاه گرگان

Pourakbar L, Satei A, Ahmadi Livani M, Ebadi M, Mohammadi A

1. Associate Professor of Biology, Faculty of Science, Urmia University

2. Ph.D. Plant Physiology at Gorgan University

3. Ph.D. student in Plant Physiology, Urmia University

4. Ph.D. Analytical Chemistry, Electrochemistry, Gorgan University

5. PhD in Genetics, University of Gorgan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: l.pourakbar@urmika.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) گیاهی علفی، متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae) می باشد که از جمله گیاهان دارویی ارزشمند است که اثرات مصرف آن در پیشگیری درمان میگرن به اثبات رسیده است که از طریق کاهش تورم درد و اسپاسم رگ های خونی صورت می گیرد. پارتنولید یکی از مهم ترین سزکوئی ترین لاکتون های موجود در گیاه بابونه کبیر است که بیش از ۸۵ درصد کل سزکوئی ترپن های این گیاه را تشکیل داده و به عنوان ماده مؤثره این گیاه شناخته شده است. در تحقیق حاضر، برگ های جوان گیاه بابونه کبیر در سطوح مختلف شوری (شامل صفر (EC=3.2)، شوری ملایم (EC=6.1)، شوری متوسط (EC=8.4) و شوری شدید (EC=10.2)) قرار داشتند به منظور مطالعه تغییرات بیان ژن مسیر بیوسنتزی پارتنولید شامل ژرماکران A سنتتاز (GAS) از روش Real Time PCR استفاده شد. میزان پارتنولید تولید شده در برگ ها با روش عصاره گیری در دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و درصد اسانس با دستگاه GC/MS سنجیده شد. نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار بیان ژن مورد مطالعه در برگ های گیاهان تحت تنش شوری نسبت به گیاهان شاهد بود. بیشترین میزان بیان ژن GAS در تیمارهای شوری شدید و شوری متوسط مشاهده شد. همچنین روند تغییرات میزان بیان ژن با روند تغییرات میزان پارتنولید تولید شده در برگ ها مطابقت داشت. بازده اسانس گیاه نیز در شرایط تنش ملایم (۰/۶۶ درصد) بیشتر از شرایط بدون تنش (۰/۴۹ درصد) بود.

واژه های کلیدی

اسانس

گیاهان دارویی

Tanacetum parthenium
HPLC

مقدمه

بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae) بوده و از لحاظ سطح کروموزومی دیپلوئید ($2x=2n=18$) و حاوی ترکیبات ترپنی متعددی می‌باشد (Groenewegen and Heptinstall 1992). گیاه بابونه کبیر یکی از گیاهان بومی اروپا و آسیا است، ولی به سراسر جهان گسترش یافته است. در ایران نیز این گیاه در برخی مناطق از جمله در منطقه آذربایجان، ارسباران، گیلان و مازندران به شکل خودرو می‌روید. در گذشته معمولاً از این گیاه برای درمان آرتريت، آسم، یبوست، درد گوش، سردرد، التهاب پوست، تب، دفع حشرات، اختلالات قاعدگی، پسوریازیس، اسپاسم، درد معده تورم، وزوز گوش، سرگیجه و درد دندان استفاده می‌شد. به همین خاطر این گیاه را بابونه کبیر¹ نیز می‌نامند (Sharopov et al. 2015).

حدود ۳۰ سزکویی ترپن لاکتون در بابونه کبیر شناسایی شده است و بیش از ۸۵ درصد کل سزکویی‌ترین‌های بابونه کبیر را پارتنولید تشکیل می‌دهد که به عنوان ماده مؤثره این گیاه شناخته شده است. فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی برای پارتنولید گزارش شده است که شامل فعالیت ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی است (Brown et al. 1997; Cretniket al. 2005; Williams et al. 1995). مسیرهای (MEP) متیل ارتیرول فسفات در پلاستیدها و موالونیک اسید (MVA) در سیتوسول دو مسیری است که مسئول بیوسنتز ترپن‌ها می‌باشند (Rohmer et al. 1993; Zeng et al. 2011). این دو مسیر با یکدیگر در ارتباط بوده و در نتیجه در بیوسنتز ترکیبات سزکویی‌ترین لاکتونی مانند پارتنولید مهم می‌باشد (Majdi et al. 2014).

