Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۶، صفحه ۹۵۷-۹۴۸ (۱۳۹۵)

اثر تنش شوری بر میزان و ترکیب اجزاء اسانس و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه بومادران (*Achillea millefolium* L.)

اعظم سلیمی[۱]، وحید روشن[۲] و الهام خان‌پور[۳*]

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

۲- استادیار، بخش منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

۳*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

پست الکترونیک: Elham.khanpoor@yahoo.com

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی اثر شوری بر میزان و ترکیب اجزاء اسانس و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه بومادران (*Achillea millefolium* L.) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار شوری شامل سطوح صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر کلرید سدیم و چهار تکرار در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای انجام شد. اسانس گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج و با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی اجزای تشکیل‌دهنده آن تفکیک و شناسایی گردید. سپس میزان پرولین برگ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی درصد وزنی اسانس افزایش معنی‌داری را در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر نشان داد. عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس عبارت بودند از: دلتا-کادینول، ترانس بتا-فارنسن، آلفا-بیسابولول، کاریوفیلن اکساید، بورنئول و منتون که با افزایش شوری میزان این ترکیب‌ها افزایش نشان داد. برخی ترکیب‌ها مانند سابینن، سیس-بتا-اوسیمن و سیس-گاما-بیسابولن فقط در تیمار شاهد و ترکیب‌هایی مانند منتون، بتا-بیسابولون، اپی-بتا-سانتالن و ۸،۱-سینئول فقط در گیاهان تیمار شده با نمک مشاهده شدند. البته محتوای پرولین در تمامی تیمارها در مقایسه با نمونه شاهد افزایش نشان داد. بررسی فعالیت مهار رادیکال DPPH عصاره متانولی گیاه نیز نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاءکنندگی عصاره با زیاد شدن غلظت شوری، افزایش یافته است و در واقع شوری تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی بومادران را افزایش داده‌است.

واژه‌های کلیدی: بومادران (*Achillea millefolium* L.)، شوری، آنتی‌اکسیدان، پرولین، گاز کروماتوگرافی، DPPH.

مقدمه

بومادران یکی از مهمترین سرده‌های متعلق به تیره گل‌ستاره‌ای‌ها (کاسنی) می‌باشد. این سرده در دنیا ۸۵ گونه دارد و در ایران دارای ۱۹ گونه می‌باشد که اغلب معطر هستند (Mozaffarian, 1996). بومادران یا هزاربرگ (*Achillea millefolium* L.) ازجمله گیاهان دارویی با ارزش است که در ایران در دامنه‌های البرز، اطراف دماوند و آذربایجان و اطراف تبریز می‌روید (Omidbeigi, 2000). این

www.SID.ir

Archive of SID

گیاه دارای اسانس روغنی فرّار می‌باشد که بیشتر در کرک‌های ترشحی که در برگ، ساقه و به‌ویژه در گلها موجود است تشکیل می‌شود و خاصیت ضد باکتری و ضد ویروس دارد و از اهمیت بسزایی در صنایع آرایشی، بهداشتی و دارویی برخوردار است. از آن در درمان اختلالات روده و معده، بیماری‌های کبد و صفرا استفاده می‌شده و در درمان زخم و التهاب‌های پوستی نیز بکار می‌رود. از این گونه در برخی مناطق دنیا علاوه‌بر استفاده‌های دارویی به‌عنوان گیاه زینتی و پوششی استفاده می‌کنند (Benedek *et al.*, 2008). البته در بررسی ترکیب اجزاء اسانس گونه‌های بومادران مشاهده شده که ترکیب‌های مونوترپن و سزکویی‌ترپن و فنلی در آنها به فراوانی یافت می‌شود. محققان در پژوهشی اجزاء عمده اسانس در برگ این گونه را کاریوفیلن اکساید، بورنئول و ۸،۱-سینئول گزارش کرده (Pino *et al.*, 2001) و در پژوهشی دیگر ترکیب‌های اصلی اسانس آن را آلفا-پینن، بتا-پینن و کاریوفیلن اکسید معرفی کردند (Shams Ardekani *et al.*, 2006).

