دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۶، صفحه ۹۶۶-۹۵۶ (۱۳۹۴)

مطالعه تغییر محتوای اسانس و میزان رزمارینیک و کافئیک اسید آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak subsp. *Daenensis*) آلوده به بیمارگر *Rhizoctonia solani* AG2-2 در شرایط درون شیشه

نجما فراهانی[۱]، محسن فرزانه[۲*]، فرزاد نجفی[۳] و حسن رضادوست[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته گیاهان دارویی، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیک: M_farzaneh@sbu.ac.ir

۳- استادیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳

چکیده

متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در واکنش گیاه نسبت به تنش‌های محیطی دارند و در شرایط تنش برخی از این ترکیب‌ها به میزان قابل‌توجهی در گیاه افزایش می‌یابد. در این راستا تأثیر قارچ بیماری‌زای *Rhizoctonia solani* (AG2-2) SBUka2 به‌عنوان الیسیتور در گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak subsp. *Daenensis*) با هدف فهم بهتری از واکنش‌های گیاه به میکروارگانیسم‌ها و امکان افزایش و بهبود کیفیت متابولیت‌های ثانویه آن در شرایط کشت بافت انجام شد. فاکتورهای اندازه‌گیری شده در این تحقیق شامل میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید و تغییرات کمّی و کیفی اسانس آویشن دنایی دو اکوتیپ ایلام و اصفهان بود. نتایج آنالیز به کمک دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) نشان داد که در مقایسه با شاهد، میزان رزمارینیک اسید موجود در گیاه آلوده شده با قارچ در آویشن دنایی اکوتیپ ایلام ۲۶/۸۲٪ و در اکوتیپ اصفهان ۸/۲۵٪ کاهش یافت. همچنین میزان کافئیک اسید در گیاه آلوده شده با قارچ در آویشن دنایی اکوتیپ‌های ایلام و اصفهان به‌ترتیب ۴/۵۱٪ و ۴/۱۶٪ کاهش یافت. نتایج کمّی اسانس نشان داد که در حضور قارچ، بازده اسانس اکوتیپ‌های ایلام و اصفهان به‌ترتیب ۲۰٪ و ۳۳٪ افزایش یافت. همچنین نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) مشخص کرد که آلودگی با قارچ باعث افزایش معنی‌دار برخی ترکیب‌های اسانس ازجمله تیمول و کارواکرول شده، در حالی‌که میزان برخی ترکیب‌های اسانس ازجمله پارا-سیمن و گاما-ترپینن در گیاه آلوده کاهش چشمگیری یافت.

واژه‌های کلیدی: *Rhizoctonia solani*، آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak subsp. *Daenensis*)، میان‌کنش، تغییرات متابولیت‌های گیاه.

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه گیاهی نقش مهمی در بقای گیاهان در اکوسیستم خود دارند و این نقش را به‌صورت‌های مختلفی مانند ایجاد مقاومت گیاه در برابر آفات و بیماری‌ها، جذب گرده‌افشان‌ها و برهم‌کنش با میکروارگانیسم‌های همزیست بروز می‌دهند (Harborne, 2001؛ Dixon, 2001). گیاهان متابولیت‌های ثانویه را به‌عنوان ابزار سازگاری با اوضاع و پدیده‌های مختلف زیست محیطی برای حفاظت از اصل و نسل خود تولید می‌کنند. به همین دلیل زمانی که گیاه در وضعیت‌های اکولوژیکی مختلف قرار می‌گیرد کمّیت و کیفیت مواد ثانوی خود را در جهت سازگاری به این وضعیت‌ها تغییر می‌دهد (Bernath,1986؛ Bernath, 2002).

از طرف دیگر در سال‌های اخیر روشهای بیوتکنولوژی با رویکرد کشت بافت گیاهی در مقیاس انبوه در مقایسه با کشت زراعی گیاه و به‌خصوص گیاهان وحشی، یک روش کارا و مطمئن برای تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشد (Briskin, 2000). قابلیت و سرعت تولید مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد، از این‌رو با کشت سلول‌های گیاهی به روشهای مختلف، بهینه‌سازی شرایط کشت و استفاده از تکنیک انگیزش (Elicitor) می‌توان میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). برخی الیسیتورهای زنده شناخته شده شامل الیگوساکاریدها، گلیکوپروتئین، پپتیدها و فسفولیپیدهای قارچی هستند (Walton & Brown, 1999) که در تغییرات متابولیت‌های ثانویه گیاهان نقش دارند. برخی از این متابولیت‌های ثانویه خاصیت ضدمیکروبی داشته و ممکن است در خود گیاه سالم ذاتاً وجود داشته باشد (phytoanticipins) و یا بعد از درک حضور میکروارگانیسم در گیاه تولید شود (phytoalexins). در شرایط کشت بافت افزایش تولید ترکیب‌های فنلی و ترپنی گیاه در پاسخ به حضور باکتری و قارچ گزارش شده‌است (Bensalim *et al.*, 1998؛ Al-Amier *et al.*, 2005؛ Vitorino *et al.*, 2013). افزایش تولید و تجمع فلاونوییدها، تری‌ترپن‌ها و کومارین‌ها در گیاه در پاسخ به آلودگی توسط قارچ‌های بیمارگر و غیربیمارگر نیز مشخص شده‌است (Naoumkina, *et al.*, 2008؛ Ribera & Zuñiga, 2012) و نقش بسیاری از این ترکیب‌ها در مکانیسم مقاومت القایی گیاهان اثبات شده‌است (Benhamou, 1996).

