بررسی و مقایسه اثر محلول‌پاشی ژرانیال و سیترال بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره اسانس گیاه دارویی *Lippia citriodora* Kunth.

حسن نورافکن*

استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی ، میانه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲۵

چکیده

تبدیل زیستی به منظور تغییر یک پیش‌ماده کم ارزش به فرآورده ارزشمند دارویی انجام می‌شود. این پژوهش گلخانه‌ای جهت ارزیابی اثر محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال مصنوعی در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر در کنار محلول‌پاشی با آب مقطر و بدون محلول‌پاشی (شاهد) بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی به‌لیمو *Lippia citriodora* Kunth. در دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه طی ۱۳۹٤ انجام گرفت. اولین محلول‌پاشی در مرحله تقریباً ۲۵ سانتی‌متری انجام شده و ۷ و ۱٤ روز بعد تکرار گردید. یک هفته پس از آخرین محلول‌پاشی، برگ‌های به‌لیمو برداشت شد. استخراج اسانس برگ به‌لیمو با روش تقطیر با آب (طرح کلونجر) انجام شد. در ارزیابی بازده اسانس، محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال و به‌خصوص غلظت‌های کم آنها (۱۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر) و آب مقطر اثر مثبتی بر افزایش درصد اسانس تولیدی نشان داد. تجزیه اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی انجام شد. در کل، ۲۱ ترکیب در اسانس نمونه‌ها شناسایی و مهمترین ترکیبات شناسایی شده لیمونن، ژرانیال و نرال بود. محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال و به‌خصوص غلظت‌های بالای آنها موجب افزایش میزان لیمونن تولیدی شد و بیشترین میزان لیمونن به ترتیب در ژرانیال (۵۰۰) و سیترال (٤۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر) به مقدار ۲۸/۲٤ و ۲٤/٥٤ درصد و کمترین میزان لیمونن (۱۷/۸۳) در تیمار شاهد شد. ولی، محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال اثر مثبتی بر میزان نرال و ژرانیال نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، به لیمو، تغذیه برگی، سیترال، ژرانیال، متابولیت ثانویه

*نویسنده مسئول: hassannourafcan@gmail.com

مقدمه

در حال حاضر حدود یک‌سوم داروهای مورد استفاده در جوامع انسانی دارای منشاء گیاهی هستند و صنایع مرتبط داروسازی توجه خود را به کشت و تولید گیاهان دارویی معطوف داشته و هرساله هزاران هکتار از زمین‌های زراعی خود را به کشت و پرورش گیاهان دارویی اختصاص می‌دهند (Zarea et al., 2015).

به‌لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* Kunth. از خانواده شاه‌پسند[1] که لویزه و وِرونِ از نام‌های دیگر آن است، برگ‌های کشیده، باریک و به رنگ سبز روشن و بسیار معطر دارد (Zarea et al., 2015; Ebadi et al., 2016). برگ به عنوان اندام مورد استفاده گیاه دارای اثرات ضدتشنج، ضدانقباض، تب‌بر و آرام‌بخش بوده و دارای سابقه‌ای طولانی در درمان آسم، اسپاسم، سرماخوردگی، سردرد، تب، نفخ، اسهال، سوء هاضمه، بی‌خوابی و اضطراب می‌باشد (Zarea et al., 2015). گیاهان دارای اسانس، نقش مهمی در زندگی انسان داشته و به لحاظ اهمیت آنها، انجام مطالعات جامع در مورد آنها ضروری است (Karimi et al., 2013). اسانس به‌لیمو دارای ترکیب‌های فیتوشیمیایی مختلفی می‌باشد که عمده‌ترین آنها سیترال[2]، ۱،۸-سینئول[3]، ژرانیال[4]، ژرانیول[5]، نرال[6]، نرول[7]، لیمونن[8]، بتا-کاریوفیلن[9]، بتاگوانین[10]، آلفا-توجون[11]، ایزومنتون[12]، آلفا-برگاموتن[13]، پارا-سیمن[14]، سیترونلول[15]، اسپاتولنول[16] و کاریوفیلن‌اکساید[17] می‌باشد (Zarea et al., 2015).

