Jeld-Darooei-21-2.qxd 2005/09/13 11:52 Page 1

جمهوری اسلامی ایران
وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

فصلنامهٔ پژوهشی
تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

شماره پیاپی ۲۸ **جلد ۲۱ شمارهٔ۲ سال ۱۳۸٤**

فهرست مطالب

اثرضد میکربی اسانس گیاه *Ammi visnaga* (L.) Lam بر برخی از باکتریهای فلور دهان .. ۱۳۹
زهرا آبروش، احمد مجد، محمد باقر رضایی و صدیقه مهرابیان
مطالعه تاثیر سرمای مصنوعی و طبیعی بر روی برخی شاخص های مورفولوژیک و فیزیولوژیک ارقام زیتون ۱٤۹
علی سلیمانی، حسین لسانی و سید رضا طبائی عقدایی
بررسی برخی ویژگیهای اکولوژیکی گونه دارویی *Zataria multiflora* Boiss. در استان هرمزگان ۱٦۱
رحمان اسدپور و محمدامین سلطانی پور
تاثیر محل جمع آوری و تیمارهای پیش رویشی بر روی صفات جوانه زنی بذر گونه دارویی *Zhumeria majdae* Rech. f. & Wendelbo ۱۷۵
عبدالحمید حاجبی و محمد امین سلطانی پور
بررسی ویژگیهای رویشگاهی و برخی ترکیبهای شیمیایی گیاه *Ferula gumosa* Boiss در استان قم. ۱۹۵
سید مهدی ادنانی، حسین بشری و حسین باقری
بررسی تأثیر محلول پاشی کود نیتروژن‌دار بر عملکرد گیاه دارویی *Melissa officinalis* L. تحت شرایط گلخانه‌ای ۲۱۳
بهلول عباس‌زاده، ابراهیم شریفی عاشورآبادی، محمدرضا اردکانی و فرزاد پاک‌نژاد
استخراج و تعیین میزان ترکیب اولئوروپین در پسآب حاصل از شستشوی میوه *Olea europa* L. ۲۲٤
کامکار جایمند، محمد باقر رضایی و اکبر نجفی آشتیانی
مطالعه تنوع موجود در صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) جمع‌آوری شده از شش استان مرکزی کشور ۲۳۳
سیدرضا طبائی عقدائی، ساسان فرهنگیان، علی اشرف جعفری و محمدباقر رضایی
بررسی اثرتیمارهای زخمی کردن، آبسیزیک اسید و سالیسیلیک اسید روی تولید پارتنولید و فعالیت آنتی اکسیدان در گیاهچه های ریزازدیادی شده وکالوس گیاه *Tanacetum parthenium* L. ۲٤۸
سمان عاکف، فرانسواز برنارد، حسین شاکر و علیرضا قاسمپور
بررسی میزان اسانس گیاه *Melissa officinalis* در طی دوره رشددر دومنطقه ارسباران و ملکان ۲٦۷
یوسف ایمانی

ISSN: 1735-0905

فصلنامهٔ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۱ شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۶۵-۲۴۸، (۱۳۸٤)

بررسی اثرتی‌مارهای زخمی کردن، آبسی‌زی‌ک اسی‌د و سالی‌سی‌لی‌ک اسی‌د روی تولی‌د پارتنولی‌د و فعالی‌ت آنتی اکسی‌دان در گی‌اهچه های ری‌زازدی‌ادی شده وکالوس *Tanacetum parthenium* L.

سمانمه عاکف[۱]، فرانسواز برنارد [۱]، حسین شاکر[۱] و علیرضا قاسم پور[۲]

چکیده

هدف این تحقیق بررسی میزان تولید پارتنولید و فعالیت آنتـی اکـسیدان در کـشت کالوس و گیاهچه های ریزازدیادی شده گیاه *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. تیـره Asteracae تحـت اثـر تیمارهـای زخمـی کـردن (wounding) و دو فیتوهورمون استرس آبسیزیک اسید و سالیسیلیک اسید بود. به این منظور بذر گیـاه در محیط MS/4 با کل ویتامین ها کشت شده و قطعات ساقه ای گیاهچـه هـای حاصـل روی محیط MS با هورمونهای (۰/٥٤ µM) NAA و (٤/٤٤ µM)BAP کشت داده شد. تیمارهای زخمی کردن ، آبسیزیک اسید و سالیـسیلیک اسـید روی قطعـات جـدا کشت(جوانه انتهایی با گره اول) حاصل از گیاهچه های ۲ ماهه ریزازدیـادی شـده بـه مدت ۱۰ ساعت در محیط مایع انجام شد. تحلیل مقدار پارتنولید در عصاره گیاهچه ها توسط HPLC انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدان به صورت فعالیت کیفـی پراکـسیداز و توسط الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ارزیابی شد. کالوس از قطعـات برگـی گیاهچـه هـای حاصـل از بـذر در محـیط MS بـا ($۲ mg.l^{-1}$) NAA و ($۰/٥ mg.l^{-1}$) BAP

---

۱ – گـروه زیـست شناسـی، دانـشکده علـوم، دانـشگاه شـهید بهـشتی ، پـست الکترونیکـی sequrity2003@yahoo.com
۲ – پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