آویشن دنایی برگ نیزه‌ای (*Thymus daenensis* subsp. *Daenensis*) گیاهی از تیره نعناعیان (Lamiaceae) و بومی ایران می‌باشد که پراکنش آن در ایران عمدتاً در کوه‌های البرز، اطراف تهران، فارس، کرمان، قزوین، همدان، اصفهان، ایلام و ... است (جم‌زاد، ۱۳۸۸). به‌دلیل داشتن تیمول بالا در اسانس و اسیدهای فنولی آزاد به‌ویژه رزمارینیک اسید در عصاره، فعالیت بیولوژیک بالا داشته و در صنایع دارویی و غذایی استفاده آن رو به گسترش است (امیدبیگی، ۱۳۸۳). از این‌رو به‌عنوان یک گزینه مطلوب برای تأمین مواد اولیه گیاهی برای داروهای مبتنی بر تیمول مطرح است.

براساس بررسی‌های بعمل آمده، مطالعه‌ای از تأثیر قارچ‌ها بر القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه آویشن دنایی وجود ندارد. بنابراین مطالعه حاضر در شرایط کشت بافت و با اهداف: ۱) بررسی تغییرات میزان رزمارینیک اسید (rosmarinic acid) و کافئیک اسید (caffeic acid) گیاه دارویی آویشن دنایی در پاسخ به بیمارگر قارچی (*Rhizoctonia saolani* (AG2-2؛ ۲) بررسی تغییرات کمّی و کیفی اسانس گیاه آویشن دنایی در پاسخ به بیمارگر قارچی و ۳) فهم کامل‌تری از واکنش‌های گیاه به میکروارگانیسم‌ها و امکان افزایش اسانس آن انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده و تهیه کلون

در این پژوهش بذر آویشن دنایی از رویشگاه‌های طبیعی آویشن دنایی استان ایلام (صالح‌آباد: ارتفاع از سطح دریا ۴۰۰ متر، ۳۳ درجه و ۳۸ دقیقه عرض جغرافیایی شمالی و ۴۶ درجه و ۲۶ دقیقه عرض جغرافیایی جنوبی) و

اصفهان (سمیرم: ارتفاع از سطح دریا ۲۳۶۰ متر، ۳۱ درجه و ۱۳ دقیقه عرض جغرافیایی شمالی و ۵۱ درجه و ۴۶ دقیقه عرض جغرافیایی جنوبی) تهیه شد. برای نگهداری، بذرهای خشک شده درون پاکت‌های کاغذی قرار گرفت و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریک و خشک نگهداری شد.

برای تهیه کلون، ابتدا بذرهای آویشن دنایی با استفاده از آب جاری شسته شده و پس از ضدعفونی و کشت درون شیشه‌های کشت حاوی محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) به محفظه تاریک (میانگین دمای روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین دمای شب ۲۴ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند (شوریابی، ۱۳۹۱). سپس بذرهای جوانه زده به اتاق کشت (دوره نوری به میزان ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) منتقل شد و بعد از دو هفته اولین واکشت انجام شد. یک گیاه شاداب به‌طور تصادفی انتخاب و به فاصله هر سه هفته یک‌بار واکشت شد.

تهیه جدایه قارچی و نگهداری آن

جدایه قارچی *Rhizoctonia solani* (AG2-2) SBUka2 که قبلاً از ریشه گیاه آویشن دنایی بیمار جداسازی شده بود (حسینی، ۱۳۹۱) از کلکسیون میکروارگانیسم‌های کاربردی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. جدایه مذکور روی بذر گندم کلونیزه شده و داخل ویال‌ها در یخچال نگهداری شد. نگهداری کوتاه‌مدت قارچ‌ها در محیط مورب پی‌دی‌ای (PDA) درون لوله آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام گردید.

مایه‌زنی گیاهچه‌های آویشن با بیمارگر قارچی در شرایط درون شیشه

طبق روش محمودی و همکاران (۱۳۸۳) از حاشیه کشت جوان قارچ روی محیط PDA توسط اسکالپل یک پلاک مربعی به قطر حدود ۰/۵ سانتی‌متر بریده شد و درون شیشه‌های کشت در یک سانتی‌متری کنار گیاهچه‌های کلون روی محیط کشت MS قرار داده شد. هر یک از شیشه‌های کشت در اتاقک رشد با میانگین دمای روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین دمای شبانه ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. دوره نوری به میزان ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم گردید.

بررسی تغییرات فیتوشیمیایی آویشن دنایی در تعامل با قارچ

بررسی تغییرات میزان رزمارینیک اسید و کافئیک اسید گیاه در حضور قارچ

پس از دو هفته از مایه‌زنی گیاهچه‌های آویشن با بیمارگر قارچی در شرایط درون شیشه، اندام هوایی گیاه از درون شیشه‌های کشت جمع‌آوری شد و در آون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های گیاهی خشک شده توسط دستگاه خردکن (tissue lyser) پودر شده و عصاره گیاه با کمک دستگاه پاورسونیک (power sonic) تهیه شد (Baskan *et al*., 2007). بدین‌صورت که به ارلن ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۰/۵ گرم گیاه خشک پودر شده، ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول (۶۰٪) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه پاورسونیک قرار داده شد. محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد و به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. عصاره بدست آمده تا زمان آزمایش در شیشه‌های کوچک تیره رنگ و در دمای ۴°C نگهداری شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد.

