



"مقاله پژوهشی"

ارزیابی تغییرات در اسانس اکوتیپ‌های گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum copticum* L.) تحت تنش خشکی

آزاده کریمی افشار^۱، غفار کیانی^۲، حمید نجفی زربینی^۲ و امین باقی‌زاده^۳

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، (نویسنده مسؤل: azadehkarimi.a@gmail.com)

۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

۳- دانشیار، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰

صفحه: ۴۱ تا ۵۰

چکیده

زنیان (*Trachyspermum copticum* L.) یکی از گیاهان با ارزش دارویی خانواده چتریان در مناطق نیمه‌خشک ایران است و از نظر تولید اسانس حاوی متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه تیمول دارای اهمیت است. به‌منظور تعیین نمایه متابولیتی زنیان تحت تنش خشکی، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار طی دو سال زراعی (۱۳۹۶-۱۳۹۵) در ایستگاه مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی کرمان انجام شد. عامل اصلی در دو سطح شامل آبیاری معمولی و تنش خشکی و عامل فرعی شامل ۳۶ اکوتیپ زنیان متعلق به ۹ استان مختلف کشور بود. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مرکب، تنش خشکی بر اجزاء اسانس تأثیر معنی‌دار داشت. نتایج به‌دست آمده از گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی نشان داد که تیمول، پاراسیمین و گاما ترپینن از بین ۱۳ ترکیب شناسایی شده، اصلی‌ترین ترکیبات اکوتیپ‌های مختلف در دو تیمار آبیاری بودند. بر اساس نمودار فاصله بای‌پلات، دو گروه اصلی شامل: اکوتیپ‌ها با تیمول بالا و اکوتیپ‌ها با پاراسیمین بالا شناسایی شدند. در این مطالعه افزایش فاصله زمان آبیاری طی مرحله گل‌دهی به‌عنوان یک استراتژی برای بهبود ترکیبات دارویی برخی اکوتیپ‌های زنیان موثر بود. به‌طور کلی، اکوتیپ با منشأ زابل با توجه به داشتن محتوای بالای تیمول به‌ویژه در شرایط تنش خشکی به‌عنوان اکوتیپ مناسب برای کشت دیم و کشت در مناطقی که خشکی در پایان فصل رشد اتفاق می‌افتد پیشنهاد می‌شود. به‌علاوه اکوتیپ‌های زابل و محمدیه به‌عنوان اکوتیپ‌های کرانه‌ای پاسخ به تنش خشکی در مرحله زایشی شناسایی شدند و توصیه می‌شود در برنامه‌های به‌نژادی مرتبط با سطح تیمول در گیاه دارویی زنیان در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تیمول، خشکی، زنیان، گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی

مقدمه

(۲۵،۱۷). در مطالعه پاسخ آویشن به تنش خشکی، مشخص شد که برخی جمعیت‌ها با افزایش ترکیبات به‌ویژه تیمول، کیفیت اسانس را بهبود دادند (۲۹). تنش خشکی از طریق افزایش یا کاهش سطح بیان ژن‌های مسئول بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، القا و یا ممانعت از بیان ژن‌های خاص، بر روی ترکیبات و مقدار متابولیت‌های ثانویه گیاه تأثیر می‌گذارد (۲۶،۱۴،۱). علی‌رغم اهمیت گیاه زنیان از نقطه نظر دارویی و همچنین کاشت آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک، به‌نظر می‌رسد تاکنون گزارشی از نمایه متابولیتی اسانس بذر زنیان به‌ویژه تحت تنش خشکی ارائه نشده و بیشتر مطالعات گذشته بر روی تعداد محدود اکوتیپ زنیان بومی هندوستان، مصر و ایران صورت گرفته است (۱۵). در بررسی زرخشناس و همکاران (۲۰۱۴) تیمول، پاراسیمین و گاما ترپینن به‌عنوان اجزای اصلی اسانس زنیان معرفی شدند و میزان تیمول در ۱۰ نمونه بومی ایران ۳۵/۰۴ تا ۶۳/۳۱ درصد و میزان پاراسیمین و گاما ترپینن در ۴ نمونه ۲۰/۴۰ تا ۳۱/۵۷٪ گزارش شد.

با توجه به اهمیت گیاه دارویی زنیان در صنایع غذایی و داروسازی و همچنین محدودیت منابع آبی مناطق خشک و نیمه‌خشک این تحقیق قصد دارد تا ضمن شناسایی متابولیت‌های ثانویه اکوتیپ‌های مختلف زنیان، اکوتیپ‌هایی که از نظر اسانس در شرایط تنش خشکی دارای مزیت‌اند را شناسایی و معرفی نماید تا راه را برای تحقیقات جهت انجام

زنیان *Trachyspermum copticum* و مترادف آن *Carum Copticum* از خانواده Apiacea گیاهی علفی و یکساله که به‌حالت خودرو در نواحی شرقی هند، ایران، پاکستان و مصر می‌روید (۱۱،۷). اهمیت گیاه زنیان به‌علت اسانس و ترکیبات موجود در اسانس آن است. در گزارشات زیادی به نقش اسانس زنیان به‌عنوان ادویه غذایی اشاره شده است و به‌دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچ و ضد باکتری که مرتبط با تیمول است، معرفی اکوتیپ با مقدار تیمول بالا به‌عنوان یک هدف اصلی در صنایع غذایی و دارویی دارای اهمیت می‌باشد (۱۳،۳۲).