تولید و میزان مواد مؤثره گیاهان دارویی، به‌عنوان یک متغیر، تحت تأثیر بسیاری از عوامل محیطی قرار می‌گیرد. کشف و دستیابی عوامل مؤثر در جهت افزایش خواص دارویی و میزان مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی، همواره مد نظر متخصصان صنایع داروسازی بوده است (Zare Dehabadi et al., 2010). روند دقیق ساخت اسانس در گیاهان هنوز به خوبی مشخص نشده است ولی اسانس‌ها به‌طور کلی بازمانده‌های ناشی از فرآیندهای اصلی متابولیسم گیاهان محسوب می‌شوند (Farzaneh et al., 2010). روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود که شامل استفاده از محرک‌ها[18]، افزودن پیش‌ماده‌ها (پیش‌سازها)[19]، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های مویین و مهندسی ژنتیک می‌باشد (Nourafcan, 2014). محرک‌ها به عنوان تحریک کننده‌های سنتز متابولیت‌های ثانویه و پیش‌ماده‌ها از اجزا لازم و معمولاً آغازگر و حدواسط در مسیر بیوسنتزی بوده و می‌توانند منجر به افزایش تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گردند (Firoozi, 2008).

طی فرآیند رشد، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی با بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در مسیرهای متابولیسم ثانویه گیاه اتفاق می‌افتد. این برنامه ژنتیکی می‌تواند تحت تأثیر عوامل خارجی تغییر دهنده وضعیت فیزیولوژیکی باشند، القاء

1. Verbenaceae
2. Citral
3 1,8-cineole
4. Geranial
5. Geraniol
6. Neral
7. Nerol
8. Limonene
9. Beta-caryophyllene
10. Beta-guanine
11. Alpha-thujone
12. Isomenthone
13. Alpha-bergamotene
14. Para-cymene
15. Citronellal
16. Spathulenol
17. Caryophyllene oxide
18. Elicitors
19. Precursors

تغییرات بیوشیمیایی با ایجاد علائمی باعث بروز پاسخ‌هایی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. ترپنوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که از ایزوپنتیل‌دی‌فسفات[1] (IPP) تشکیل شده‌اند. ایزوپنتیل‌دی فسفات پیش‌ماده بسیاری از مونوترپن‌ها است که در ترکیب با ایزوپرن به وجود می‌آیند (Prins et al., 2013). پیش‌ماده‌ها شامل ترکیبات زیستی مختلفی هستند که در ابتدا و یا میانه مسیر بیوسنتزی متابولیت های ثانویه وجود دارند و افزودن آنها می‌تواند میزان تولید محصول نهایی مورد نظر را افزایش دهد. اسیدهای آمینه از جمله ترکیباتی هستند که به عنوان پیش‌ساز به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه به کار می‌روند. به‌عنوان مثال دو متابولیت ایزوفلاون[2] و فلانوییید[3] از اسیدآمینه فنیل‌آلانین مشتق می‌شوند که در بالا دست مسیر متابولیکی فنیل‌پروپانویید[4] قرار دارد. افزودن فنیل‌آلانین به محیط کشت میزان تولید متابولیت‌های مورد نظر را افزایش می‌دهد (Omidi and Abdollahi, 2014).

روغن‌های فرار معمولاً از مونوترپن‌ها ساخته شده و عطر و طعم بسیاری از گونه‌های گیاهی را باعث می‌شوند. شرایط محیطی می‌تواند بیوسنتز اسانس را با تغییر تعادل هورمونی تحت تأثیر قرار دهد (Prins et al., 2013). ژرانیول یک الکل مونوترپن آسیلیکلی[5] است که از گل‌های بسیاری از گونه‌ها، به‌ویژه گل‌های رُز منتشر می‌شود. همچنین، در بافت‌های رویشی بسیاری از گیاهان دارویی دیده شده و اغلب همراه با ژرانیال و نرال که از اکسیداسیون ژرانیول تولید می‌شوند، یافت می‌شود. سیترال به ترکیب ژرانیال و نرال گفته می‌شود عطر گیاهانی مانند لیمو، علف‌لیمو[6]، زنجبیل و برخی از ارقام ریحان غنی از سیترال می‌باشد. با این وجود، در حال حاضر، تولید سیترال از ژرانیول با الکل دهیدروژناز[7] یا اکسیداز به طور قطعی ثابت نشده است. اگر ژرانیول تنها سوبسترای اکسیداسیون منجر به تشکیل سیترال یا نرول، یا ایزومر سیس ژرانیول[8] باشد می‌تواند به‌عنوان یک پیش‌ماده به‌کار رود. ژرانیول به احتمال زیاد از ژرانیل دی فسفات به عنوان پیش‌ماده عام تمام مونوترپن‌ها تولید می‌شود (Iijima et al., 2004). در سال‌های اخیر توانایی کشت سلول‌های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای برای تبدیل زیستی[9] یک پیش‌ماده کم ارزش به فرآورده نهایی ارزشمند بررسی شده است (Omidi and Farzin, 2012).