ردیابی اسید رزمارینیک و کافئیک اسید به روش پیشنهادی Reich و Schibli (۲۰۰۶) با کمی تغییر انجام شد. سیستم کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (High Performance Thin Layer Chromatography) شامل پیمایش‌گر ۳ به همراه لکه‌گذار لینومات۵ (Linomat 5) و نرم‌افزار وین‌کتس (WinCATs 1.2.2) از شرکت کاماگ (CAMAG, Switzerland) بود. برای شویش صفحات TLC (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany)، فاز متحرک (استون، تولوئن، فرمیک اسید به نسبت ۴:۵:۱) در محل مخصوص (اتاقک عمودی) ریخته

شده و صفحه TLC در داخل اتاقک قرار گرفت. پس از کامل شدن فرایند توسعه، صفحات با پیمایش‌گر در موج ۳۲۷ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. استاندارد رزمارینیک و کافئیک اسید در غلظت‌های ۲۰ تا ۲۰۰ نانوگرم لکه‌گذاری شد و برای ترسیم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تغییرات کمّی و کیفی اسانس گیاه در حضور قارچ

گیاهچه‌های کلون ۱۵ روزه، مطابق با روش ذکر شده قبلی با قارچ مایه‌زنی شد و ظروف شیشه‌ای مایه‌زنی شده به مدت دو هفته در اتاقک کشت نگهداری شدند. در نهایت وزن مشخصی از گیاه آلوده شده با جدایه قارچ بیمارگر *R. solani* برای اسانس‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. شاهد شامل آویشن دنایی تیمارشده با آب مقطر سترون بود.

استخراج اسانس از ماده گیاهی (۱۰–۵ گرم) به روش تقطیر با آب (سفیدکن و رحیمی بیدگلی، ۱۳۸۱) و توسط دستگاه طرح کلونجر (مدل NON-ASBESTOS,MSE از شرکت TOPO) طبق فارماکوپه بریتانیا برای ۳ ساعت انجام شد (British Pharmacopoeia, 1993). اسانس بدست‌آمده به‌وسیله سولفات‌سدیم خشک آبگیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. درصد اسانس نسبت به وزن تر با تشکیل یک تناسب ساده محاسبه گردید.

آنالیز و شناسایی ترکیب‌های اسانس

اسانس‌های بدست آمده از هر دو اکوتیپ گیاهی با دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) مورد شناسایی قرارگرفتند. دستگاه گاز کروماتوگراف واریان مدل سی‌پی ۳۸۰۰ (VARIAN;CP-3800 GC) مجهز به ستون DB-5 به طول ۶۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس با برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه با افزایش دمای ۴ درجه در دقیقه، نوع دتکتور FID با دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس، گاز حامل هلیوم با جریان ثابت ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان بهترین شرایط انتخاب گردید. یک میکرولیتر از اسانس به دستگاه GC تزریق شد و پس از یافتن برنامه‌ریزی مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری (retention time) هر ترکیب، از هر نمونه یک میکرولیتر اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید. دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی از نوع Thermoquest-Finnigan، مجهز به ستون DB-5 به‌طول ۶۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برنامه‌ریزی حرارتی مشابه دستگاه GC، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، گاز حامل هلیوم و دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس بود. شناسایی ترکیب‌ها بر اساس شاخص بازداری (retention index) و مقایسه طیف جرمی آنها با ترکیب‌های پیشنهادی کتابخانه دستگاه انجام شد. درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح انجام گردید (Adams, 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

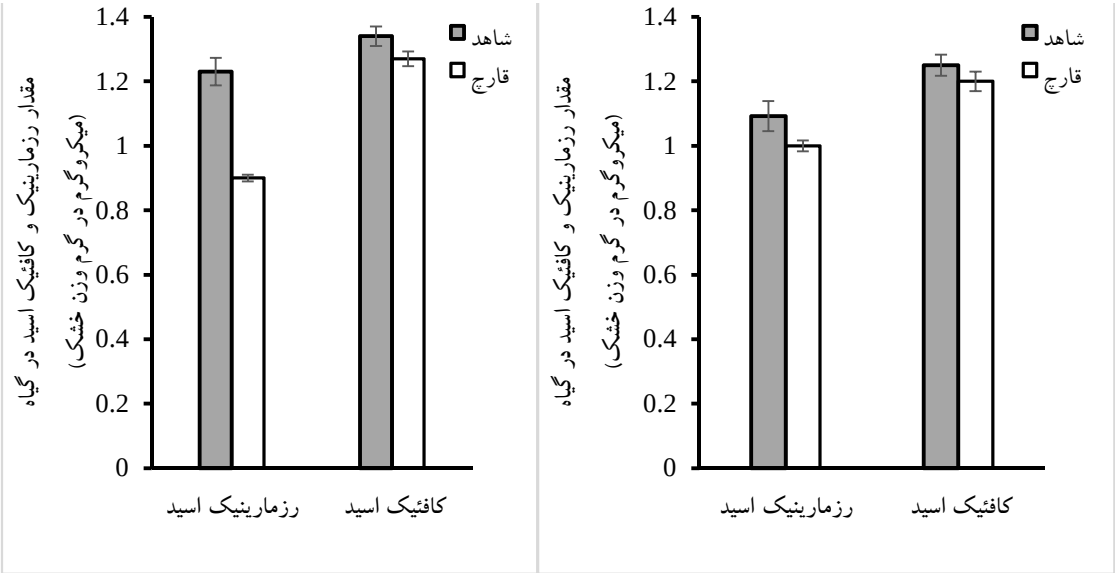
برای تجزیه داده‌ها از دو نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز بهره برده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد. آنگاه برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ یا ۵٪ مقایسه شدند.