ایران با متوسط بارندگی ۲۲۰ میلی‌متر در سال جزء مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان محسوب می‌شود. از طرف دیگر ایران از نقطه نظر پوشش و تنوع گیاهی دارای منابع بی‌ظنیری است و این تنوع می‌تواند پایه‌گزینش برای به‌نژادی به‌منظور انتخاب برترین توده برای کشت، در نظر گرفته شود (۱۳،۴). در زمینه تولید گیاهان دارویی، یکی از مهم‌ترین چالش‌ها تولید گیاه با کیفیت بالا است، چرا که هدف نهایی از کشت گیاهان دارویی استخراج متابولیت‌های ثانویه و استفاده از آن‌هاست (۱۰). مطالعات بر روی گیاهان دارویی، نشان داد که تنش خشکی با کاهش و یا افزایش متابولیت‌های ثانویه باعث تغییر در کیفیت اسانس می‌شود

پروژه‌های اصلاح بذر و تولید رقم برای مناطق دیم و رقم با سطح تیمول بالا هموار سازد.

مواد و روش‌ها

اکوتیپ‌های زنیان از مناطق رویشگاه‌های طبیعی آن در استان‌های مختلف (توسط کلیدهای معتبر رده‌بندی گیاه‌شناسی) شناسایی و جمع‌آوری شدند. اکوتیپ زنیان متعلق به ۹ جمعیت جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف ایران به صورت آزمایش کرت‌های خرد شده و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی شامل دو عامل رژیم آبیاری متفاوت به‌عنوان عامل اصلی و ۳۶ اکوتیپ به‌عنوان عامل فرعی با ۳ تکرار در مزرعه مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی کرمان واقع شده در ۳۰ درجه و ۵ دقیقه عرض شمالی و ۵۷ درجه و ۲۸ دقیقه طول شرقی و ارتفاع ۱۹۶۹ متر از سطح دریا طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ کشت شدند (جدول ۱).

بذور در کرت‌ها به طول ۲ متر و عرض ۱ متر کاشت شدند. فاصله ردیف‌ها ۲۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف از هم ۵ سانتی‌متر تنظیم شد. کشت به صورت پاییزه و در اوایل دی‌ماه صورت گرفت.

آبیاری مزرعه در هر دو شرایط آبیاری نرمال و تنش خشکی تا مرحله ۵٪ گلدهی به‌طور مشابه انجام شد. از مرحله ۵٪ گلدهی به بعد، دور آبیاری تا زمان برداشت برای شرایط نرمال هر ۷ روز یکبار و برای شرایط تنش خشکی هر ۱۴ روز یکبار اعمال شد. در هر سال بعد از برداشت، بذر هر تیمار جداگانه خشک و سپس اسانس با استفاده از روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت از ۱۰ گرم بذر خشک شده و ساییده شده استخراج گردید. اسانس به دست آمده توسط سولفات سدیم رطوبت‌زدایی شد (۷). تجزیه و شناسایی ترکیب‌های اسانس توسط دستگاه‌های GC (گاز کروماتوگرافی) و GC/MS (گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی) انجام گرفت. در ابتدا اسانس‌ها به دستگاه GC تزریق و سپس درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام با روش نرمال‌کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح محاسبه گردید و پس از یافتن برنامه مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری هر ترکیب، اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی GC/MS تزریق شدند و طیف جرمی ترکیب‌ها مشخص گردید.

دستگاه GC/MS مدل Agilent با ستون موئینه‌ی HB-5MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر بود. برنامه دمایی ستون بدین شرح تنظیم شد: دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد، توقف در این دما ۵ دقیقه، دمای انتهایی آن ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما ۳ دقیقه و گرادیان حرارتی ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان

۰/۸ میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید. برنامه حرارتی دو دستگاه مشابه انتخاب شد. ظرفیت الکتریکی شناساگر eVIE ۷۰ بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و با تزریق هیدروکربن‌های نرمال (C7-C25) تحت شرایط یکسان و مقایسه آن با مقایسه طیف‌های جرمی با پیشنهاد کتابخانه دستگاه GC/MS صورت گرفت.

تجزیه واریانس مرکب بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1) انجام گرفت. جهت بررسی تغییر در کیفیت اسانس بعد از اعمال تنش خشکی، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام و نمودار بای‌پلات بر اساس ۲ مؤلفه اصلی با کمک نرم‌افزار Minitab (Ver. 17) ترسیم شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از GC-MS، تمامی ۱۳ ترکیب شناخته شده اسانس جزء مونوترپن‌ها بودند. نتایج تجزیه واریانس مرکب ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نشان داد که اثرات اصلی آبیاری، اکوتیپ و همچنین اثر متقابل آبیاری در اکوتیپ اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد (۰/۰۱ p) داشتند (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری در اکوتیپ بیشترین میزان پاراسیمن را در اکوتیپ محمدیه با میانگین ۴۱/۳۵ و کمترین میزان را در اکوتیپ زاوه تحت شرایط نرمال با میانگین ۹/۱ نشان داد. در شرایط آبیاری نرمال پاراسیمن به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیب اسانس اکوتیپ‌های محمدیه (۴۱/۳۵٪)، جوپار (۳۸/۷٪) و مشهد (۳۵/۹٪) و در شرایط تنش خشکی به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیب اسانس اکوتیپ‌های محمدیه و جوپار (۳۵/۸٪) شناسایی شد. بررسی اثر متقابل آبیاری و اکوتیپ نشان دهنده آن است که در بین تیمارها، اکوتیپ میبد در تنش خشکی بالاترین میزان گاماترپین را داشت (۳۴/۹۲) و کمترین مقدار آن مربوط به اکوتیپ بجنورد تحت شرایط نرمال (۸/۴) بود. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری در اکوتیپ، بالاترین میزان تیمول را در اکوتیپ زابل تحت تنش خشکی با میانگین ۷۲/۹۶ و کمترین را در اکوتیپ محمدیه تحت تنش نرمال با میانگین ۱۹/۰۲ نشان داد (جدول ۳).