بدست آمد. کالوسهای یک ماهه به محیط MS مایع با تیمارهای آبسیزیک اسید، سالیسیلیک اسید و دی متیل سولفوکسید (DMSO) انتقال یافته و پس از یک هفته مقدار پارتنولید و فعالیت کیفی پراکسیداز در آنها طبق روش فوق اندازه گیری شد. میزان پارتنولید بدست آمده در گیاهچه های ریزازدیادی شده در این تحقیق برابر ۰/۰۰۲۸۳ ± ۰/۰۰۸٦۳ بود، در حالی‌که تیمار زخمی کردن با سالیسیلیک اسید کمترین مقدار پارتنولید و بیشترین میزان رشد را در گیاهچه ها ایجاد کرد. تولید پارتنولید در تیمارها با افزایش رشد کاهش یافت. مقدار پارتنولید در کالوس میان تیمارها اختلاف معنی دار نداشت و نسبت به گیاهچه کمتر بود. نتایج الکتروفورز یک باند اضافی درتیمار زخمی کردن نشان داد. باندهای آنیونی از کاتیونی قویتر بودند. ولی میان باندهای الکتروفورزی بافت کالوس هیچ تفاوتی مشاهده نشد. بین میزان تولید پارتنولید در بافتهای گیاهی با فعالیت کیفی پراکسیداز رابطه‌ای مستقیم مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *Tanacetum parthenium* L. ، پارتنولید، فعالیت آنتی اکسیدان، آبسیزیک اسید، سالیسیلیک اسید، زخمی کردن، دی متیل سولفوکسید

مقدمه

گیاه *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. گیاهی است دارویی که تاریخی طولانی در استفاده در طب سنتی دارد (Dermarderosian، ۲۰۰۱). متابولیتهای ثانویه گیاه شامل سزکوئی ترپن لاکتونها، گلیکوزیدهای فلونوئیدی، منوترپنها و ترکیبهای دیگر از جمله پلی استیلنها، پیرترین[1]، ملاتونین[2]، تاننها و موسیلاژ است (Kemper، ۱۹۹۹). سزکوئی ترپن لاکتونها از فراوانترین ترکیبهای گیاه بوده و در میان آنها پارتنولید که جزء گروه ژرماکرانولیدها[3] است، تا ۸۵٪ محتوی سزکوئی ترپن لاکتونی گیاه را تشکیل داده و مسئول فعالیتهای بیولوژیکی گیاه است. پارتنولید در بخشهای هوایی گیاه (گل، برگ، ساقه) ترکیب می شود، ولی ریشه ها یا فاقد این ترکیب بوده و یا مقدار بسیار جزیی از آنرا را تولید می کنند (Aljacic *et al*، ۲۰۰۰، Kemper، ۱۹۹۹)

پارتنولید مانع تجمع پلاکتها و ترشح سروتونین و سایر ترکیبهای التهاب زا از پلاکتها می گردد. این ترکیب همچنین اثر ضد اسپاسم داشته و حساسیت و واکنش عضلات صاف دیواره رگهای خونی مغز را نسبت به بعضی ترکیبها از جمله سروتونین[4] و پروستاگلندینها[5] از بین می برد که در نتیجه همه این اثرات باعث بروز اثر پیشگیری کننده از میگرن می شوند (Dermarderosian، ۲۰۰۱). یکی دیگر از اهداف پارتنولید نیتریک اکساید سنتتاز در سیستم عصبی مرکزی است و مانع آزادسازی NO می گردد. اثر ضد میگرن آن تا حدی نیز به این اثرش برمی گردد (Fiebich *et al*، ۲۰۰۲). به رغم خصوصیات بیولوژیکی زیادی که پارتنولید نشان می‌دهد و تحقیقات فارماکولوژیکی گسترده درباره آن، سوالات زیادی در مورد سازوکار عمل و ارتباط بین ساختار شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی آن حل نشده باقی مانده است. به دلیل اثرات دارویی زیادی که پارتنولید نشان می‌دهد و نیز به دلیل اینکه ترکیب شیمیایی آن مشکل می باشد، پیدا کردن روشی برای افزایش تولید آن در گیاه مفید بنظر می رسد.

1- Pyrethrin
2- Melatonin
3- Germacranolde
4- Serotonin
5- Prostaglandin

هدف ما نیز در این تحقیق بررسی اثر تیمارهـای زخمـی کـردن و دو فیتوهورمـون تنش آبسیزیک اسید و سالیسیلیک اسـید روی میـزان تولیـد پارتنولیـد و فعالیـت آنتـی اکسیدان و ارتباط احتمالی آنها در کشت کالوس و گیاهچه های ریزازدیادی شـده گیـاه بابونه گاو چشم می باشد.

مواد و روشها

ماده گیاهی

بذر گیاه از مزرعه تحقیقاتی و پژوهشی پژوهشکده گیاهان دارویـی دانـشگاه شـهید بهشتی جمع آوری شد. گیاهچه های استفاده شده در تحقیقات از کشت بذر در شیـشه بدست آمدند. محیط کشت استفاده شده جهت کشت بذر، محیط MS/4 با کل ویتـامین ها و pH=5.8 بود.

کشت قطعه جداکشت و تولید گیاهچه

محیط اسـتفاده شـده، محـیط MS حـاوی هورمونهـای (۰/٥٤ µM) NAA و (µM ٤/٤٤) BAP بود (Stojakowska & Kisiel، ۱۹۹۷). قطعات ساقه ای حاوی یک یـا دو گره بریده شده و به حالت عمودی در محیط کشت قرار داده شدند.

کشت کالوس

محیط کشت اسـتفاده شـده، محـیط MS حـاوی هورمونهـای (۲ $mg.l^{-1}$) NAA و (۰/٥ $mg.l^{-1}$) BAP بود (Brown *et al*، ۱۹۹٦). برگها از گیاهچه های حاصل از کـشت بذر گرفته شـده و در قطعـات ۰/٥ cm x ۰/٥ cm بریـده شـدند. روی سـطح فوقـانی قطعات برگی با تیغ اسکالپر چند خراش کوچـک ایجـاد شـد، سـپس برگهـا بـرعکس،

طوری که سطح فوقانی آنها در تماس با محیط کشت قرار داشته باشد، روی محیط کشت قرار گرفتند.