نتایج

بررسی میزان تغییر محتوای رزمارینیک و کافئیک اسید در گیاه آلوده به قارچ

میزان رزمارینیک و کافئیک اسید ردیابی شده در گرم وزن خشک گیاه سالم بین ۱/۱ تا ۱/۳ میکروگرم می‌باشد

(شکل ۱). محتوای رزمارینیک موجود در گیاه آویشن دنایی ایلام تیمار شده با قارچ ۲۶/۸۲٪ و در اکوتیپ اصفهان ۸/۲۵٪ نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار یافت. همچنین میزان کافئیک اسید در گیاه تیمار شده آویشن دنایی ایلام ۴/۵۱٪ و در اکوتیپ اصفهان ۴/۱۶٪ کاهش یافت (شکل ۱). در کل محتوای کافئیک اسید و رزمارینیک اسید اکوتیپ ایلام بیشتر از اصفهان بود.



شکل ۱- مقدار رزمارینیک و کافئیک اسید در دو اکوتیپ اصفهان (سمت راست) و ایلام (سمت چپ) در حضور بیمارگر *R. solani*

بررسی تغییرات کمّی و کیفی اسانس گیاه در واکنش به قارچ *R. solani*

هر دو اکوتیپ آویشن دنایی از نظر بازده و کیفیت اسانس در واکنش به قارچ تفاوت معنی‌دار نشان دادند. بازده اسانس حاصل از گیاه آویشن دنایی اکوتیپ اصفهان ۰/۳٪ وزن تر گیاه بود که در حضور قارچ به ۰/۴٪ رسید؛ در حالی‌که بازده اسانس حاصل از گیاه آویشن دنایی اکوتیپ ایلام ۰/۵٪ بود و در حضور قارچ به ۰/۶٪ رسید. به عبارتی حضور قارچ، بازده اسانس آویشن دنایی اصفهان و ایلام را به‌ترتیب ۳۳/۳٪ و ۲۰٪ افزایش داد. نتایج آنالیز GC/MS ترکیب‌های اسانس نشان داد که در دو اسانس آویشن دنایی اکوتیپ ایلام و اصفهان به‌ترتیب ۲۴ و ۲۵ ترکیب شناسایی شد (جدول ۱).

عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس *T. daenensis* عبارت از چهار ترکیب تیمول، کارواکرول، گاما-ترپینن و پارا-سیمن می باشد که مقدار آنها در دو تیپ (اصفهان و ایلام) به‌ترتیب شامل تیمول (۸۱/۷۳٪ و ۷۵/۶٪)، گاما-ترپینن (۳/۲٪ و ۵/۶٪)، پارا-سیمن (۳/۱۵٪ و ۴/۹۹٪) و کارواکرول (۲/۱۹٪ و ۰/۳۸٪) می‌باشد.

جدول ۱- تغییرات ترکیب‌های اسانس آویشن دنایی اکوتیپ‌های اصفهان و ایلام در حضور بیمارگر *Rhizoctonia solani* در شرایط کشت بافت

