اثر تنش شوری بر تحریک بیوسنتز ترکیبات مونوترپنی در گیاه دارویی مورتلخ (*Salvia mirzayanii*)

مرضیه ولی فرد*[1]، ساسان محسن زاده[2] و بهمن خلدبرین[3]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۲- دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز. ۳- استاد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شیراز، شیراز.

*نویسنده مسئول: mvalifard@yahoo.com

چکیده

Salvia mirzayanii، از گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعنائیان و بومی ایران می باشد که به دلیل داشتن ترکیبات دارویی خاص، نقش مهمی در درمان‌های طب سنتی و صنایع داروسازی دارد. در پژوهش حاضر اثر غلظت های مختلف کلرید سدیم در آب آبیاری (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار) بر مقدار بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی تشکیل دهنده روغن های فرار گیاه *S. mirzayanii* مورد بررسی قرار گرفت. مقدار و نوع ترکیبات تشکیل دهنده اسانس *S. mirzayanii* با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی تعیین شد. نتایج نشان داد مونوترپن های اکسیژن دار بیشترین ترکیبات موجود در اسانس گیاه شاهد را تشکیل می دهند که در بین آنها آلفا ترپنیل استات و ۱و۸ سینئول درصد بیشتری را به خود اختصاص داده اند. تنش شوری منجر به افزایش بیوسنز مونوترپن های اکسیژن دار و مونوترپن های هیدروکربنی در گیاهان *S. mirzayanii* گردید. افزایش ترکیبات ترپنوئیدی در گیاهان قرار گرفته تحت تنش نه تنها منجر به افزایش قدرت آنتی اکسیدانی گیاه و مقابله با اثرات زیانبار تنش می شود بلکه گیاهان *S. mirzayanii* تحت تنش به عنوان منبعی از متابولیت های ثانویه و دارویی خاص می‌توانند مورد توجه صنایع داروسازی قرار گرفته شوند.

مقدمه

در گیاهان عالی کربن اضافی که در فرایند رشد و نمو مورد استفاده قرار نگرفته است به صورت ترکیبات ثانویه با پایه کربنی (Carbon Based-Secondary Compounds)، CBSCs، و یا ذخایر نشاسته درون سلول ساماندهی می‌شوند. کربن هایی که به منظور تولید CBSCs در نظر گرفته شده اند به چند مسیر بیوسنتزی و قابل جایگزین (شیکیمیک اسید یا موالونیک اسید) هدایت شده و در نهایت منجر به سنتز گروه متفاوتی از CBSCs مانند ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، تانن های قابل هیدرولیز و ترپنوئیدها خواهند شد (Koricheva et al., 1998). این گروه از ترکیبات ثانویه گیاهی، همواره مورد علاقه بسیاری از داروسازان در صنایع مختلف داروسازی می‌باشند و نقش های مختلفی از جمله اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی برای آنها در نظر گرفته شده است (Basyuni, 2008). مقدار CBSCs و همچنین چگونگی اختصاص یافتن کربن قابل دسترس مازاد به سمت تولید نوع خاصی از CBSCs بخشی تحت تاثیر عوامل ژنتیکی و بخش اعظم آن تحت تاثیر عوامل محیطی می‌باشد. پژوهش ها نشان داده اند بیوسنتز متابولیت های ثانویه گیاهی یا CBSCs در شرایط تنش زا در بیشتر گیاهان افزایش می یابد و یکی از مکانیسم های گیاه برای مقاومت در برابر تنش‌ها محسوب می‌شوند. به طور مثال عملکرد ترپنوئیدها به عنوان سدهای خود حفاظتی در برگ و ریشه گیاهان حرادر برابر تنش شوری مورد تایید قرار گرفته است (Basyuni, 2008). از این رو، با توجه به مطالب ذکر شده بررسی تغییرات در مقدار و نوع CBSCs در گیاهانی که به منظور مطالعه مقاومت به تنش‌های مختلف مورد بررسی قرار می گیرند ضروری به نظر می‌رسد. *Salvia mirzayanii*، یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعنائیان و بومی ایران می باشد که به دلیل داشتن ترکیبات ترپنوئیدی خاص، نقش مهمی در درمان‌های طب سنتی و صنایع داروسازی دارد. برگ های گیاه *S. mirzayanii* از زمانهای قدیم تاکنون در درمان‌های طب سنتی به عنوان تسکین دهنده درد های معده و ضدعفونی کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد

(جاویدنیا و همکاران، ۲۰۰۲). به دلیل اهمیت ترکیبات ترپنوئیدی تشکیل دهنده اسانس این گیاه در پژوهش حاضر اثر تنش شوری بر این گروه ترکیبات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- کاشت بذر، تولید نهال و اعمال تنش شوری بر گیاهان

به منظور تحریک جوانه زنی و شکستن خواب بذرهای *S. mirzayanii* از تیمار آب ۹۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، تیمار آب ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۴ درجه سانتیگراد و تیمار تاریکی به مدت یک هفته استفاده شد. تولید نهال از بذر در دو مرحله و در دو محیط گلدان های اژدری و گلدان های پلاستیکی بزرگ با ترکیب خاک متفاوت انجام شد (Valifard et al., 2015). میانگین دمای شب و روز گلخانه، به منظور دستیابی به رشد حداکثری نهال ها، به ترتیب ۲±۱۷ و ۴±۲۹ درجه سانتی گراد و میزان رطوبت نسبی ۵±۵۹ و ۵±۳۸ درصد به دست آمد. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر ترکیبات تشکیل دهنده روغن های فرار، گیاهان ۲۱ هفته ای تحت تیمار سطوح مختلف شوری آب آبیاری (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) قرار گرفتند و بیست روز پس از اعمال آخرین سطح تنش جمع آوری صورت گرفت. برای هر سطح تنش سه تکرار در نظر گرفته شد.

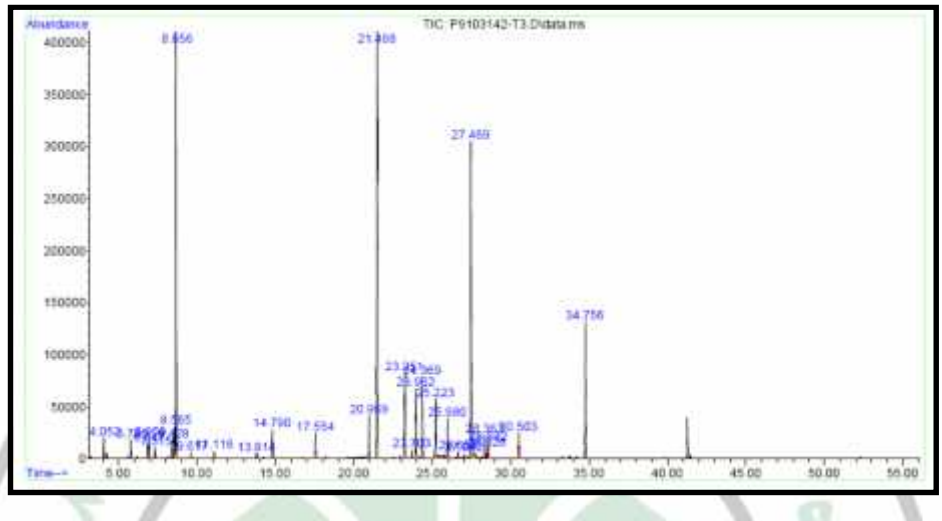
۲- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

به منظور بررسی اجزاء تشکیل دهنده روغن های فرار گیاه *S. mirzayanii* از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC /MS) استفاده شد. نمونه‌های تازه برگ پس از خرد شدن به سرعت در ویال های ۲۰ میلی لیتری مخصوص قرار داده و درب شیشه ها با لاستیک سیلیکونی و پوشش آلومینیومی بسته شد. سپس ویال ها به منظور بررسی ترکیبات موجود در اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی منتقل شدند. شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از بررسی طیف های جرمی و مقایسه با طیف های جرمی پیشنهادی توسط کتابخانه‌های کامپیوتر دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی و ترکیبات استاندارد صورت گرفت (Adams, 2007). آزمون آماری ANOVA و تست آماری دانکن در سطح ۰/۰۵ =α به منظور آنالیز آماری داده ها استفاده شد.

