تغییرات فنل، فلاونوئید و آنتی اکسیدان تحت تأثیر تیمار هیومیک اسید و تنش شوری در گیاه دارویی درمنه خزری (*Artemisia annua* L.)

آتنا محمدی نیا سماکوش[۱]، حسین مرادی*[۲] و وحید اکبرپور[۳]

[۱]دانشجوی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

[۲]نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

[۳]استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

*نویسنده مسئول: moradiho@ yahoo.com

چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین فاکتورهای کاهش عملکرد و تولید در گیاهان زراعی، باغی و دارویی در جهان می‌باشد. هیومیک اسید به عنوان یک اسید آلی و آسکوربات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌توانند در جهت بهبود عملکرد گیاهان در شرایط تنش شوری مؤثر واقع شوند. لذا به منظور بررسی تأثیر هیومیک اسید بر میزان آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید در گیاه دارویی درمنه خزری تحت تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در منطقه شیرگاه به اجرا درآمد. تیمارها شامل عامل شوری در سه سطح (۰، ۴ و ۶ گرم بر لیتر) و عامل هیومیک اسید نیز در سه سطح (۰، ۱۵۰و۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر هیومیک اسید و شوری تأثیر معنی‌داری بر روی تعدادی از صفات فیتوشیمیایی اندازه‌گیری شده داشت. بیش‌ترین میزان فنل (۲/۳۹میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم) در تیمار شوری ۶ گرم بر لیتر و بدون هیومیک اسید بود. حداکثر میزان فلاونوئید (۰/۱۱۵ میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم) نیز در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و شوری صفر گرم بر لیتر حاصل شد. بنابراین تیمار شوری و هیومیک اسید در میزان فنل و فلاونوئید اثر مثبت نشان دادند اما میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۶۶/ ۵۳ درصد) در عدم تیمار مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: تیره کاسنی، کودهای زیستی، گیاه دارویی، مواد مؤثره

مقدمه

درمنه‌خزری با نام علمی (*Artemisia annua* L.) متعلق به خانواده‌ی کاسنیان (Asteraceae (Compositae است. اهمیت این گیاه به دلیل حضور ماده آرتمیزینین است که یک لاکتون‌سزکویی‌ترپن‌اندوپراکسید می‌باشد، که فعالیت مؤثری علیه نژادهای پلاسمودیوم، مقاوم به داروهای چندگانه فعلی دارد. علاوه بر این مواد مؤثره موجود در *A.annua* دارای اثرات گوناگونی از جمله ضد التهاب، ضدتومور، ضدزخم‌معده، آنتی‌اکسیدان، کاهش‌دهنده سوءهاضمه و ضدانقباض کیسه صفرا می‌باشد (Kim *et al*., 2003). کاربرد کودهای بیولوژیک درکشاورزی قدمت زیادی دارد ولی بهره‌برداری علمی از این گونه منابع سابقه چندانی ندارد. امروزه با توجه به مشکلات زیست محیطی متعددی که مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی به همراه داشته است استفاده از کودهای زیستی در کشاورزی مجددا مطرح شده است. با توجه به این که تنش شوری جزو اولین تنش‌های محیطی است که گیاهان با آن مواجه‌اند و امروزه به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی، رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. استفاده از هیومیک اسید به عنوان یک عامل بازدارنده شوری می‌تواند نقش بسزایی را ایفا کند. برای مثال، تنش شوری فرآیندهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه را در گیاهان‌دارویی تحت تاثیر قرارمی‌دهد. در نتیجه به کارگیری موادی که بتواند تنش شوری را کنترل نماید از اهمیت بالایی برای گیاه برخوردار است از جمله این مواد هیومیک اسید است. مواد هیومیکی با گیاه سازگار بوده و هیچ‌گونه سمیتی برای گیاه ایجاد نمی‌نماید و به عنوان مکمل آلی-کودی و بهبوددهنده جذب مواد غذایی استفاده می‌شوند (Abedi *et al*., 2010). این مواد عموماً مانند تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اکسین و سایتوکنین عمل می‌کند و سبب بهبود تحمل به تنش‌های مختلف

