مقایسه محتوای ترکیب ضد میگرنِ پارتنولید در نمونه‌های طبیعی و گیاهچه‌های کشت بافتی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی *Tanacetum parthenium* L. در استان‌های مختلف

ریحانه زندی[۱]، علی سنبلی[۲]، قاسم اقلیما[۳]، حسن رضادوست[٤]، محمدحسین میرجلیلی[٥]*

[۱] کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

[۲] دانشیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] استادیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

[٤] استادیار، گروه فیتوشیمی ، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

[٥] دانشیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۰٦/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۱۰/۲٦

چکیده

سسکویی‌ترپن لاکتون – پارتنولید در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) به عنوان مهمترین ماده موثره دارویی با اثرات ضدسرطانی، ضدالتهابی، ضد اسپاسم و بویژه ضد میگرن شناخته شده است. در این مطالعه محتوای پارتنولید در سرشاخه‌های گلدار برخی از جمعیت‌های طبیعی گیاه *T. parthenium* L. از رویشگاه‌های مختلف در استان‌های گیلان (ماسوله)، مازندران (چالوس)، قم (وشنو) و تهران (آهار) که در مرحله گلدهی کامل جمع‌آوری شده بودند با گیاهچه‌های گل انگیزی شده آن‌ها در شرایط درون شیشه‌ای مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفته است. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای با کشت بذر جمعیت‌های مورد مطالعه بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیز شده، ۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید و ۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین تولید و گل انگیزی در آنها انجام شد. محتوای پارتنولید سرشاخه‌های گلدار همه نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر جمعیت و شرایط کشت و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پارتنولید معنی‌دار می‌باشد. محتوای این ترکیب در جمعیت‌های وحشی از ۰/۰۰۷ ± ۰/۱۳ تا ۰/۱۱۳ ± ۱/۰۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و در گیاهچه‌های کشت بافتی از ۰/۰۱۱ ± ۰/۲۳ تا ۰/۱٤۸ ± ۱/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود. بیشترین و کمترین محتوای پارتنولید به ترتیب در جمعیت‌های قم (وشنو) و گیلان (ماسوله) مشاهده شد. محتوای پارتنولید برای تمامی جمعیت‌ها در نمونه‌های کشت بافتی بیشتر از نمونه‌های طبیعی بود. یافته‌های این تحقیق می‌تواند برای تولید تجاری ترکیب دارویی پارتنولید در شرایط کنترل شده مورد توجه و بهره‌برداری قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بابونه کبیر، پارتنولید، جمعیت‌های طبیعی و کشت بافت

*نویسنده مسئول: m-mirjalili@sbu.ac.ir

مقدمه

بابونه کبیر با نام علمی *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.-Bip، گیاهی علفی و چند ساله از تیره کاسنی (Asteraceae) است که دارای ساقه‌ای راست یا ایستاده و شیاردار به ارتفاع ٤٠ تا ٨٠ سانتی‌متر، پهنک برگ تخم‌مرغی با قطعات اولیه ٣ تا ٥ جفتی است. کپه ها چندتائی تا زیاد در گل آذین پانیکول تنک، گلهای کناری زبانه ای و سفید و گلهای طبقی لوله ای زرد، فندقه ها بطول ١ تا ٢ میلی‌متر و ٥ تا ٦ رگه ای هستند (Mozaffarian, 2008). منشاء اصلی گیاه بابونه کبیر آسیا و اروپا بوده ولی امروزه در سراسر جهان گسترش یافته است (Ahmadi Livani et al., 2021). این گیاه در ایران، در برخی مناطق از جمله، گیلان، مازندران، تهران، آذربایجان‌غربی و شرقی به صورت خودرو می‌روید. از این گیاه برای درمان آسم، درد گوش، آرتریت، یبوست، سردرد، تب، التهاب پوست، اختلالات قاعدگی، اسپاسم، پسوریازیس، درد تورم معده، سرگیجه، درد دندان، وزوز گوش و دفع حشرات استفاده می‌شود که به همین خاطر این گیاه را بابونه کبیر[1] نیز می‌نامند (Sharopov et al., 2015).