ترکیب ارگانیک اپوکسید[10] برای ساخت ترکیبات آلی ارزشمند مورد استفاده قرار گرفته و به‌عنوان پیش‌ماده برای مولکول‌های بیوشیمیایی خاص به شمار می‌رود. ترکیب ٦،٧-اپوکسید از سیترال برای تولید ١،٢-اپوکسی کاروتنوئیدی مانند ١،٢-اپوکسی لیکوپن و ١،٢،١ ', ٢'-دیپوکسیل لیکوپن به کار می‌رود. علاوه بر این، ٢،٣-اپوکسید به عنوان یک پیش‌ماده مهم برای ساخت بنزوفوران‌های[11] مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zuniga et al., 2016). در پژوهشی برای بررسی اثر محرک‌ها و پیش‌ماده‌ها روی میزان تولید منتول در کشت سلولی نعناع فلفلی مشاهده شد که کاربرد Ý-سیکلودکسترین[12] به تنهایی بیشتر از منتون روی تولید منتول مؤثر است ولی استفاده همزمان آن‌ها باعث ایجاد اثر هم‌افزایی[13] در تولید منتول نشان داد

1. Isopentenyl diphosphate (IPP)
2. Isoflavone
3. Flavonoid
4. Phenylpropanoid
5. Acyclic monoterpene
6. *Cymbopogon citratus*
7. Alcohol dehydrogenase
8. Cis-isomer of geraniol
9. Biotransformation
10. Epoxide
11. Benzofurans
12. Ý-Cyclodextrin
13. Synergistic

(Chakraborty and Chattopadhyay, 2008). اضافه کردن فنیل‌آلانین به‌عنوان یک پیش‌ماده باعث بهبود عملکرد تولید رزمارینیک‌اسید در کشت سلولی گیاه حسن‌یوسف شده است (Habibi Khaniani et al., 2005). در مطالعه‌ای نشان دادند که مصرف پیش‌ماده‌های اسیدآمینه‌های فنیل‌آلانین و سیستئین و محرک‌های سالیسیلیک‌اسید، متیل‌جاسمونات و عصاره مخمر موجب افزایش تولید گلوکوتروپائولین[1] در کشت ریشه مویین *Tropaeolum majus* L. می‌شود (Wielanek and Urbanek, 2006).

این پژوهش جهت بررسی تأثیر محلول پاشی سیترال و ژرانیال مصنوعی بر میزان اسانس و ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه دارویی به‌لیمو انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نهال‌های کشت بافتی به‌لیمو پس از سازگاری در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی البرز به گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه در سال ۱۳۹٤ منتقل شد. آبیاری گلدان‌ها به‌طور مرتب کنترل شده و هفته‌ای یک‌بار با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. پس از رسیدن گیاهان به اندازه تقریباً ۲۵ سانتی‌متری، اولین محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال مصنوعی در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر در کنار محلول‌پاشی با آب مقطر و بدون محلول‌پاشی (شاهد) انجام شد. دومین و سومین محلول‌پاشی به فاصله ۷ و ۱٤ روز بعد از اولین محلول‌پاشی اعمال گردید. یک هفته پس از پایان سومین محلول‌پاشی و به‌صورت همزمان، برگ‌های به‌لیمو برداشت شد. برای هر تیمار و به منظور تهیه اسانس کافی، ۲۰ گلدان یکنواخت انتخاب گردید. استخراج اسانس از برگ‌ها به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر[2] انجام شد. مدت زمان اسانس‌گیری دو ساعت در نظر گرفته شد. اسانس‌ها در ظرف‌های کوچک دربدار ریخته شده و به‌وسیله سولفات‌سدیم بی‌آب رطوبت‌زدایی شد. ظروف شیشه‌ای محتوی اسانس تا زمان تجزیه فیتوشیمیایی در تاریکی یخچال و دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تعیین نوع و درصد ترکیبات شیمیایی اسانس به‌لیمو از دستگاه کروماتوگراف گازی[3] (GC) و کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی[4] (GC-MS) آزمایشگاه فیتوشیمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور استفاده شد.