محققان مقدار و میزان ترکیب اجزاء اسانس گیاهان را به عوامل ژنتیکی و محیطی نسبت می‌دهند، از طرفی نظر بر این است که تولید متابولیت‌های ثانویه برای سازگاری گیاه نسبت به عوامل نامساعد و تنش‌های محیط زندگی انجام شده و به‌منزله بکار افتادن یک نوع جریان دفاعی در جهت استمرار تعادل فعالیت‌های حیاتی به حساب می‌آید (Omidbeigi, 2000). شوری نیز ازجمله عوامل محیطی مهمی است که تأثیر زیادی در بیوسنتز اسانس و ترکیب‌های آن دارد (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009). تنش شوری همانند بسیاری از تنش‌های غیرزیستی دیگر، رشد گیاه را محدود می‌کند. البته کاهش رشد یک نوع سازگاری برای زنده ماندن گیاه در شرایط تنش است (Zhu, 2001). پاسخ گیاهان به تنش شوری متفاوت بوده و به‌میزان سمّیت و قابلیت اسمزی نمک و مدت زمان تنش بستگی دارد. گیاهان در تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری، گرما و غیره با ذخیره مواد تنظیم‌کننده اسمزی با این تنش‌ها مقابله می‌کنند. مواد تنظیم‌کننده فشار اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه، قندها و برخی یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها هستند، پرولین یکی از اسید آمینه‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی می‌باشد که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد (Parida & Das, 2005).

در نتیجه تنش شوری، تنش‌های ثانویه مانند تنش اکسیداتیو نیز ممکن است بروز کند که در این حالت، تولید و تجمع رادیکال‌های فعال منجر به اکسید شدن پروتئین‌ها و لیپیدها و در نتیجه مرگ سلول می‌شود (Molassiotis *et al.*, 2006). از سوی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌ها منع‌کننده‌های اکسیداتیو هستند که خصوصیت اصلی آنها توانایی به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد است و دیگر ویژگی آنها جلوگیری از بوجود آمدن رادیکال‌های آزاد می‌باشد. Mirzaei و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که گیاه بومادران دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

بنابراین با توجه به افزایش روزافزون زمین‌های شور و تأثیر تنش شوری بر میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، در این مطالعه اثر تنش شوری بر میزان و ترکیب اجزاء اسانس و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی بومادران یا هزاربرگ که از گیاهان متداول در طب سنتی ایران است، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در گلخانه مرکز آموزشی و تحقیقاتی هیدروپونیک و بیوتکنولوژی صدرای شیراز انجام شد. نشاءهای یکسان بومادران از مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی این مرکز تهیه و در گلدان‌های حاوی ترکیب خاکی، خاک معمولی (خاک مزرعه)، خاکبرگ و ماسه بادی، به نسبت حجمی ۱:۱:۱ کاشته شدند. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این خاک در جدول ۱ آورده شده‌است. گلدان‌ها در گلخانه با شرایط کنترل شده نگهداری شدند. آبیاری آنها با آب مقطر انجام شد. در شروع مرحله گلدهی تیمار شوری اعمال گردید و گلدان‌ها با محلول کلریدسدیم در غلظت‌های صفر (۰)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر آبیاری شدند. به‌منظور جلوگیری از وارد آمدن تنش ناگهانی، غلظت‌های شوری به‌تدریج اعمال شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ویژگی‌های خاک مورد استفاده در پژوهش

بافت خاک	اسیدیته (pH)	هدایت الکتریکی (ds/m)	نیتروژن (%)	فسفر (mg/kg)	پتاسیم (mg/kg)	کربن (%)	آهن (mg/kg)	روی (mg/kg)	مس (mg/kg)	منگنز (mg/kg)
لومی شنی	۷/۸	۰/۸۴	۰/۱	۱/۸	۲۶۶	۱/۰۶	۱/۵۸	۰/۶	۰/۶	۲

استخراج اسانس و بررسی اجزاء تشکیل‌دهنده آن

با اتمام مرحله گلدهی، گیاهان برداشت شدند و بخش هوایی به‌منظور استخراج اسانس در شرایط سایه خشک شد. استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر انجام شد. عمل تقطیر به مدت ۳ ساعت انجام شد و بعد از اسانس‌گیری، اسانس توسط سدیم سولفات بدون آب، آبگیری و درصد اسانس‌ها نسبت به وزن خشک محاسبه گردید. برای جداسازی و شناسایی ترکیب اجزاء اسانس، اسانس‌های بدست‌آمده به دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر تزریق شد.

مشخصات دستگاه کروماتوگراف گازی

کروماتوگراف گازی از نوع Agilent technologies و مدل ۷۸۹۰A، ستون HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برنامه‌ریزی دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه سلسیوس با افزایش دمای ۳ درجه در دقیقه، نوع آشکارساز: FID با دمای ۲۹۰ درجه سلسیوس، دمای محفظه تزریق: ۲۸۰ درجه سلسیوس، گاز حامل: نیتروژن با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه.

مشخصات دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی از نوع Agilent technologies و مدل ۵۹۷۵C، ستون HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه سلسیوس با افزایش دمای ۳ درجه سلسیوس در دقیقه، دمای محفظه تزریق: ۲۸۰ درجه سلسیوس، گاز حامل: هلیوم با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه.