طبق نتایج (Majdi et al. 2014) در گیاه بابونه کبیر، بیشترین مقدار پارتنولید در گل‌ها و به دنبال آن در برگ‌ها و ساقه مشاهده شده است و پارتنولیدی در ریشه بابونه کبیر تعیین نشده است. همچنین آن‌ها گزارش کرده‌اند که بیان ژن TpGAS (ژرماکرن A سنتتاز) دقیقاً در ارتباط با بیوسنتز پارتنولید است و بالاترین بیان ژن TpGAS در گل‌ها و کرک‌های ترش‌چی می‌باشد و تمرکز

¹ Feverfew

پارتنولید در کرک‌ها نشان داده است که کرک‌ها مکان ویژه‌ای برای سنتز و اسیمیلایون پارتنولید می‌باشد. مقایسه غلظت کرک‌ها در چندین سلول گیاهی نشان داده است که دیسک گلچه بیشترین کرک‌های ترش‌چی را دارد و به دنبال آن‌ها برگ و ساقه‌ها کمترین کرک‌ها را دارا هستند.

رشد و نمو گیاهان توسط عوامل طبیعی به شکل عامل‌های زنده و غیرزنده تحت تأثیر قرار می‌گیرد. گیاهان همیشه در طول دوره زندگی خود تحت تنش‌هایی از قبیل کاهش دما، شوری، خشکی، سیل، گرما، تنش اکسیداتیو و سمیت فلزات سنگین قرار می‌گیرند. فعالیت‌های متنوع انسان، عامل‌های تنش موجود در طبیعت را گسترده‌تر کرده است. همه این عامل‌های تنش، تهدیدی برای گیاهان محسوب می‌شود و رشد و تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پاسخ به این عامل‌های تنش‌زا، ژن‌های گوناگون تنظیم می‌شوند که می‌توانند اثر تنش را کاهش داده و با تنظیم محیط سلولی مقاومت گیاه را افزایش دهند (Cretniket et al. 2005). در حقیقت یکی از مهم‌ترین وظایف متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش محافظتی آن‌ها در شرایط تنش است. این ترکیبات به گیاهان کمک می‌کنند تا بتوانند در مقابل عوامل و شرایط نامساعد محیطی مقاومت کنند و به حیات خود ادامه دهند (Ramakrishna and Ravishankar 2011). تنش شوری درصد اسانس اکثر گیاهان دارویی را افزایش می‌دهد، چون در موارد تنش متابولیت‌های بیشتری تولید شده و این مواد باعث جلوگیری از عمل اکسیداسیون در سلول می‌شوند (Bettaieb et al. 2008). افزایش درصد اسانس در شرایط سطح اولیه تنش شوری در گیاه اسطوخودوس توسط (Khorasani Nejad et al. 2016) گزارش شده است. با وجود آن‌که اثرات تنش‌های غیرزیستی بر عملکرد، ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیک گیاهان به فراوانی مورد بررسی قرار گرفته است، اما تأثیر اولیه این تنش‌ها بر رفتارهای بیوشیمیایی و مولکولی به خوبی مطالعه نشده است. لذا به نظر می‌رسد آگاهی از پاسخ‌های مولکولی گیاهان به تغییر محیط پیرامون و تنش‌های غیرزیستی یکی از حوزه‌های مهم در پژوهش‌ها به شمار می‌رود. این آگاهی می‌تواند منجر به به کارگیری فن‌آوری‌های زیستی به منظور ایجاد ارقام متحمل به تنش‌ها شود. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر شوری بر میزان و توزیع ماده

ژن‌های مزبور در بانک اطلاعاتی NCBI و به‌کمک Primer BLAST مورد بررسی و تایید قرار گرفتند و عملکرد آن‌ها با PCR نیز بررسی شد. برای انجام واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Step-one شرکت ABI استفاده شد. برنامه دمایی PCR به این شرح بود: واسرشت‌سازی اولیه به مدت ده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه بدین صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بسط ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. بسط نهایی هفت دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. یک ماکرولیتر از cDNA سنتز شده (با خلط ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم) به‌عنوان الگو برای استفاده شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR منحنی ذوب با برنامه سرعت ۰/۳ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه در هر چرخه و بین دمای ۹۵-۶۵ به‌منظور بررسی اختصاصی واکنش PCR انجام شد. نرخ بیان ژن مورد مطالعه با استفاده از روش دلتا دلتا محاسبه شد. بر این اساس، ابتدا برای نمونه میانگین سیکل آستانه ΔCT (حاصل از دو تکرار محاسبه) سپس همین عمل برای ژن خانه‌دار^۱ مربوط به نمونه اجرا شد و در نهایت میزان بیان ژن مورد نظر با استفاده از فرمول زیر حاصل می‌شود:

$$\text{Gene expression: } 2^{-\Delta\Delta CT} \text{ (House-Keeping Gene) - } \Delta CT \text{ (Target Gene)}$$

برای تعیین مقدار پارتنولید در عصاره گیاه بابونه کبیراز دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) Agilent (با مشخصات ستون zorbax xDB C₁₈ به طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. همچنین فاز متحرک با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه به نسبت ۴۰:۶۰ آب و اتانول استفاده شد.

¹ House-Keeping

مؤثره پارتنولید در شرایط نموی مختلف در برگ‌های بابونه کبیر همچنین تغییر بیان ژن کلیدی مسیر بیوسنتز پارتنولید بسته به شدت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف تنش شوری بر بیان یک ژن درگیر در مسیر بیوسنتزی پارتنولید در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium*) در سال ۱۳۹۵ در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی گرگان انجام شد. این تحقیق در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمار شامل تنش شوری در چهار سطح شامل بدون تنش ($EC=3.2$)، ملایم ($EC=6.1$)، متوسط ($EC=8.4$) و شدید ($EC=10.2$) بود. بذر بابونه کبیر از شرکت بذر پاکان اصفهان تهیه شد و به گلدان‌های پلاستیکی با بستر کشت شامل ماسه، خاک برگ، کود حیوانی، خاک مزرعه انتقال یافت. در اوایل مرحله رویشی اعمال تنش شوری در چهار سطح بدون تنش و تنش ملایم (۲۵ میلی‌مول نمک در ۸۰۰ سی‌سی آب) تنش متوسط (۵۰ میلی‌مول نمک در ۸۰۰ سی‌سی آب) و تنش شدید (۷۵ میلی‌مول نمک در ۸۰۰ سی‌سی آب) صورت گرفت که اعمال تنش به صورت یک روز در میان بود. بعد از گذشت ۳۰ روز اعمال تنش، نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و بالغ در اواخر شهریور انجام شد و نمونه‌های برگ‌ها در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند و نمونه‌های برگ‌ها در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند. با توجه به اطلاعات ژنومی موجود در NCBI. به‌عنوان ژن‌های خانه دار برای گیاه بابونه کبیر با استفاده از نرم‌افزار (http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3) BatchPrimer3 طراحی (Singh et al. 2017) و توسط شرکت سیناژن ساخته شد (جدول ۱). این پرایمرها از نظر تکثیر اختصاصی

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای ژن *TpGas* در *T. parthenium*

ژن	توالی آغازگر
Tp(PTS)	Forward primer: AGACATTACGTTTACACCCTCCCG
	Reverse primer: ATCACGACACAAGTCCCAGGG
TpGAS	Forward primer: TGCTATCTCGGGTACTTTCAAGG
	Reverse primer: TTCTCCTCTTATTCTCAACTGTGCG

اندازه‌گیری در طول موج حداکثر ۲۱۰ نانومتر مربوط به پارتنولید انجام گرفت. جهت تهیه نمونه ۴ گرم از پودر خشک شده برگ‌های بابونه کبیر به مدت ۲۴ ساعت درون دستگاه سوکسله قرار گرفت در قسمت بالن دستگاه از ۴۵۰ میلی‌لیتر پترلیوم اتر استفاده شد و دما در محدوده ۴۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. بعد از ۲۴ ساعت، جهت تبخیر حلال نمونه‌ها با استفاده از روتاری در شرایط خلا و دمای ۴۰ درجه به مدت ۲ ساعت خشک شد. عصاره رقیق شده با ۲۰ سی‌سی استونیتریل قبل از تزریق به دستگاه HPLC با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد.