ترکیب‌ها	شاخص بازداری	ترکیب‌ها در اسانس آویشن دنایی (٪)			
		اکوتیپ اصفهان		اکوتیپ ایلام	
		گیاه سالم	گیاه آلوده	گیاه سالم	گیاه آلوده
α-thujene	۹۲۴	۰/۸۹±۰/۰۰۵۷	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۰/۵۵±۰/۰۳۶۰	۰/۰۵±۰/۰۰۰
α-pinene	۹۳۴	۰/۳۴±۰/۰۱۰۰	tr*	۰/۳۲±۰/۰۲۰۸	tr
camphen	۹۴۶	۰/۰۶±۰/۰۰۰	tr	۰/۱۶±۰/۰۱۵۳	tr
sabinene	۹۶۹	۰/۱±۰/۰۰۵۷	tr	tr	tr
β-pinene	۹۷۴	۰/۲۲±۰/۰۰۰	۰/۰۶±۰/۰۰۰	۰/۲۲±۰/۰۲۶۴	۰/۵۰±۰/۰۱۵۳
myrcene	۹۸۸	۱/۴۲±۰/۰۱۵۲	tr	۰/۷۹±۰/۰۵۶۸	tr
α-phellandrene	۱۰۰۲	۰/۲۰±۰/۰۱۰۰	tr	tr	tr
δ-3-carene	۱۰۰۸	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۰/۰۶±۰/۰۱۰۰	–	–
α-terpinene	۱۰۱۴	۰/۷۴±۰/۰۱۰۰	۰/۱۸±۰/۰۲۰۸	۱/۲۲±۰/۰۲۵۲	۰/۰۷±۰/۰۱۰۰
ρ-cymene	۱۰۲۰	۳/۱۵±۰/۰۰۵۷	۰/۱۳±۰/۰۰۰	۴/۹۹±۰/۱۰۲۶	۰/۱۲±۰/۰۲۰۸
limonene	۱۰۲۴	۱/۵۰±۰/۰۱۱۵	۰/۴۸±۰/۰۲۰۸	۰/۰۶±۰/۰۰۰	۰/۱۵±۰/۰۱۷۳
1,8-cineol	۱۰۲۶	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۰/۰۵±۰/۰۰۰	–	–
γ-terpinene	۱۰۵۴	۳/۲۰±۰/۰۱۵۳	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۵/۶۰±۰/۰۵۱۹	۰/۳۰±۰/۰۱۰۰
Z-sabinene hydrate	۱۰۵۶	۰/۴۲±۰/۰۰۵۷	۱/۴۴±۰/۰۱۱۵	۰/۵۷±۰/۰۱۷۳	۰/۰۵±۰/۰۰۰
linalool	۱۰۹۵	tr	۱/۲۴±۰/۰۱۰۰	۰/۵۰±۰/۰۱۰۰	۰/۰۸±۰/۰۱۵۳
E-sabinene hydrate	۱۰۹۸	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۰/۳۵±۰/۰۰۵۷	Tr	۱/۳۵±۰/۰۶۶۵
camphor	۱۱۴۱	–	–	۰/۵۷±۰/۰۲۸۸	۱/۰۱±۰/۰۴۳۵
borneol	۱۱۵۶	–	–	Tr	۰/۶۰±۰/۰۴۵۸
terpinen-4-ol	۱۱۷۴	۰/۱۵±۰/۰۰۵۷	۰/۲۶±۰/۰۰۵۷	Tr	۰/۲۹±۰/۰۳۰۰
α-terpineol	۱۱۸۶	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۰/۰۵±۰/۰۰۰	–	–
carvacrol, methyl ether	۱۲۴۱	–	–	۳/۴۱±۰/۰۵۰۰	۰/۰۹±۰/۰۱۵۳
thymoquinone	۱۲۴۸	–	–	۱/۱۵±۰/۰۱۱۵	۰/۰۵±۰/۰۰۰
thymol	۱۲۸۹	۸۱/۷۳±۰/۵۸۵۰	۸۲/۹۹±۰/۵۳۵۲	۷۵/۶±۰/۴۱۴۲	۷۹/۰۷±۱/۰۳۱۲
carvacrol	۱۲۹۸	۲/۱۹±۰/۰۳۲۱	۵/۷۴±۰/۳۸۵۰	۰/۳۸±۰/۰۲۶۴	۴/۳۰±۰/۱۸۹۰
E-caryophyllane	۱۴۱۷	۱/۵۳±۰/۰۳۴۶	۳/۰۱±۰/۰۱۵۳	۲/۴۷±۰/۰۲۸۸	۲/۱۰±۰/۰۷۵۵
α-humulene	۱۴۵۲	–	–	۰/۰۶±۰/۰۰۰	۰/۰۶±۰/۰۱۱۵
bicyclogermacrene	۱۵۰۰	۰/۵۷±۰/۰۲۶۴	۱/۳۳±۰/۰۳۲۱	–	–
(*Z*)-γ-macrocarpene	۱۵۱۲	۰/۸۳±۰/۰۱۵۲	۱/۴۱±۰/۰۱۱۵	–	–
myristicin	۱۵۱۷	–	–	۰/۰۵±۰/۰۰۰	۰/۱۷±۰/۰۴۳۵
caryophyllene oxide	۱۵۸۲	tr	۰/۱۹±۰/۰۰۵۷	–	–
n-tricosane	۲۳۰۰	۰/۰۷±۰/۰۱	۰/۰۵±۰/۰۰۰	–	–
Total		۹۹/۵۱±۰/۰۷	۹۹/۱۴±۰/۱۱۹۳	۹۸/۶۷±۰/۴۵۱۳	۹۰/۰۵±۰/۷۷۸۹

*: مقدار ناچیز (کمتر از ۰/۰۵٪)

برخی ترکیب‌های موجود در اسانس اکوتیپ‌های اصفهان و ایلام با هم تفاوت داشتند، به عبارتی ترکیب‌های کامفور، بورنئول، کارواکرول متیل‌اتر، تیموکئینون، آلفا-هومولن و میریسنی‌سین در آویشن دنایی ایلام وجود داشت. در حالی‌که ترکیب‌های دلتا-۳-کارن، ۸،۱-سینئول، بی‌سیکلوژرماکرن، (سیس)-گاما-ماکروکارپن، کاریوفیلن اُکساید و ان-تریکوسن در آویشن اصفهان وجود داشت ولی در آویشن ایلام دیده نشد (جدول ۱). نتایج آنالیز GC نشان داد که تیمول آویشن دنایی در حضور قارچ در هر دو اکوتیپ اصفهان و ایلام به‌ترتیب ۱/۰۱۵ و ۱/۰۴۶ برابر افزایش یافت که قابل توجه نیست. علاوه‌بر این، در حضور قارچ میزان کارواکرول آویشن دنایی در دو اکوتیپ اصفهان و ایلام نیز به‌ترتیب ۲/۶۲ و ۱۱/۳۱ برابر افزایش یافت که بسیار در خور توجه است. بنابراین با افزایش نسبت تیمول و کارواکرول در اسانس می‌توان نتیجه گرفت، از آنجایی که گیاه با تنش ناشی از بیمارگر مواجه شده برای دفاع از خود ترکیب‌های ضدقارچی تیمول و به‌ویژه کارواکرول را افزایش داده‌است. علاوه‌بر این، میزان پارا-سیمن و گاما-ترپینن در اسانس اکوتیپ ایلام بیشتر از اصفهان بود و با تلقیح قارچ *R. solani* میزان پارا-سیمن و گاما-ترپینن به‌طور معنی‌داری در هر دو اکوتیپ کاهش چشمگیری پیدا کرد. به عبارت دیگر با حضور قارچ در دو اکوتیپ اصفهان و ایلام، نسبت پارا-سیمن اسانس به‌ترتیب ۲۴/۲۳ و ۴۱/۵۸ برابر کاهش و نسبت گاما-ترپینن اسانس به‌ترتیب ۶۴ و ۱۸/۶۶ برابر کاهش نشان داد.