سنجش پرولین

برای این منظور ۰/۵ گرم از نمونه‌های تازه گیاهی ریز شده و درون ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ ریخته و به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول را به لوله آزمایش انتقال داده و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک غلیظ اضافه گردید و به‌مدت ۱ ساعت درون حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس لوله‌ها درون یخ قرار داده شد و پس از سرد شدن محلول‌ها، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه گردید و به‌مدت ۳۰-۱۵ ثانیه توسط همزن برقی بهم زده شد و دو فاز ایجاد گردید. آنگاه میزان جذب فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از پرولین با غلظت‌های مختلف برای رسم نمودار منحنی استاندارد استفاده گردید و برای جذب‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین در گرم بافت تازه بر حسب میکرومول بدست آمد (Bates *et al.*, 1973).

استخراج عصاره و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به روش DPPH مورد سنجش قرار گرفت. بدین‌منظور عصاره متانولی از گیاه تهیه گردید. برای تهیه عصاره متانولی، ۱۰ گرم پودر نمونه خشک شده گیاه را در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ریخته و پس از ۴۸ ساعت عصاره با استفاده از کاغذ صافی صاف و برای حذف حلال، در دستگاه تبخیر در خلأ چرخشی قرار داده شد. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت و درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

=درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

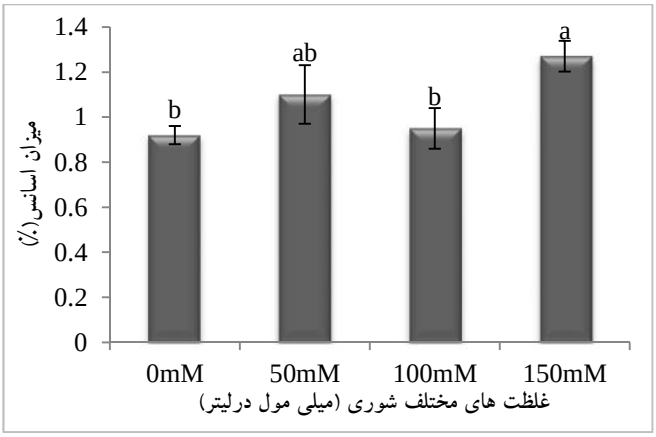
100- [(A) sample-(A) blank) × 100/(A) control]

www.SID.ir

Archive of SID

ضمن تعیین رابطه بین غلظت DPPH و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رسم نمودار، IC_{50} (غلظتی از ترکیب که باعث ۵۰٪ بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می‌شود) محاسبه شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره (µmol/g) مقایسه گردید. بدیهی است که هر چه عدد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کوچکتر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد بیشتر می‌باشد (Bruits *et al.*, 2001).

تجزیه واریانس داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف شوری بر بازده اسانس در گیاه بومادران

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن بین آنهاست.

نتایج

اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر مقدار یا درصد اسانس گیاه بومادران

نتیجه تجزیه آماری داده‌های بدست آمده نشان داد که میزان اسانس گیاه بومادران در تیمار شاهد (۰/۹۲٪) و در تیمارهای ۱۵۰-۱۰۰-۵۰ میلی‌مول در لیتر به‌ترتیب ۱/۳٪-۰/۹۵٪-۱/۱٪ بود. بیشترین میزان درصد وزنی اسانس (۱/۳٪) در تیمار ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر شوری مشاهده شد که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت، در حالیکه در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول در لیتر اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان اسانس گیاه بومادران در شکل ۱ آورده شده‌است.

اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

نتایج حاصل از جداسازی و شناسایی ترکیب‌های گیاه برای هر تیمار در جدول ۲ گزارش شده‌است. به‌طوری که در اسانس حاصل از تیمار شاهد، ۲۸ ترکیب شناسایی شده که ۹۹/۷٪ اسانس را تشکیل می‌داد. عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در این تیمار عبارت بودند از: دلتا-کادینول (۱۳/۲٪)، دلتا-المن (۱۲/۴٪)، بتا-سسکوئی‌فلاندرون (۱۲/۱٪) و آلفا-بیسابولول (۱۱/۶٪). در اسانس حاصل از تیمار ۵۰ میلی‌مول در لیتر، ۲۹ ترکیب شناسایی شد. ترکیب های عمده اسانس در این تیمار به‌ترتیب مقدار عبارت بودند از: بتا-سسکوئی‌فلاندرن (۱۴/۱٪)، آلفا-بیسابولول (۱۱/۳٪)، ژرماکرین-دی (۱۱/۳٪) و کاریوفیلن‌اکساید (۶/۶٪) که در مجموع ۹۸/۷٪ از کل اجزاء اسانس را تشکیل می‌دادند. در اسانس حاصل از تیمار ۱۰۰ میلی‌مول در لیتر، ۳۲ ترکیب شناسایی شد که ۹۶/۳٪ اسانس را تشکیل می‌داد. عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در این تیمار عبارت بودند از: دلتا-کادینول (۱۴/۹٪)، آلفا-بیسابولول (۱۴/۳٪)، بتا-سسکوئی‌فلاندرن (۸/۹٪) و ترانس-بتا-فارنسن (۶/۱٪). در اسانس حاصل از تیمار ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر، ۲۰ ترکیب شناسایی شد که ۹۹/۴٪ اسانس را تشکیل می‌داد. عمده‌ترین ترکیب های تشکیل‌دهنده اسانس در این تیمار عبارت بودند از: آلفا-بیسابولول (۲۴/۴٪)، دلتا-کادینول (۲۲/۴٪)، بتا-سسکوئی‌فلاندرن (۸/۵٪)، بورنئول (۶/۶٪) و ترانس-بتا-فارنسین (۵/۳٪).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- معرفی ترکیب اجزاء شناسایی شده در اسانس حاصل از تیمارهای مختلف شوری بر گیاه بومادران

