

مقایسه اسیدهای چرب و هیدروکربن‌های گیاه دارویی خارمریم در سطوح مختلف تنش آبی

راحله قنبری محب سراج^۱، مهدی بهنامیان^{۱*}، اسدالله احمدی خواه^۲، وحید شریعتی^۳ و سارا دژستان^۱

^۱ ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه بیوتکنولوژی

^۳ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، گروه بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷



چکیده

تنش آبی یکی از مهم‌ترین عواملی است که مسیرهای متابولیکی را در گیاه تحت تاثیر قرار می‌دهد و بنابراین، سنتز و تجمع ترکیبات طبیعی از جمله اسیدهای چرب و هیدروکربن‌ها را در گیاهان دارویی تغییر می‌دهد. در این پژوهش، اثر سطوح مختلف تنش آبی (آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی، آبیاری در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و آبیاری در حد ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) بر میزان اسیدهای چرب و هیدروکربن‌های گیاه دارویی خارمریم مورد ارزیابی قرار گرفت. اعمال تنش خشکی در مرحله گلدهی انجام شد. سپس عصاره روغنی از بذور گیاهان به روش سوکسله استخراج و با استفاده از دستگاه GC-MS تجزیه و تحلیل شد. در نهایت ترکیبات شناسایی شده مورد آنالیز بیوانفورماتیکی قرار گرفت و مسیر واکنش‌ها و آنزیم‌های دخیل در این واکنش‌ها شناسایی شد. نتایج بدست آمده در این آزمایش بیانگر افزایش عملکرد اسیدهای چرب و هیدروکربن‌ها با افزایش شدت تنش بود. اسید چرب غالب شناسایی شده در عصاره روغنی خارمریم شامل لینولئیک اسید (۲۷/۴-۱۵/۲ درصد) و هیدروکربن غالب آن نیز شامل دودکان (۱۴/۱-۱۲/۳ درصد) بود. درصد اسیدهای چرب شناسایی شده تحت تاثیر تنش کاهش یافت که احتمالاً به دلیل تجزیه آن‌ها به هیدروکربن‌ها به منظور حفظ فشار اسمزی در شرایط کم آبی بود.

واژه های کلیدی: آنالیز بیوانفورماتیکی دودکان، عصاره روغنی، لینولئیک اسید، *Silybum marianum*

* نویسنده مسئول، تلفن: مهدی بهنامیان، ۰۹۱۴۴۱۴۵۰۷۲، پست الکترونیکی: mbehnamian@uma.ac.ir

مقدمه

گیاهی استفاده می‌شود (۲۵). فندقه‌های طبیعی این گیاه حاوی حدود ۰/۲ تا ۰/۶ درصد ترکیب سیلیمارین است (۳۰). ماریتیغال و روغن حاصل از آن در درمان بیماری‌های کبدی (۲۲) و کاهش میزان کلسترول بد خون (۴۱) کاربرد داشته و دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی (۲۰) می‌باشد. بیوسنتز و تجمع ترکیبات فعال در بافت‌های گیاهی به میزان زیادی به شرایط محیطی همبستگی دارد (۱۶ و ۵۵). تنش‌های محیطی، مسیرهای متابولیکی مربوط به متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار داده و بنابراین،

گیاهان دارویی مخازن اساسی بسیاری از ترکیبات و مواد دارویی می‌باشند که این ترکیبات علاوه بر عوامل ژنتیکی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرند (۳ و ۴۹). خارمریم (*Silybum marianum* L.) متعلق به خانواده Asteraceae که با نامهای خارشیری و ماریتیغال شناخته می‌شود، گیاهی یکساله و در بعضی رقم‌ها دوساله بوده و بومی نواحی مدیترانه است و در سرتاسر جهان گسترش یافته است (۱۹ و ۴۰). میوه این گیاه، فندقه به رنگ قهوه‌ای براق یا خاکستری است و معمولاً به‌عنوان داروی

سنتز و تجمع ترکیبات طبیعی در گیاهان را تغییر می‌دهد (۹).

تنش آبی یکی از جدی‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد گیاهان را محدود کرده و کمیت و کیفیت محصول را کاهش می‌دهد (۵۳ و ۳۷). تنش‌های محیطی با تغییر ساختمان غشا از لحاظ کمیت و کیفیت اسیدهای چرب و پروتئین‌ها، بر رشد گیاه تاثیر دارند (۴۲)، به طوری که Rezaeizad (۵۲) و Sibi (۵۷) نشان دادند که درصد روغن دانه در گل آفتابگردان و گلرنگ در اثر تنش خشکی دچار کاهش شد. کاهش عملکرد دانه و درصد روغن در شرایط تنش خشکی در فاز زایشی از گلدهی به بعد در کاهش عملکرد روغن سهیم می‌باشد (۶). دانشیان و جباری (۱۲) و عباسی سیه جانی و همکاران (۷) نیز گزارش کردند که حداکثر عملکرد روغن در گل آفتابگردان از گیاهان شاهد آبیاری شده حاصل شد و اعمال تنش شدید کم آبیاری به ترتیب باعث کاهش ۷۷ و ۶۵ درصدی عملکرد روغن شد. با توجه به ارزش اسیدهای چرب در صنایع داروسازی، غذایی و بهداشتی، روش‌های تهیه و تامین آن از منابع طبیعی و سنتزی دارای اهمیت است. از جمله این روش‌ها دستیابی به منابع گیاهی است که به علت فقدان اطلاعات لازم و کافی در مورد ساختار شیمیایی و ترکیبات آن‌ها کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۵). اسیدهای چرب به طور گسترده‌ای در طبیعت و مواد محتوی چربی پراکنده‌اند. مهم‌ترین شاخص یک روغن خوراکی محتوی اسید چرب و تنوع این اسیدها در روغن است (۲۴).

در پژوهشی که توسط گلی و همکاران (۵) روی گیاه ماریتیغال انجام شد مشخص شد که میزان اسید لینولئیک (۵۱/۲ درصد) و اولئیک (۲۸/۸ درصد) بیش از اسیدهای چرب دیگر است. در پژوهشی دیگر علی‌رضالو و همکاران (۴) میزان اسیدهای چرب روغن دانه ماریتیغال را اندازه‌گیری کرده و مشاهده کردند که در بین اسیدهای چرب اندازه‌گیری شده، بیشترین آن‌ها مربوط به لینولئیک

اسید (۳۹ درصد) و اولئیک اسید (۳۶/۷ درصد) بود. سایر اسیدهای چرب شامل پالمیتیک اسید (۱۰/۱ درصد)، استئاریک اسید (۶/۸ درصد)، لینولئیک اسید (۳/۶ درصد)، آراشیدیک اسید (۲/۹ درصد) و بهنیک اسید (۰/۵۷ درصد) بودند. گزارش‌ها نشان می‌دهد که روغن گیاه خارمریم شامل اسیدهای چرب ضروری و غیرضروری مانند لینولئیک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید، استئاریک اسید، پالمیتیک اسید و ترکیباتی مثل توکوفرول‌ها و فیتواسترول‌ها است که می‌تواند بعنوان روغن خوراکی مورد مصرف قرار بگیرد (۱۷).