علاوه‌بر چهار ترکیب اصلی اسانس، دیگر ترکیب‌های اسانس نیز تغییرات قابل توجهی داشتند، بدین صورت که گروهی از ترکیب‌ها کاهش و گروهی دیگر افزایش یافتند. در حضور قارچ میزان ترکیب‌های مشترک دو اکوتیپ از قبیل آلفا-توجون، آلفا-پینن و آلفا-ترپینن در اکوتیپ اصفهان به‌ترتیب ۱۷/۸، ۱۱/۳۳ و ۴/۱۱ برابر و در اکوتیپ ایلام به‌ترتیب ۱۳/۷۵، ۱۶ و ۱۷/۴۲ برابر کاهش نشان داد. علاوه‌بر این، در حضور قارچ میزان میرسین در هر دو اکوتیپ کاهش چشمگیری یافته و قابل ردیابی نبود (بیش از ۱۰۰ برابر کاهش). در مقابل، حضور قارچ در اکوتیپ اصفهان باعث افزایش ترکیب‌های ترانس-سابینن هیدرات و ترپینن-۴-اُل به‌ترتیب به میزان ۷ و ۱/۷۳ برابر شد، در حالی‌که با تأثیر قارچ روی اکوتیپ ایلام میزان این دو ترکیب به بالای سطح قابل ردیابی رسیده و به‌ترتیب حدود ۱۳۵ و ۲۹ برابر افزایش پیدا کردند.

از طرفی حضور قارچ باعث افزایش یا کاهش ترکیب با توجه به اکوتیپ نیز شد. برای مثال در حضور قارچ، بتا-پینن در اکوتیپ اصفهان کاهش و در اکوتیپ ایلام افزایش قابل‌توجهی نشان داد و عکس آن، ترانس-کاریوفیلن در اکوتیپ اصفهان افزایش و در اکوتیپ ایلام کاهش یافت.

از طرف دیگر، حضور قارچ روی ترکیب‌های اختصاصی هر اکوتیپ نیز تأثیرگذار بود. به عبارتی، قارچ باعث افزایش برخی ترکیب‌های مختص اکوتیپ اصفهان از قبیل بی‌سیکلوژرماکرن، (سیس)-گاما-ماکروکارپن و کاریوفیلن اُکساید شد، در حالی‌که برخی ترکیب‌های مختص اکوتیپ ایلام از قبیل کارواکرول متیل اتر و تیموکئینون در حضور قارچ کاهش یافت، اما ترکیب میریسنی‌سین آن افزایش یافت.

بحث

الگوهای مولکولی مرتبط با میکروارگانیسم‌های مختلف اعم از بیمارگر یا غیربیمارگر به‌عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (microbe-associated molecular patterns; MAMPs) توصیف می‌شوند (Ludwig *et al*., 2005؛ Mackey & McFall, 2006). علاوه‌بر این، در اثر آسیب ایجاد شده توسط میکروب‌ها، ممکن است سیگنال‌هایی با عملکرد مشابه از خود گیاه نیز حاصل شود که این الگوها نیز به‌عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (damage-associated molecular patterns; DAMPs) توصیف شده‌اند (Lotze *et al*., 2007). گیرنده‌های شناسایی الگویی (pattern recognition receptors; PRRs) در غشای پلاسمایی گیاهان، MAMPs/DAMPs را از طریق حوزه‌های (domains) خارج سلولی شناسایی کرده و

پیام‌های داخل سلولی را تولید می‌کنند که درنهایت واکنش‌های دفاعی شروع می‌شود. این فرایندها به‌عنوان ایمنی القاء شده از طریق MAMP (MAMP-triggered immunity (PTI) نامیده می‌شوند (Jones & Dangl, 2006؛ Chisholm *et al*., 2006).

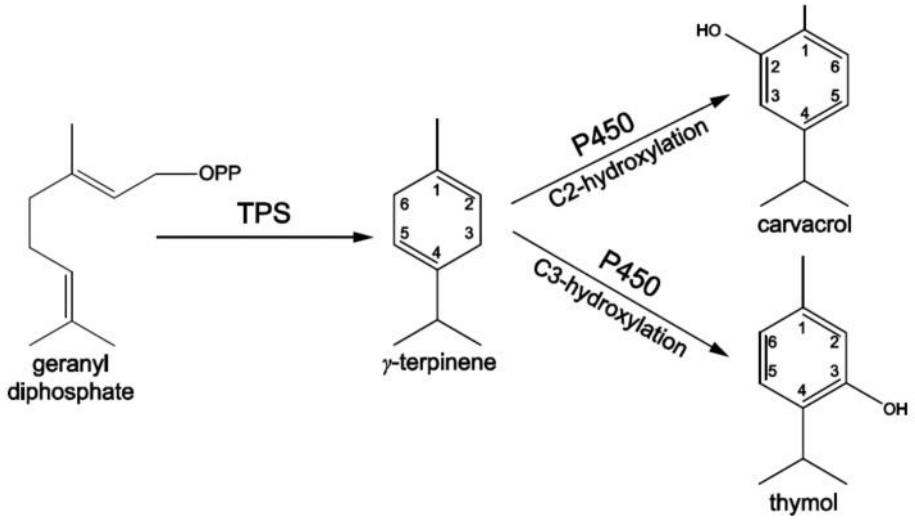
تشخیص الیسیتورها توسط گیاه میزبان، مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی در سلول را مورد حمله قرار داده و سلول‌های همجوار را فعال کرده و منجر به تغییر فعالیت‌های سلولی و فعال‌سازی شدید ترکیب‌های مرتبط با دفاع می‌گردد. Mizukami و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند که افزودن عصاره مخمر به کشت سوسپانسیون سلولی *Lithospermum erythrorhizon* تحت شرایط تاریکی، منجر به افزایش سریع در فعالیت دو آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (phenylalanine ammonia lyase; PAL) و تیروزین آمینوترانسفراز (tyrosine aminotransferase; TAT) شده و میزان رزمارینیک اسید را افزایش می‌دهد. افزودن عصاره مخمر به محیط کشت سوسپانسیون سلولی *Orthosiphon aristatus* نیز باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمینوترانسفراز شده و افزایش مقدار رزمارینیک اسید را در پی داشت (Mizukami *et al*., 1992). علاوه‌بر این افزودن مخمر به محیط کشت سوسپانسیون سلولی *Salvia miltiorrhiza* باعث افزایش تولید رزمارینیک اسید توسط گیاه شد (Chen *et al*., 2001). البته در شرایط کشت بافت نیز افزایش تولید ترکیب‌های فنلی در برخی کلون‌های *Mentha pulegium* در پاسخ به حضور میکروارگانیسم‌ها گزارش شده‌است (Al-Amier *et al*., 2005).