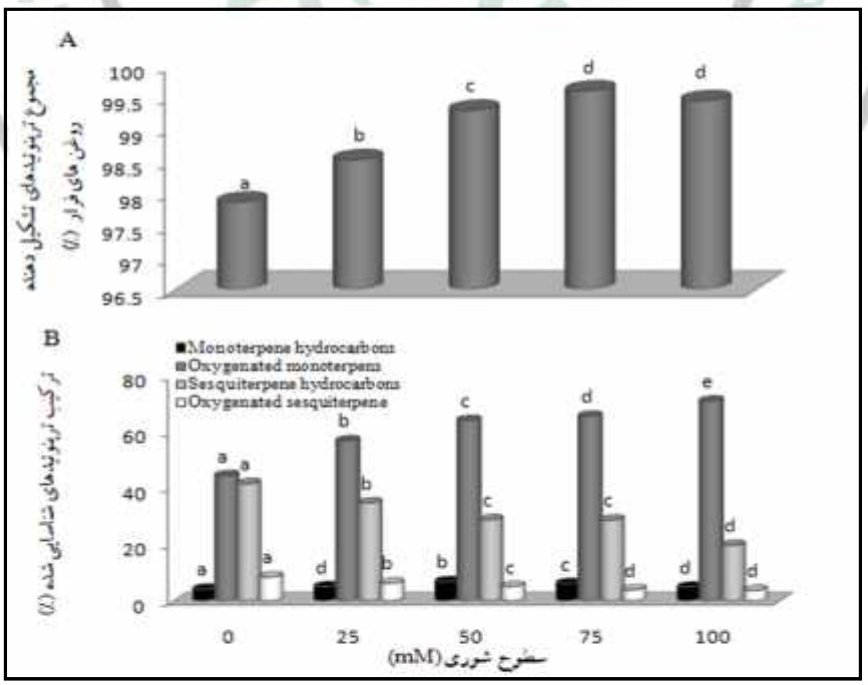
نتایج و بحث

شکل ۱ نمونه ای از کروماتوگرام HS-GC/MS حاصل از ترکیبات فرار تشکیل دهنده اسانس گیاه *S. mirzayanii* در گیاهان شاهد را نشان می دهد. نتایج حاصل از آنالیز ترپنوئیدهای تشکیل دهنده اسانس در گیاه شاهد نشان داد ۲۸ ترکیب دارویی مختلف ۹۷/۸۵ درصد از کل ترکیبات اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند (شکل ۲-A). در بین این ترکیبات، مونوترپن های اکسیژن دار (۴۴/۶۷٪) بیشترین و مونوترپن های هیدروکربنی (۴/۲۴٪) کمترین ترکیبات را به خود اختصاص داده اند (شکل ۲-B). افزایش تنش شوری تا سطح ۷۵ میلی مولار منجر به افزایش معنی دار هر دو گروه مونوترپن های اکسیژن دار و هیدروکربنی و کاهش در هر دو گروه سزکوئی ترپن ها گردید. اگرچه تنش شوری ملایم و متوسط منجر به افزایش در مقدار مونوترپن ها شده است، با این وجود سطوح شوری بیشتر (۱۰۰ میلی مولار) باعث کاهش در کل ترپنوئیدهای تشکیل دهنده اسانس گردید. افزایش در مقدار مونوترپن های اکسیژن دار در گیاهان چنار (Behnker et al., 2013) و ساج (Ben Taarit et al., 2010) قرار گرفته در معرض تنش شوری نیز دیده شده است. نتایج آزمایش های مختلف بر مقدار ترکیبات ویژه اسانس ها نشان می‌دهد تحریک تولید روغن های ضروری تحت سطوح ملایم شوری به دلیل تراکم زیاد غده های روغنی و افزایش در تعداد مطلق غده ها می‌باشد (Said-Al Ahl & Omer, 2011). همچنین پژوهش های مختلف نشان می‌دهد افزایش در مقدار ترپنوئیدها در تنش شوری باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانی گیاه و در نتیجه مقابله با اثرات مخرب رادیکال های آزاد تشکیل شده در شرایط تنش خواهد شد (Vickers,

(2009. از این رو افزایش در مقدار ترکیبات ترپنوئیدی نه تنها به عنوان یکی از مکانیسم های مقاومت گیاهان در مقابل تنش محسوب می‌شود بلکه گیاهان *S. mirzayanii* تحت تنش به عنوان منبعی از متابولیت های ثانویه و دارویی خاص می‌توانند مورد توجه صنایع داروسازی قرار گرفته شوند.