اثر تیمارها روی گیاهچه ها

برای اثر تیمارها از قطعات ساقه ای به صورت جوانه انتهایی به همراه گره اول استفاده شد. تیمارها به صورت یک پالس ۱۰ ساعته در محیط MS مایع فاقد هورمونهای NAA و BAP اعمال شدند. سپس قطعات دوباره به محیط جامد انتقال یافته و پس از ۱۰ هفته برداشت شدند. غلظت بکار رفته برای هورمون آبسیزیک اسید $۱۰^{-۷}$ µM و برای هورمون سالیسیلیک اسید ۲۰۰ µM بود. برای اعمال اثر زخمی کردن روی گیاه، برگهای ساقه‌ای بریده شدند.

اثر تیمارها روی کالوس

برای اثر تیمارها روی کالوس، هورمونهای ABA و SA با همان غلظتهای قبلی به تنهایی و همراه با ٦۰ $\mu l.ml^{-1}$ از DMSO به منظور افزایش نفوذ پذیری استفاده شدند. کالوسهای یک ماهه به محیط MS مایع حاوی (۲ $mg.l^{-1}$) NAA و (۰/۵ $mg.l^{-1}$)BAP و تیمارهای مختلف هورمونی انتقال یافته و پس از یک هفته برداشت شدند.

اندازه گیری رشد

جهت اندازه گیری میزان رشد بافت گیاهی، وزن خشک مقدار ۰/۱۰۵ گرم از بافت توسط دستگاه Moisture analyzer تحت اثر درجه حرارت ٦۰ $^{\circ}C$ پس از مدت زمان حدود ۲۰ دقیقه بدست آمد.

استخراج پارتنولید

مقدار ۲۰۰–۵۰ میلی گرم از بافت لیوفیلیز و پودر شده در ۱۰ میلی لیتر استون (HPLC grade) برای ۳ ساعت در $^{\circ}C$ ۲۰ عصاره گیری شد. محلول حاصل توسط کاغذ صافی whatman شماره ۱ صاف شد. مواد باقی مانده روی کاغذ صافی نیز سه بار با استن شستشو شد. در نهایت همه محلولها با هم مخلوط گشتند. حلال استن تبخیر شده و مواد جامد باقی مانده در اتانول (analytical grade) تا غلظت نهایی ۱۰۰–۲۰ میلی گرم وزن خشک در هر میلی گرم محلول حل شد. محلول حاصل با استفاده از فیلتر ۰/۲ µm تحت فشار فیلتر شد. عصاره حاصل جهت تعیین میزان پارتنولید توسط HPLC مورد استفاده قرار گرفت (Brown *et al* ، ۱۹۹٦).

آنالیز HPLC

سیستم HPLC بکار رفته در این تحقیق مدل Well chrom از شرکت Knauer آلمان با پمپ مدل K-1001 و دتکتور UV مدل K-2800 تنظیم شده در ۲۱۰ nm و ستون C-18 به طول ۲۵ cm و قطر ٤ mm می باشد. مرحله متحرک استونیتریل: آب با نسبت (40:60v/v) می باشد. سرعت جریان حلال در ستون $ml.min^{-1}$ ۱/۵ و مقدار نمونه تزریق شده µl ۲۰ بود. محلول استاندارد و عصاره های حاصل از بافتهای گیاهی به دستگاه تزریق گردیدند. زمان بازداری پارتنولید در محلول استاندارد min ۰/۹ ± ۱۰/۵ بود (تصویر شماره ۱–۲).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدان

جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدان در بافتهای گیاهی مورد آزمایش، فعالیت کیفی آنزیم پراکسیداز اندازه گیری شد. برای اندازه گیریهای کیفی، ابتدا پراکسیداز باید توسط محلول بافر استخراج پراکسیداز (Korori، ۱۹۸۹) با pH7 از بافتها خارج شود. فعالیت

کیفی پراکسیداز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید[1] در سیستم بافری ناپیوسته شامل دو نوع ژل رویی[2] و زیری[3] و با ولتاژ 200V به مدت ٤ ساعت اندازه گیری شد. برای ظهور پراکسیداز بر روی ژل از معرف رنگی بنزیدین در محیط بافری با pH4.8 استفاده شد.

تحلیل آماری

آزمایشها در قالب طرحهای کاملاً تصادفی(CRD) و با ۳ بار تکرار انجام شد. جهت مقایسه کلی نتایج حاصل، از تحلیل واریانس (ANOVA) و برای مقایسه دوبدو آنها از آزمون LSD استفاده گردید. تحلیلهای آماری به کمک نرم افزار SPSS9.0 و در سطح معنی داری ۵٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای مختلف روی میزان رشد گیاهچه های ریزازدیادی شده

به منظور بررسی رشد، وزن خشک گیاهچه ها در تیمارهای مختلف آبسیزیک اسید، سالیسیلیک اسید، زخمی کردن، آبسیزیک اسید با زخمی کردن و سالیسیلیک اسید با زخمی کردن همراه با نمونه شاهد اندازه گیری شد (نمودار ۱-۳). طبق نتایج بدست آمده، گیاهچه ها در تیمار سالیسیلیک اسید با زخمی کردن بالاترین میزان رشد را دارا بودند، ولی تیمار سالیسیلیک اسید به تنهایی اثری روی رشد گیاهچه ها نداشته است. در حالی‌که در کشت سلول *Hypericum perforatum* مشاهده شد که سالیسیلیک اسید

[1] PAGE: Poly Acrylamid Gel Electrophoresis
[2] Staking
[3] Resolving

اثر تحریکی روی رشد سلولها داشته است (Walker *et al*، ۲۰۰۲). همچنین در گیاه *Ullucus tuberosus* تیمار سالیسیلیک اسید باعث القاء طویل شدن ساقه، تحریک رشد و افزایش وزن تر بخش هوایی شد (Handro *et al*، ۱۹۹۷). از طرفی اعمال تیمار زخمی کردن در بافتهای گیاهی سبب القاء تقسیم سلولی در آنها می گردد (Taiz & Zeiger، ۲۰۰۲).