سسکویی‌ترپن لاکتون‌ها از فراوان‌ترین ترکیبات شناخته شده در این گیاه می‌باشند که تاکنون در حدود ۳۰ نوع از آنها در گیاه شناسایی شده است. از بین آن‌ها، پارتنولید که جزء گروه جرماکرانولیدها می‌باشد، ۸۵ درصد از محتوای سسکویی‌ترپن‌های گیاه را شامل شده و به عنوان ماده موثره اصلی بابونه کبیر شناخته می‌شود. خاصیت ضد سرطانی و ضد التهابی از جمله فعالیت‌های بیولوژیکی است که برای پارتنولید گزارش شده است (Kouhpaikar et al., 2020). پارتنولید از تجمع پلاکت‌ها و ترشح سروتونین وسایر ترکیبات التهاب زا جلوگیری می‌کند (Majdi et al., 2014). این ترکیب همچنین دارای اثر ضداسپاسم بوده و حساسیت و واکنش عضلات صاف دیواره رگ‌های خونی مغز را نسبت به بعضی ترکیب‌ها از جمله پروستاگلاندین‌ها و سروتونین از بین می‌برد که موجب بروز اثر پیشگیری کننده از میگرن می‌شوند (Ahmadi Livani et al., 2021).

امروزه تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی بر میزان مواد فعال بیولوژیکی گیاهان دارویی (فنل‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپن‌ها) بطور گسترده‌ای تایید شده است (Eghlima et al., 2021). مطالعه و فونسکا و همکاران (Fonseca et al., 2008) نشان داد که نور و دما بر میزان پارتنولید و سایر ترکیبات فنلی موثر هستند. بیشترین مقدار پارتنولید در گیاه بابونه کبیر به‌ترتیب در گل، برگ و ساقه گیاه گزارش شده است. تا به حال گزارشی مبنی بر وجود این ترکیب در ریشه گیاه ارائه نشده است (Majdi et al. 2014). در مطالعه‌ای توسط ویو و همکاران (Wu et al., 2006)، میزان پارتنولید در عصاره بابونه کبیر ۲/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شده است. در تحقیقی دیگر، میزان پارتنولید موجود در ژنوتیپ‌های مختلف بابونه کبیر جمع‌آوری شده از باغ Chelesa Physic لندن، بین ۰/۱ تا ۱/۳ میلی‌گرم بر گرم گزارش شده است (Smith and Burford, 1992). شاه‌حسینی و همکاران (Shahhoseini et al., 2019) میزان پارتنولید در بابونه کبیر را به‌طور میانگین ۱/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیان کردند.

با توجه به ارزش ترکیبات اولیه دارویی در صنعت داروسازی و افزایش روز افزون تقاضای جهانی آن از یک‌سو و از سویی دیگر محدودیت‌های آب و اراضی کشاورزی برای توسعه کشت گیاه، ضرورت تولید و عرضه این مواد با هزینه کمتر و سرعت بیشتر و همچنین کاهش تاثیر عوامل محیطی بر محتوای ترکیبات در گیاه باعث شده است کشت کنترل شده و درون شیشه‌ای یکی از روش‌های جایگزین برای تولید

۱. Feverfew

پایدار این ترکیبات با ارزش معرفی شود (Yari khosroshahi et al., 2006). با توجه به اینکه بیشترین میزان بیوسنتز و تجمع پارتنولید در گلچه‌های لوله‌ای و بطور کلی درگل‌های کپه گیاه بیشتر از سایر اندام‌ها می‌باشد (Majdi et al., 2014)، ایجاد کشت درون شیشه‌ای، پرآوری گیاهچه و در نهایت القای گلدهی درون شیشه‌ای می‌تواند یک راهکار مناسب برای تولید انبوه این ترکیب در شرایط کنترل شده باشد. تاکنون از تکنیک کشت بافت برای بهره‌برداری از گیاهان مختلف از جمله مریم‌گلی (Tavan et al., 2021)، برازمبل (Ghaderi et al., 2019)، پنیرباد (Yousefian najafabadi et al., 2018)، سرخدار (Ahadi et al., 2018)، آویشن (Mirjalili et al., 2016) ، استویا (Singh and Dwivedi, 2014) و کاسنی (Kumari et al., 2007) گزارش شده است. مرور منابع علمی نشان داد که تاکنون مقایسه‌ای بین محتوای پارتنولید در گیاهان وحشی و گیاهچه‌های کشت بافتی بابونه کبیر در ایران گزارش نشده است. بنابراین هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی محتوای این ترکیب در برخی جمعیت‌های این گیاه و مقایسه استعداد متابولیتی گیاهچه‌های کشت بافتی آنها در تولید پارتنولید بود. یافته‌های این تحقیق به خوبی می‌تواند برای بهره‌برداری از گیاه در شرایط کنترل شده جهت تولید ترکیب ضد میگرن پارتنولید مورد توجه و استفاده قرار گیرد.