شکل ۱- نمونه ای از کروماتوگرام HS-GC/MS حاصل از ترکیبات فرار تشکیل دهنده اسانس گیاه *S. mirzayanii* در گیاهان شاهد. محور افقی نمودار زمان خارج شدن هر یک از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و منحنی عمودی فراوانی هر کدام از ترکیبات را نشان می‌دهد.



شکل ۲- اثر غلظت های مختلف کلرید سدیم بر مقدار ترپنوئیدهای کل (A) و ترکیب ترپنوئیدهای (B) تشکیل دهنده اسانس گیاه *S. mirzayanii* حروف متفاوت قرار گرفته بر روی ستون ها در سطح $\alpha \leq$ ۰/۰۵ معنی دارمی‌باشند.

منابع

1. Adams. R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois.1-804.
2. Basyuni. M. 2008. Studies on Terpenoid Biosynthesis of Mangrove,Tree Species. Ph.D Thesis in Agriculture. Kagoshima University, Japan.
3. Behnke. K., Ghirardo, A. Janz, D. Kanawati, B. Esperschütz, J. Zimmer, I. Schmitt-Kopplin, P. Niinemets, U. Polle, A. Schnitzler, J.P. and Rosenkranz, M. 2013. Isoprene function in two contrasting poplars under salt and sunflecks. Tree Physiology. 1:1–17.
4. Ben Taarit, M.K. Msaada, K. Hosni, K. and Marzouk, B. 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. Food Chemistry. 9(3):951-956.
5. Javidnia, K. Miri, R. Kamalinejad, M. and Nasiri, A. 2002. Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech.f. &Esfand from Iran. Flavour and Fragrance Journal. 17:465-467.
6. Koricheva, J. Larsson, S. Haukioja, E. and Keininen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: Hypothesis testing by means of meta-analysis. OIKOS. 83:212-226.
7. Said-Al Ahl, H.A.H. and Omer, E.A. 2011. Medicinal and aromatic plants production under salt stress: A review. Herba Polonica. 57:72-87.
8. Valifard, M. Mohsenzafeh, S. Niazi, A. and Moghadam, A. 2015. Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in *Salvia* species. Australian Journal of Crop Science. 9(4):254-263.
9. Vickers, C.E. Gershenzon, J. Lerdau, M.T. Loreto, F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. Nature Chemical Biology. 5:283–291.

Effect of salt stress on induction of monoterpenoids biosynthesis in *Salvia mirzayanii* plants

M.Valifard[1]*, S.Mohsenzadeh[2], B.Kholdebarin[3]

1- Ph. D. student of Plant Physiology, Shiraz University. 2- Associate Professor, Dep. of Biology, Shiraz University. 3- Professor, Dep. of Biology, Shiraz University.

*Corresponding author: mvalifard@yahoo.com

Abstract

Salvia mirzayanii is a medicinal and aromatic plants belonging to the Lamiaceae family, which has many pharmaceutical properties. In the present study, the effects of different salt concentrations (0, 25, 50, 75 and 100 mM NaCl) on terpenoids biosynthesis of volatile components in *S. mirzayanii* were studied. The volatile components were identified and analyzed by HS (headspace)-GC-MS using the Combi PAL System technique. Our results showed that oxygenated monoterpenes were the most constitutes of volatile oils and among these compounds, α-terpinyl acetate and 1, 8-cineole were the most compounds. Salt stress induced biosynthesis of monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes in *S. mirzayanii* plants. Increase in terpenoids biosynthesis in plants which were exposed to salinity stress not only cause increase in antioxidant activity but also, these plants, have many interest for pharmaceutical industries.

Key words: Terpenoids, Salt Stress, Salvia Plant