میزان تولید پارتنولید در گیاهچه های ریزازدیادی شده

میزان تولید پارتنولید در بخش هوایی گیاهچه های ۱۰ هفته ای تحت تأثیر تیمارهای سالیسیلیک اسید، آبسیزیک اسید، زخمی کردن، سالیسیلیک اسید با زخمی کردن و آبسیزیک اسید با زخمی کردن همراه با نمونه شاهد نسبت به وزن خشک و وزن تربافت گیاهی توسط HPLC مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. بر طبق نتایج حاصل از تحلیل واریانس و LSD، میزان تولید پارتنولید در هر دو حالت وزن خشک و وزن تر گیاهچه ها، بین تیمارها دارای اختلاف معنی دار بود.

میزان تولید پارتنولید در هر گرم وزن خشک گیاه در تیمار زخمی کردن با سالیسیلیک اسید (SA+wounding) کمترین مقدار بود، ولی سایر تیمارها هیچ اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. مقدار پارتنولید در تیمار زخمی کردن بیشترین بوده و نسبت به شاهد اختلاف معنی دار نشان داد. تیمارهای دیگر هیچ اختلاف معنی داری با شاهد نداشتند(نمودار۲-۳).

تأثیر زخمی کردن درگیاه سبب القاء تولید جاسمونیک اسید از مسیر اوکتادکانوئید می گردد. سیگنالینگ جاسمونیک اسید در پاسخ گیاه به استرسها از جمله زخمی شدن، حمله پاتوژنها و اشعه UV مهم است (Weber، ۲۰۰۲)، و نشان داده شده که جاسمونیک اسید و متیل استر آن ترکیبات سیگنالینگ کلیدی هستند که به تجمع

متابولیتهای ثانویه مختلف در پاسخ به استرس منجر می گردند (Walker *et al*، ۲۰۰۲). همچنین در چندین تحقیق دیده شده که کاربرد اگزوژن سالیسیلیک اسید باعث افزایش تولید متابولیتهای ثانویه می گردد، به عنوان مثال افـزودن اسـتیل سالیـسیلیک اسـید بـه کشت درون شیشه ای گیـاه *Catharanthus roseus* اثـرات قابـل تـوجهی روی تولیـد متابولیتهای ثانویه گیاه ازجمله آلکالوئیدها داشته است و احتمالاً تأثیر خـود را از طریـق فعالسازی آنزیم های کلیدی در مسیرهای بیوسنتزی متابولیتهای ثانویه اعمـال مـی کنـد (Cheong *et al*، ۲۰۰۲) ولی همان‌طور که مشاهده شد تیمار سالیسیلیک اسید با زخمی کردن سـبب کـاهش تولیـد پارتنولیـد شـد. تیمـارزخمی کـردن از طریـق سـیگنالینگ جاسمونیک اسید عمل می کند، در حالی‌که جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسـید دارای اثرات متقابل هستند (Pruitt، ۲۰۰۳). پروتئین های القاء شده توسط سالیـسیلیک اسـید در اثر زخمی کردن القـاء نمـی گردنـد و مـسیرهای سـیگنالینگ سالیـسیلیک اسـید و جاسمونیک اسید مستقل از یکدیگر عمل کرده و گروههای متفاوتی از ژنها را فعال می کنند. در سیگنالینگ سالیسیلیک اسید ژنهای فعـال شـده در پاسـخ SAR[1] شـرکت مـی کنند، ولی در پاسخ به JA ژنهایی فعال می‌شوند که حفاظت فوری را فـراهم مـی کننـد (Merkouropoulos *et al*، ۱۹۹۹).

جهت بررسی ارتباط احتمالی بین میزان تولید پارتنولید و میزان رشد در گیاهچه‌هـا، نمودار نقطه‌ای دو متغیر رسم گردید (نمودار ۱-۳). طبق این نمودار نشان داده شـد کـه با افزایش رشد طی تیمارهای مختلف، تولید پارتنولید کاهش یافت، به‌طوری که تیمـار سالیسیلیک اسید با زخمی کردن که باعث ایجاد حداکثر وزن خـشک و تقریبـاً ۳ برابـر کنترل در گیاهچه ها شده بود، کمترین تولید پارتنولید بـه میـزان ۳۱٪ تولیـد در حالـت کنترل را القاء کرد. در حالیکه در گزارشهای پیشین که توسط Brown و همکـارانش در

[1] Systemic Acquired Resistance

سال ۱۹۹٦ ارائه شد، مشاهده گردید که ارتباط مستقیمی بین رشد(وزن تر) ساقه ها با محتوی پارتنولید در غلظتهای مختلف سوکروز وجود دارد که ممکن است به‌دلیل فراهم شدن منبع کربن در محیط باشد. به‌طور کلی رشد نیازمند متابولیسم اولیه در سلولها است و زمانی سلولها در مسیر تولید متابولیتهای ثانویه وارد می گردند که رشد سلول متوقف شده و نیاز بیشتری به متابولیتهای اولیه نباشد.