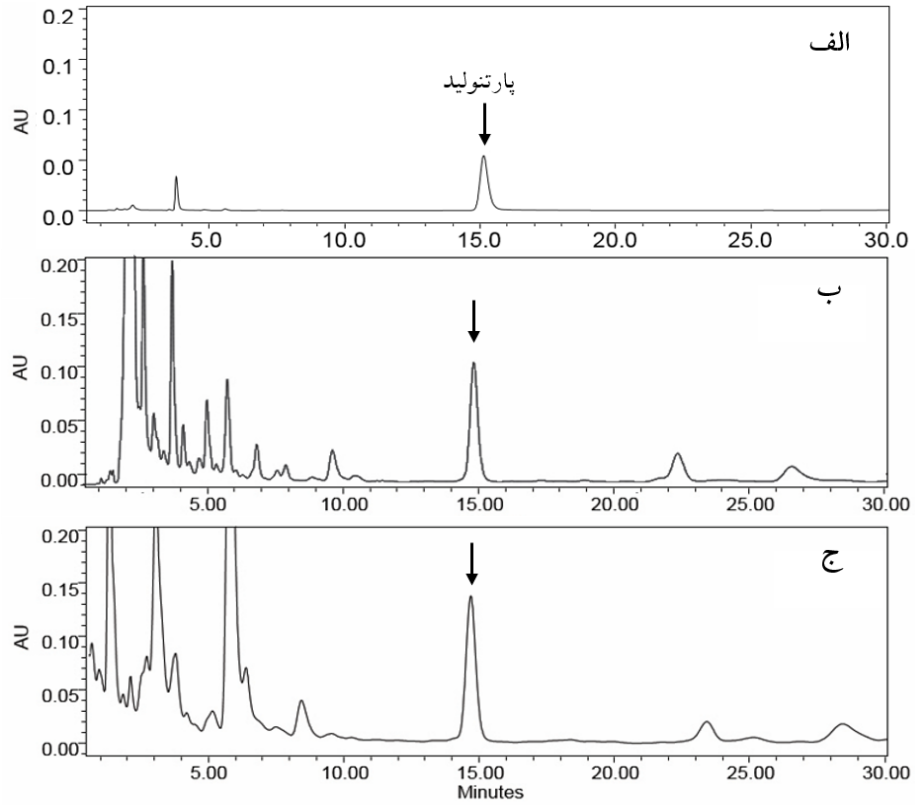
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: سرشاخه‌های گلدار چهار جمعیت از گیاه بابونه کبیر از استان‌های گیلان (ماسوله)، قم (وشنو)، مازندارن (چالوس) و تهران (آهار) در مرحله گلدهی کامل جمع‌آوری و در شرایط سایه خشک شدند. مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. نمونه‌های هرباریومی این جمعیت‌ها در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی نگهداری شده است (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات جغرافیایی مکان جمع‌آوری جمعیت‌های بابونه کبیر

ردیف	نام جمعیت	شماره هرباریومی	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	گیلان (ماسوله)	MPH-2265	۳۷°۱۰'	۴۸°۵۹'	۱۱۹۳
۲	قم (وشنو)	MPH-2266	۳۴°۳۲'	۵۰°۵۳'	۱۰۷۵
۳	مازندران (چالوس- مرزن آباد)	MPH-1704	۳۶°۱۷'	۵۱°۱۴'	۱۲۱۰
۴	تهران (آهار)	MPH-2269	۳۵°۵۴'	۵۱°۳۰'	۲۰۴۴

شکل ۱: نمونه‌ای از گیاهچه‌های گل‌انگیزی شده بابونه کبیر در شرایط درون شیشه‌ای



شکل ۲: نمونه کروماتوگرام HPLC-UV اندازه‌گیری پارتنولید در نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه در طول موج ۲۵٤ نانومتر، (الف) استاندارد، (ب) نمونه گیاه خودرو (تهران-آهار)، (ج) نمونه کشت بافتی (تهران-آهار)

کشت درون شیشه‌ای و تولید گیاهچه: بذرهای جمع‌آوری شده از نمونه‌های طبیعی، ابتدا به مدت ٤ ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند و سپس به ترتیب با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی و با آب مقطر به مدت ۱ دقیقه آبکشی شد. پس از آن ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه و آبکشی با آب مقطر به مدت ۳، ۵ و ۷ دقیقه انجام شد. بذرهای استریل شده در شیشه‌های مربایی بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم آگار بدون هر گونه تنظیم کننده رشد کشت شدند. دانهال‌های گیاه بعد از شش ماه بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین، ۲ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید و ۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین گل‌انگیزی شدند. در هر دو مرحله، گیاهچه‌های کشت بافتی در اتاقک رشد با دوره فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب نگهداری شدند.