یکی دیگر از سازوکارهای گیاه برای مقابله با تنش خشکی، تنظیم اسمزی می‌باشد. با تنظیم اسمزی تا حدی شرایط لازم برای ادامه جذب آب از محیط ریشه و حفظ و ادامه آماس سلول فراهم می‌شود (۲۳). برای این منظور، گیاهان از ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌کنند. برخی انواع کربوهیدرات‌ها در بین ترکیبات از اهمیت زیادی برخوردار هستند زیرا با فتوسنتز مرتبط می‌باشند (۵۱). توزیع مواد هیدروکربنی بطور مستقیم تحت تاثیر کمبود آب و بطور غیرمستقیم تحت تاثیر هورمون گیاهی قرار می‌گیرند. تجمع ترکیبات آلی مانند کربوهیدرات‌ها و آمینو اسیدها در سیتوپلاسم نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی گیاهان دارند (۱۸) سازوکارهای فوق منجر به رشد و نمو گیاه خارمریم با کمترین میزان دریافت آب و بدون کاهش عملکرد می‌شود (۸ و ۲۹). بنابراین، هدف از این تحقیق، بررسی میزان روغن و آنالیز محتوای اسیدهای چرب و هیدروکربن‌های موجود در بذر گیاه دارویی خارمریم تحت سطوح مختلف تنش آبی بود.

مواد و روشها

تهیه و کشت بذر: بذور گیاه دارویی خارمریم از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و در مزرعه ای با مساحت ۱۵۰ متر مربع، با فاصله ۲۵ سانتیمتر از یکدیگر در قسمت داغاب پشته‌هایی به عرض یک متر در عمق ۳ سانتیمتری

خاک کشت شده و هر ۳ روز یکبار به طور کامل آبیاری گردید. ترکیبات تشکیل دهنده خاک شامل ۱/۳ رس، ۱/۳ شن و ۱/۳ کمپوست برگی بود. میانگین دمای هوا، بارندگی، رطوبت نسبی و سرعت باد برای هر ماه از سایت هواشناسی ثبت شد (جدول ۱). پس از رشد گیاهان و رسیدن به مرحله گلدهی، تنش آبی روی آنها اعمال شد.

جدول ۱- اطلاعات اتمسفری مزرعه دانشگاه شهید بهشتی، منطقه

شمیرانات در سال های ۹۶-۹۷

اطلاعات اتمسفری	اسفند	فروردین	اردیبهشت	خرداد
میزان بارندگی (mm)	۶۰/۵	۷۶/۷	۰	۲۶/۳
میانگین دمای (°C)	۱۲/۷	۱۹/۶	۲۵/۸	۲۸/۱
رطوبت (%)	۵۳	۴۱	۱۹	۲۸
سرعت باد (mps)	۱۰	۱۷	۱۲	۱۰

روز دوم خاک به ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی رسید و در روزهای ششم و هشتم به ترتیب به ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی رسید.

نحوه اعمال تنش آبی و نمونه برداری: به منظور اعمال تنش آبی، نمونه‌های گیاهی مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به صورت یک روز در میان با ۲۵۰ لیتر آب (میزان آب تا پر شدن کامل جوی) آبیاری شدند و گیاهان مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به فاصله هر چهار روز با ۱۷۵ لیتر آب و نمونه‌های مربوط به تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به فاصله هر شش روز با ۱۰۰ لیتر آب آبیاری شدند. پس از گذشت ۸ روز، نمونه‌برداری جهت استخراج عصاره انجام گرفت. مراحل انجام این آزمایش، از کشت بذر تا برداشت نمونه سه ماه به طول انجامید. به منظور نمونه برداری، ۴ بوته گیاه به طور تصادفی روی هر پشته انتخاب شده و بذره‌های آنها پس از برداشت با هم ترکیب شده و به مدت یک ماه در دمای اتاق خشک گردید (۱ و ۲).

استخراج عصاره روغنی از بذور خارمریم: نمونه‌های بذر خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب به طور کامل پودر گردید و استخراج عصاره روغنی گیاه با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. برای این منظور ۲ گرم بذر از هر نمونه در کاغذ صافی پیچیده شد و در محفظه دستگاه قرار گرفت. سپس ۸۰ میلی لیتر حلال هگزان به آن اضافه شده و عمل عصاره‌گیری در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت انجام گردید. پس از این مدت، شیر سوکسله بسته شد تا هگزان موجود در عصاره بخار شود و عصاره بدست آمده تا زمان تجزیه در شیشه‌های تیره رنگ در یخچال نگهداری شد.

آماده‌سازی عصاره‌های روغنی و تجزیه توسط دستگاه GC-MS: تجزیه عصاره‌های روغنی با دستگاه GC-MS (TRACE/DSQ, Thermo Finnigan, USA) مجهز به ستون (Agilent company, United States) DB1 به طول ۶۰ متر،

تعیین میزان آب خاک: در این آزمایش، میزان آب خاک به روش وزنی تعیین گردید (۱ و ۲). برای این منظور، ابتدا کل زمین بطور کامل و اشباع آبیاری گردید و پس از رسیدن خاک به حد ظرفیت زراعی، هر روز به میزان یک کیلو خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری در سه تکرار از نقاط مختلف زمین برداشته و وزن شد. سپس نمونه‌های خاک در آون با دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده و در نهایت، وزن خشک آنها اندازه‌گیری گردید. زمانی که خاک در سطح ظرفیت زراعی بود میزان آب آن در سطح ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و سپس نمونه برداری از خاک تا زمانی که میزان آب آن به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی رسید، انجام گرفت. برای محاسبه میزان آب موجود در خاک ابتدا وزن تر خاک اندازه‌گیری شد سپس وزن خشک خاک نیز اندازه‌گیری و از وزن تر خاک کسر گردید. این عمل به مدت ۱۰ روز انجام شد. در

انجام شد و شکل‌ها و جداول با استفاده از برنامه‌های Word و Excel رسم گردید.

نتایج

ترکیب شیمیایی بذور خارمریم تحت شرایط متغیر آبیاری: نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای سطوح مختلف آبیاری (ظرفیت زراعی، ۷۰٪ ظرفیت زراعی و ۴۰٪ ظرفیت زراعی) از لحاظ مقادیر اسیدهای چرب لینولئیک اسید، سیس-۱۳-اکتادکانوئیک اسید، پالمیتیک اسید، استئاریک اسید (جدول ۲) و هیدروکربن-های دودکان، دکان، اکتان، تترادکان، هگزاکان، اکتادکان و ۳-متیل هپتان (جدول ۳) تفاوت معنی‌داری وجود داشت ولی بین بلوک‌ها در هیچ یک از ترکیبات اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

نتایج تجزیه GC-MS نشان داد که محتوای کل روغن استخراج شده در شرایط ظرفیت زراعی ۳۶۵/۴۱، در شرایط ۷۰٪ ظرفیت زراعی به میزان ۵۳۰/۰۷ و در نهایت در شرایط ۴۰٪ ظرفیت زراعی به میزان ۶۱۶/۵۸ سطح پیک بود.

قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. برای این منظور، ابتدا ۱/۵ میلی لیتر هگزان به هر نمونه اضافه و کمی تکان داده شد. سپس به منظور آب-گیری نمونه‌ها، یک میلی لیتر از فاز رویی برداشته شده و به همراه نیم گرم سدیم سولفات به مدت پنج دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت یک میکرولیتر از فاز رویی به دستگاه تزریق شد. سپس نتایج GC-MS در پژوهشکده گیاهان دارویی شهید بهشتی تجزیه و تحلیل شد و ترکیبات با بیشترین مقدار شناسایی و مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز بیوانفورماتیکی ترکیبات شناسایی شده: ترکیبات شناسایی شده حاصل از GC-MS با استفاده از پایگاه داده KEGG و METACYC آنالیز شد و واکنش‌های تولید کننده این ترکیبات، مسیر این واکنش‌ها و آنزیم‌های دخیل شناسایی گردید.

آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار R 3.6.1 و RStudio 1.1.463 انجام شد. آزمایش در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکج *agricolae* در سطح معنی‌داری ۰/۰۵

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس برخی از اسیدهای چرب اندازه گیری شده در گیاه دارویی خارمریم

Stearic acid	Palmitic acid	cis-13-Octadecenoic acid	Linoleic acid	درجه آزادی	منابع تغییرات
۴/۶۱ ^{ns}	۵/۰۱ ^{ns}	۴/۸۲ ^{ns}	۵/۱۶ ^{ns}	۲	بلوک
۸/۶۸۲ ^{**}	۲/۰۳ ^{**}	۲۷۳/۴۶ ^{**}	۴۲/۷۷ ^{**}	۲	تیمار تنش
۰/۰۷	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۴	خطا
۲/۰۳	۱/۳۰	۷/۲۵	۱/۱۶		ضرب تغییرات
ns عدم معنی داری		* معنی دار در سطح ۰/۰۰۵		** معنی دار در سطح ۰/۰۰۱	

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس برخی از هیدروکربن های اندازه گیری شده در گیاه دارویی خارمریم

3-methyl-Heptane	Octadecane	Hexadecane	Tetradecane	Octane	Decane	Dodecane	درجه آزادی	منابع تغییرات
۴/۷۱ ^{ns}	۵/۰۱ ^{ns}	۵/۱۶ ^{ns}	۵/۳۶ ^{ns}	۶/۰۶ ^{ns}	۴/۳۶ ^{ns}	۵/۲ ^{ns}	۲	بلوک
۱۷/۹۰ ^{**}	۳/۰۹۳ ^{**}	۸۹/۳۴ ^{**}	۴۸۷/۲ ^{**}	۲۷۸/۳ ^{**}	۲۱۶/۹ ^{**}	۱۳۵/۳ ^{**}	۲	تیمار تنش
۰/۰۵۷	۰/۰۱۲	۰/۰۳۷	۰/۰۱۹	۰/۰۲۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	۴	خطا
۱/۸۰	۴/۵۴	۱/۱۲	۹/۴۲	۱/۴۵	۱/۶۰	۹/۴۷		ضریب تغییرات
ns: عدم معنی داری			* معنی دار در سطح ۰/۰۰۵			** معنی دار در سطح ۰/۰۰۱		

کمترین درصد آن مربوط به استتاریک اسید بود. با مقایسه درصد اسیدهای چرب در هر سه سطح آبیاری مشخص شد که با افزایش شدت تنش درصد اسیدهای چرب در عصاره روغنی کاهش یافت (جدول ۴).

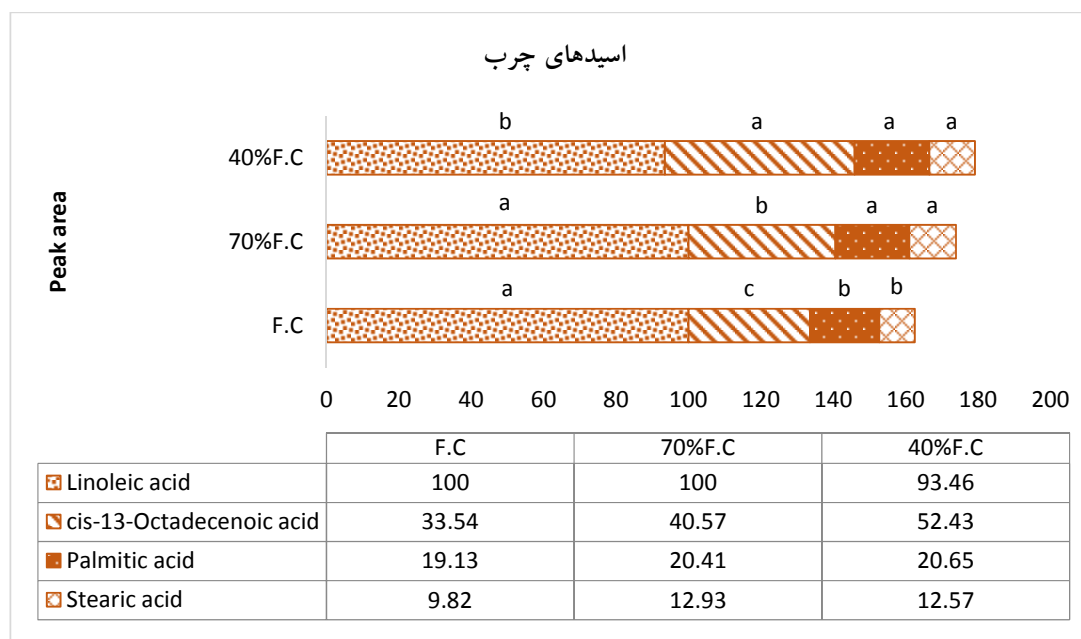
جدول ۴- درصد اسیدهای چرب گیاه دارویی خارمریم در سطوح مختلف آبیاری

اسید چرب	درصد اسیدهای چرب		
	ظرفیت	۷۰ درصد	۴۰ درصد
زرعی	ظرفیت	ظرفیت	ظرفیت
زرعی	زرعی	زرعی	زرعی
Linoleic acid	۲۷/۴	۱۸/۹	۱۵/۲
cis-13-Octadecenoic acid	۹/۲	۷/۷	۸/۵
Palmitic acid	۵/۲	۳/۹	۳/۳
Stearic acid	۲/۷	۲/۴	۲

مقدار کل سطح پیک در اسیدهای چرب اندازه‌گیری شده در عصاره روغنی در تیمار ظرفیت زراعی، ۱۶۲/۴۹، در تیمار ۷۰٪ ظرفیت زراعی، ۱۷۳/۹۱ و در تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی، ۱۷۹/۱۱ بود. مقدار بالای مجموع اسیدهای چرب در تیمارهای تنش به دلیل وجود مقادیر بالای اکتادکانوئیک اسید در روغن استخراج شده بود (شکل ۱).

اسیدهای چرب غالب شناسایی شده در عصاره روغنی خارمریم شامل لینولئیک اسید (۱۵/۲-۲۷/۴ درصد)، سیس-۱۳-اکتادکانوئیک اسید (۸/۵-۹/۲ درصد)، پالمیتیک اسید (۳/۳-۵/۲ درصد) و استتاریک اسید (۲-۲/۷ درصد) بوده و هیدروکربنهای غالب آن نیز شامل دودکان (۱۴/۱-۱۲/۳ درصد)، دکان (۱۱/۲-۱۵/۲ درصد)، اکتان (۱۶/۲-۱۰/۷ درصد)، تتراکان (۹/۲-۹/۵ درصد)، هگزاکان (۴-۳/۸ درصد)، اکتادکان (۱/۳-۱/۷ درصد) و ۳-متیل هپتان (۱/۲-۰/۷ درصد) بود که در سه سطح مختلف تنش شامل آبیاری در حد ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، آبیاری در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و آبیاری در حد ظرفیت زراعی متغیر بود.