مشخصات دستگاه کروماتوگراف گازی: از دستگاه کروماتوگراف گازی مدل 9A ساخت کشور ژاپن استفاده شد. دستگاه دارای ستون موئینه با نام تجاری Ph-5 ساخت شرکت Shimadzu، به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۱ میلی‌متر به ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود که سطح داخلی آن با فاز ساکن از جنس phenyl Dimethylsiloxane,5% پوشیده شده بود. برنامه‌ریزی حرارتی ستون، از دمای اولیه ٦۰ درجه سلسیوس شروع و تا دمای نهایی اولیه ۲۱۰ درجه سلسیوس در هر دقیقه ٤ درجه به آن افزوده شد و سپس تا دمای نهایی ثانویه ۲٤۰ درجه سلسیوس در هر دقیقه ۲۰ درجه سلسیوس به آن افزوده شد و در نهایت توقف در این دما به مدت ۱۸/۵ دقیقه رسید. نوع آشکارساز و درجه حرارت آن، FID در دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس، حرارت محفظه تزریق، ۲۸۰ درجه سلسیوس، نوع گاز حامل هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد که فشار ورودی آن به

1. Glucotropaeolin

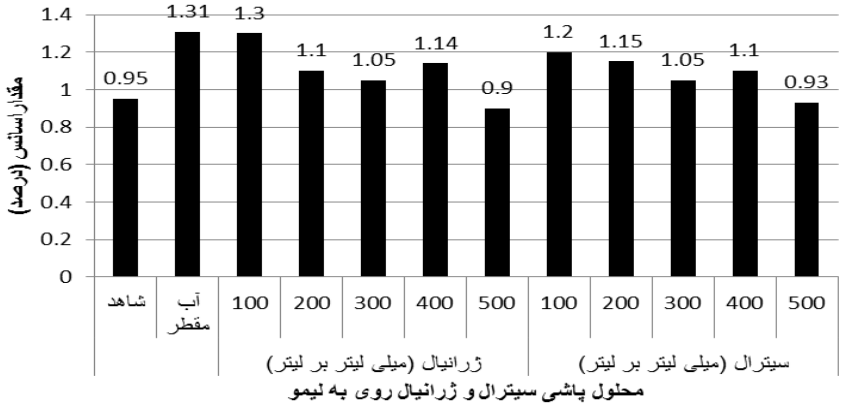
2. Clevenger
3. Gas chromatography (GC)
4. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

ستون برابر ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع تنظیم شده بود.

مشخصات دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی: دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی مدل واریان ۳٤۰۰ از نوع تله یونی مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر که ضخامت لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه ریزی حرارتی ستون دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی از ۲۵۰-٤۰ درجه سلسیوس با سرعت افزایش دمای ٤ درجه سلسیوس در دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۱۰ درجه بیشتر از دمای نهایی ستون تنظیم شد. گاز حامل هلیوم بود که با سرعت ۳۱/۵ سانتی متر بر ثانیه در طول ستون حرکت می کرد. زمان اسکن برابر یک ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ٤۰ تا ۳۰۰ بود.