میزان تولید پارتنولید در کشت کالوس

در مطالعات پیشین در کالوس و سوسپانسیون سلولی این گیاه هیچ پارتنولیدی یافت نشده بود (Brown *et al*، ۱۹۹٦). در حالی‌که در کشت کالوس در تحقیق حاضر تولید پارتنولید در کالوسها دیده شد، علت این اختلاف احتمالاً به‌دلیل تفاوت در سن کالوسها در تحقیقات مختلف است و سن کالوسها در این تحقیق کم بود.

تیمارهای مختلف آبسیزیک اسید، سالیسیلیک اسید، دی متیل سولفوکسید (DMSO)، آبسیزیک اسید با دی متیل سولفوکسید و سالیسیلیک اسید با دی متیل سولفوکسید هیچ اثری روی تولید پارتنولید در کالوسها نداشتند(نمودار ۲-۳)، احتمالاً به این دلیل که کالوسها در محیط مایع هنوز در مرحله لگاریتمی رشد بوده و وارد مرحله ثابت که بهترین مرحله جهت تولید متابولیتهای ثانویه است، نشده بودند و یا به دلیل اینکه توده های سلولی بسیار متراکم بوده و این ترکیبها قدرت کافی برای نفوذ به درون سلولها نداشتند. ممکن است که دی متیل سولفوکسید تولید کل پارتنولید را افزایش داده باشد، ولی به دلیل اثرش روی افزایش نفوذپذیری غشاء سلول، بیشتر پارتنولید تولید شده تحت اثر این تیمار به محیط خارج سلولی ترشح شده باشد، بنابراین اندازه گیری غلظت پارتنولید در محیط کشت مفید خواهد بود. نتایج مشابهی از اثر دی متیل سولفوکسید روی کشت سوسپانسیون سلولی و تولید سزکوئی ترپن لاکتون

تساریک اسید[1] در گیاه *Tessaria absinthioides* بدست آمد. تیمار دی متیل سولفوکسید تولید کل متابولیت را در سلولها افزایش داد، ولی بیشتر این ترکیب در محیط کشت یافت شد. غلظتهای بالاتر از مقداربهینه دی متیل سولفوکسید به علت افزایش بیش از حد نفوذپذیری سلول باعث آسیب به سلول می گردد (Kurina Sanz *et al*، ۲۰۰۰).

براساس نمودار ۲-۳ مشاهده می گردد که تولید پارتنولید در کالوس نسبت به مقدار آن در گیاهچه بسیار کمتر و در میان تیمارها تقریباً ثابت است که علت آن می تواند عدم وجود اندامهای تخصصی برای تولید پارتنولید در کالوسها باشد (Brown *et al*، ۱۹۹٦) در کارهای پیشین انجام شده توسط Stojakowska & Kisiel،۱۹۹۷ نیز مشاهده شد که تولید پارتنولید در گیاهچه ها خیلی بیشتر از کالوس بود. این مسأله ضرورت تمایز بافتی را برای بیوسنتز پارتنولید نشان می دهد.

علت اینکه در تیمارهای اعمال شده روی کالوس و یا گیاهچه پاسخ مطلوب و اختلاف معنی دار با شاهد در میزان تولید پارتنولید بدست نیامد، ممکن است بکار بردن غلظتهای پایین مواد بوده که شدت استرس کافی ایجاد نکرده و یا به‌عنوان مثال شدت جراحت اعمال شده در تیمار زخمی کردن گیاهچه ها و یا غلظت بکار رفته دی متیل سولفوکسید در کالوس و شدت استرس برای ایجاد اختلاف معنی دار کافی نبوده است.

فعالیت کیفی پراکسیداز در گیاهچه های ریزازدیادی شده

براساس تصاویرالکتروفورز ژل پراکسیداز در گیاهچه ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف اعمال شده، در همه تیمارها باندهای آنیونی نسبت به باندهای کاتیونی قویتربودند(تصویر ۱-۳). تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت کیفی آنزیم

[1] TA: Tessaric acid

پراکسیداز شد. سالیسیلیک اسید هورمونی گیاهی است که در تثبیت SAR از طریق افزایش H_2O_2 عمل می کند و باعث مقاوم شدن گیاه در حمله بعدی می شود (Scheel & Wasternack، ۲۰۰۲). تیمار با سالیسیلیک اسید اگزوژن، افزایشی را در سطوح H_2O_2 در بافت گیاهی القاء می کند و این افزایش سیگنالی است در مقابل حمله پاتوژن (Lamb & Dixon، ۱۹۹۷). پراکسیداز دارای یک عمل دوگانه است و علاوه بر اینکه در حذف H_2O_2 عمل می کند، نوع متصل به دیواره آن در تولید ROS در طول حمله پاتوژن برای سمی کردن آپوپلاست عمل می کند (Andrew & Robert، ۱۹۹۷). پیش تیمار کشتهای موز با محلول ۰/۵ mM اسید سالیسیلیک در شرایط طبیعی رشد (۲۲ $^{\circ}C$) فعالیت پراکسیداز را افزایش داد، ولی در شرایط سرما (۵$^{\circ}C$) باعث کاهش فعالیت آن شد (Kang *et al*، ۲۰۰۳). در گیاه ذرت نیز در شرایط مشابه بعضی آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز را فعال کرد (Janda *et al*، ۱۹۹۹). تیمار آبسیزیک اسید نیز باندهای قویتری را در فعالیت کیفی آنزیم نسبت به شاهد ایجاد کرد. آبسیزیک اسید به‌عنوان یک هورمون گیاهی مهم در پاسخ به استرس اسمزی و شوری شرکت دارد و غلظت آن در طول استرس در همه اندامهای گیاهی به‌تدریج بالا می رود. به‌علاوه، کاربرد آبسیزیک اسید در گیاهان پاسخهایی شبیه آنچه از استرس آبی ناشی می شود را باعث می گردد. بعضی پروتئینها در پاسخ گیاه به این استرسها و همچنین کاربرد اگزوژن آبسیزیک اسید کد می شوند، از جمله پروتئین‌های پاک کننده ROS مانند آنزیم پراکسیداز (Smallwood *et al*، ۱۹۹۹) در ژل الکتروفورز در تیمار زخمی کردن یک باند اضافی تشکیل شد که نشان دهنده وجود یک ایزوپراکسیداز جدید است، که این ایزوزیم جدید احتمالاً به فرم متصل به دیواره آنزیم مربوط است، که فعال شده و H_2O_2 تولید شده توسط آمین اکسیداز را در جهت چوبی شدن دیواره مصرف می کند (Scheel & Wasternack، ۲۰۰۲). تیمارهای آبسیزیک اسید با زخمی