اثر سطوح مختلف آبیاری بر محتوای اسیدهای چرب بذور گیاه دارویی خارمریم: نتایج حاصل از GC-MS نشان داد که عصاره روغنی خارمریم حاوی تعداد زیادی اسیدهای چرب می باشد که غالب‌ترین آن‌ها لینولئیک اسید، اکتادکانوئیک اسید، پالمیتیک اسید و استتاریک اسید بود (جدول ۴). در مطالعه حاضر، بیشترین درصد اسیدهای چرب در هر سه سطح آبیاری مربوط به لینولئیک اسید و



شکل ۱- میزان اسیدهای چرب گیاه دارویی خارمریم در سطوح مختلف آبیاری

در این میان، دودکان، دکان، اکتان، تترادکان، هگزاکان، اکتادکان و ۳-متیل هپتان بیشترین سهم را به خود اختصاص دادند. بیشترین درصد ترکیبات هیدروکربنی در عصاره روغنی این گیاه در شرایط ظرفیت زراعی مربوط به دودکان مشاهده شد ولی در شرایط ۷۰ درصد و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، بیشترین مقدار هیدروکربن به ترتیب متعلق به دکان و اکتان بود، در حالیکه کمترین درصد ترکیبات هیدروکربنی در همه تیمارها به ۳-متیل هپتان تعلق داشت. در مجموع، نتایج نشان داد که درصد هیدروکربن‌ها در عصاره روغنی گیاه با افزایش شدت تنش آبی، افزایش یافت.

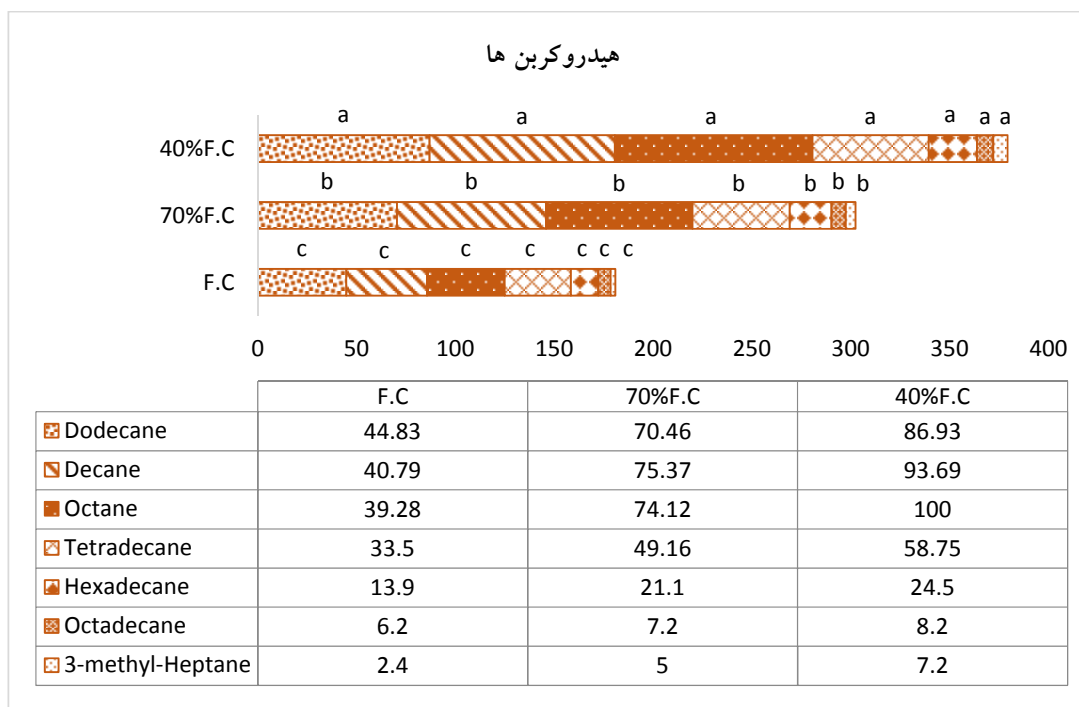
در این مطالعه، بیشترین سطح پیک در مجموع هیدروکربن‌ها (۳۷۹/۲۷) در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و کمترین آن (۱۸۰/۹۰) در تیمار ظرفیت زراعی مشاهده شد (شکل ۲).

اثر سطوح مختلف آبیاری بر محتوای هیدروکربنی بذور گیاه دارویی خارمریم: تجزیه عصاره روغنی گیاه دارویی خارمریم نشان داد که نمونه‌ها حاوی مقادیر متفاوتی هیدروکربن (آلکان) بودند (جدول ۵).

جدول ۵- درصد هیدروکربن‌های گیاه دارویی خارمریم در سطوح

مختلف آبیاری

هیدروکربن	درصد هیدروکربن‌ها		
	ظرفیت زراعی	۷۰ درصد	۴۰ درصد
Dodecane	۱۲/۳	۱۳/۳	۱۴/۱
Decane	۱۱/۲	۱۴/۲	۱۵/۲
Octane	۱۰/۷	۱۴	۱۶/۲
Tetradecane	۹/۲	۹/۳	۹/۵
Hexadecane	۳/۸	۴	۴
Octadecane	۱/۷	۱/۴	۱/۳
3-methyl-Heptane	۰/۷	۰/۹	۱/۲



شکل ۲- میزان هیدروکربن‌های گیاه دارویی خارمریم در سطوح مختلف آبیاری

آنالیز بیوانفورماتیکی اسیدهای چرب و هیدروکربن‌های

شناسایی شده: در زیست‌فناوری همواره به بررسی مسیرهای تولید ترکیبات طبیعی توجه می‌شود. یکی از روش‌هایی که امروزه بیش از هر موضوع دیگری در زمینه بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهی مورد توجه قرار دارد، آنالیز بیوانفورماتیکی ترکیبات می‌باشد. لذا در این مطالعه با توجه به اهمیت ترکیبات شناسایی شده در این گیاه، به شناسایی واکنش‌های تولید کننده این ترکیبات، مسیرهای واکنش و همچنین آنزیم‌های دخیل در این واکنش‌ها پرداخته شد. بررسی نتایج نشان داد که لینولئیک اسید غالباً در مسیر متابولیسم لینولئیک اسید و مسیرهای متابولیک فعال است، ولی سپس ۱۳-اکتادکنوئیک اسید در مسیر بیوستز اسیدهای چرب و بیوستز کوتین، سوربین و واکس نقش دارد. پالمیتیک اسید نیز در مسیر متابولیسم اسیدهای چرب، مسیرهای متابولیک و متابولیسم رتینول فعالیت دارد، در حالی که استئاریک اسید فقط در مسیر

بیوستز اسیدهای چرب نقش دارد. مهم‌ترین آنزیم‌های فعال در مسیر تولید اسیدهای چرب شامل لینولات لیپوکسیژناز، میکروزومال مونواکسیژناز، پالمیتیل کوآ-هیدرولاز، آسیل ACP هیدرولاز، امگا-مونوکسیژناز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی، پالمیتیل پروتئین هیدرولاز، آدنیلاز/ ترانسفراز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی می‌باشند. بعلاوه، تمامی هیدروکربن‌های شناسایی شده در این آزمایش در مسیر بیوستز آلکان فعالیت دارند و مهم‌ترین آنزیم فعال در این مسیر آلدهید دکربونیلز می‌باشد (جدول ۶). لذا با توجه به اطلاعات بدست آمده در این آزمایش و همچنین اهمیت اسیدهای چرب در صنایع غذایی و دارویی، می‌توان با استفاده از تکنیک مهندسی ژنتیک و افزایش بیان آنزیم‌های دخیل در این واکنش‌ها، بیان ژن‌های سنتز کننده این ترکیبات را افزایش داد. همچنین می‌توان این واکنش‌ها را در آزمایشگاه بازسازی کرد و ترکیبات را به صورت گسترده تولید نمود.