اگرچه تنش‌های محیطی، رشد و نمو گیاهان را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند اما محتوای متابولیت‌های ثانویه، اکثراً از طریق اثرات مثبتی که تنش‌ها روی مسیرهای متابولیکی سنتز ترکیب‌های مؤثره گیاهان دارند افزایش می‌یابد (Selmar, 2008). در پژوهش حاضر نیز برخی تغییرات متابولیتی آویشن دنایی در تعامل با قارچ در شرایط درون شیشه‌ای ایجاد شد. از طرفی کاهش ترکیب‌های فنولی ممکن است ناشی از پیشرفت بیماری و آسیب دیدن کلروپلاست (از اندامک‌های زیست ساختی جاسمونیک اسید) باشد. جاسمونیک اسید یک هورمون دفاعی است، پس مقدار این هورمون به احتمال زیاد کاهش یافته، در نتیجه تحریک دفاعی در گیاه نیز کم شده و ترکیب‌های فنولی کمتری تولید شده و گیاه مقاومت خود را از دست داده است.

در کل در مقایسه بین دو تیپ اصفهان و ایلام در شرایط کشت بافت مشخص شد که تیپ ایلام نسبت به اصفهان دارای بازده اسانس بیشتری است. بررسی ترکیب‌های اسانس هر دو تیپ نشان داد که مقدار تیمول و کارواکرول تیپ اصفهان نسبت به ایلام بیشتر می‌باشد، ولی مقدار دو پیش ماده پارا-سیمن و گاما-ترپینن در تیپ ایلام بیشتر از اصفهان بود و نشان‌دهنده این موضوع است که احتمالاً فرایند هیدروکسیله شدن گاما-ترپینن به تیمول و کارواکرول (Crocoll, 2011) در تیپ اصفهان نسبت به ایلام بالاتر است.

تیمار با قارچ *R. solani* در هر دو اکوتیپ آویشن دنایی باعث افزایش تولید تیمول و کارواکرول شد و ترکیب‌های حد واسط مثل گاما-ترپینن و پارا-سیمن کاهش شدیدی نسبت به شاهد داشت و می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این ترکیب‌ها به تیمول و کارواکرول تبدیل شده‌اند. کاهش گاما-ترپینن نشان‌دهنده این است که این ماده احتمالاً به تیمول و کارواکرول تبدیل شده‌است (شکل ۲).

در این تحقیق، بجز چهار ترکیب اصلی اسانس آویشن دنایی برخی ترکیب‌های دیگر افزایش و برخی ترکیب‌ها نیز کاهش پیدا کردند. ترکیب‌هایی که در تعامل با بیمارگر افزایش نشان دادند احتمالاً در مقاومت گیاه به بیمارگرها نقش داشته باشند. به عبارت دیگر، گیاه در شرایط تنش با بیمارگر از یک طرف سنتز برخی متابولیت‌های ثانویه را کاهش و یا متوقف کرده و از طرف دیگر سنتر متابولیت‌های ثانویه دخیل در مقاومت را افزایش می‌دهد.



شکل ۲- مسیر پیشنهادی بیوسنتز carvacrol و thymol در آویشن و مرزه

این شکل فرایند هیدروکسیله شدن گاما-ترپینن به تیمول و کارواکرول را نشان می‌دهد (Crocoll, 2011).

سپاسگزاری

بودجه و امکانات این تحقیق از سوی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی (طرح شماره ۶۰۰/۱۵۱۹) تأمین شده‌است، بدین‌وسیله نویسندگان تشکر خود را ابراز می‌دارند.