کردن و سالیسیلیک اسید با زخمی کردن باندهای ایجاد شده کمرنگ و حتی نسبت به شاهد نیز ضعیف تر بودند(تصویر ۱-۳).

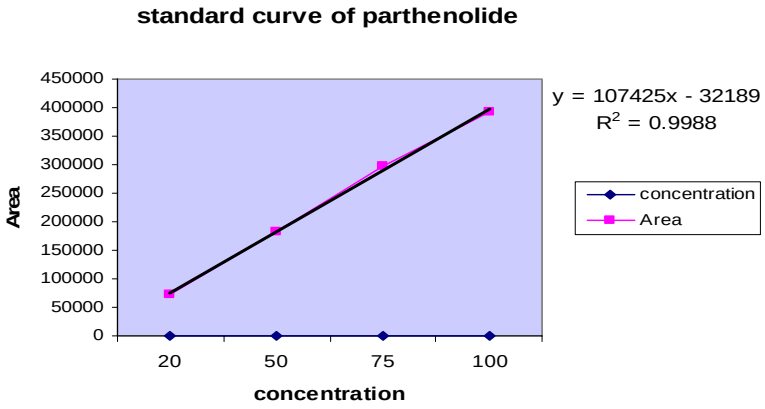
فعالیت کیفی پراکسیداز در کشت کالوس

در ژل الکتروفورز بافت کالوس فقط دو باند تشکیل شد که نشان دهنده کم بودن تعداد ایزوزیم های پراکسیدازی در بافت کالوس می باشد. میان تیمارهای مختلف اعمال شده هیچ اختلافی در مقدار ایزوپراکسیدازهای آنیونی و کاتیونی دیده نشد و هیچ باند جدیدی نیز تشکیل نگردید (تصویر ۱-۳). این به این معنی است که تیمارهای اعمال شده هیچ اثری روی بیان و فعالیت آنزیم نداشته اند و هیچ ایزوزیم جدیدی سنتزنشده است.

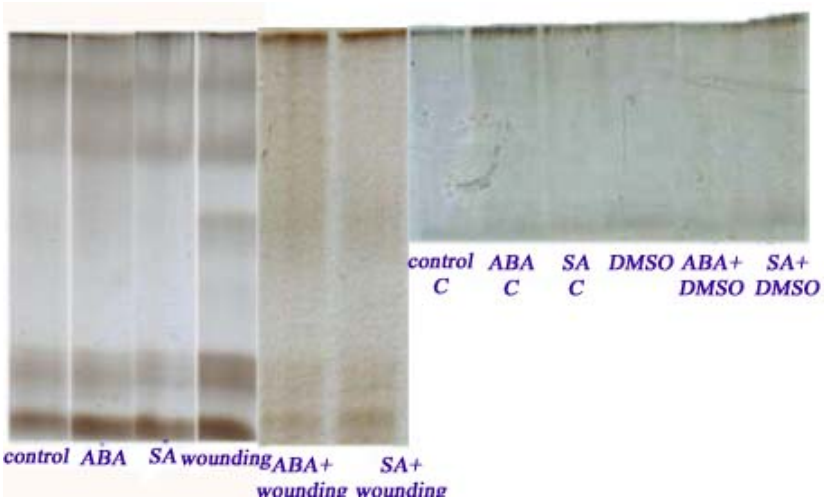
در نهایت با مقایسه ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز و مقدار پارتنولید در گیاهچه‌های ریزازدیادی شده و کالوسهای حاصل از گیاه بابونه گاو چشم مشاهده شد که فعالیت کیفی آنزیم پراکسیداز یا به عبارتی فعالیت آنتی اکسیدان در گیاه با میزان تولید پارتنولید در آن کاملاً مطابقت داشته و رابطه‌ای مستقیم نشان می‌دهند.