در مطالعات دیگران تعداد ترکیبات موجود در اسانس زنیان بین ۱۲ تا ۱۷ مورد گزارش شده و اغلب تیمول، پاراسیمن و گاماترپین به‌عنوان اصلی‌ترین عناصر اسانس زنیان معرفی شده‌اند (۲۸، ۱۶، ۱۲، ۸، ۶). این در حالی است که شجاع‌الدینی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که کارواکرول، گاماترپین و پاراسیمن اصلی‌ترین ترکیبات اسانس زنیان آفریقای می‌باشند (۳۱). همچنین زید و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که آلفاترپین و سیمن اصلی‌ترین ترکیبات اسانس زنیان تحت شرایط نرمال رطوبتی و تنش خشکی بودند.

جدول ۱- اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نه استان کشور

Table 1. List of 36 collected ajowan ecotypes from nine different provinces of Iran

ردیف	استان	شهرستان (اکوتیپ)	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	کرمان	کوهبنان	1990	56 16 E	31 24 N
۲	کرمان	جوپار	1885	57 7 E	30 3 N
۳	کرمان	راور	1185	56 47 E	31 16 N
۴	کرمان	بردسیر	2036	5634 E	29 56 N
۵	کرمان	راین	2201	57 26 E	29 35 N
۶	کرمان	ماهان	1890	57 16 E	30 3 N
۷	کرمان	رفسنجان	1541	55 59 E	3021 N
۸	یزد	میبد	1613	54 22 E	30 2 N
۹	یزد	شاهدیه	1215	54 20 E	31 54 N
۱۰	یزد	صدوق	2091	53 28 E	32 1 N
۱۱	یزد	یزد	992	55 24 E	31 36 N
۱۲	یزد	اردکان	1011	53 57 E	32 21 N
۱۳	فارس	سروستان	1547	53 13 E	29 16 N
۱۴	فارس	فسا	2118	52 16 E	30 3 N
۱۵	فارس	مرودشت	1740	54 2 E	29 7 N
۱۶	اصفهان	فلاورجان	2589	5018 E	33 1 N
۱۷	اصفهان	نجف آباد	1154	52 22 E	33 23 N
۱۸	اصفهان	ناین	1560	53 5 E	32 50 N
۱۹	اصفهان	سمیرم	2331	51 34 E	31 23 N
۲۰	خراسان شمالی	بجنورد	1069	57 19 E	37 28 N
۲۱	خراسان شمالی	گرمه	675	56 44 E	37 39 N
۲۲	سیستان و بلوچستان	زابل	480	61 49 E	31 02 N
۲۳	سیستان و بلوچستان	زاهدان	1385	60 89 E	29 47 N
۲۴	خراسان جنوبی	فردوس	1293	58 17 E	34 01 N
۲۵	خراسان جنوبی	قاین	1432	59 18 E	33 73 N
۲۶	خراسان جنوبی	سربیشه	1839	59 81 E	32 59 N
۲۷	خراسان جنوبی	بشرویه	880	57 43 E	33 86 N
۲۸	خراسان جنوبی	بیرجند	1491	59 21 E	32 87 N
۲۹	مرکزی	شازند	1920	49 42 E	33 93 N
۳۰	مرکزی	اراک	1735	49 42 E	34 5 N
۳۱	مرکزی	خمین	1830	50 05 E	33 63 N
۳۲	خراسان رضوی	چناران	1610	59 11 E	36 64 N
۳۳	خراسان رضوی	محمديه	1315	58 21 E	35 15 N
۳۴	خراسان رضوی	زاهه	1750	59 72 E	35 26 N
۳۵	خراسان رضوی	گناباد	1150	58 67 E	34 35 N
۳۶	خراسان رضوی	مشهد	1050	59 57 E	36 30 N

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری در اکتیپ برای ترکیبات اصلی اسانس (تیمول، گاماترپین و پاراسیمن)
Table 3. Means comparison of irrigation*ecotypes interval effects for main composition of essential oils (Thymol, Gama-terpinene and p-Cymene)