در این آزمایش مقدار ۱۰۰ گرم نمونه خشک شده از برگ هر منطقه از گیاه بابونه کبیر را وزن کرده و با استفاده از دستگاه اسانس‌گیری فارماکوپه (BIO-RAD, 164-0300) به روش تقطیر با آب به مدت یک ساعت مورد اسانس‌گیری قرار گرفت. دبی (حجم آبدی در واحد زمان) آب خنک‌کننده ۵ میلی‌لیتر در دقیقه محاسبه شد و اسانس حاصل به صورت مخلوط با آب بود که به‌وسیله حلال (دی اتیل اتر) از آب جدا شد. بازده اسانس ۰/۶۵ درصد بود.

جهت آنالیز مواد مؤثره اسانس گیاه بابونه کبیر از دستگاه کروماتوگرافی گازی جرمی مدل Varian 3400 متصل شده به طیف سنج جرمی مدل Saturn II، با ستون موئینه با نام تجاری DB-5 ساخت شرکت J&W به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌لیتر که سطح داخلی آن با فاز ساکن پوشیده شده از جنس Dimethylsiloxane.5% phenyl به ضخامت ۰/۲۵ میکرون با فشار گاز سرستون ۳۵ Psi، با انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت، در درجه حرارت ستون ۴۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و درجه حرارت محفظه تزریق ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ترانسفر لاین معادل ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص‌های بازداري کواتس (۷، ۱۲، ۱۳) و مقایسه آن‌ها با شاخص‌های بازداري استاندارد که در منابع مختلف منتشر شده انجام و مطالعه طیف‌های جرمی با مقایسه طیف جرمی ترکیب‌های استاندارد، استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه

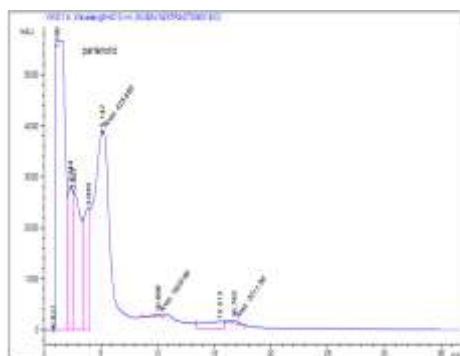
ترینوئیدها در کامپیوتر دستگاه GC/MS تأیید شدند. محاسبات کمی (تعیین درصد هر یک از ترکیبات) به‌کمک داده پرداز Chromatopac C-R3A به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ مربوط به طیف‌ها انجام شد. در این مطالعه چون بیشترین میزان اسانس در شوری ملایم مشاهده شد در نتیجه جهت آنالیز مواد مؤثره اسانس در گیاه بابونه کبیر در شوری ملایم انجام شد.

تحلیل و توصیف داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 در سطح معنی‌داری یک درصد انجام شد. نخست با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) مورد آزمون نرمال قرار گرفت. جهت تعیین سطوح اختلاف از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار از آزمون دانکن جهت دسته‌بندی داده‌ها استفاده شد.

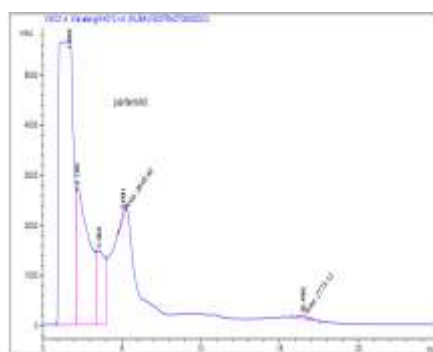
نتایج و بحث

نتایج بررسی میزان بیان ژن مسیر بیوسنتزی پارتنولید (TpGAS) در برگ‌های جوان بابونه کبیر نشان داد که بین تیمارهای مختلف سطوح شوری در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیان ژن TpGAS در برگ‌های جوان تحت سطوح مختلف شوری (ملایم، متوسط و شدید) نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند. همچنین تغییرات ژن TpGAS در تیمارهای شوری شدید و متوسط بیشترین میزان را به خود اختصاص داد و اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد (شکل ۱ و ۲).