ردیف	نام ترکیب	اندیس بازداری	شاهد	۵۰ میلی‌مول در لیتر	۱۰۰ میلی‌مول در لیتر	۱۵۰ میلی‌مول در لیتر
۱	α-pinene	۹۳۲	۰/۷	۰/۵	–	–
۲	sabinene	۹۶۹	۱/۴	–	–	–
۳	β-pinene	۹۷۴	۳/۴	–	۰/۳	۱/۱
۴	ρ-cymene	۱۰۲۰	۰/۴	۱/۴	۰/۶	۱/۵
۵	limonene	۱۰۲۴	–	۰/۶	–	–
۶	1,8-cineole	۱۰۲۶	–	۰/۹	۰/۶	۱/۲
۷	(z)-β-ocimene	۱۰۳۲	۰/۴	–	–	–
۸	γ-terpinene	۱۰۵۴	–	۰/۶	–	–
۹	camphor	۱۱۴۱	–	–	۰/۳	–
۱۰	menthone	۱۱۴۸	–	۱/۵	۰/۸	۲/۵
۱۱	borneol	۱۱۶۵	۳/۵	۱/۴	۳/۴	۶/۶
۱۲	piperitone	۱۲۴۹	۰/۴	۰/۷	۰/۸	–
۱۳	δ-elemene	۱۳۳۵	۱۲/۴	۶/۹	۰/۳	۱/۴
۱۴	β-elemene	۱۳۸۹	۰/۸	۰/۷	۰/۸	–
۱۵	trans-caryophyllene	۱۴۱۷	۱/۲	۳	۲/۴	۱/۷
۱۶	β-santalene	۱۴۴۵	–	۰/۶	۰/۶	–
۱۷	α-humulene	۱۴۵۲	–	–	۰/۴	–
۱۸	trans-β-farnesene	۱۴۵۴	۴/۹	۶/۴	۶/۱	۵/۳
۱۹	β-santalene	۱۴۵۷	۰/۵	۰/۶	۰/۸	–
۲۰	germacrene-D	۱۴۸۴	۵/۳	۱۱/۳	۴/۵	۲/۵
۲۱	10s,11s-himachala-3(12),4-diene	۱۴۹۲	۳/۳	۴/۷	۴/۳	۳/۶
۲۲	α-zingiberene	۱۴۹۴	۱/۹	۲/۲	–	–
۲۳	bicyclogermacrene	۱۵۰۰	–	–	۱/۴	–
۲۴	β-bisabolene	۱۵۰۵	–	۲/۷	۱/۹	۱/۲
۲۵	γ-bisabolene	۱۵۱۴	۲/۵	–	–	–
۲۶	β-sesquiphellandrene	۱۵۲۱	۱۲/۱	۱۴/۱	۸/۹	۳/۵
۲۷	γ-Bisabolene	۱۵۲۹	۱/۱	۰/۶	۰/۵	–
۲۸	cis- nerolidol	۱۵۳۱	–	۱/۱	۰/۴	–
۲۹	spathulenol	۱۵۷۷	۱/۵	۲	۲	–
۳۰	caryophyllene oxide	۱۵۸۲	۳/۵	۶/۶	۷/۲	۴/۸
۳۱	widdrol	۱۵۹۹	۱/۱	۰/۹	۱/۴	۱/۳
۳۲	agaruspirol	۱۶۲۹	۲/۳	–	۱/۴	۱/۳
۳۳	cedr-8-en-13-ol	۱۶۴۶	۷/۲	۳/۷	۴/۴	۴/۴
۳۴	δ-cadinol	۱۶۵۴	۱۳/۲	۸/۷	۱۴/۹	۲۲/۴
۳۵	eudesm-7(11)-en-4-ol	۱۶۸۵	۰/۸	–	۲/۱	–
۳۶	α-bisabolol	۱۶۸۸	۱۱/۶	۱۱/۳	۱۴/۳	۲۴/۴
۳۷	α-trans-bergamotol	۱۶۹۰	۰/۶	–	۱/۱	–
۳۸	aristolone	۱۷۵۴	۰/۸	۰/۷	۰/۴	۱/۳
	Total		۹۹/۷	۹۶/۵۵	۹۰/۳	۹۷/۱