زمان بازداری	پاراسیمن	گاماترپین	تیمول			
	۱۰۲۵	۱۰۵۷	۱۲۹۰			
فرمول	C _{۱۰} H _{۱۴}	C _{۱۰} H _{۱۶}	C _{۱۰} H _{۱۴} O			
تیمار	نرمال	تنش	نرمال	تنش		
۱	۱۹/۸ k-m	۱۷/۵ o-r	۳۳/۱ a-c	۳۱/۲ a-c	۳۵/۹ z	۳۷/۸ yz
۲	۳۸/۷ b	۳۵/۸ c	۱۹/۲ k-s	۱۷/۰۴ p-v	۲۹/۲ b'	۳۲/۰۹ a'
۳	۲۰/۶ j-l	۱۵/۹ s-u	۱۸/۸ m-s	۱۶/۹ p-v	۵۲/۶ j-m	۶۰/۸ de
۴	۱۸/۰۶ n-p	۱۱/۸ x	۱۹/۰۵ l-s	۱۲/۶ v-z	۵۵ f-i	۶۵/۵ c
۵	۲۱/۸ j	۱۹/۱ mn	۲۲/۹ f-m	۲۰/۲ h-q	۴۷/۱ st	۴۹/۶ o-r
۶	۱۹/۶ lm	۱۸/۱ n-p	۲۳/۶ e-l	۱۸/۷ m-s	۴۷/۱ r-t	۳۵/۵ h-k
۷	۱۷/۹ n-q	۱۵/۶ tu	۲۲/۲ f-o	۱۹/۲ j-s	۴۸/۵ q-t	۵۲/۸ i-m
۸	۳۲/۵ d	۲۵/۷ hi	۳۴/۹ a	۳۰/۱۵ b-d	۲۰/۵ d'	۳۰/۸ a b'
۹	۲۵/۸ hi	۱۹/۶ lm	۱۸/۵ m-s	۱۷/۷ p-u	۴۴/۶ uv	۵۲/۰۴ j-n
۱۰	۱۸/۲ n-p	۱۴/۸ uv	۲۵/۹ d-g	۲۳/۸ e-k	۴۳/۷ v	۵۰/۸ m-q
۱۱	۲۴/۶ i	۲۰/۸ j-l	۱۴/۶ u-x	۱۱/۷ w-z	۴۹/۹ n-r	۵۳/۴۲ h-k
۱۲	۱۸/۱ n-q	۱۵/۸ s-u	۱۲/۹ v-z	۹/۱ yz	۵۹/۵ e	۶۲/۲ d
۱۳	۱۹/۱ mn	۱۶/۹ p-s	۲۴/۵ e-i	۲۰/۸ h-p	۴۶/۹ st	۵۱/۰۲ l-p
۱۴	۲۰/۹ jk	۱۹/۶ lm	۱۵/۱ r-x	۱۰/۸۶ x-z	۵۲/۱ j-n	۵۶/۱ f
۱۵	۱۸/۲ n-p	۱۶/۷ q-t	۱۶/۹ p-v	۱۵/۰۷ r-x	۵۳/۲ h-l	۵۹/۴ e
۱۶	۲۱/۸ j	۱۹/۸ k-m	۲۰/۶ h-p	۱۸/۱ n-s	۵۰/۵ m-q	۵۵/۸ fg
۱۷	۳۰/۹ e	۲۴/۸ hi	۱۸/۹ m-s	۱۹/۵ j-s	۳۷/۶ yz	۴۱/۸ w
۱۸	۲۱/۱ jk	۱۵/۷ s-u	۲۳/۰۲ f-m	۱۹/۷ j-s	۴۹/۵ o-r	۵۱/۲ k-o
۱۹	۱۷/۸ n-p	۱۵/۸ s-u	۲۴/۶ e-i	۲۱/۸ g-o	۵۰/۵ m-q	۵۲/۱ j-n
۲۰	۲۱/۱ jk	۱۸/۶ m-o	۱۱/۹ w-z	۸/۴ z	۵۶/۱ fg	۶۰/۹ de
۲۱	۲۱/۱ jk	۱۲/۶ wx	۲۰/۰۳ i-q	۱۳/۸ u-x	۵۰/۷ m-q	۶۲/۱ d
۲۲	۱۸/۶ m-o	۱۳/۶ vw	۱۸/۷ m-s	۱۱/۹ w-z	۵۵/۷ fg	۶۴/۴ c
۲۳	۲۸/۳ g	۲۱/۸ j	۲۳/۸۱ e-k	۱۵/۷ r-w	۴۰/۶ wx	۵۲/۴ j-m
۲۴	۱۹/۱ mn	۱۵/۵ tu	۲۳/۶ e-l	۱۹/۸ j-r	۵۲/۷ j-m	۵۵/۸ fg
۲۵	۱۷/۸ n-q	۱۳/۹ v	۲۳/۸ e-k	۱۹/۵ j-r	۴۹/۵ o-r	۵۳/۶ g-j
۲۶	۱۷/۱ p-s	۱۵/۸ s-u	۳۳/۷ ab	۲۶/۶ d-f	۳۹/۵ xy	۴۶/۹ st
۲۷	۲۰/۶ j-l	۱۷/۵ o-r	۱۸/۷ m-s	۱۸/۹ m-s	۵۲/۶ j-m	۵۵/۱ f-h
۲۸	۳۰/۶ ef	۲۵/۹ h	۲۰/۸۱ h-p	۱۷/۹ o-u	۳۶/۸ z	۴۴/۱ v
۲۹	۲۷/۵ g	۲۵/۷ hi	۲۴/۷ e-h	۲۳/۷ e-l	۳۶/۳ z	۳۹/۶ xy
۳۰	۱۷/۷ n-q	۱۶/۴ r-t	۱۳/۵۷ u-y	۲۰/۸ h-p	۴۸/۷ p-s	۵۱/۸ j-o
۳۱	۲۰/۹ j-l	۱۷/۸ n-q	۲۵/۶۷ e-g	۲۴/۰۱ e-i	۴۷/۱ st	۴۹/۸ n-r
۳۲	۲۱/۸۵ j	۱۷/۸ n-q	۲۸/۰۴ c-e	۲۴/۷ e-i	۳۷/۲ z	۵۰/۸ m-q
۳۳	۴۱/۳۵ a	۳۵/۸ c	۲۵/۶۱ e-g	۲۲/۷ f-n	۱۹/۰۲ d'	۲۶ c'
۳۴	۱۱/۵ x	۹/۱ y	۱۰/۹ x-z	۸/۵۷ z	۶۸/۵ b	۷۲/۹ a
۳۵	۱۵/۴ tu	۱۱/۵ x	۲۶/۵ e-d	۲۴/۵ e-i	۴۶/۴ tu	۵۰/۷ m-q
۳۶	۲۵/۹ c	۲۹/۶ f	۳۰/۸ a-c	۲۴/۶۵ e-i	۲۱/۰۴ d'	۳۰/۸ a b'

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد دارند.

باشد. در حقیقت آسیمیلاسیون برای تولید مقدار ترین بیشتر تحت شرایط تنش خشکی، می‌تواند به‌علت کاهش تخصیص کربن به رشد جهت تلاش برای حفظ بقا باشد (۳۶،۲۴،۲). در این رابطه فرضیه‌های متفاوتی مطرح شده است:

فرضیه اول که موازنه کربن- عناصر غذایی (CNB) نام دارد. گیاه کربن را در صورت دسترسی به عناصر غذایی به رشد اختصاص می‌دهد. کاهش جذب مواد غذایی به‌واسطه خشکی خاک تأثیر بیشتری نسبت به کاهش فتوسنتز بر محدود شدن رشد گیاه دارد و کربن موجود در گیاه جهت سنتز هیدرات‌های کربنی هدایت می‌شود و در نتیجه متابولیت‌های ثانویه کربن‌دار تولید می‌شوند.