نتایج

در ارزیابی بازده اسانس برگ به‌لیمو، محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال و به‌خصوص غلظت‌های کم آنها و آب مقطر اثر مثبت بهتری بر افزایش درصد اسانس تولیدی نشان داد. در کل، محلول‌پاشی با آب مقطر، ژرانیال با غلظت ۱۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر، سیترال ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر به ترتیب بالاترین بازده اسانس را نشان داد و ژرانیال و سیترال در غلظت ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر و شاهد به ترتیب کمترین میزان اسانس تولیدی را داشتند (شکل ۱).

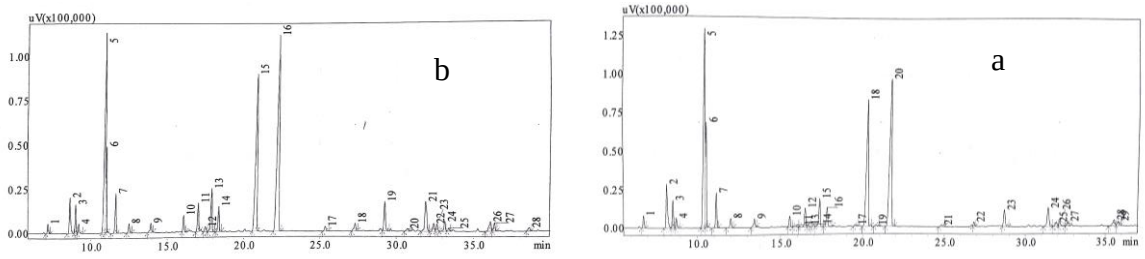


شکل ۱: مقایسه بازده اسانس برگ به‌لیمو تحت تأثیر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف سیترال و ژرانیال

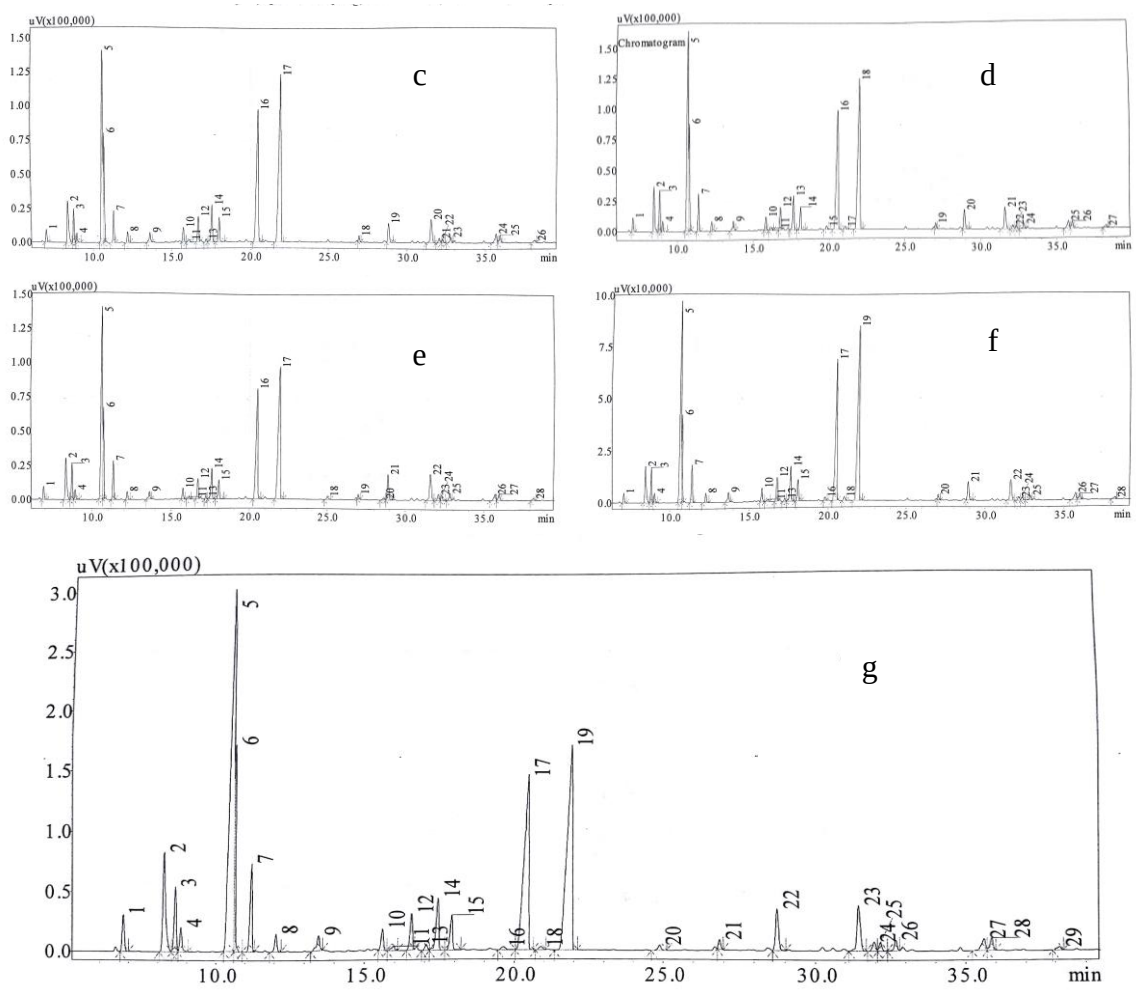
ترکیبات شناسایی شده به‌لیمو به همراه شاخص بازداری و درصد آنها در جدول ۱ خلاصه شده است. تجزیه فیتوشیمیایی اسانس به‌لیمو با کروماتوگراف گازی و کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی تحت تأثیر محلول‌پاشی با سیترال و ژرانیال (شکل ۲، شکل ۳ و شکل ٤) نشان داد که تعداد ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس در تیمارهای مختلف محلول‌پاشی متفاوت بوده و در تیمارهای شاهد و سیترال ٤۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر ترکیب اپی آلفا کادینول[1] مشاهده نشد. عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در تمام تیمارهای محلول‌پاشی به‌ترتیب شامل لیمونن، ژرانیال، نرال، ۱،۸-سینئول، آلفاپینن و سیترونلال بودند. کمترین میزان نرال (۱۵/۱۱ درصد)، ژرانیال (۱۹/۸۹ درصد) و سیترونلال (۲/٦۷ درصد) در ژرانیال ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر و بیشترین مقدار نرال (۱۸/۰۸ درصد)، ژرانیال (۲۵/٤٤ درصد) و سیترونلال