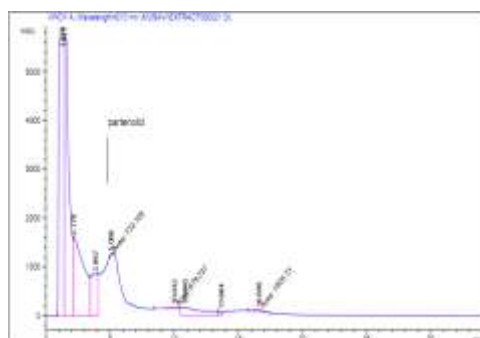
با توجه به نتایج حاصل از HPLC در این تحقیق بهترین میزان پارتنولید تولید شده در برگ‌ها با مقدار ۱/۵mg/g در تیمار شوری شدید و کمترین میزان پارتنولید مربوط به تیمار شاهد (۰/۱ میلی‌گرم در گرم) بود (شکل ۳ الف و ب).



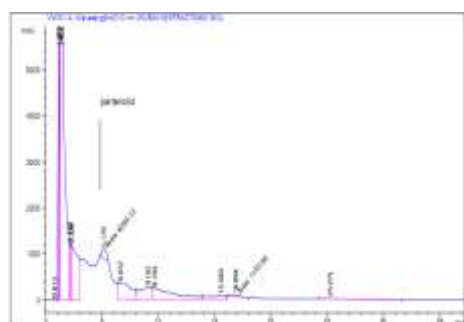
شکل ۳ الف- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره برگ بابونه کبیر (بدون اعمال تنش شوری) ($EC=3.2$)



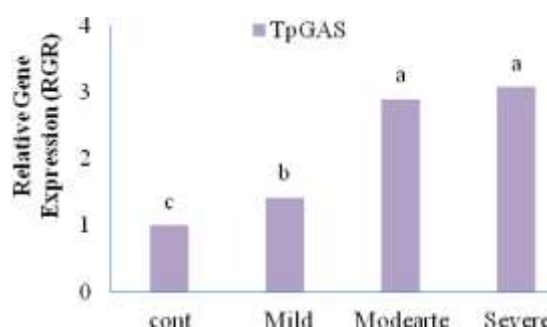
شکل ۳ ب- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره برگ بابونه کبیر تحت تنش شوری متوسط ($EC=8.4$)



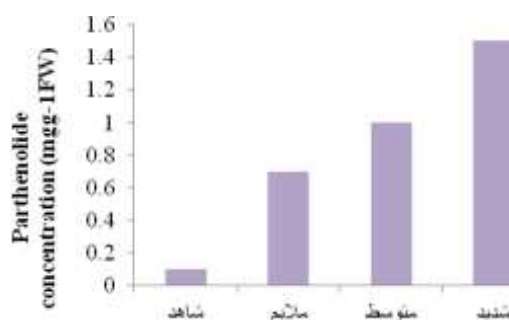
شکل ۳ ج- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره برگ بابونه کبیر تحت تنش شوری ملایم ($EC=6.1$)



شکل ۳ د- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره برگ بابونه کبیر تحت تنش شوری شدید ($EC=10.2$)



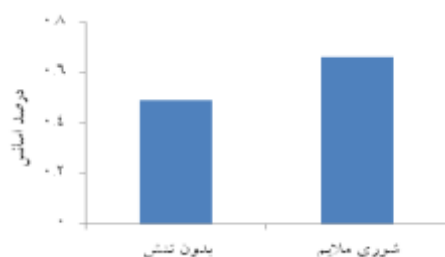
شکل ۱- نمودار الگوی بیان ژن *TpGAS* در مسیر بیوسنتزی پارتنولید در برگ‌های جوان بابونه کبیر (مرحله اول رویشی) تحت تنش شوری (شاهد با $EC=3.2$ ، شوری ملایم با $EC=6.1$ ، شوری متوسط با $EC=8.4$ و شوری شدید با $EC=10.2$). ستون‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ هستند.



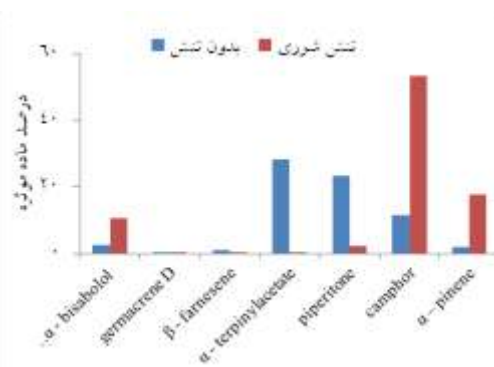
شکل ۲- مقایسه میزان پارتنولید در گیاه بابونه کبیر در شرایط متفاوت تنش تحت تنش شوری (شاهد با $EC=3.2$ ، شوری ملایم با $EC=6.1$ ، شوری متوسط با $EC=8.4$ و شوری شدید با $EC=10.2$). ستون‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ هستند.