جدول شماره ۱-۲- محلول استخراج پراکسیداز (Korori، ۱۹۸۹)

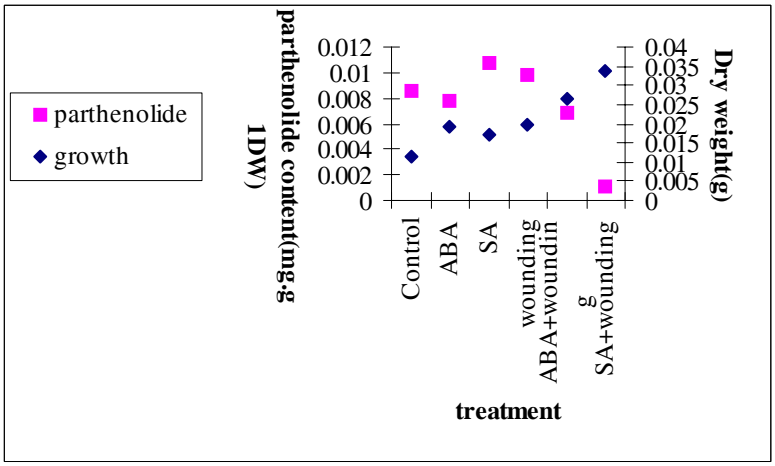
ترکیب	وزن گرم	غلظت (mM)
تریس (Tris-HCl)	۱/۲	۸
اسید آسکوربیک	۲	۱۰
بوراکس (Di Sodium tetraborat)	۳/۸	۱۰
کلرید سدیم (NaCl)	۲	۳۰
$EDTA\text{-}Na_2$	۲	۵
پلی اتیلن گلیکول 4000	۵۰	



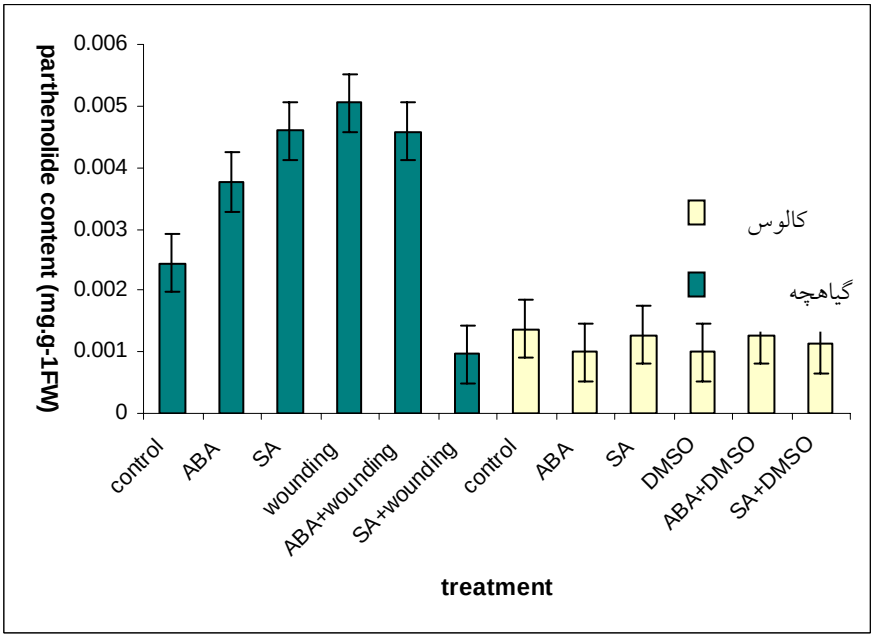
تصویر شماره ۱-۲- منحنی استاندارد پارتنولید



تصویر شماره ۱-۳- تأثیر تیمارهای مختلف روی تنوع ایزوپراکسیدازی در گیاهچه و کالوس



نمودار۱-۳- ارتباط رشد با میزان تولید پارتنولید نسبت به وزن خشک بافت گیاهی



نمودار۲-۳- میزان تولید پارتنولید تحت اثرتیمارهای مختلف در گیاهچه و کالوس

منابع

- Aljancic, I., Vajs, V., Bulatovic, V., Menkovic,N. and Milosavljevic, S., 2001. Parthenolide from the aerial parts of *Tanacetum parthenium*. Biochemical Systematic and Ecology, 29: 655-657.
- Andrew, C.A. and Robert, F., 1997. Two distinct sources of elicited Reactive Oxygen Species in tobacco epidermal cells. Plant Cell, 9: 1559-1572.
- Brown, A. M. G., Lowe, K. C., Davey, M. R. and Power, J. B., 1996. Feverfew (*Tanacetum parthenium*): tissue culture and parthenolide synthesis. Plant Science 116: 223-232.
- Cheong, Y. H., Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. and Luan, Sh., 2002. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic stress and HormonalResponses in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 129: 661-677.
- Dermarderosian, A., 2001. A Guid to Popular Natural Products. Facts & Comparisons. Wolters Kluwer Company. pp. 90-92.
- Fiebich, B. L., Lieb, K., Engels, S. and Heinrich, M., 2002. Inhibition of LPS-induced P42/44 MAPkinase activation and iNOS/NO synthesis by parthenolide in rat primary microglial cells, Journal of Neoroimmunology, 132: 18-24.
- Handro, W., Mello, C.M., Manzano, M. A. and Floh, E. I. S., 1997. Enhancement of stem elongation and flower bud regeneration by salicylic acid. R. Bras. Fisiol. Veg, 9: 139-142.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Páldi, E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta, 208: 175-180.
- Kang, G., Wang, Ch., Sun, G. and Wang, Zh., 2003. Salicylic acid changes activities of H_2O_2-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environmental and Experimental Botany 50: 9-15.
- Kemper, K. J., 1999. Feverfew (*Tanacetum parthenium*). WWW.mcp.edu/herbal/default.htm. and WWW.childrenshospital.org/holistic
- Korori, S.A., 1989. Gel Electrophoretische and spectraphotomet rishe unteruchungen zum ein slussder temperature jvs struktur and okapivitat der amylase and peroxidase isoenzyme verschicdener bsymarten. Ph.D. Thesis, University Sur Boden kalture Win.