www.SID.ir

Archive of SID

اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر محتوای پرولین

با مطالعه میزان پرولین در برگ مشاهده شد که تیمارهای مختلف شوری بر محتوی پرولین اثر گذاشته و با افزایش شوری محتوی پرولین افزایش معنی‌داری یافته است، به‌طوری که بیشترین مقدار پرولین به میزان ۴۸/۱۶ میکروگرم بر گرم وزن تر گیاه در تیمار ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر شوری مشاهده شد که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. میزان پرولین در برگ‌های نمونه شاهد و نمونه‌های تحت تنش در جدول ۳ نشان داده شده و تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر میزان پرولین در جدول ۴ آورده شده‌است.

جدول ۳- نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر محتوی پرولین برگ گیاه ($\mu g\ g^{-1}$ F.W)

تیمار شوری (میلی‌مول در لیتر)	محتوی پرولین ($\mu g\ g^{-1}$ F.W)
۰	۴/۶۴۶±۰/۱۸۶ d
۵۰	۲۲/۳۶±۰/۲۷۴ c
۱۰۰	۳۸/۳۱±۰/۲۱۳ b
۱۵۰	۴۸/۱۶±۰/۱۴۵ a

*: داده‌ها $\bar{X}\pm SE$ را نشان می‌دهند. میانگین‌های دارای حروف یکسان، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر کلرور سدیم بر محتوی پرولین گیاه

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
NaCl	۳	۹۷۴/۰۵۲ **
خطا	۸	۰/۱۴۰
کل	۱۱	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر فعالیت مهار رادیکال DPPH

نتایج حاصل از پژوهش نشان داده‌است که تأثیر سطوح مختلف شوری بر فعالیت مهار رادیکال DPPH معنی‌دار بوده و شوری منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH شد، به‌طوری که بالاترین درصد تخریب رادیکال‌های آزاد، برای غلظت ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر کلرور سدیم و پایین‌ترین درصد برای غلظت صفر می‌باشد (شکل ۲).