میزان پارتنولید تولید شده در برگ‌های تیمار شده با شوری ملایم و شوری متوسط به ترتیب ۰/۸ میلی گرم در گرم و ۱/۱۹ میلی گرم در گرم بوده است (شکل ۳ ج و د). نتایج حاصل نشان داد که همبستگی مثبت و نسبتاً قوی بین میزان پارتنولید و بیان ژن $TpGASR^2=0.9$ وجود داشت.

(شکل ۵ و ۶). کامفور یک مونوترپن اکسیژن دار دو حلقه ای است که قویاً ضد عفونی کننده و به عنوان یک ترکیب آنتی پاتوژن و مخصوصاً به عنوان دافع قارچ، باکتری و حشرات شهرت یافته است. همچنین به عنوان مسکن اعصاب، کاهش دهنده دمای بدن و تب و محرک مراکز عصبی و تنفس شناخته شده است (Parvin et al. 2012). کامفور و کریزانتیل استات به عنوان مهم ترین مواد مؤثره اسانس گونه مورد نظر معرفی شده است (Pareek et al. 2011). کامفور، کامفن، پی سیمن و بورنیلاستات به عنوان ترکیبات اصلی اسانس گیاه گزارش شده است. ماده مؤثره کامفور به عنوان مهم ترین ترکیب دافع حشرات و آفات گزارش شده است. همچنین کامفور به عنوان یک آنتی پاتوژن قوی در درمان عفونت های باکتریایی و قارچی می باشد (Groenewegen and Heptinstall 1992).



شکل ۴- نمودار مقایسه درصد اسانس در بابونه کبیر در شرایط بدون تنش (EC=3.2) و تنش شوری ملایم (EC=6.1)



شکل ۵- نمودار مقایسه درصد ماده مؤثره در بابونه کبیر تحت شرایط بدون شوری (EC=3.2) و تنش شوری ملایم (EC=6.1)

تحقیقات نشان داده است که یکی از مهم ترین عوامل تأثیرگذار در میزان متابولیت های ثانویه موجود در گیاهان، تنش های محیطی اعمال شده بر آنها است. در حقیقت یکی از مهم ترین وظایف

در گزارش دیگری از (Majdi et al. 2014) عنوان شده است که همبستگی مثبتی بین میزان پارتنولید و رونوشت ژن TpGAS وجود دارد به طوری که میزان بالای بیان ژن TpGAS به همراه بیشترین میزان پارتنولید در کرک های غده های بابونه کبیر مشاهده شده است که این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق همسویی نشان می دهد. کرک های ترشخی به عنوان محل اصلی بیوسنتز و تجمع پارتنولید عمل می کنند. علاوه بر این القای تتراپلوییدی در بابونه کبیر نشان داده است که ژنوتیپ تتراپلویید نسبت به ژنوتیپ دیپلویید مشتق شده دارای میزان بیشتری از پارتنولید در برگ و گل می باشد که این افزایش باتوجه به داده های به دست آمده می تواند در اثر افزایش بیان ژن TpGAS باشد.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، شرایط تنشی بر بیان ژن مسیر بیوسنتزی پارتنولید و همچنین بر میزان پارتنولید تولید شده در برگ های گیاه بسیار مؤثر بوده، به طوری که بیشترین بیان ژن مورد مطالعه و بیشترین میزان پارتنولید در تیمار شدید تنش شوری و متوسط مشاهده شد. بنابراین تنش شوری را می توان به عنوان یک القا کننده مثبت بر تولید ماده مؤثره پارتنولید در نظر گرفت.

بررسی میزان درصد اسانس در شرایط تنش شوری ملایم و بدون تنش

طبق نتایج پژوهش حاضر، بازده اسانس گیاه مورد مطالعه (در برگ) در شرایط بدون تنش و شرایط تنش ملایم (EC=6.1) به ترتیب ۰/۴۹ و ۰/۶۶ درصد به دست آمد.