جدول ۶- واکنش‌ها، مسیر واکنش و آنزیم‌های درگیر در تولید اسیدهای چرب و هیدروکربن‌ها

ترکیبات	واکنش	مسیر واکنش	آنزیم‌های دخیل
	Linoleate + Oxygen \rightleftharpoons (9Z,11E)-(13S)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid	متابولیسم لینولئیک اسید	لینولات ۱۳S لیپوکسیژناز
	Linoleate \rightleftharpoons Rumenic acid	مسیرهای متابولیک	آراشیدونات ۱۵ لیپوکسیژناز
		متابولیسم لینولئیک اسید	لینولات ایزومراز
	Linoleate + Oxygen \rightleftharpoons (9Z,12Z)-(11S)-11-Hydroperoxyoctadeca-9,12-dienoic acid	متابولیسم لینولئیک اسید	لینولات ۱۱ لیپوکسیژناز
	Linoleate + 2 Ferrocycytochrome b5 + Oxygen + 2 H+ \rightleftharpoons Crepenynate + 2 Ferricytochrome b5 + 2 H2O	متابولیسم لینولئیک اسید	آسیل-لیپید دلتا ۱۲-استیلاز
	Linoleate + Oxygen + NADPH + H+ \rightleftharpoons 9(10)-EpOME + NADP+ + H2O	متابولیسم لینولئیک اسید	میکروزومال مونواکسیژناز
		مسیرهای متابولیک	
		متابولیسم لینولئیک اسید	میکروزومال مونواکسیژناز
	Linoleate + Oxygen + NADPH + H+ \rightleftharpoons 12(13)-EpOME + NADP+ + H2O	متابولیسم لینولئیک اسید	میکروزومال مونواکسیژناز
		مسیرهای متابولیک	
		متابولیسم لینولئیک اسید	لینولات ۹S لیپوکسیژناز
	Linoleate + Oxygen \rightleftharpoons 9(S)-HPODE	متابولیسم لینولئیک اسید	لینولات ۹S لیپوکسیژناز
	Linoleate + Oxygen \rightleftharpoons 8(R)-HPODE	متابولیسم لینولئیک اسید	لینولات ۸R لیپوکسیژناز
	Linoleate + Reduced acceptor + Oxygen \rightleftharpoons (6Z,9Z,12Z)-Octadecatrienoic acid + Acceptor + 2 H2O	متابولیسم لینولئیک اسید	آسیل کوآ ۶-دستوراز
		مسیرهای متابولیک	

فسفولیپاز A2	متابولیسم لینولئیک اسید مسیرهای متابولیک	Phosphatidylcholine + H2O \rightleftharpoons 1-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholine + Linoleate	میتس ۱۲-اکتادکنونیک اسید
پالمیتویل کوآ-هیدرولاز	بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع	Linoleoyl-CoA + H2O \rightleftharpoons CoA + Linoleate	
لینولات ۱۰R لیپوکسیژناز	متابولیسم لینولئیک اسید	Linoleate + Oxygen \rightleftharpoons (8E,10R,12Z)-10-Hydroperoxy-8,12-octadecadienoate	
اولئات ۱۰S لیپوکسیژناز	-	Linoleate + Oxygen \rightleftharpoons (8E,10S,12Z)-10-Hydroperoxyoctadeca-8,12-dienoate	
اولئات هیدراتاز	-	(R)-10-Hydroxystearate \rightleftharpoons (9Z)-Octadecenoic acid + H2O	
آسیل ACP هیدرولاز	بیوسنتز اسیدهای چرب	Oleoyl-[acyl-carrier protein] + H2O \rightleftharpoons Acyl-carrier protein + (9Z)-Octadecenoic acid	
پالمیتویل کوآ هیدرولاز	بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع	Oleoyl-CoA + H2O \rightleftharpoons CoA + (9Z)-Octadecenoic acid	
امگا-مونوکسیژناز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی پروکسیژناز بذر گیاه	بیوسنتز کوتین، سوبرین و واکس بیوسنتز کوتین، سوبرین و واکس	(9Z)-Octadecenoic acid + [Reduced NADPH---hemoprotein reductase] + Oxygen \rightleftharpoons 18-Hydroxyoleate + [Oxidized NADPH---hemoprotein reductase] + H2O (9Z)-Octadecenoic acid + Lipid hydroperoxide \rightleftharpoons cis-9,10-Epoxyoctadecenoic acid + Alcohol	پالمیتویل اسید
آمید هیدرولاز اسید چرب	-	Oleamide + H2O \rightleftharpoons (9Z)-Octadecenoic acid + Ammonia	
اولئات ۱۰S لیپوکسیژناز	-	(9Z)-Octadecenoic acid + Oxygen \rightleftharpoons (8E,10S)-10-Hydroperoxyoctadeca-8-enoate	
پالمیتویل کوآ هیدرولاز	طویل شدن اسیدهای چرب	Palmitoyl-CoA + H2O \rightleftharpoons CoA + Hexadecanoic acid	
پالمیتویل پروتئین هیدرولاز	چرب بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع مسیرهای متابولیک متابولیسم اسید چرب	ATP + Hexadecanoic acid + CoA \rightleftharpoons AMP + Palmitoyl-CoA + Diphosphate	
آسیل کوآ سینتاز	بیوسنتز اسیدهای چرب تخریب اسیدهای چرب مسیرهای متابولیک متابولیسم اسیدهای چرب	Hexadecanoic acid + 2 Hydrogen peroxide \rightleftharpoons Pentadecanal + CO2 + 3 H2O	
پروکسیداز اسید چرب	-	Hexadecanal + NAD+ + H2O \rightleftharpoons Hexadecanoic acid + NADH + H+	
آلدهید دهیدروژناز زنجیره های طولانی	تخریب اسید چرب	Hexadecanoic acid + Protein \rightleftharpoons Palmitoyl-protein + H2O	پالمیتویل اسید
پالمیتویل پروتئین هیدرولاز	-	Hexadecanoyl-[acp] + H2O \rightleftharpoons Acyl-carrier protein + Hexadecanoic acid	
سیستم سینتاز اسید چرب آسیل ACP هیدرولاز	بیوسنتز اسید چرب مسیرهای متابولیک متابولیسم اسید چرب	Retinyl palmitate + H2O \rightleftharpoons Retinol + Hexadecanoic acid	
-	متابولیسم رتینول		