فرضیه دیگر به موازنه رشد- تمایز (GDBH) اشاره دارد و بیان می‌کند تا زمانی که امکان تقسیم و گسترش سلولی وجود

تفاوت در ترکیبات اسانس در شرایط مختلف محیطی توسط عسکری و همکاران (۲۰۱۸) و محمدی و همکاران (۲۰۱۸) در آویشن دنايي و آویشن باغی و رضوی‌زاده و همکاران (۲۰۱۷) در زنیان نیز گزارش شده است.

افزایش مقدار مونوترپن‌ها در گیاهان دارویی دیگر به‌ویژه مریم‌گلی، سنبل‌بری و بادرنجبویه تحت تیمار تنش خشکی گزارش شده است (۲۴،۱۹،۲۱،۵،۱۸). نتیجه بررسی اثر تنش خشکی بر گل‌راعی نشان داد که در گیاهان تیمار شده در مقایسه با شاهد محتوای ترکیبات فنلی افزایش داشت (۹).

تفاوت در ترکیبات اسانس طی تنش خشکی می‌تواند به‌دلیل تغییر در فعالیت‌های آنزیمی و متابولیسمی باشد (۱۶). افزایش مقدار بیوسنتز ترین‌ها طی اعمال تنش خشکی می‌تواند به‌علت تأثیر غیر مستقیم بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها

اکوتیپ‌های زاوه، اردکان، بجنورد و زابل که در قسمت پایین سمت چپ و در داخل دایره نشان داده شده‌اند اکوتیپ‌های کرانه‌ای دارای تیمول بالا در شرایط آبیاری نرمال بودند (شکل ۱).

در شرایط تنش خشکی پاراسیمین و بتاپینین بالاترین ضریب را در مؤلفه اول داشتند در حالی که برای مؤلفه دوم بالاترین ضریب مربوط به تیمول بود (جدول ۴). با توجه به نمودار بای‌پلات در شرایط تنش خشکی اکوتیپ‌های محمدیه، جوپار، کوهبنان، مشهد، میند، شازند و بیرجند مانند شرایط نرمال در گروه پاراسیمین قرار گرفتند در حالی که اکوتیپ‌های چناران و زاهدان در شرایط تنش بر خلاف آبیاری نرمال در گروه تیمول قرار گرفتند.

اکوتیپ زابل با داشتن بالاترین میزان برای مؤلفه دوم به‌عنوان اکوتیپ کرانه‌ای با مقدار تیمول بالا تحت شرایط تنش خشکی شناسایی شد. به‌علاوه اکوتیپ‌های زاوه، گناباد، اردکان، فسا و مرودشت نیز با داشتن مؤلفه دوم بالا جزء اکوتیپ‌ها با میزان تیمول بالا قرار گرفتند. اکوتیپ بجنورد که در شرایط نرمال تیمول بالایی تولید کرد تحت تنش خشکی با تولید میزان متوسط تیمول متفاوت عمل نمود.

با توجه به منشأ اکوتیپ‌های هر گروه می‌توان پیشنهاد کرد که بیشترین میزان تیمول مربوط به اکوتیپ‌هایی است که از مناطق خشک و نیمه‌خشک جمع‌آوری شده بودند. اکوتیپ زابل که در هر دو شرایط تنش و نرمال میزان تیمول بالایی داشت از منطقه‌ای در بلوچستان که به‌عنوان منشأ این گیاه شناخته می‌شود جمع‌آوری شد (۲۲). در اقلیم نیمه‌خشک کمبود آب از یک طرف و افزایش شدت نور از طرف دیگر بر فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهان تأثیر می‌گذارد و باعث آسیب به گیاه می‌شود. گیاهان دارویی رشد یافته در شرایط نیمه‌خشک اغلب میزان بالاتری از ترکیبات طبیعی را نسبت به گیاهان رشد یافته در شرایط نرمال تولید می‌کنند (۳۰، ۳۳).

بر اساس نتایج این پژوهش اکوتیپ‌های زینان ایران پلی‌مورفیسیم بیوشیمیایی بالایی داشتند. همچنین اکوتیپ با منشأ زابل با توجه به محتوای بالای تیمول نسبت به دیگر اکوتیپ‌ها طی شرایط نرمال و تنش خشکی به‌عنوان اکوتیپ مناسب کشت برای مناطق نیمه‌خشک و یا کشت دیم در صورتی که به‌دست آوردن تیمول در اولویت کشت باشد پیشنهاد می‌شود.

به‌علاوه دو اکوتیپ زابل و محمدیه به‌ترتیب با داشتن بیشترین و کمترین مقدار تیمول به‌عنوان ژرم پلاسماهای کرانه‌ای برای بررسی ژن‌های مرتبط با بیوسنتز تیمول و همچنین اصلاح رقم با محتوای بالای تیمول برای مناطق خشک و نیمه‌خشک معرفی می‌شوند.

داشته باشد کربن صرف رشد می‌شود. در زمان کمبود آب رشد متوقف شده و گیاه کربن را در مسیر سنتز و تشکیل مخازن متابولیت‌های ثانویه مصرف می‌کند.