در گیاه می‌شوند. هیومیک اسید به عنوان یک اسید آلی حاصل از هوموس و سایر منابع طبیعی از طریق اثرات هورمونی و بهبود جذب عناصر غذایی، سبب افزایش بیوماس ریشه و اندام هوایی می‌شود. با توجه به ملاحظات زیست محیطی، استفاده از انواع اسیدهای آلی برای بهبود کمی وکیفی محصولات زراعی و باغی رواج فراوانی یافته است. مقادیر بسیار کم از اسیدهای آلی اثرات قابل ملاحظه‌ای در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک داشته و به دلیل وجود ترکیبات هورمونی اثرات مفیدی در افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی دارند. از طرفی کودهای آلی مانند هیومیک اسید می‌تواند باعث افزایش میزان فلاونوئید در گیاه شود. فلاونوئیدهای موجود در برگ به عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و گیاهان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. هم‌چنین، فلاونوئیدها به دلیل داشتن نقش آنتی‌اکسیدانی، به طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی و یا به طور غیرمستقیم بوسیله کلات کردن آهن، مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (Yuosefi *et al*.,2014). اخیراً استفاده از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان به دلیل ویژگی‌های بالقوه آنتی‌اکسیدانی و اثرات سلامت‌بخش، به ویژه هنگامی که این ترکیبات در مقادیر بالا در مواد غذایی حضور دارند، افزایش یافته است (Muanda *et al*., 2011) و هم‌چنین نتایج مطالعات اخیر در خصوص کاربرد کودهای زیستی نشان داد کودهای زیستی اثر معنی‌داری بر میزان ترکیبات فنلی داشتند. با در نظر گرفتن خصوصیات ذکر شده هدف از این پژوهش بررسی اثر هیومیک اسید و تنش شوری بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید گیاه درمنه خزری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

نشاءهای گیاه درمنه خزری بومی منطقه (شهر شیرگاه با مختصات ۳۶ درجه و ۱۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۲۲ دقیقه عرض‌شمالی و ۵۲ درجه و ۴۴ دقیقه تا ۵۲ درجه و ۵۳ دقیقه طول‌شرقی و ارتفاع ۲۳۸ متر از سطح دریا)، به صورت یکنواخت در گلدان‌های پلاستیکی با بستر محتوی خاک باغچه و خاکبرگ کشت شدند. گلدان‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با دو فاکتور شامل تنش شوری در سه سطح (۰، ۴ و ۶ گرم بر لیتر) و هیومیک اسید در سه سطح (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در سه تکرار قرار گرفتند. تیمار شوری به صورت محلول در خاک گلدان و تیمار هیومیک اسید به صورت محلول‌پاشی بر روی گیاه انجام گردید. نحوه اعمال تیمار به گونه‌ای بود که ابتدا تیمار هیومک اسید اعمال گشت و روز بعد تیمار شوری انجام شد. این عمل سه بار به فاصله زمانی ۵ روز تکرار شد.

عصاره‌گیری

جهت انجام عصاره‌گیری، یک گرم از بافت خشک را در ده میلی‌لیتر متانول به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده سپس التراسونیک کرده و پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، از محلول بالایی جهت اندازه‌گیری استفاده شد (Kadhim *et al*., 2016).

فنل کل

به منظور بررسی محتوی تام فنلی عصاره از روش معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. ابتدا به ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهان ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین–سیو کالتیو افزوده شد. سپس ۱/۶ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و ۵ دقیقه استراحت به مخلوط مورد نظر می‌دهیم در ادامه ۳۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم ۱ مولار اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۴۰ درجه قرار می‌دهیم و در طول موج ۷۶۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت می‌گردد. میزان تام فنولیک بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره از طریق فرمول زیر گزارش گردید (Slinkard *et al*., 1977).

$$Y=0.925X-0.026$$

فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل، از روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم برگ تازه در هاون چینی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر متانول ساییده شد؛ سپس به ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده، ۱ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد آلومینیوم‌کلرید (AlCl3) اضافه شد و حجم آن، با اتانول به ۲۵ میلی‌لیتر رسید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و پس از ۴۰ دقیقه، جذب روشناور نمونه‌ها در طول موج ۳۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئیدهای کل از ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ میلی‌مولار بر سانتی‌متر استفاده شد که از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Y=0.030X-0.002$$

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

یک میلی‌لیتر از عصاره با یک میلی‌لیتر ازمحلول رادیکال آزاد DPPH ۱۰میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد و سپس در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت صورت گرفت (Ebrahimzadeh *et al*., 2009). درصد مهارراديكال آزاد ازطریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$IP= (A\ control - A\ sample / A\ control) \times 100\%$$

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشـان داد تغییرات فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر تیمار شوری و هیومیک اسید در گیاه دارویی درمنه خزری در سـطح احتمـال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱).