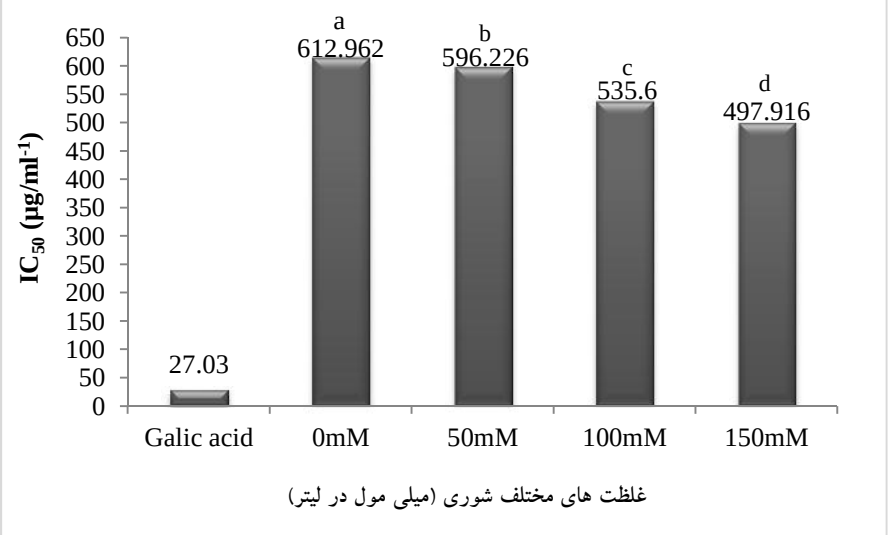
بحث

بررسی اثرات تنش شوری بر مقدار یا درصد اسانس

نتایج حاصل از بررسی درصد وزنی اسانس گیاه بومادران نشان داد که بیشترین میزان درصد وزنی اسانس (۱/۳٪) در تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر دیده شد که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. البته افزایش میزان اسانس تحت تنش شوری در گیاهان دارویی مریم‌گلی (Taarit *et al.*, 2009)، نعناء (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009) و بادرنجبویه (Parida & Das, 2005) نیز گزارش شده‌است. هر چند که نقش عمده در بیان صفات فیزیولوژیکی گیاه بیشتر تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه می‌باشد، اما تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه بسیار تحت تأثیر شرایط محیطی به‌ویژه استرس‌های زیستی و غیرزیستی است که در بین آنها افزایش شوری تأثیر زیادی در بیوسنتز اسانس گیاهی دارد و ترکیب‌های اسانس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009). بنابراین در توضیح افزایش درصد اسانس در شرایط تنش می‌توان گفت که چون میزان متابولیت‌های اولیه گیاه در شرایط نامساعد محیطی کاهش می‌یابد و چون تولید متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان نوعی سازوکار دفاعی برای جلوگیری از اکسیداسیون درون سلولی است، تولید آنها در گیاه افزایش می‌یابد. Bernstein و همکاران (۲۰۰۹) در آزمایشی مشابه روی ریحان دریافتند که با افزایش شوری، درصد اسانس در بافت‌های گیاه افزایش پیدا کرد. آنان بیان کردند که یک همبستگی مثبت بین سطح تنش اعمال شده روی سلول‌ها و درصد اسانس در بافت‌های گیاهی وجود دارد و افزایش درصد اسانس ممکن است به دلیل تغییر در بیوسنتز اسانس تحت تنش و محدود شدن سطح برگ‌ها باشد که می‌تواند دلیل متراکم‌تر شدن غدد ترشحی اسانس در مقایسه با برگ‌های تحت شرایط غیر تنش باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نمایش اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم بر فعالیت مهار رادیکال DPPH گیاه بومادران

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن بین آنهاست.

بررسی اثرات تنش شوری بر ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

مطالعات نشان داده‌است که عوامل محیطی و فاکتورهای تنش‌زا، همواره ترکیب‌های شیمیایی اسانس گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و سبب تغییر در میزان درصد ترکیب‌های اسانس گیاه می‌شود که این اختلافات تأثیر شرایط فیزیولوژیک گیاه را بر روی مسیرهای بیوسنتزی ترکیب‌ها توجیه می‌کند.

در این پژوهش بیشترین میزان ترکیب‌های موجود در اسانس بومادران به‌ترتیب دلتا-کادینول، دلتا-المن، بتا-سسکوئی‌فلاندرن، آلفا-بیسابولول، ژرماکرین‌دی، کاریوفیلن اکساید، بورنئول و منتون بودند. ولی هیچ کامازولونی شناسایی نشد. این نتایج با نتایج بعضی از پژوهشگران که میزان کامازولن را صفر گزارش کرده بودند همسو می‌باشد (Gudaityte & Venskutonis, 2007). زمان برداشت ازجمله عواملی است که می‌تواند روی نوع ترکیب‌های اسانس مؤثر باشد (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009). در این پژوهش گیاهان در مرحله گلدهی برداشت شدند، زیرا گیاه بومادران در مرحله گلدهی از بیشترین میزان اسانس برخوردار است (Zargari, 1996). نتایج این پژوهش نشان داد که میزان ترکیب‌های اصلی و مهم شناسایی شده اسانس تحت تنش شوری در گیاه بومادران افزایش داشته است. تغییرات مواد مؤثره گیاهان در اثر شوری در تحقیقات Morales و همکاران (۱۹۹۳) که گزارش کردند شرایط شوری متوسط باعث افزایش مقادیر کاردنولاید در برگهای گل انگشتانه می‌شود و Aroiee (۱۳۷۹) که اعلام داشت تنش شوری اثر معنی‌داری بر مقدار بتا-سیتوسترول در روغن بذر کدوی تخمه کاغذی دارد، نیز مشاهده شد.

همچنین Hasani و Omidbeigi (۱۳۸۲) بیان کرد با افزایش غلظت نمک در آب آبیاری ریحان مقدار ترکیب‌هایی مانند میرسن، ۸،۱-سینئول، متیل کاویکول، بورنیل استات، ژرانیل استات و سیس-آلفا-برگاموتن افزایش و بعکس مقدار لینالول، متیل اوژنول و آلفا-هومولن کاهش می‌یابد.

بررسی اثرات تنش شوری بر محتوای پرولین

یکی از مهمترین واکنش گیاهان تحت تنش شوری تولید و تجمع ترکیب‌های محلول سازگار می‌باشد. ترکیب‌های محلول سازگار دارای وزن مولکولی کم هستند و معمولاً برای گیاهان ایجاد سمّیت نمی‌کنند. پرولین ازجمله معمول‌ترین این ترکیب‌ها می‌باشد که تحت شرایط خشکی، شوری و دمای پایین و سایر عواملی که باعث کاهش قابلیت آب سلول می‌شوند در بسیاری از گیاهان تجمع می‌یابد (Islam *et al.*, 2009). هر چند که در برخی از گیاهان تغییری نشان نمی‌دهد. در واقع تولید پرولین

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر تنش‌هاست. البته ذخیره پرولین در بافت‌های گیاهی به دلیل کاهش تجزیه پرولین و افزایش بیوسنتز آن، افزایش می‌یابد (Lutts *et al.*, 2006).