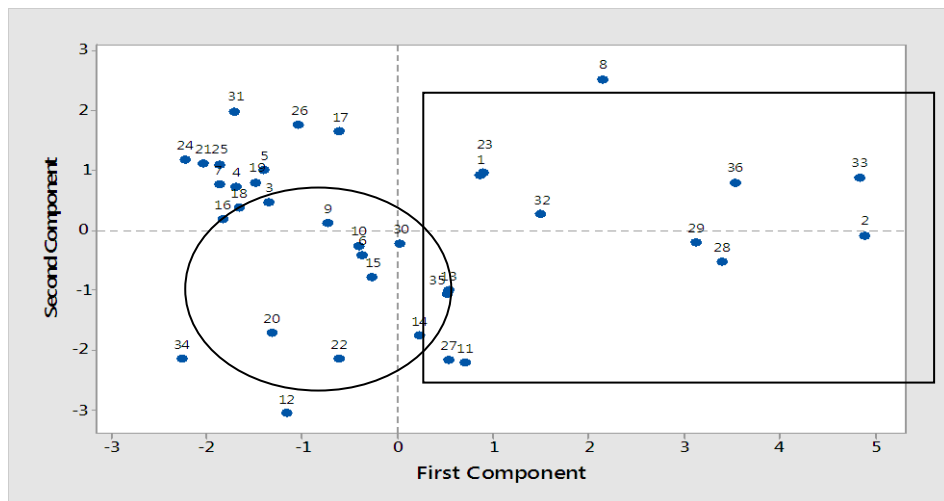
اخیراً مفهوم جامعی در این ارتباط مطرح شده‌است. گیاهان زمانی که با کمبود آب مواجه می‌شوند تحت تنش خشکی (همراه با عدم محدودیت انرژی نورانی) بسته شدن روزنه‌ها، جذب بالای CO₂ را کاهش می‌دهد و باعث کاهش شدید فتوسنتز می‌شود. به‌طور همزمان مصرف کوآنزیم‌های احیا (+NADPH+H) به‌مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و حجم زیادی از این اکوالنت‌های احیا انباشته می‌شوند. در نتیجه مقدار کمی از کوآنزیم‌های کاهش یافته اکسید شده (+NADP) به‌عنوان گیرنده الکترون در دسترس خواهند بود. به‌نوبه خود مقادیر زیادی +NADPH+H در سلول تجمع یافته و یک جایگاه به‌شدت کاهش یافته را ایجاد می‌نمایند. با توجه به روند کاهش کوآنزیم‌ها (+NADPH+H) واکنش‌هایی باید در جهت مصرف آن‌ها فعالیت کنند که در نتیجه سنتز ترکیب‌های ثانویه مثل فنل‌ها، ترپن‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک افزایش می‌یابند (۳۰).

تغییر در مقدار ترکیبات اسانس نشان‌دهنده تغییر کیفیت اسانس اکوتیپ‌ها تحت تنش خشکی است. این نکته که تغییر همیشه مثبت نمی‌باشد دارای اهمیت است (۳۴، ۲۷، ۳۵). با توجه به این که تیمول اصلی‌ترین ترکیب اسانس اغلب اکوتیپ‌ها بود و از طرف دیگر این ترکیب به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی خواص دارویی زیادی دارد تغییر مثبت به‌صورت تغییر در جهت افزایش مقدار تیمول اسانس شناخته می‌شود (۲۰).

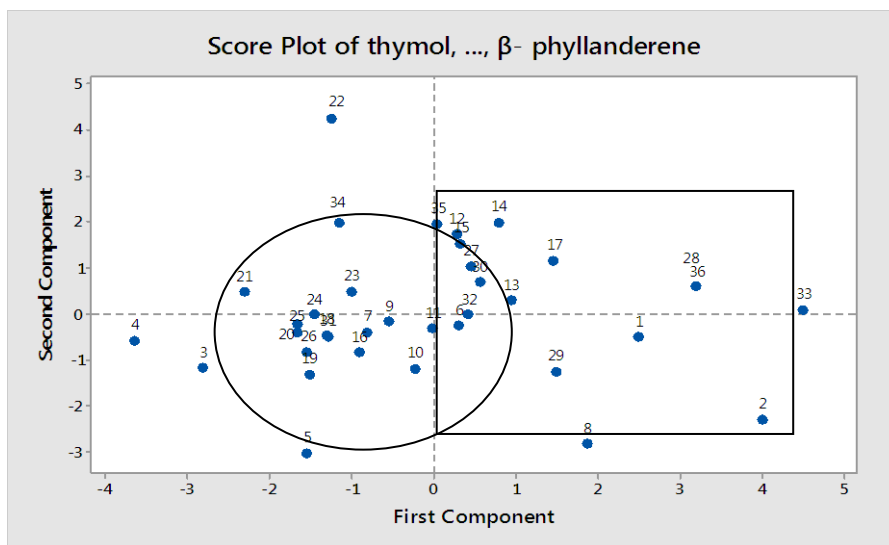
نمودار بای‌پلات جهت نشان دادن شباهت و تفاوت بین اکوتیپ‌ها و همچنین بررسی تغییرات در کیفیت اسانس آن‌ها تحت تنش خشکی بر اساس دو مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی رسم گردید (شکل ۱ و ۲). مؤلفه اول ۹۷٪ از تغییرات را در هر دو شرایط نرمال رطوبتی و تنش خشکی توجیه نمود (جدول ۴). تحت شرایط آبیاری نرمال، پاراسیمین در مؤلفه اول بالاترین ضریب را داشت (۴۰۹/۰)، در حالی که گاماترپینین و کارواکرول در مؤلفه دوم ضرایب بالایی به‌ترتیب معادل (۵۲/۰) و (۴۰۲/۰) داشتند و در هر دو مؤلفه تیمول دارای ضریب منفی بود. بر اساس نمودار بای‌پلات در شرایط آبیاری معمولی اکوتیپ‌ها به ۲ گروه اصلی تقسیم شدند. اکوتیپ‌های محمدیه، جوپار، مشهد، بیرجند، کوهبنان، میند، چناران، زاهدان و شازند که مؤلفه اول و دوم بالایی داشتند در گروه پاراسیمین قرار گرفتند. این گروه در نمودار بای‌پلات با مربع نشان داده شده است (شکل ۱).