استخراج و اندازه‌گیری پارتنولید: جهت عصاره‌گیری و اندازه‌گیری پارتنولید، ۲۰۰ میلی‌گرم از سرشاخه‌های گلدار هر یک از جمعیت‌های طبیعی بابونه کبیر و گیاهچه‌های گلدار نمونه‌های کشت بافتی پودر شده و مورد استفاده قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول: اسیدفرمیک (۱:۱۰۰۰ v/v) را به آن اضافه کردیم به

آنها اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد در دستگاه حمام اولتراسونیک (Ultrasonic) مدل الماسونیک – دی ۷۸۲۲٤ سینجن اچ تی دبلیو (SingenHtw Elmasonic- D 78224)، ساخت شرکت الما آلمان (Elma Germany) قرار داده شد (Majdi et al., 2011). در ادامه، عصاره‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل R۵۷۰۲ ساخت شرکت اپندورف (Eppendorf)، به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. برای داشتن عصاره‌ای همگن و تبخیر حلال نمونه، به مدت ٤٠ دقیقه در دستگاه روتاری قرار گرفت. پس از آن ۱۰ سی سی حلال متانول: اسیدفرمیک اضافه شد و عصاره در میکروتیوب‌های ۲ میکرولیتر ریخته شد و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. عصاره از فیلتر ۰/٤۲ میکرون عبور داده شد و به ویال‌های اچ پی ال سی منتقل و برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی آماده و تا زمان آنالیز در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مشخصات و شرایط کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی: از سیستم HPLC ساخت شرکت (Germany) Knauer مجهز به دو پمپ (مدل – Wellchron-K1001) و آشکارساز PDA (مدل K2800) برای جداسازی و اندازه‌گیری استفاده شد. ستون مورد استفاده بدین منظور نیز ساخت شرکت Eurosphere و از نوع RP-C18 با قطر داخلی ٤/٦ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر بوده است. از حلال‌های استونیتریل و آب مخصوص HPLC به عنوان فاز متحرک و با برنامه شویش شیبی استفاده شد. این برنامه شامل شویش ستون با ۹۵ درصد آب به مدت ۵ دقیقه و تغییر ترکیب درصد از ۹۵ درصد به ۵ درصد در مدت ۳۰ دقیقه طراحی گردید. نمونه‌ها در طول موج جذب و نشر ۲٥٤ نانومتر ارزیابی شدند. استاندارد پارتنولید از شرکت فیتولب آلمان تهیه گردید. به منظور رسم منحنی استاندارد پارتنولید، غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ٤، ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تهیه و به دستگاه تزریق گردید. از نرم‌افزار شرکت EZchorm که بر روی سیستم عامل ویندوز نصب شده است، برای انتگرال‌گیری و محاسبه سطح زیر منحنی استفاده گردید. مساحت پیک غلظت‌های استاندارد حساب شده و منحنی استاندارد با نرم افزار اکسل رسم گردید و سپس معادله خط y=bx+a بدست آمد.

آنالیز داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده براساس آزمایش فاکتوریل دو عامله صورت گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

با تزریق استاندار پارتنولید به دستگاه HPLC (شکل 2)، پس از گذشت ۵ تا ۱۵ دقیقه پیک‌هایی ظاهر شدند که این پیک‌ها بیانگر غلظت پارتنولید بودند. معادله حاصل از منحنی کالیبراسیون پارتنولید (غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ٤، ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) به صورت $y = 28429x + 62.642$ و $R^2 = 0.9999$ بدست آمد. نمونه‌های عصاره‌گیری شده از نمونه‌های طبیعی و کشت بافت (شکل 2) جمعیت‌های بابونه کبیر به دستگاه HPLC تزریق و با استفاده از معادله بدست آمده و میزان پارتنولید در نمونه‌های موجود برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برای هر جمعیت تعیین شد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس بررسی تاثیر داده‌های مربوط به نوع جمعیت بابونه کبیر و شرایط کشت در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر جمعیت و شرایط

کشت و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

نتایج مقایسه میانگین مربوط به جمعیت‌های مختلف نشان داد (جدول ۳) که میزان پارتنولید در جمعیت‌های طبیعی گیلان (ماسوله)، قم (وشنو)، مازندارن (چالوس-مرزن‌آباد) و تهران (آهار) به ترتیب ۰/۱۳۰۵، ۱/۰۲۸، ۰/۳۳۴۰ و ۰/۵۲۹۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. نتایج حاصل از آنالیز HPLC نمونه های کشت بافت نشان داد که محتوای پارتنولید جمعیت‌های مختلف بابونه کبیر از ۰/۲۲۶۲ تا ۱/۲۱۳٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغییر بود. در بین نمونه‌های کشت بافت بیشترین میزان پارتنولید در جمعیت قم (وشنو) و کمترین آن در جمعیت گیلان (ماسوله) مشاهده شد.