جدول(۱): تجزیه واریانس و سطح معنی داری فاکتورهای مختلف و اثرات متقابل آنها بر آنتی اکسیدان، فنل و فلاونوئید

		میانگین مربعات			
منبع تغییرات	درجه‌آزادی	آنتی‌اکسیدان کل (DPPH) (%)	فنل (میلی‌گرم گالیک اسید در۱۰۰ گرم)	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم)	**سطح معنی داری**
اثر هیومیک اسید	۲	۲۶۷/۹۸۰۱	^{ns}۰/۰۷۸۹	۰/۰۰۴۲	** < ۰/۰۰۰۱
اثر شوری	۲	۲۷۱/۳۴۴۲	۱/۱۵۰۵	۰/۰۰۳۶	** < ۰/۰۰۰۱
اثر متقابل هیومیک *شوری	۴	۱۹۰/۵۶۳۵	۰/۳۱۴۹	۰/۰۰۱۴	** < ۰/۰۰۰۱
خطا	۱۶				
کل	۲۶				

** معنی داری در سطح یک درصد. ns عدم معنی داری.

جدول(۲) مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک اسید و تنش شوری بر صفات مورد مطالعه گیاه دارویی درمنه خزری
(H: هیومیک اسید S: شوری)

تیمار	آنتی‌اکسیدان کل (%) (DPPH)	فنل (میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم)	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم)
H_0S_0	۵۳/۶۶ a	۱/۳۲ d	۰/۰۸۳ b
H_0S_4	۳۴/۷۸ c	۲/۳۰۸ a	۰/۰۶۸ c
H_0S_6	۳۱/۶ c	۲/۳۹ a	۰/۰۲۶ e
$H_{150}S_0$	۳۷/۵۴ cb	۱/۴۷ dc	۰/۰۲۸ e
$H_{150}S_4$	۲۷/۷۹ c	۲/۲۴ a	۰/۰۷۱ c
H150S6	۳۷/۲ cb	۱/۷۵ b	۰/۰۴۲ d
H300S0	۴۶/۶۷ ab	۱/۸۲ b	۰/۱۱۵ a
H300S4	۵۰/۸۲ a	۲/۲۰ a	۰/۰۹۴ b
H300S6	۳۷/۷۵ cb	۱/۶۲ bc	۰/۰۵۸ c

در هر ستون میانگین هایی که حداقل یک حروف مشترک دارند، از لحاظ آماری آزمون دانکن در سطح احتمال(۵٪) اختلاف معنی داری باهم ندارند.

تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان‌دارویی همیشه به یک میزان صورت نمی‌گیرد و عوامل متعددی وجود دارند که می‌توانند تولید این ترکیبات را تحت تاثیر قراردهند. تنوع گونه‌ای، مراحل رشد و نموی، شرایط فصلی خاص، میزان دسترسی به مواد غذایی معدنی و شرایط تنش از جمله این عوامل هستند. در پاسخ به تنش شوری یا خشکی تولید ترکیبات ثانویه ممکن است افزایش یا کاهش نشان دهد اما تحقیقات زیادی در این زمینه صورت نگرفته‌است(Aghai *et al*.,2014) .

در گیاه‌بابونه *(Chamomilla Matricaria)* تجمع اسیدهای فنلی مانند پروتوکاته‌کین‌اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک با زیاد شدن شوری با افزایش سه برابری نسبت به شاهد همراه بود (Cik *et al*.,2009) که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر استفاده از ، هیومیک اسید ، نقش موثری در افزایش میزان فلاونوئید در گیاه شنبلیله داشت(امینی فرد و همکاران، ۱۳۹۹). نتایج حاصل ازاین پژوهش نشان داد که بیشترین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به ترتیب در غلظت۶ گرم بر لیتر شوری و عدم استفاده از هیومیک اسید و ۳۰۰میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و در شوری صفر حاصل شد هرچند تیمارهای آزمایش نتوانست آنتی اکسیدان را تحت تاثیر خود قرار دهد. مطالعات نشان داده که عوامل مختلفی بر درصد و میزان ترکیبات فنلی عصاره استخراجی از گیاهان دارویی موثر هستند، در این زمینه می توان به عوامل مختلفی مانند عوامل ژنتیکی، شرایط محیطی از جمله سیستم‌های تغذیه‌ای و شرایط نگهداری اشاره کرد. حتی بین واریته‌های زراعی یک گونه نیز از نظر درصد و میزان ترکیبات فنلی تفاوت وجود دارد. همچنین میزان رسیدن و زمان برداشت بر محتوای فنلی موثرند(Jacopic *et al*., 2007).