پرولین علاوه‌بر نقش حفاظت‌کننده اسمزی، در حفاظت غشاء پلاسمایی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در برابر اثرات مخرب تنش‌های مختلف به‌وسیله حفظ هومئوستازی قابلیت اکسایش–کاهش و جاروب رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive oxygen species) نقش دارد (Cicek & Cakirlar, 2002).

گزارشهای متعددی مبنی بر وجود همبستگی مثبت انباشت پرولین و سازش به شرایط تنش اسمزی در گیاهان وجود دارد که نقش مهم پرولین را در گیاهانی که در معرض تنش آبی و شوری قرار گرفته‌اند مورد تأکید قرار می‌دهد. Baatour و همکاران (۲۰۱۰) ضمن بررسی اثر شوری آب آبیاری بر گیاه مرزنجوش بیان کردند که مقدار پرولین برگها افزایش معنی‌داری داشته است. Ashraf (۱۹۸۹) بیان کرد که شوری در گیاه ماش باعث افزایش معنی‌دار پرولین در برگ شده‌است. در این پژوهش نیز در هماهنگی با یافته‌های فوق، با افزایش غلظت کلرید سدیم میزان انباشت پرولین افزایش یافت.

بررسی اثرات تنش شوری بر فعالیت مهار رادیکال DPPH

استفاده از رادیکال پایدار DPPH، برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی کاربرد زیادی دارد (Dordevic *et al.*, 2007). این رادیکال چربی‌دوست بوده و دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷–۵۱۵ نانومتر است. در این آزمون، رادیکال‌های DPPH با آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش داده و مقدار رنگ آن از بنفش به زرد کاهش یافته، در نتیجه جذب آن کاهش می‌یابد (Demirci *et al.*, 2007).

علاوه‌بر تغییرات فیزیولوژیکی که در اثر تنش شوری در گیاه ایجاد می‌شود، صدمات اکسیداتیو نیز از عوامل مهم محدودکننده رشد و تولیدات گیاهی هستند که در اثر عدم وجود شرایط مناسب ایجاد می‌شود. البته بیشترین صدمه در گیاهان نیز به‌وسیله در معرض تنش بودن یا صدمه اکسیداتیو در سطح سلول همراه است (Molassiotis *et al.*, 2006).

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارآیی بالا هستند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده یا خنثی کنند (Mittler, 2002). تحقیقات مختلف نشان داده‌است که یک ارتباط قوی بین تحمل تنش‌های اکسیداتیو که به‌دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش در غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد (Sairam & Srivastava, 2001). در این مطالعه شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط عصاره برگ بومادران گردید، به‌طوری که بیشترین افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH مربوط به بومادران رشد کرده در سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر کلرید سدیم بود.

به‌طور کلی از یافته‌های این تحقیق، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که گیاه بومادران مانند بیشتر گیاهان به تنش شوری واکنش نشان داده است و با توجه به اینکه با افزایش شوری میزان اسانس افزایش یافته، بنابراین در تیمار ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر بیشترین میزان اسانس دیده شده و نیز میزان برخی ترکیب‌های اصلی و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه با افزایش شوری افزایش یافته است و از آنجایی که گیاهان تولید شده در شرایط شوری، در اثر کاهش رشد کوچکتر بوده و حجم کمتری را اشغال می‌کنند، بنابراین شاید بتوان با افزایش تراکم کاشت در شوری‌های تا حد ۱۵۰ میلی‌مولار، میزان کمبود عملکرد اسانس را در شرایط بدون تنش جبران کرد و به عملکرد قابل قبولی از اسانس دست یافت.

منابع مورد استفاده

- Aroiee, H., 2000. Effect of salinity and nitrogen nutrition on quantitative and qualitative characteristics of medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo*). Ph.D thesis, Department of Horticulture, Tarbiat Modares University, Tehran.
- Ashraf, M., 1989. The effect of NaCl on water relation, chlorophyll protein and proline content of two cultivars of blackgram (*Vigna munjo* L.). Plant and Soil, 119(2): 205-210.
- Baatour, B.O., Kaddour, R., Wannes, W.A., Lachaâl, M. and Marzouk, B., 2010. Salt effect on the growth, mineral nutrition, essential oil yield and composition of marjoram (*Origallum majorana* L.). Acta Physiologia Plantarum, 32: 45-51.