جدول ۲: تجزیه واریانس تاثیر جمعیت بابونه کبیر، شرایط کشت و اثرمتقابل آن‌ها بر میزان پارتنولید

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	مقدار F	سطح معنی‌داری
جمعیت	۳	۰/۰۲۳	٤۹/۳۸۳	۰/۰۰۰
شرایط کشت	۱	۰/۰۰۹	٦۷/۸۰۱	۰/۰۰۰
جمعیت × شرایط کشت	۳	۰/۰۰۰۰۱	۱٦/۹٤۲	۰/۰۰۰
خطای آزمایشی	۱٦	۰/۰۰۰۰۲۳۱		

جدول ۳: مقایسه محتوای پارتنولید موجود در جمعیت‌های طبیعی و نمونه‌های کشت بافت بابونه کبیر

جمعیت	نمونه	محتوای پارتنولید (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)
گیلان (ماسوله)	کشت بافت	۰/۲۲٦۲ ± ۰/۰۱۱
	طبیعی	۰/۱۳۰۵ ± ۰/۰۰۷
قم (وشنو)	کشت بافت	۱/۲۱۳٤ ± ۰/۱٤۸
	طبیعی	۱/۰۲۸ ± ۰/۱۱۳
مازندران (چالوس – مرزن آباد)	کشت بافت	۰/٤۲۹۷ ± ۰/۰٥٤
	طبیعی	۰/۳۳٤۰ ± ۰/۰۳٦
تهران (آهار)	کشت بافت	۰/٦۳٦۸±۰/۰٤۲
	طبیعی	۰/٥۲۹۰ ± ۰/۰۹٤

بحث

بابونه کبیر یکی از مهم‌ترین گیاهان با خواص دارویی متعدد و فراوانی است. این گیاه برای درمان طیف وسیعی از بیمارهای مانند اختلات قاعدگی، دندان درد، میگرن، آسم، تب، درد معده و آرتروز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Maggi 2019). متابولیت‌های ثانویه دارای ساختارهای پیچیده شیمیایی و مسیرهای بیوسنتزی طولانی هستند که از گیاهان خود رو یا کشت شده استخراج می‌شوند (Yue et al., 2016). پارتنولید یکی از ترکیبات موثره مهم در بابونه کبیر است که فعالیت بیولوژیکی زیادی از قبیل فعالیت ضدمیگرنی، ضدسرطانی و ضدالتهابی برای آن گزارش شده است (Pourianezhad et al., 2019). امروزه از کشت بافت گیاهی به عنوان یک روش جایگزین و امیدوارکننده برای تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل پارتنولید استفاده می‌شود (Pourianezhad et al., 2019; Nieto-Trujillo et al., 2017; Majdi et al., 2015) و گزارش‌های متعددی

برای استفاده از کشت بافت گیاهی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (Khan et al., 2018).

با توجه به تخریب و کاهش اراضی کشاورزی جهت کشت گیاهان دارویی، افزایش جمعیت کره‌ی زمین و افزایش مصرف مواد اولیه دارویی، استفاده از روش‌های کشت بافت یکی از روش‌های جایگزین مناسب می‌تواند باشد (Azarmehr et al., 2014). گسترش روش‌های بیوتکنولوژی مانند کشت بافت، ریزازیادی، کشت ریشه موئین و کشت سلولی یکی از مهم‌ترین روش‌های حل مشکلات مربوط به برداشت بی‌رویه و اثرات مخرب برداشت گیاهان با خصوصیات دارویی، صنعتی و غذایی است (Mehri Rad et al., 2015). بنابراین، با توجه به سرعت کم تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت، می‌توان موقعیت تولید در شرایط کنترل شده و در مدت زمان کوتاه‌تر را با استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در شرایط درون شیشه‌ای فراهم ساخت (Shirazi et al., 2014). اجزای تشکیل دهنده متابولیت‌های گیاهان تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی از جمله موقعیت جغرافیایی، ارتفاع، شرایط کشت، تغذیه و زمان برداشت قرار می‌گیرد (Rahmati et al., 2017).

ارزیابی محتوای پارتنولید موجود در نمونه‌های درون شیشه‌ای در مقایسه با جمعیت‌های طبیعی نشان داد که میزان پارتنولید موجود در نمونه‌های کشت بافت در تمامی جمعیت‌های بابونه کبیر بیشتر از میزان پارتنولید در شرایط طبیعی بود (شکل ۳ و جدول ۳).