منابع

امینی‌فرد، م. ح. و قادری‌زه، ح. ۱۳۹۹. اثر سطوح مختلف هیومیک اسید و تراکم کاشت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص بیوشیمیایی گیاه دارویی (*Trigonella foenum- graecum* L). نشریه علمی–پژوهشی اکوفیتوشیمی گیاهان‌دارویی. ۱۸: ۸۹–۷۷.

Abedi, T. and Pakniyat, H. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oil seed rape (*Brassica napus* L.). Czech. Journal of Genetics and Plant Breeding, 46(1): 27-34.

Aghai, K., Talai, N., Kanani, M. and Yazzdani, M. 2014. Effect of salt stress on some physiological and biochemical parameters of two Salvia species. Ournal of plant Process and Function, 3(9): 85-96.

Cik, J.K., Klejdus, B., Hedbavny, J. and Backor, M. 2009. Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of Matricaria chamomilla plants. Ecotoxicology, 18(5): 544-554.

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F. and Nabavi, S.M. 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of Eryngium Caucasicum Trautv at flowering stage. Pharmacognocy Research, 1(6): 435-439.

Jacopic, J., Colaric, M., Veberic, R., Hudina, M., Solar, A. and Stampar, F. 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur. Food chemistry, 104 (1): 100-5.

Kadhim, M.J., sosa, A.A., hameed, I. H. 2016. Evaluation of anti-bacterial activity and bioactive chemical analysis of Ocimum basilicum using Fourier transform infrared (FT-IR) and gas chromatographymass spectrometry (GC-MS) techniques. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 8(6): 127-146.

Kim, Y., Wethers, P.J., Wyslouzil, B.E. 2003. A comparative study of mist and bubble column reactor in the in vitro production of artemisinin. Plant Cell Reports, 20: 451- 455.

Muanda, F.N., Soulimani, R., Diop, B. and Dicko, A. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. LWT-Food Science and Teachnology, 44: 1865-1872.

Slinkard, K. and Singleton, V. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture, 28: 49-55.

Yousefi, M., Enteshare, S.H. and Saadatmand, M. 2014. The effect of treatment with silicea and bor some morphological characteristics, anatomical and physiological borage (*Echium amoenum* L.). Journal of Greenhouse Crop Science and Technology, 5(18): 52- 62.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and theirscavenging effects on superoxideradicals. Food Chemistry, 64(4): 555-559.

Effect of humic acid and salinity on antioxidant activity, Phenol, flavonoid content in Artemisia annua

Athena Mohammadi Nia Samakoush[1], Hossein Moradi[*2] and Vahid Akbarpour[3]
[1]Master student of medicinal plants, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
[2]Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
[3]Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
[*]*Corresponding author*: *moradiho @ yahoo.com*

Abstract

Salinity stress is one of the most important factors in reducing yield and production of crops, orchards and medicine plants in the world. Humic acid as an organic acid and ascorbate as a powerful antioxidant can effectively improve plant yield under salinity stress. Therefore, an experiment designed to investigate the effect of humic acid on the antioxidant activity, and phenol and flavonoid contents of Caspian artichoke under salinity stress. The experiments were conducted as a factorial design in a randomized complete block with three replications. Treatments included salinity at three levels (0, 4 and 6 g/l) and humic acid at three levels (0, 150 and 300 mg/l). The results of analysis of variance showed that the effect of humic acid and salinity had a significant effect on the measured phytochemical traits. The highest amount of phenol (2.39 mg gallic acid per 100 g) was achieved in salinity treatment (6 g/l) with no humic acid treatment. The maximum flavonoid content (0.115 mg quercetin per 100 g) was obtained at a concentration of 300 mg/l humic acid and salinity of 0 g/l. we concluded that salinity and humic acid treatments had a positive effect on phenol and flavonoid contents, but the control treatment showed the highest antioxidant capacity (53.66%).

Keywords: Active ingredients, Biofertilizers, Chicory genus, Medicinal plant