جدول ۴- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ترکیبات اساسی زنیان تحت شرایط آبیاری معمولی و تنش خشکی
Table 2. Results of principal component analysis in normal and drought stress conditions

تنش خشکی		آبیاری معمولی		نام ترکیبات
مؤلفه دوم	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه اول	
۰/۳۵۲	-۰/۴۰۴	-۰/۴۱	-۰/۳۹	تیمول
-۰/۲۴۷	۰/۴۱۵	-۰/۲۱	۰/۴۰۹	پاراسیمین
-۰/۳۸	۰/۱۷	۰/۵۲	۰/۱۳۹	گاماترپینین
۰/۰۰۱	۰/۳۹	-۰/۲۰۲	۰/۳۶۲	آلفاتوجن
۰/۰۶۳	۰/۰۷	-۰/۰۰۱	۰/۳	آلفا پیپین
۰/۰۸	۰/۴۵	-۰/۱۳۷	۰/۴	بتا پیپین
-۰/۰۵	-۰/۰۱۶	-۰/۱۸۶	۰/۳۱	بتا میرسن
-۰/۳	-۰/۰۱۶	-۰/۱۰۷	-۰/۰۰۲	بتا توژن
-۰/۲۶	-۰/۲۹	۰/۳۳۷	-۰/۲۱	آلفاترپینین
-۰/۴۴	-۰/۱۳	-۰/۱۴	۰/۱۱	تریپنول
-۰/۳۸۱	-۰/۲۷	۰/۱۷	-۰/۳۴	پولگون
-۰/۱۵	-۰/۲۳	۰/۴۰۲	-۰/۱۴	کارواکربول
-۰/۰۶۶	۰/۱۱	-۰/۲۶۹	-۰/۰۹	بتا فیلاندرن
۲/۲	۲/۸	۳/۲	۳/۳	بردار ویژه
۹۹	۹۷	۹۹	۹۷	واریانس جمعی



شکل ۱- نمودار بای پلات ۳۶ اکوتیپ زنیان در شرایط آبیاری معمولی
Figure 1. Bi-plot graph of 36 ajowan ecotypes in normal condition



شکل ۲- نمودار بای پلات ۳۶ اکوتیپ زنیان در شرایط تنش خشکی
Figure 2. Bi-plot graph of 36 ajowan ecotypes in drought stress condition

منابع

1. Abedi, Z., H. Najafi Zarrini, S.M. Emadi and N. Bagheri. 2019. Evaluation of Relationship between Agronomical and Physiological Traits of Soybean and Grouping of Soybean Genotypes under Different Amount of Sulfur Application. *Journal of Crop Breeding*, 11: 134-142.
2. Aliabadi Farahani, H., A.R. Valadabadi, J. Daneshian, H. Shiranirad and A. Katava. 2009. Medicinal and aromatic plants farming under drought conditions. *Journal of Horticulture and Forestry*, 1(6): 086-092.
3. Askary, M., M.A. Behdani, S. Parsa, S. Mahmoodi and M. Jamalhmadi. 2018. Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crop and Products*, 111: 336-344.
4. Bahreininejad, B., J. Razmjoo and M. Mirza. 2013. Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. *International Journal of Plant Production*, 7(1): 151-166.
5. Bahreininejad, B., J. Razmjoo and M. Mirza. 2014. Effect of water stress on productivity and essential oil content and composition of *Thymus carmanicus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5): 717-725.
6. Bairwa, R., R.S. Sodha and B.S. Rajawat. 2012. *Trachyspermum ammi* L. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11): 56-60.
7. Chauhan, B., G. Kumar and M. Ali. 2012. A Review on Phytochemical Constituents and Activities of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague fruits. *American Journal of Pharmtech Research*, 2(4): 1-12.
8. Davazdah, E.S., F. Sefidkon, M. Jahansooz and D. Mazaheri. 2011. Chemical Composition of the Essential Oils from foliage and Seeds of ajowan *Trachyspermum ammi* L. Sprague in two planting dates (spring and summer). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(5): 639-642.
9. De Abreu, I.N. and P. Mazzafera. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 241-248.
10. Dwivedi, S., N. Mishra and R.P. Alava. 2012. aneeta, Phytochemistry, Pharmacological studies and Traditional benefits of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(5): 1705-1709.
11. Esmaeili, A. and S. Ghobadianpour. 2016. Antibacterial activity of *Carum copticum* extract loaded MnFe₂O₄ nanoparticles coated with PEGylated chitosan. *Industrial Crop and Products*, 91: 44-48.
12. Fazeli-nasab, B. and Z. Fooladvand. 2016. A Review on Iranian *Carum copticum* (L.): Composition and Biological Activities. *European Journal of Medicinal Plants*, 12(1): 1-8.
13. Ghabraie, M., K.D. Vu, L. Tata, S. Salmieri and M. Lacroix. 2016. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *Food Science and Technology*, 66: 332-339.
14. Ghanbari, S., A. Nooshkam, B.A. Fakheri and N. Mahdinezhad. 2019. Relationship between Yield and its Component in Soybean Genotypes (*Glycine max* L.) using Multivariate Statistical Methods. *Journal of Crop Breeding*, 11: 85-92.
15. Kedia, A., B. Prakash, P.K. Mishra, A.K. Dwivedy and N. Dubey. 2015. *Trachyspermum ammi* L: essential oil as plant based preservative in food system. *Industrial Crop and Products*, 69: 104-109.
16. Khajeh, M., Y. Yamini, F. Sefidkon and N. Bahramifar. 2004. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 86(4): 587-591.
17. Khalid, K.A. 2006. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). *International Agrophysics*, 20: 289-296.
18. Liu, H., X. Wang, D. Wang, Z. Zou and Z. Lianga. 2011. Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Industrial Crop and Products*, 133: 84-88.
19. Manukyan, A. 2011. Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soil less greenhouse production: I. drought stress. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5: 119-125.
20. Mirahmadi, S., M.R. Hasandokht, F. Sefidkon and M.E. Hassani. 2012. A comparative study on chemical constituents of essential oils from different populations of *Achillea biebersteinii* Afan. growing wild in khorasan using multivariate statistical analyses. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(1): 1-13.
21. Mohammadi, H., M. Ghorbanpour and M. Brestic. 2018. Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. *Industrial Crop and Products*, 122: 119-132.