در مطالعه‌ای محتوای استویوزاید برگ‌های استویا رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و افزایش قابل توجهی در میزان استویوزاید گیاهان بدست آمده از شرایط کشت درون شیشه‌ای نسبت به گیاهان رشد کرده در شرایط طبیعی مشاهده شد (Singh and Dwivedi, 2014). در تحقیق دیگری، کوماری و همکاران (Kumari et al., 2007) محتوای اینولین را در بافت‌های مختلف (برگ و ریشه در شرایط درون شیشه‌ای و طبیعی) گیاه کاسنی اندازه‌گیری کردند. بیشترین میزان اینولین برابر ۱۰۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در ریشه کاسنی و در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شد. مقایسه ترکیبات عصاره و اسانس گیاه استویا در شرایط مختلف رشدی (شرایط طبیعی و کشت بافت) نشان داد که ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره و اسانس گیاهان حاصل از کشت بافت با گیاه رشد کرده در شرایط مزرعه‌ای متفاوت می‌باشد (Malekirad et al., 2017). احدی و همکاران (Ahadi et al., 2018) محتوای تاکسول کالوس‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سرخدار (*Taxus baccata* L.) را ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند که نسبت به بافت‌های طبیعی افزایش نشان داد. همچنین عملکرد عصاره و ترکیبات منوساکاریدی در نمونه‌های درون شیشه‌ای گیاه *Pterospartum tridentatum* نسبت به نمونه‌های وحشی آن به طور قابل توجهی افزایش نشان داد (Gonçalves et al., 2018). رحمتی و همکاران (Rahmati et al., 2017) محتوای تاکسول موجود در کالوس‌های حاصل از شرایط درون شیشه‌ای با برخی از بافت‌های طبیعی دو گونه سرخدار را مقایسه کردند. نتایج آن‌ها نشان که میزان تاکسول محاسبه شده در کالوس هر دو گونه بیشتر از بافت‌های طبیعی بود. در مطالعه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و متانولی *Ziziphora tenuior* رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد شرایط درون شیشه‌ای موجب افزایش قابل توجهی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه نسبت به گیاهان وحشی شد (Dakah et al., 2014).

براساس نتایج و آنالیز داده‌ها (جدول ۳)، میزان پارتنولید موجود در نمونه‌های کشت بافت

جمعیت‌های مورد مطالعه بابونه کبیر بیشتر از جمعیت‌های رشد کرده در شرایط طبیعی بدست آمد. با در نظر گرفتن این موضوع که بدست آورن نمونه‌های کشت بافت در شرایط آزمایشگاهی در تمامی فصول و طول سال بدون محدودیت امکان‌پذیر است، بنابراین تولید پارتنولید در شرایط درون شیشه‌ای، می تواند جایگزین مناسب و مقرون به‌صرفه ای برای تولید این ترکیب با ارزش در صنعت داروزسازی باشد. عوامل متعددی از قبیل تیمارهای هورمونی، نور و تاریکی، محرک‌های زیستی و غیرزیستی سبب نوسان در تولید میزان متابولیت‌های و ترکیبات دارویی در گیاهان می‌شوند، لذا در جهت افزایش تولید این ترکیب موثره پیشنهاد می‌گردد که تحقیقات تکمیلی دیگری انجام شود تا بتوان از این ترکیب دارویی ارزشمند با استفاده از روش‌های تکنولوژی روز بهره‌مند شد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش به طور کلی نشان داد که میزان پارتنولید در نمونه‌های کشت بافت با نمونه‌های رشد کرده در شرایط طبیعی متفاوت است. نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی نشان داد که محتوای پارتنولید در جمعیت‌های بومی بابونه کبیر ۰/۰۰۷±۰/۱۳ تا ۰/۱۱۳±۱/۰۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و نمونه‌های حاصل از کشت بافت از ۰/۱۱±۰/۲۳ تا ۰/۱٤۸±۱/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود. میزان پارتنولید محاسبه شده برای تمامی جمعیت‌ها در نمونه‌های کشت بافت بیشتر از نمونه‌های طبیعی بود. براساس نتایج بدست آمده در دو شرایط کشت مورد مطالعه و با توجه به بالا بودن میزان پارتنولید در نمونه‌های کشت بافت، پس از ارزیابی اقتصادی، شرایط درون شیشه‌ای به عنوان جایگزین مناسب و مقرون به‌صرفه ای برای تولید پارتنولید در جهت تامین نیاز صنعت داروسازی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی بابت حمایت مالی و سرکار خانم شیرین گودرزی جهت همکاری در آنالیزهای فیتوشیمیایی به عمل می آورند.