۱۱- سیس رتینیل پالمیتات هیدرولاز	متابولیسم رتینول	$11\text{-cis-RetinyI palmitate} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 11\text{-cis-Retinol} + \text{Hexadecanoic acid}$	
پالمیتویل پروتئین هیدرولاز	-	$\text{S-Palmitoylprotein} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Hexadecanoic acid} + [\text{Protein}]\text{-L-cysteine}$	
امگا-مونوکسیژناز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی	بیوسنتز کوتین، سوبرین و واکس مسیرهای متابولیک	$\text{Hexadecanoic acid} + [\text{Reduced NADPH---hemoprotein reductase}] + \text{Oxygen} \rightleftharpoons 16\text{-Hydroxypalmitate} + [\text{Oxidized NADPH---hemoprotein reductase}] + \text{H}_2\text{O}$	
آدنیلاز/ ترانسفراز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی	-	$\text{ATP} + \text{Hexadecanoic acid} \rightleftharpoons \text{Diphosphate} + (\text{Palmitoyl})\text{adenylate}$	
آدنیلاز/ ترانسفراز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی	-	$\text{ATP} + \text{Hexadecanoic acid} + \text{Holo-}[(\text{hydroxy})\text{phthioceranic acid synthase}] \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{Diphosphate} + \text{Palmitoyl-}[(\text{hydroxy})\text{phthioceranic acid synthase}]$	
آسیل ACP هیدرولاز	بیوسنتز اسید چرب	$\text{Octadecanoyl-[acyl-carrier protein]} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Acyl-carrier protein} + \text{Octadecanoic acid}$	
پالمیتویل کوآ هیدرولاز	بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع	$\text{Stearoyl-CoA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CoA} + \text{Octadecanoic acid}$	استارایک اسید
آدنیلاز/ ترانسفراز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی	-	$\text{ATP} + \text{Octadecanoic acid} \rightleftharpoons \text{Diphosphate} + (\text{Stearoyl})\text{adenylate}$	
آدنیلاز/ ترانسفراز اسیدهای چرب با زنجیره طولانی	-	$\text{ATP} + \text{Octadecanoic acid} + \text{Holo-}[(\text{hydroxy})\text{phthioceranic acid synthase}] \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{Diphosphate} + \text{Stearoyl-}[(\text{hydroxy})\text{phthioceranic acid synthase}]$	
آلدئید دکربونیلاز	بیوسنتز آلکان	$\text{a long-chain fatty aldehyde} + 2 \text{ NADPH} + \text{oxygen} + \text{H}^+ \rightarrow \text{an alkane} + \text{formate} + 2 \text{ NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$	۲- متیل هپتان اکتان، تترادکان دودکان، دکان
آلدئید دکربونیلاز	بیوسنتز آلکان	$\text{a long-chain fatty aldehyde} \rightarrow \text{an alkane} + \text{carbon monoxide}$	
فتودکربوکسیلاز اسید چرب	-	$\text{a long-chain fatty acid} + \text{hv} + \text{H}^+ \rightarrow \text{a long-chain alkane} + \text{CO}_2$	
آلدئید دکربونیلاز	بیوسنتز آلکان	$\text{a long-chain fatty aldehyde} + 2 \text{ NADPH} + \text{oxygen} + \text{H}^+ \rightarrow \text{an alkane} + \text{formate} + 2 \text{ NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$	اکتادکان هگزا دکان
آلدئید دکربونیلاز	بیوسنتز آلکان	$\text{a long-chain fatty aldehyde} \rightarrow \text{an alkane} + \text{carbon monoxide}$	

بحث و نتیجه گیری

گیاهان به طور مداوم در معرض تنش‌های محیطی نامطلوب از جمله زخمی شدن، حمله عوامل بیماری‌زا، خشکی، سرما، شوری، نور بیش از حد و محدودیت غذایی قرار دارند. برای زنده ماندن در این شرایط، گیاهان باید تنش‌های محیطی را بشناسند و به سرعت واکنش‌های دفاعی متعددی را انجام دهند. همچنین، آنها مجبورند آسیب سلولی ناشی از تنش را کاهش دهند. چربی‌ها

ترکیبات اصلی و حیاتی سلولی هستند، زیرا پایه ساختار غشای سلولی و انرژی ذخیره‌ای برای متابولیسم را فراهم می‌سازند. آن‌ها همچنین می‌توانند شرایط خارج سلولی را حس کنند. پیام‌رسانی بواسطه چربی‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی رخ می‌دهد. پیشنهاد شده است که لیزوفسفولیپید، اسید چرب، اسید فسفاتیدیک، دی اسیل گلیسرول، اینوزیتول فسفات، اکسی لیپین‌ها، اسفینگولیپید و N اسیتانولامین به عنوان چربی‌های پیام‌رسان عمل می‌کنند (۳۳، ۳۵، ۴۵، ۴۷، ۵۹ و ۶۰).

مطالعات روی این گونه‌های چربی ناشی از تنش نشان داده است که هر دسته از چربی‌ها دارای ارتباط بیولوژیکی خاص، مکانیسم‌های بیوسنتزی و آبشارهای پیام‌رسان هستند که واکنش دفاعی را در سطح رونویسی فعال می‌کنند (۴۷، ۵۹ و ۶۰). علاوه بر نقش آن‌ها در پیام‌رسانی، چربی‌ها همچنین به عنوان کاهش‌دهنده شدت تنش عمل می‌کنند (۲۰، ۲۱، ۴۶، ۴۸ و ۵۰). برای کاهش تنش‌های خاص، چربی‌های منحصرفرد که در مقادیر کم تحت شرایط رشد طبیعی تجمع می‌یابند اغلب سنتز آن‌ها تحت شرایط تنش افزایش می‌یابد.

همچنین نشان داده شده است که اسیدهای چرب در پاسخ به تنش نقش دارند (۳۱). اسیدهای چرب آزاد بطور معمول در دوران پیری در سلول‌های حساس به خشکی تجمع یافته و علت کاهش یکنواختی غشا هستند (۵۸).

با توجه به نتایج ارائه شده در شکل ۱، مجموع اسیدهای چرب موجود در عصاره روغنی با افزایش شدت تنش آبی در گیاه دارویی خارمریم افزایش ولی درصد این اسیدهای چرب کاهش پیدا کرد (جدول ۲) که احتمالاً به دلیل نقش آنها در تخفیف تنش می‌باشد. ماهیت اسیدهای چرب که غشاهای لیپیدی گیاهان را تشکیل می‌دهند بستگی به دما و در دسترس بودن آب دارد (۳۶). از طرف دیگر، این عوامل نقش بسیار مهمی در حفظ پیکربندی عملکردی اسید چرب دارند (۲۷). کمبود آب می‌تواند لیپیدهای غشای پلاسمایی را تغییر دهد (۳۴ و ۱۳). به همان اندازه اندامک‌های مختلف سیتوپلاسمی بر عملکرد آنها و همچنین متابولیسم مناسب سلولی تأثیر می‌گذارد. افزایش درجه اسیدهای چرب اشباع شده و کاهش اسیدهای چرب اشباع نشده باعث ایجاد تغییرات در ساختار غشایی می‌شود، به طوری که غشاهای سلولی که دارای سطح اشباع نشده هستند در اثر تنش‌های محیطی مانند تنش آبی تغییر می‌کنند (۱۴). اسید چرب‌های استئاریک و پالمیتیک جزو اسیدهای چرب اشباع شده می‌باشند اما لینولئیک اسید

و سیس-۱۳-اکتادکانوئیک اسید جزو اسیدهای چرب اشباع نشده می‌باشند. اسیدهای چرب اشباع شده در شرایط تنش پایداری بیشتری نسبت به اسیدهای چرب اشباع نشده دارند، لذا در شرایط تنش از اهمیت بالاتری برخوردار هستند. در این مطالعه لینولئیک اسید در شرایط تنش کاهش پیدا کرده است اما سه اسید چرب دیگر افزایش پیدا کرده اند (شکل ۱). نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج ملک زاده و همکاران (۴۳) مطابقت دارد.