www.SID.ir

Archive of SID

- Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J., 2006. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. Plant Growth Regulation, 19(3): 207-218.
- Mirzaei, A., Akbartabar, M., Sadeghi, H. and Sharifi, B., 2010. The Antioxidant activities and total phenolic of *Artemisia martima*, *Achillea millefolium* and *Matricaria recutica*. Journal of Armaghan-e-Danesh, 15(3): 243-252.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7(9): 405-415.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. and Therios, I., 2006. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). Environmental and Experimental Botany, 56: 54-62.
- Morales, C., Cusido, R.M., Palazon, J. and Bonfill, M., 1993. Response of *Digitalis purpurea* plants to temporary salinity. Journal of Plant Nutrient, 16(2): 327-335.
- Mozaffarian, V., 1996. Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Publishers, Tehran, 762p.
- Omidbeigi, R, 2000. Production and Processing of Medicinal and Aromatic Plants (Vol 1). Astan Ghods Razavi Publication, Mashhad, 347p.
- Parida, A.K. and Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60(3): 324-349.
- Pino, J.A., Rosado, A. and Fuentes, V., 2001. Chemical composition of the leaf oil of *Achillea millefolium* grown in Cuba. Journal of Essential oil Research, 10(4): 427-428.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C., 2001. Water stress tolerance of wheat *Triticum aestivum* L.: variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. Journal of Agronomy and Crop Science, 186: 63-70.
- Shams Ardekani, M.R., Hadjiakhoondi, A., Jamshidi, A.H. and Rafiee, P.M., 2006. Pharmacognosical and plant tissue culture studies of *Achillea millefolium*. Journal of Medicinal Plants, 1(17): 21-26.
- Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K., Hammami, M., Kchouk, M.E. and Marzouk, B., 2009. Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. Industrial Crops and Products, 30(3): 333-337.
- Zargari, A., 1996. Medicinal Plants (Vol 1). Tehran University Press, Tehran, 288p.
- Zhu, J.K, 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science, 6(2): 66-71.
-Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Benedek, B., Rothwangl-Wiltschnigg, K., Rozema, E., Gjoncaj, N., Reznicek, G., Jurenitsch, J., Kopp, B. and Glasl, S., 2008. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) pharmaceutical quality of commercial samples. Journal Pharmazie, 63: 23-26.
- Bernstein, N., Kravchik, M. and Dudai, N., 2009. Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*) in relation to alteration of morphological development. Annals Applied Biology, 156(2): 167-177.
- Bruits, M., Asres, K. and Bucar, F., 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. Phytotherapy Research, 15: 103-108.
- Cicek, N. and Cakirlar, H., 2002. The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 28(1-2): 66-74.
- Demirci, B., Kosar, M., Demirci, F., Dinç, M. and Başer, K.H.C., 2007. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. Food Chemistry, 105(4): 1512-1517.
- Dordevic, S., Petrovic, Dobrić, S.S., Milenković, M., Vučićević, D., Žižić, S. and Kukić, J., 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 109(3): 458-463.
- Gudaityte, O. and Venskutonis, P.R., 2007. Chemotypes of *Achillea millefolium* transferred from 14 different locations in Lithuania to the controlled environment. Biochemical and Systematics and Ecology, 35(9): 582-592.
- Hasani, A., Omidbeigi, R., 2003. Effects of water stress on some morphological, physiological, and metabolical characteristics in basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Agricultural Science, 12 (3): 47-59.
- Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N., Shimoishi, Y., Nakamura, Y. and Murata, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. Journal of Plant Physiology, 166: 1587-1597.
- Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Neffati, B., Baldan, A., Ranieri, B., Marzoukc, M., Lachaal, A. and Smaoui, A., 2009. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. Industrial Crops and Products, 30(3): 338-343.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of salinity on quality and quantity of essential oil components and antioxidant activity in yarrow (*Achillea millefolium* L.)

A. Salimi[1], V. Rowshan[2] and E. Khanpoor[3*]

1- Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Department of Natural Resources, Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
3*- Corresponding author, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
E-mail: Elham.khanpoor@yahoo.com

Received: September 2015 Revised: February 2016 Accepted: April 2016

Abstract

This research was aimed to investigate the effect of salinity on quality and quantity of essential oil components and antioxidant activity in *Achillea millefolium* L. The study was conducted in a completely randomized design in greenhouse, controlled environment, with four treatments including 0 (control), 50, 100 and 150 mM NaCl and four replications per treatment. The essential oil was first extracted and the active components of the essential oil were separated and identified by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methods. Then, the proline content in fresh leaf and antioxidant activity of methanolic extract were determined. According to the results, the essential oil yield showed a significant increase at 150 mM NaCl. Regarding the essential oil composition, the main compounds were delta-cadinol, trans-beta-farnesene, α-Bisabolol, borneol, caryophyllene oxide, and menthone, showing an increase with increasing salinity. Some compounds such as sabinene, cis-β-ocimene, cis-γ-bisabolene were only detected in control treatment. Menthone, beta-bisabolene, epi-beta-santalene, and 1,8-cineole were only detected in the plants treated with salt. Proline content was increased with increased concentration of NaCl. The results showed that radical scavenging activity and reducing power of yarrow extract increased with increasing of salinity concentration. Our findings suggest that salt stress increases the antioxidant compounds in *Achillea millefolium.*

Keywords: *Achillea millefolium* L., salinity, antioxidant, proline, gas chromatography, DPPH.

www.SID.ir