References

1. Ahadi, H., Mirjalili, M.H., Farzaneh, M. and Rezadosst, H. 2018. Quantification of taxol and 10-deacetyl baccatin III in the leaf and cell suspension cultures of two *Taxus* L. species. Journal of plant productions, 41(3): 95-104.
2. Ahmadi Livani, M., Pourakbar, L., Sateii, A. and Ebadi, M. 2021. Evaluation of germacrene A synthase gene expression under salinity stress in Feverfew. Iranian genetics society, 16(2): 143-150.
3. Azarmehr, B., Karimi, F., Taghizade, M. and Mosavi Gargari, S.L. 2014. Comparative study of growth and secondary metabolite production ability in transformed hairy roots from *Cichorium intybus*. Journal of plant research (Iranian journal of biology), 26 (4): 476-485.
4. Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbas, S. and Wink, M. 2014. In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. Saudi Journal of Biological Sciences, 21(4):317-323.
5. Der marderosian, A. 2001. A guid to popular natural products. Facts and Comparisons A Wolters Kluwer Company, 90-92 p.
6. Eghlima, GH., Sanikhani, M., Kheiry, A., Hadian, J. and Aelaei, M., 2021. Evaluation of glabridin content and its

relationship with environmental factors in some different populations of *Glycyrrhiza glabra* L. native to Iran. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 9(1): 35-46.
7. Fonseca, J.M., Rushing, J.W., Rajapakse, N.C., Thomas, R.L. and Riley, M.B. 2008. Phenolics and parthenolide levels in Feverfew (*Tanacetum parthenium*) are inversely affected by environmental factors. Journal of Applied Horticulture, 10: 36-39.
8. Ghaderi, S., Nejad ebrahimi, S., Ahadi, H., Eslamboolchi moghaddam, S. and Mirjalili, M.H. 2019. In vitro propagation and phytochemical assessment of *Perovskia abrotanoides* Karel. (Lamiaceae) - A medicinally important source of phenolic compounds. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19: 101-113.
9. Gonçalves, J.C., Coelho, M.T., Diogo, M.G., Alves, V.D., Bronze, M.R., Coimbra, M.A., Martins, V.M. and Moldão-Martins, M. 2018. In vitro shoot cultures of *Pterospartum tridentatum* as an alternative to wild plants as a source of bioactive compounds. Natural product communications, 13 (4): 439-442.
10. Khan, T., Abbasi, B.H. and Khan, M.A. 2018. The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. Journal of photochemistry and photobiology B: biology, 185:153–160.
11. Kouhpaikar, H., Sadeghian, M.H., Rafatpanah, H., Kazemi, M., Iranshahi, M., Delbari, Z., Khodadai, H. and Rassouli, F. 2020. Synergy between parthenolide and arsenic trioxide in adult T-cell leukemia/lymphoma cells *in vitro*. Iranian journal of basic medicinal sciences, 23: 616-622.
12. Kumari, B.D.R., Velayutham, P. and Anitha, S. 2007. A comparitive study on inulin and esculin content of in vitro and in vivo plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local). Advances in Biological Research, 1: 22-25.
13. Maggi, F. 2019. Feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip.). Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements. Elsevier, Amsterdam, 223–225 p.
14. Majdi, M., Karimzadeh, G. and Malboobi, M.A. 2014. Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in feverfew (*Tanacetum parthenium*). Biologia plantarum, 58: 379-384.
15. Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Beekwilder, J., Cankar, K., Vos, R.D., Todorovic, S., Simonovic, A. and Bouwmeester, H. 2011. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). Phytochemistry, 72: 1739-1750.
16. Malekirad, M., Nasr, N. and Kazemitabar, S.K. 2017. Study on some Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) metabolites in the invitro and invivo conditions using GC- MS. Journal of medicinal plants biotechnology, 2(4): 41-53.
17. Mehri Rad, N., Payam Noor, V. and Nazari, J. 2015. Effect of trees age and light on *Betula litwinowii* callogenesis and botulin induced in vitro conditions. Iranian journal of rangelands and forests plant breeding and genetic research, 23(1): 93-102.
18. Mirjalili, M.H., Bakhtiar, Z., Moridi farimani, M. and Sonboli, A. 2016. Quantification of betulinic oleanolic and ursolic acids as medicinally important triterpenoids in some *Thymus* species from Iran. Research journal of pharmacognosy, 3: 23-28.
19. Mozaffarian, V. 2008. Flora of Iran No. 59: Daisy family (Compositae): Anthemideae and Echinopeae. Publications of Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, Iran, 130-142 p.
20. Nieto-Trujillo, A., Buendia-Gonzalea, L., Garcia-Morales, C., Roman-Guerrero, A., Cruz-Sosa, F. and Estrada-Zuniga, M.E. 2017. Phenolic compounds and prathenolide production

from in vitro culture of *Tanacetum parthenium*. Revista Mexicana de ingeniera quimica, 16(2): 371-383.