هیدروکربن‌های حاصل از اسیدهای چرب (مانند آلکان‌ها و آلکن‌ها) در بافت‌های بیرونی گیاهان و حشرات فراوان بوده و اغلب نشان‌دهنده بخش عمده موم‌های کوتیکولی هستند (۲۶ و ۳۹). تقریباً تمام قسمت‌های هوایی گیاهان با یک لایه هیدروکربنی که به طور عمده از موم و کوتین تشکیل شده است، پوشیده شده و به کاهش تنش ناشی از کمبود آب از طریق محدود کردن تعرق کمک می‌کند. موم و کوتین نقش مهمی در تحمل به خشکی گیاهان دارند (۵۴)، و تنش خشکی، شوری و تیمار ABA اغلب منجر به افزایش این لایه‌های هیدروکربنی در گیاهان متحمل می‌شود (۱۱، ۳۸، ۵۶ و ۶۱). همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است مجموع هیدروکربن‌های موجود در عصاره روغنی در شرایط تنش آبی در گیاه دارویی خارمریم افزایش پیدا کرده است. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده در این آزمایش، تنش آبی منجر به افزایش عملکرد اسیدهای چرب و هیدروکربن‌ها در گیاه دارویی خارمریم می‌شود که به دلیل پاسخ و مقابله با تنش می‌باشد.

امروزه هیدروکربن‌های گیاهی بویژه هیدروکربن‌های دارای تعداد کربن زوج به عنوان جایگزین برای تولید انرژی توسط محققین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۲). هیدروکربن‌ها همچنین به عنوان پوشش محافظ برای حفظ رطوبت گیاه، عوامل کاهش دهنده نفوذپذیری آب، مولکول پیام رسان در حشرات (۲۸) و بازدارنده اتلاف آب در گرده و تضمین زنده مانی آن، در نهایت بر فعل و انفعالات پاتوژن

جهت تولید انرژی و پوشش محافظ به منظور اهداف مختلف استفاده کرد.

در گیاه تاثیر می گذارد (۳۸ و ۱۰). با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، می توان از اسیدهای چرب این گیاه در اهداف تغذیه ای و دارویی و از هیدروکربن ها نیز

منابع

- ۴- علیرضالو، ک.، حصاری، ج.، علیرضالو، ا.، محمدی، م.، فتحی آچالویی، ب. ۱۳۸۹. بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و ترکیب اسید چربی روغن دانه ماریتیغال، مجله پژوهش های صنایع غذایی، ۲۱(۱): ۲۵-۳۳.
- ۵- گلی، ا.، کدیور، م.، بهرامی، ب. سبزلیان، م. ۱۳۸۶. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی روغن دانه ماریتیغال. مجله علوم و صنایع غذایی، ۴(۴): ۲۷-۳۲.
- ۶- فنایی، ح.ر.، ازمیل، ا. و پیری، ع. ۱۳۹۵. تاثیر کودهای بیولوژیک و شیمیایی بر عملکرد دانه، روغن و برخی صفات زراعی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) تحت رژیم های مختلف آبیاری. نشریه بوم شناسی کشاورزی، ۸(۴): ۵۵۱-۵۶۶.
- 7- Abbasi Seyahjani, E., Khomari, S. and Sadeghi, A. 2009. Comparison of performance potential of sunflower cultivars for seed and oil yield in water deficit stress conditions. *Journal of Crop Breeding*, 2:1-11.
- 8- Belitz, A.R. and Sams, C.E. 2007. The effect of water stress on the growth, yield, and flavonolignan content in milk thistle (*Silybum marianum*). In *International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants* 756: 259-266.
- 9- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7(7): 1099-1111.
- 10- Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R.P., Napier, J.A., Lessire, R. and Joubès, j. 2011. Overexpression of *Arabidopsis* ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 156: 29-45.
- 11- Cameron, K.D., Teece, M.A. and Smart, L.B. 2006. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiology*, 140:176-183.
- 12- Daneshian, J. and Jabari, H. 2009. Effect of irrigation and plant density on morphological characteristics and grain yield in a dwarf sunflower hybrid (CMS26 × R103) as second crop. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 10: 377-388.
- 13- ElSayed, A.I., El-hamamhy, M.A., Rafudeen, M.S., Mohamed, A.H. and Omar, A.A. 2019. The impact of drought stress on antioxidant responses and accumulation of flavonolignans in Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn). *Plants*, 8(12), 611.
- 14- El-Tohamy, W., Schnitzler, W. H., El-Behairy, U. and Singer, S. M. 1999. Effect of long-term drought stress on growth and yield of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Angewandte Botanik/ Applied Botany*, 73:173 – 177.
- 15- Ezeagu, I.E., Petzke, K.J., Lange, E., Metges, C.C. 1998. Fat content and fatty acid composition of oils extracted from selected wild-gathered tropical plant seeds from Nigeria. *JAOCs*, 75: 1031-6.
- 16- Falk, K.L., Tokuhisa, J.G., Gershenzon, J. 2007. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology*, 9(5):573-581.
- 17- Fathi-Achachlouei, B. and Azadmard-Damirchi, S. 2009. Milk thistle seed oil constituents from different varieties grown in Iran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86: 643-649.
- 18- Flagella, Z., Pastore, D., Campanile R.G. and Di Fonzo, N. 1995. The quantum yield or