22. Nagulakshmi, S., N.B. Shankaracharya, J.P. Naik and L.J.M. Rao. 2000. Studies on chemical and technological aspects of ajowan aspects (*Trachyspermum ammi*). Journal of Food Science and Technology Mysore, 39: 277-81.
23. Nasrollahi, V., A. Mirzaie-asl, K. Piri, S. Nazeri and R. Mehrabi. 2014. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). Phytochemistry, 103: 32-37.
24. Nowak, M., M. Kleinwchter, R. Manderscheid, H.J. Weigel and D. Selmar. 2010. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. Journal of Applied Botany and Food Quality, 83(2): 133-136.
25. Petropoulos, S.A., D. Daferera, M.G. Polissiou and H.C. Passam. 2008. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. Scientia Horticulture, 15(4): 393-397.
26. Ramakrishna, A. and G.A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior, 6(11): 1720-1731.
27. Razavizadeh, R., F. Adabavazeh, F. Rostami and A. Teimouri. 2016. Comparative study of osmotic stress effects on the defense mechanisms and secondary metabolites in *Carum copticum* seedling and callus. Journal of Plant Process and Function, 5(18): 23-34.
28. Sahaf, B.Z., S. Moharramipour and M.H. Meshkatsadat. 2007. Chemical constituents and fumigant toxicity of essential oil from *Carumcopticum* against two stored product beetles. Insect Science, 14: 213-218.
29. Sarajuoghi, M., B. Abbaszadeh and M.R. Ardakani. 2014. Investigation morphological and physiological response of *Thymus vulgaris* L. to drought stress. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 5(2): 486-492.
30. Selmar, D. and M. Kleinwachter. 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Industrial Crop and Products.
31. Shojaaddini, M., S. Moharramipour and B.Z. Sahaf. 2008. Fumigant toxicity of essential oil from *Carum copticum* against Indian meal moth. Journal of Plant Protection Research, 48(4): 411-418.
32. Soltani Howyzeh, M., S.A. Sadat Noori, V. Shariati and M. Amiripour. 2018. Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant *Trachyspermum ammi* L. Nature, 8(13405): 1-19.
33. Sujatha, S., R. Bhat, C. Kannan and D. Balasimha. 2011. Impact of intercropping of medicinal and aromatic plants with organic farming approach on resource use efficiency in arecanut (*Areca catechu* L.) plantation in India. Industrial Crops and Products, 33: 78-83.
34. Weitzel, C. and H.T.C.P. Simonsen. 2015. Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes. Phytochemistry Reviews, 14: 2-7.
35. Zarshenas, M., M. Soliman, S.M. Mohammadi, P. Petramfar and M.R. Moein. 2014. Analysis of the essential oil components from different *Carum copticum* L. samples from Iran. Phcog Res Pharmacognosy Researc, 6(6): 62-66.
36. Zeid, F.A., E.A. Omer, A.Y. Amin and S.A.H. Hanafy. 2014. Effect of putrescine and salicylic acid on Ajwain plant (*Trachyspermum ammi*) at vegetatives stage grown under drought stress. International Journal of Agricultural Science and Research, 4(6): 61-79.

Evaluation of Changes in Essential oil of Ajowan (*Trachyspermum copticum* L.) Ecotypes under Drought Condition

Azadeh Karimi Afshar¹, Ghafar Kiani², Hamid Najafi Zarini² and Amin Baghi Zadeh³

1- PhD Student Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: azadehkarimi.a@gmail.com)

2- Assistant Professor and Associate Professor Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources

3- Associate Professor of Plant Breeding, Department of Biotechnology, Institute Science and High Technology and Environmental Science, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Received: April 9, 2019

Accepted: November 13, 2019

Abstract

Ajowan (*Trachyspermum copticum* L.) is one of the most important herbs of the Apiaceae family in semi-arid tropical regions of Iran, which is considerable in the production of essential oils with valuable secondary metabolites, especially thymol. In order to determine the secondary metabolites profile of ajowan under drought stress, a split plots experiment was conducted in two irrigation conditions (normal and drought stress) as main factor and 36 ecotypes of ajowan belong to 9 different provinces of Iran as sub plots were planted based on a randomized complete block design with 3 replications during 2015 and 2016 in Agricultural Jihad Research Station of Kerman. Based on the results of combine analysis, water stress has significant effect on the components of essential oil. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis revealed the presence of 13 compounds with the major constituents including thymol, p-cymene and γ -terpinene constituents in all ecotypes in both irrigation conditions. Based on bi-plot, two groups of high thymol and high p-cymene were identified. In this experiment, increasing the irrigation interval effected as an advantageous strategy to improve pharmacological component in some ecotypes. In conclusion, Zabol ecotype was superior to others, in terms of its relatively good performance of thymol, special in drought stress and it is recommended as suitable ecotype for cultivating in dryland and also where drought stress usually happens at the end of cropping season. Also, two ecotypes included Zabol and Mohammadih were identified as extreme ecotypes in response to drought stress in reproductive stage, these ecotypes could be recommended for breeding programs to obtain drought tolerant thymol-chemotype cultivars ajowan.

Keywords: Drought, GC/MS, PCA, Thymol, *Trachyspermum copticum*