21. Pourianezhad, F., Rahnama, H., Mousavi, A., Khosrowashahli, M. and Mafakheri, S. 2019. Parthenolide production in cell suspension culture of feverfew. Bioresources and bioprocessing, 6 (23): 1-7.
22. Rahmati, Z., Payam Nour, V., Ghasemi Bazdi, K. and Ebrahimi, P. 2017. Compare production of taxol in natural tissues of *Taxus baccata* L. and *Taxus berevifolia* Nutt. with in vitro condition. Journal of plant research (Iranian journal of biology), 30(1): 99-109.
23. Shahhoseini, R., Azizi, M., Asili, J. Moshtaghi, N. and Samiei, L. 2019. Comprehensive assessment of phytochemical potential of *Tanacetum parthenium* L. phenolic compounds, antioxidant activity, essential oil and parthenolide. Journal of essential oil bearing plants, 1-16.
24. Sharopov, F.S., Setzer, W.N., Isupov, S.J. and Wink, M. 2015. Composition and bioactivity of the essential oil of *Tanacetum parthenium* from a wild population growing in Tajikistan. American journal of essential oil and natural products, 2(4): 32-34.
25. Shirazi, Z., Piri, K., Mirzaie Asl, A. and Hasanloo, T. 2014. The effect of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on production amount of glycyrrhizin and isoliquiritigenin in hairy roots of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). Journal of plant research (Iranian journal of biology), 27(3): 440-449.
26. Singh, P. and Dwivedi, P. 2014. Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of *Stevia rebaudiana*, an anti- diabetic medicinal herb. 3 Biotech, 4(4): 431-437.
27. Smith, R.M. and Burford, M.D. 1992. Supercritical fluid extraction and gas chromatographic determination of the sesquiterpene lactone parthenolide in the medicinal herb Feverfew (*Tanacetum parthenium*). Journal of Chromatography A, 627: 255-261.
28. Tavan, M., Sarikhani, H., Mirjalili, M.H., Rigano, M. and Azizi, A. 2021. Triterpenic and phenolic acids production changed in *Salvia officinalis* via in vitro and in vivo polyploidization: A consequence of altered genes expression. Phytochemistry, 189:1-11.
29. Wu, C., Chen, F., Wang, X., Kim, H.J., He, G.Q., Haley-Zitlin, V. and Huang, G. 2006. Antioxidant constituents in Feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. Food Chemistry. 96: 220-227.
30. Yari khosroshahi, A., Habibi khaniani, B. and Aghdi Badi, H. 2006. Review taxol as the main anticancer natural compound. Journal of Medicinal Plants, 18:1-9.
31. Yousefian Najafabadi, Z., Hosseini, B., Rezadoost Chahardeh, H., Palazon, J. and Mirjalili, M.H. 2018. Production of the anticancer compound withaferin A from genetically transformed hairy root cultures of *Withania somnifera*. Natural Product Communications, 13: 943-948.
32. Yue, W., Ming, Q-L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C-J., Han, T. and Qin, L. 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. Critical reviews in biotechnology, 36:215–232.

Comparison content of parthenolide as an anti-migraine in Natural samples and tissue culture seedlings of some populations of *Tanacetum parthenium* L.

Zandi, R.[1], Sonboli, A.[2], Eghlima, GH.[3], Rezadoost, H.[4], Mirjalili, M.H.[5]*

[1]MSc. Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[2]Associate Professor, Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[4]Assistant Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[5]Associate Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 20-9-2021; Accepted: 16-1-2022

Abstract

Sesqui-terpene lactone - parthenolide in *Tanacetum parthenium* L. is known as the most important medicinal substance with anti-cancer, anti-inflammatory, anti-spasm and especially anti-migraine effects. In this study, the content of parthenolide in the flowering branches of some natural populations of *T. parthenium* L. from different habitats in Gilan (Masoleh), Mazandaran (Chalos), Qom (Vishnu) and Tehran (Ahar) provinces were collected at the full flowering stage and compared with their flowered seedlings under in vitro conditions. In vitro seedlings were seeded and cultured on Murashige and Skoog medium enriched with hydrolyzed casein (100 mg/l), salicylic acid (2 mg/l) and benzylaminopurine (5 mg/l). The parthenolide content of flowering branches of all samples was measured using high performance liquid chromatography (HPLC). The results of variance analysis of the data showed that the effect of population and cultivation conditions as well as their interaction at the probability level of 1% on parthenolide content was significant. The parthenolide content in self-grown populations ranged from 0.13±0.007 to 1.03±0.113 mg/g dry weight and in tissue culture seedlings from 0.23±0.011 to 1.21±0.148 mg/g dry weight was variable. The highest and lowest parthenolide content was observed in Qom (Vashno) and Gilan (Masuleh) populations, respectively. Parthenolide content for all populations was higher in tissue culture samples than in natural samples. The findings of this study can be considered and exploited for the commercial production of parthenolide pharmaceutical composition under controlled conditions.

Keywords: Asteraceae, Feverfew, Parthenolide, Self-grown populations, Tissue culture.

*Corresponding author; m-mirjalili@sbu.ac.ir