نتایج حاصل از آنالیز GS/MC اسانس برگ در شرایط تنش شوری و شرایط بدون تنش

نتایج حاصل از آنالیز مواد مؤثره اسانس برگ در جدول ۲ آورده شده است. مطابق این جدول camphor و α-pinene از مهم ترین ترکیبات شناخته شده در برگ های گیاه تحت تیمار شوری ملایم بود، در حالی که در شرایط بدون تنش piperitone و α-terpinylacetate میزان بیشتری را به خود اختصاص دادند. طبق شکل ۴ درصد اسانس در شرایط تنش ملایم بیشتر از شرایط بدون تنش بود (نه لزوماً در همه موارد). نتایج HPLC نشان داد که این مواد (کامفور، کریزانتیل استات، کامفن، پی سیمن و بورنیلاستات و مطابق جدول ۲) در عصاره بابونه کبیر موجود بود

بین سطح تنش اعمال شده روی سلول‌ها و درصد اسانس در بافت‌های گیاهی وجود دارد. افزایش درصد اسانس ممکن است به دلیل تغییر در بیوسنتز اسانس تحت تنش و محدود شدن سطح برگ‌ها باشد که می‌تواند دلیل متراکم‌تر شدن غدد ترشحی اسانس در مقایسه با برگ‌های تحت شرایط غیر تنش باشد. همچنین در دو گیاه ریحان و نعنا گزارش شده که زیاد بودن تراکم غده‌های مترشح اسانس در اثر کاهش سطح برگ ناشی از تنش، باعث تجمع بیشتر اسانس می‌شود (Farzaneh et al. 2010). Khalid Hendawy and Khalid (2005) نیز به نتایج مشابهی در گیاه مریم گلی اشاره کرده‌اند. در توضیح افزایش درصد اسانس در شرایط تنش می‌توان گفت که چون میزان متابولیت‌های اولیه گیاه در شرایط تنش کاهش می‌یابد گیاه با تنش مواجه می‌شود، و چون تولید متابولیت‌های ثانویه نوعی سازوکار دفاعی در شرایط نامساعد محیطی هستند تولید آن‌ها در گیاه افزایش می‌یابد (Archangi 2011).

متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش محافظتی آن‌ها در شرایط تنش است. این ترکیبات به گیاهان کمک می‌کنند تا بتوانند در مقابل عوامل مزاحم خارجی (مانند آفات و پاتوژن‌ها) و شرایط نامساعد محیطی مقاومت کنند و به حیات خود ادامه دهند. شواهد زیادی مبنی بر افزایش چند برابری متابولیت‌های ثانویه تحت تنش‌های محیطی وجود دارد، اما برخی تحقیقات نیز نشان می‌دهد که این تأثیر همیشگی نیست و در مواردی حتی کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط تنش‌های محیطی دیده می‌شود (Ramakrishna and Ravishankar 2011). شرایط تنش می‌تواند کمیت و کیفیت اسانس را تغییر دهد (Hay 1993). در گیاهان دارویی و معطر، شوری ممکن است در برخی از ترکیبات و عملکردهای متابولیت‌های ثانویه اثر معنی داری داشته باشد (Petroopoulos et al. 2008). Bernstein et al. (2009) در آزمایشی مشابه روی ریحان نشان داده‌اند که با افزایش شوری، انباشت اسانس در بافت‌های گیاه افزایش پیدا می‌کند. آن‌ها بیان کرده‌اند که یک همبستگی مثبت

جدول ۲- نتایج آنالیز مواد مؤثره اسانس برگ بابونه کبیر در شرایط بدون تنش ($EC=3.2$) و شوری ملایم ($EC=6.1$)