- Kurina Sanz, M., Hernandez, X. E. and Tom, C. E., 2000. Enhancement of tessaric acid production in *Tessaria absinthioides* cell suspension cultures. Plant Cell Report, 19: 821-824.
- Lamb, C. and Dixon, R. A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Anna. Rev. Plant Physil. Plant Mol. Biol., 48: 251-275.
- Merkouropoulos, G., Barnett, D. C. and Shirsat, A. H., 1999. The *Arabidopsis* extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic acid, and codes for a protein with unusual motifs. Planta, 208: 212-219.
- Pruitt, P., 2003. Outline for a Comprehensive Theory of Plant Hormones. WWW.pruittfamily.com/paul/plants.
- Scheel, D. and Wasternack, C., 2002. Plant Signal Transduction. Oxford University Press. 320p.
- Smallwood, M. F., Calvert, C. M. and Bowles, D. J., 1999. Plant Responses to Environmental Stress. BIOS Scientific Publishers, Oxford. 224p.
- Stojakowska, A. and Kisiel, W., 1997. Production of parthenolide in organ cultures of feverfew. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 159-162.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 2002. Plant Physiology. Sinauer., 690p.
- Walker, T. S., Bais, H. P. and Vivanco, J. M., 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspention cultures of *Hypericum perforatum* L. (st. John's wort). Phytochemistry, 60: 289-293.
- Weber, H., 2002. Fatty acid derived signals in plants. TRENDS in Plant Science, 7: 217-224.

Vol. 21 No. (2), 123-129 (2005)

Investigation of Parthenolide Production and Antioxidant Defence in Tissue Culture of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) under Wounding, Abscisic acid and Salicylic acid Treatments

S. Akef[1], F. Bernard[1], H. Shaker[1] and A. Ghasem poor[2]

Absract

In this research investigation on parthenolide production and antioxidant defence in callus culture and micropropagated plantlets of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. Family: Asteraceae) wounding, abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) treatments were done.

For this purpose, seeds were cultured on MS/4 medium with the whole vitamins, and shoot explants of seedlings, with shoot tip and without shoot tip and also, were cultured on MS medium supplemented with NAA (0.54µM) and BAP (4.44µM). The growth of plantlets was computed as dry weight.

For biochemical investigations, shoot tip explants were cut from two months old plantlets and treated with ABA, SA and wounding (leaves discarded) for 10 hours in MS liquid medium. Parthenolide content was measured by HPLC. Antioxidant defense was evaluated as qualitative peroxidase activity.

Callus tissues were obtained from leaf explants of seedlings, in MS medium supplemented with NAA (2mg.L^{-1}) and BAP (0.5mg.L^{-1}). One month old calli were transferred to liquid medium with ABA, SA and DMSO treatments. After one weak, parthenolide content and peroxidase activity were measured as above. Parthenolide content of control plantlets in this investigation was 0.00863±0.00283, but SA + Wounding treatment in plantlets showed the less parthenolide content and the maximum dry weight. Parthenolide production in treatments was decreased as the growth increased. In callus tissues, parthenolide content was not different significantly between treatments, and approximately half of the plantlets. Qualitative variation in antioxidant defense was shown by electrophoretic patterns and we had an extra band in wounding treatment in micropropagated plantlets. Anionic bands were stronger than cationic bands. Electrophoretic bands had no difference in callus tissues.

Key words: feverfew, *Tanacetum parthenium,* Parthenolide, Antioxidant defense, HPLC

1- Biology department, Faculty of Science, Shahid Beheshti University
2- Institute of Medicinal Plants, Shahid Beheshti University

Islamic Republic of Iran
Ministry of Jihad-e-Agriculture
Agricultural Research and Education Organization
Research Institute of Forests and Rangelands

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants

Vol. 21 No.(2), 2005

Contents

Antimicrobial Effect of *Ammi visnaga* Essential oil on Mouth Microflora..... 280
Z. Abravesh, A. Majd, M. B. Rezaee and S. Mehrabian
Influence of Natural and Artificial Freezing Temperature on some Morphological and Physiological Index of Olive Plant 279
A. Solimani, H. Lessani and S. R. Tabaei-Agdaei
Study of some Ecological Characteristics of *Zataria multiflora* in Hormozgan Province..... 278
R. Asadpoor and M. A. Soltanipoor
Effect of Collection Area and Pre-treatments on Germination of *Zhumeria majdae*. Rech. f. & Wendelbo Seed 277
A. H. Hajebi and M. A. Soltanipoor
Investigation of Provenance Properties and some Chemical Components of *Ferula gumosa* Boiss. in Qom Province..... 276
S. M. Adnani , H. Bashari and H. Bagheri
Effect of Spraying of Nitrogen Fertilizer on *Melissa officinalis* L. Yield in the Greenhouse Condition 275
B. Abbaszadeh, E. Sharifi Ashourabadi, M. R. Ardakani, M. B. Rezaee and F. Paknejad
Extraction and Identification of Oleuropein in Residue Waste Water of Washing Fruits of *Olea europaea* L. 274
K. Jaimand, M. B. Rezaee and A. N. Ashtiany
Evaluation of Morphological Variation in *Rosa damascena* Mill. Genotypes from Six Central Provinces of Iran 273
S. R. Tabaei-Aghdaei, S. Farhangian A. A. Jafari and M. B. Rezaee
Investigation of Parthenolide Production and Antioxidant Defence in Tissue Culture of feverfew (*Tanacetum parthenium*) under Wounding, Abscisic acid and salicylic acid Treatments..... 272
S. Akef, F. Bernard, H. Shaker and A. Ghasem poor
Investigation on Essential Oil Content of *Melissa officinalis* during Growth Period in Malekan and Arasbaran. 271
Y. Imani

ISSN: 1735-0905