- photosynthetic electron transport evaluated by chlorophyll fluorescence as indicator of drought tolerance in durum wheat. *The Journal of Agricultural Science, Cambridge Core*, 125(3): 325-329.
- 19-Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D. 2002. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*, 22(1): 51-65.
 - 20-Gasulla, F., Vom Dorp, K., Dombrink, I., Zahringer, U., Gisch, N., Dörmann, P. and Bartels, D. 2013. The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Cratogeomys plantagineum*: a comparative approach. *The Plant Journal*, 75:726741.
 - 21-Gaude, N., Nakamura, Y., Scheible, W.R., Ohta, H. and Dörmann, P. 2008. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 56:28-39.
 - 22-Gazak, R., Walterova, D. and Kren, V. 2007. Silybin and silymarin, new and emerging applications in Medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 315-338.
 - 23-Good, A. and Zaplachinski, S. 1994. The effects of drought on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 90: 9-14.
 - 24-Goode, G.K., Miller, J.P. and Heagerty, A.M. 1995. Hyperlipidemia, Hypertension, and Coronary Heart Disease. *Lancet*, 345: 362-364.
 - 25-Habán, M., Otepka, P., Kobida, L'. Habánová, M. 2009. Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion. *Horticultural Science (Prague)*, 36(2): 25-30.
 - 26-Hadley, N.F. 1989. Lipid water barriers in biological systems. *Progress in Lipid Research*, 28:1-33.
 - 27-Hamrouni, I., Salah, H. B. and Marzouk, B. 2001. Effects of water-deficit on lipids of safflower aerial parts. *Phytochemistry*, 58:277-280.
 - 28-Howard, R.W. and Blomquist, G.J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, 50: 371-393.
 - 29-Ibrahim, H.M. and El-Khateeb, A.Y. 2019. Growth, yield and active constituents of Milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn) under drought stress. *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering*, 6(1): 1.
 - 30-Indrák, P. and Chytilová, D. 1992. K problematice stanovení silybinu v droze ostropestřce mariánského. *Zahradnictví*, 22: 309-313.
 - 31-Kachroo, A. and Kachroo, P. 2009. Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 47:153-176.
 - 32-Kalita, D. 2008. Hydrocarbon plant-New source of energy for future. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12:455-471.
 - 33-Kang, L., Wang, Y.S., Uppalapati, S.R., Wang, K., Tang, Y., Vadapalli, V., Venables, B.J., Chapman, K.D., Blancaflor, E.B. and Mysore, K.S. 2008. Overexpression of a fatty acid amide hydrolase compromises innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 56:336-349.
 - 34-Keshavarz Afshar, R., Hashemi, M., DaCosta, M., Spargo, J., and Sadehpour, A. 2016. Biochar application and drought stress effects on physiological characteristics of *Silybum marianum*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(6): 743-752.
 - 35-Kilaru, A., Herrfurth, C., Keereetaweep, J., Hornung, E., Venables, B.J., Feussner, I. and Chapman, K.D. 2011. Lipoxygenase-mediated oxidation of polyunsaturated N-acyl ethanolamines in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 286:15205-15214.
 - 36-Kizis, D., Lumbreras, V. and Pages, M. 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett*, 498:187-189.
 - 37-Kolenc, Z., Vodnik, D., Mandelc, S., Javornik, B., Kastelec, D. and Cerenak, A. 2016. Hop (*Humulus lupulus* L.) response mechanisms in drought stress: Proteomic analysis with physiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 105:67-78.
 - 38-Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J. and Jenks, M.A. 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151:1918-1929.
 - 39-Kunst, L., Samuels, A.L., Jetter, R. 2005. The plant cuticles: formation and structures of epidermal surfaces. In DJ Murphy ed, *Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 270-302.
 - 40-Kurkin, V.A. 2003. Saint-Mary thistle: a source of medicinals. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(4): 189-202.

- 41-Locher, R., Suter, P., Weyhenmeyer, R. and Vetter, W. 1998. Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation. *Arzneimittelforschung, Drug Research*, 48: 236-239.
- 42-Majidi heravan, E. 1994. Resistant physiological mechanism to environmental limited. In: *Proceeding of the 3rd Crop Production Science*.
- 43-Malekzadeh, M., Mirmazloun, S.I., Mortazavi, S.N., Panahi, M., and Angorani, H.R. 2011. The physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn. cv. Budakalászi) under drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8): 1485-1488.
- 44-Mandal, M.K., Chandra-Shekara, A.C., Jeong, R.D., Yu, K., Zhu, S., Chanda, B., Navarre, D., Kachroo, A. and Kachroo, P. 2012. Oleic acid-dependent modulation of NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 protein levels regulates nitric oxide-mediated defense signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24:1654-1674.
- 45-Markham, J.E., Lynch, D.V., Napier, J.A., Dunn, T.M. and Cahoon, E.B. 2013. Plant sphingolipids: function follows form. *Current Opinion in Plant Biology*, 16:350-357.
- 46-Moellering, E.R., Muthan, B. and Benning, C. 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330:226-228.
- 47-Munnik, T. and Testerink, C. 2009. Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of Lipid Research*, 50:260-265.
- 48-Nakamura, Y., Koizumi, R., Shui, G., Shimojima, M., Wenk, M.R., Ito, T. and Ohta, H. 2009. Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:20978-20983.
- 49-Nostro, A., Germano, M.P., Dangelo, V., Marino, A., Cannatelli, A. 2000. Exaction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant with antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30(5):379.
- 50-Okazaki, Y., Otsuki, H., Narisawa, T., Kobayashi, M., Sawai, S., Kamide, Y., Kusano, M., Aoki, T., Hirai, M.Y. and Saito, K. 2013b. A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nature Communications*, 4:1510.
- 51-Parakas, A., Nikolaou, N., Ziazioiu, E., Radoglou K. and Noitsakis, B. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science*, 163: 361-367.
- 52-Rezaeizad, A. 2007. Responses of some sunflower genotypes to drought stress using different stress tolerance indices. *Seed and Plant Improvement Journal*, 23(1):43-58.
- 53-Riccardi, M., Pulvento, C., Patanè, C., Albrizio, R., Barbieri, G. 2016. Drought stress response in long-storage tomatoes: physiological and biochemical traits. *Scientia Horticulturae*. 200: 25-35.
- 54-Samuels, L., Kunst, L. and Jetter, R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology*, 59:683-707.
- 55-Selmar, D. and Kleinwachter, M. 2013. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant Cell physiology*, 54(6): 817-826.
- 56-Seo, P.J., Lee, S.B., Suh, M.C., Park, M.J., Go, Y.S. and Park, C.M. 2011. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23:1138-1152.
- 57-Sibi, M. 2011. Effect of water stress, zeolite and foliar application of salicylic acid on some of agronomical and physiological traits in spring safflower. M.Sc. Thesis. Agronomy and crop development department. College of agriculture. Islamic Azad University, Branch, Arak. 213 pages.
- 58-Singh, S.C., Sinha, R.P. and Häder, D.P. 2002. Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria. *Acta Protozoologica*. 41: 297 – 308.
- 59-Wang, X. 2004. Lipid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:329-336.
- 60-Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W. and Welti, R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research*, 45:250-278.
- 61-Williams, M.H., Rosenqvist, E. and Buchhave, M. 1999. Response of potted miniature roses (*Rosa x hybrida*) to reduced water availability during production. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74:301-308.

Comparison of fatty acids and hydrocarbons of Milk thistle in different levels of water stress and identification of their reaction pathways

Ghanbary Moheb Seraj R.¹, Behnamian M.¹, ahmadikhah A.², Shariati V.³ and Dezhsetan S.¹

Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

Dept. of Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran.

Dept. of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Water stress is one of the most important factors affecting the metabolic pathways in the plant and thus alters the synthesis and accumulation of natural compounds such as fatty acids and hydrocarbons in medicinal plants. This study aimed to investigate the effect of different levels of water stress (Full irrigation at field capacity, irrigation at 70% of field capacity and irrigation at 40% of field capacity) on fatty acid and hydrocarbon quantities of Milk thistle. Drought stress was applied at flowering stage. Then the oil extract was extracted from the seeds using Soxhlet method and analyzed by GC-MS. Finally, the identified compounds were bioinformatically analyzed and the pathways of reactions and enzymes involved in these reactions were identified. The results showed that the yield of fatty acids and hydrocarbons increased with increasing drought stress intensity. The predominant fatty acids identified in Milk thistle oil extract was linoleic acid (15.2-27.4%) and its dominant hydrocarbon was dodecane (12.3-14.1%). The percentage of fatty acids detected under stress was reduced, probably due to their degradation into hydrocarbons to maintain osmotic pressure under dehydration.

Key words: Mass spectrometer, Bioinformatics analysis, Soxhlet, Field capacity, Gas chromatography.