ماده مؤثره	درصد ماده مؤثر بدون تنش	درصد ماده مؤثر تنش شوری (ملایم)
spathulenol	۰/۲	۰/۰
β - bairbonene	۵/۶۱	۸/۱۶
α - copaene	۲/۶	۰/۰
pinocarvone	۲/۰۶	۰/۰
cisa - erpineol	۰/۶۱	۰/۰
α - bisabolol	۱/۰۱	۰/۳۷
α - bisabolol oxide B	۲/۵۱	۱۰/۵۲
germacrene D	۰/۵	۰/۵
β - farnesene	۱/۰۳	۰/۱۶
α - terpinylacetate	۲۸/۳۶	۰/۴
piperitone	۳۳/۳۵	۲/۲
pinocarvone	۰/۰	۰/۸
camphor	۱۱/۵	۵۳/۳۲
γ - terpinene	۰/۴۴	۰/۳۳
1,8-cineole	۰/۸۲	۱/۶
p-cymene	۰/۸۷	۱/۶۲
α - phellandrene	۱/۰	۱/۵۵
β - pinene	۱/۰	۰/۲
α - pinene	۲/۸۱	۱۷/۶۷
α - thujene	۲/۹	۰/۹
tricyclene	۱/۴	۰/۷

منابع

Archangi A (2011) Investigating the effects of salinity on germination and vegetative growth of two medicinal herbs of basil and Fenugreek. M.Sc. thesis, Shahrekord University. (In Farsi).
Bernstein N, Kravchik M, Dudai N (2009) Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Osimumbasilicum*) in relation to alteration of morphological development. *Annals Applied Biology* 156:167-177.

Bettaieb I, Zakhama N, Wannes WA, Kchouk ME, Marzouk B (2008) Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae* 120:271-275.
Brown AMG, Edwards CM, Davey MR, Power JB, Lowe KC (1997) Effects of extracts of *Tanacetum* species on human polymorphonuclear leucocyte activity *in vitro*. *Phytotherapy Research* 11:479-484.

- Cretnik L, Skerget M, Knez Z (2005) Separation of parthenolide from feverfew: performance of conventional and high-pressure extraction techniques. *Separation and Purification Technology* 41:13-20.
- Farzaneh A, Ghani A, Azizi Arani M (2010) Effect of water stress on appearance characteristics, function and essence percentage in the basil plant (*Keshkeni luvelou cultivar*). *Journal of plant Production Researches* 2:10-18. (In Farsi).
- Groenewegen WA, Heptinstall S (1992) Progress in the medicinal chemistry of the herb, feverfew. *Progress in Medicinal Chemistry* 29:217-238.
- Hay RKM (1993) Physiology. In: *Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production*, eds., Hay R.K.M. and P.G. Waterman. Longman, England 23-46.
- Khalid Hendawy S F, Khalid A (2005) Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. *Journal of Applied Science Research* 1:147-155.
- Khorasani Nejad S, Soltanlou H, Hadian J, Atashi S (2016) Effect of Salinity on Some Appearance, Quantitative and qualitative characteristic of essence on *Lavandula angustifolia* Miller. *Journal of Horticultural Science* 30:209-216. (In Farsi).
- Majdi M, Karimzadeh G, Malboobi MA (2014) Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Biologiaplantarum* 58:379-384. (In Farsi).
- Pareek A, Suthar M, Rathore GS, Bansal V (2011) Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacogn Review* 5:103-110.
- Parvin N, Samani RA, Shahinfard N, Reissi S, Alibabaie Z, Asgari A (2012) Effect of alcoholic extract of *Tanacetum parthenium* on acute pain in rat. *Journal of Qazvin University, Medical of Science*. 16:15-21. 2012
- Petropoulos SA, Daferera D, Polissiou MG, Passam HC (2008) The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Phytochemistry* 115:393-397.
- Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6:1720-1731.
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemistry of Journal* 295:517-524.
- Sharopov FS, Setzer WN, Isupov SJ, Wink M (2015) Composition and bioactivity of the essential oil of *Tanacetum parthenium* from a wild population growing in Tajikistan. *AJEONP* 2:32-4.
- Singh G, Singh G, Singh P, Parmar R, Paul N, Vashist R, Kumar Swarnkar M, Kumar A, Singh S, Kumar Singh S. Kumar S (2017) Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in *Stevia rebaudiana* Bert. *Scientific Reports* 7:11-835.
- Williams CA, Hoult JRS, Harborne JB, Greenham J, Eagles J (1995) Biologically-active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* 38:267-270.
- Zeng QP, Zeng X.M, Yang RY, Yang XQ (2011) Singlet oxygen as a signaling transducer for modulating artemisinin biosynthetic genes in *Artemisia annua*. *Biology of Plant* 55:669-674.