منابع مورد استفاده

- امیدبیگی، ر.، ۱۳۸۳. تولید و فرآوری گیاهان دارویی (جلد سوم). انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۴۲۴ صفحه.
- جمزاد، ز.، ۱۳۸۸. آویشن‌ها و مرزه‌های ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ۱۷۱ صفحه.
- حسینی، م.، ۱۳۹۱. غربالگری ریزوباکتری‌های بدست آمده از آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) برای کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی، تهران، ۱۰۰ صفحه.
- سفیدکن، ف. و رحیمی بیدگلی، ع.، ۱۳۸۱. بررسی تغییرات کمّی و کیفی اسانس آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) در دوره رشد گیاه و با روشهای مختلف تقطیر. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۵: ۲۱-۱.
- شوریابی، م.، ۱۳۹۱. اهلی کردن گیاه آویشن دنایی: بررسی تنوع مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی، پایداری صفات کمّی و کیفی و ریزازدیادی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، پژوهشکده گیاهان دارویی، شهید بهشتی، تهران، ۱۵۲ صفحه.
- محمودی، س.ب.، مصباح م. و علیزاده ع.، ۱۳۸۳. تنوع در بیماریزایی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* چغندر قند. بیماری‌های گیاهی، ۳(۴۰): ۲۸۰-۲۵۳.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, USA, 804p.
- Al-Amier, H., Mansour, B.M.M., Toaima, N., Shetty, K. and Craker, L., 2005. Stimulation of high biomas, rosmarinic acid, and total phenolics in tissue cultures of pennyroyal in response to *Pseudomonas mucidolens*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 11(3): 13-24
- Baskan, S., Öztekin, N. and Bedia Erim, F., 2007. Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in Sage by capillary electrophoresis. Food Chemistry, 101(4): 1748-1752.
- Benhamou, N., 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. Trend in Pharmacological Sciences, 1: 233-240.
- Bensalim, S., Nowak, J. and Asiedu, S.K., 1998. Temperature and *pseudomonad bacterium* effects on in vitro and ex vitro performance of 18 clones of potato. American Journal of Potato Research, 75(3): 145-152.
- Bernath, J., 1986. Production ecology of secondary plants product: 185-234. In: Craker, L.E. and Simon, J.E., (Eds.). Herbs, Spices and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology (Herbs, Spices, and Medicinal Plants) (Vol 1). Oryx Press, Arizona, 359p.

- Bernath, J., 2002. Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. Acta Horticulture, 576p.
- Briskin, D.P., 2000. Medicinal plant and phytomedicines. Plant Physiology, 125: 507-514.
- British Pharmacopoeia., 1993. Her Majesty's Stationary Office, London, 300p.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C.K. and Lo, C.M.Y., 2001. The effect of yeast elicitor on the growth secondary metabolism and of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Enzyme and Microbial Tecnology, 28: 100-105.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J., 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124: 803-814.
- Crocoll, C., 2011. Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Diss. PhD Thesis, Friedrich Schiller Universität.
- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. Nature, 411: 843-847.
- Harborne, J.B., 2001. Twenty-five years of chemical ecology. Natural Product Reports, 18: 361-379.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. Nature, 444: 323-329.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tör, M. and Billiar, T., 2007. The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. Immunological Reviews, 220: 60-81.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G. and Miersch, O., 2005. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. Proceeding of the National Academy of Sciences, 102(30): 10736-10741.
- Mackey, D. and McFall, A.J., 2006. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. Molcular Microbiology, 61: 1365-1371.
- Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B.E., 1992. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. Plant Cell Reports, 11: 480-483.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.
- Naoumkina, M.A., He, X. and Dixon, R.A., 2008. Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula.* BMC Plant Biology, 8: 132.
- Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101-153.
- Reich, E. and Schibli, A., 2006. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. Thieme Medical Publishers, 197p.
- Ribera A.E. and Zuñiga, G., 2012. Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 12(4):893-911.
- Selmar, D., 2008. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. Landbauforschung-vTI Agriculture and Forestry Research, 58: 139-144.
- Vitorino, L.C., Silva, F.G., Lima, W. C., Soares, M.A., Pedroso, R.C.N., Silva, M.R., Dias, H.J., Crotti, A.E.M., Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Pauletti, P.M. and Januário, A.H., 2013. Metabolic response induced by endophytic fungi and bacteria in *H. marrubioides* Epling in vitro microplants. Quimica Nova, 36(7): 1014-1020.
- Walton, N.J. and Brown, D.E., 1999. Chemical from Plants Perspectives on Plant Secondary Products. World Scientific Publishers, 425p.

Study of essential oil and rosmarinic and caffeic acids contents of *Thymus daenensis* Celak subsp. *daenensis* infected by *Rhizoctonia solani* AG2-2 under in vitro condition

N. Farahani[1], M. Farzaneh[2*], F. Najafi[3] and H. Rezadoost[4]

1- MSc. Student, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drug Institue, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drug Institue, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
E-mail: M_farzaneh@sbu.ac.ir
3- Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drug Institue, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
4- Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drug Institue, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: January 2014 Revised: November 2014 Accepted: November 2014

Abstract

Secondary metabolites play an important role in plant responses to environmental stresses and some of these compounds are significantly increased under stress conditions. The use of biotic and abiotic elicitors for promoting the production of secondary metabolites reduces the processing time to achieve high concentrations of the metabolite. In this study, the effects of pathogenic fungus, *Rhizoctonia solani* (AG2-2) SBUka2, as biotic elicitor, were studied to better understanding of plant reactions to microorganisms and enhance yield and quality of secondary metabolites of *Thymus daenensis* in tissue culture. In this way, rosmarinic acid and caffeic acid contents of two ecotypes (Ilam and Isfahan) of *T. daenensis* were determined by High Performance Thin Layer Chromatogharapghy (HPTLC), while essential oil variations were studied by Gas Chromatoghraphy-Mass Spectrometry (GC-MS). The results showed that in the presence of *R. solani*, rosmarinic acid content of inoculated plant was decreased by 26.82% and 8.25% in Ilam and Isfahan ecotypes, respectively whereas caffeic acid content decreased to 4.51 and 4.16, respectively. The analysis of essential oils exhibited that in the presence of *R. solani*, the yield of essential oils increased by 33% and 20% in Isfahan and Ilam types, respectively. In addition, the content of some essential oil compositions such as thymol and carvacrol were increased in infected plants whereas other compounds such as para-cymene and gama-terpinene were decreased.

Keywords: *Rhizoctonia solani*, *Thymus daenensis* Celak subsp. *Daenensis*, interaction, plant metabolites variations.