1. Epi-α-cadinol

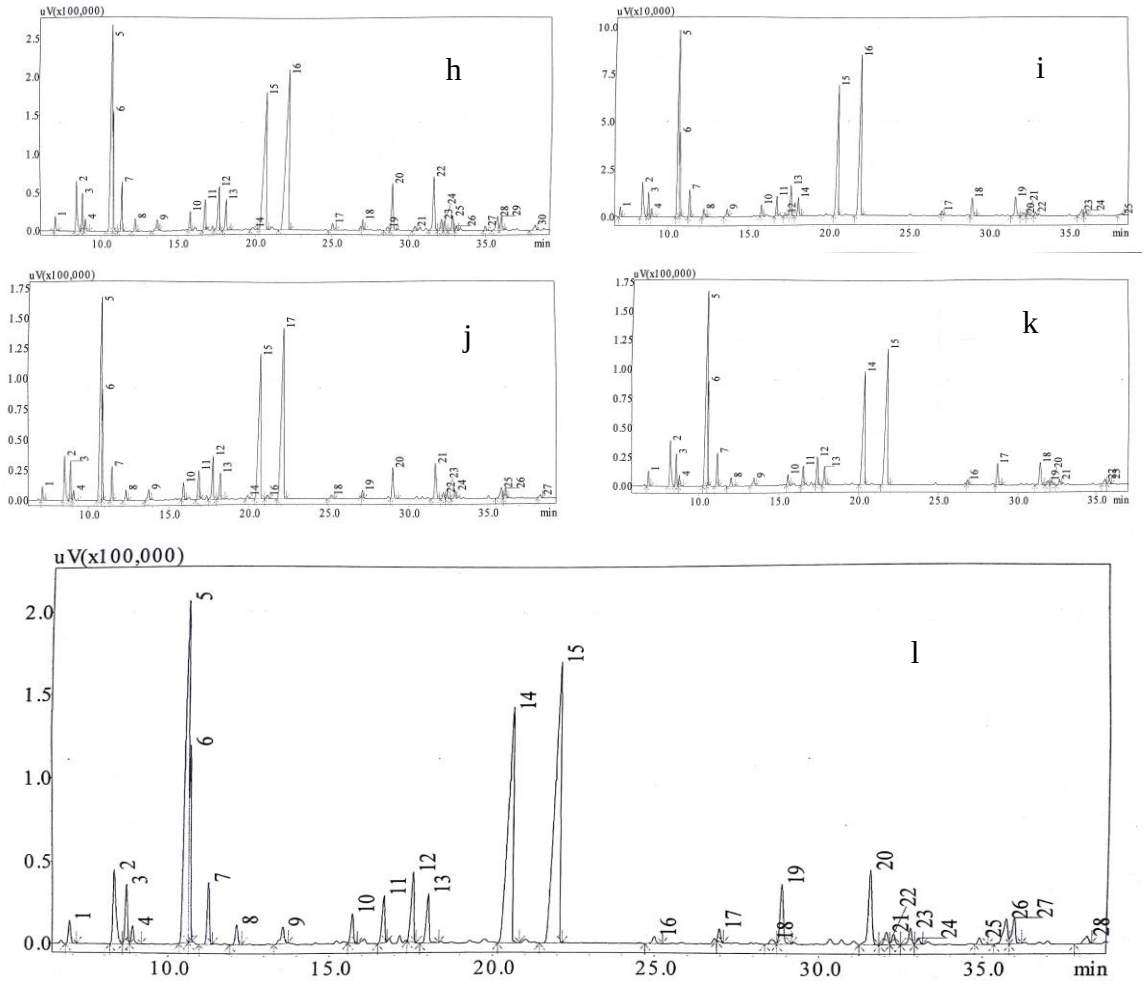
(۳/٦ درصد) در تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) دیده شد و برعکس، بیشترین میزان لیمونن (۲۸/۲٤ درصد) و آلفاپینن با (۵/۱۹ درصد) در تیمار ژرانیال ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر و کمترین میزان لیمونن (۱۷/۸۳ درصد) و آلفاپینن (۳/۰۹ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد. محلول‌پاشی با ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر ژرانیال باعث ایجاد کیفیت بالای اسانس به‌لیمو شده و می‌تواند به‌عنوان بهترین تیمار در نظر گرفته شود. از بین ترکیبات عمده به‌لیمو، فقط ۱،۸- سینئول با بقیه متفاوت بود و بیشترین میزان ۱،۸- سینئول (۷/۳۵ درصد) در تیمار محلول‌پاشی با آب مقطر و کمترین میزان آن (۳/۷ درصد) در تیمار سیترال ۱۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر بود (جدول ۱).



شکل ۲: کروماتوگرام آنالیز اسانس به‌لیمو تحت تأثیر محلول‌پاشی آب مقطر (a) و شاهد (b)



شکل ۳: کروماتوگرام آنالیز اسانس به‌لیمو تحت تأثیر محلول‌پاشی ژرانیال ۱۰۰ (c)، ۲۰۰ (d)، ۳۰۰ (e)، ٤۰۰ (f) و ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر (g)



شکل ٤: کروماتوگرام آنالیز اسانس به‌لیمو تحت تأثیر محلول‌پاشی سیترال ۱۰۰ (h)، ۲۰۰ (i)، ۳۰۰ (j)، ٤۰۰ (k) و ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر (l)

جدول ۱: اثر محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال بر ترکیبات شیمیایی اسانس به‌لیمو

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری	شاهد	آب مقطر	ژرانیال (میلی‌لیتر بر لیتر)					سیترال (میلی‌لیتر بر لیتر)				
					۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	٤۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	٤۰۰	۵۰۰
۱	α-Pinene	۹٤۰	۳/۰۹	٤/۵٤	٤	۳/۹۱	٤/۵٦	۳/۸۷	۵/۱۹	۳/۲٤	٤/۳۰	۳/۷۸	۵/۰۵	۳/۵۹
۲	Sabinene	۹۷٦	۱/۹۷	۲/۲۷	۲/٤۲	۳/۱۱	۳	۲/۸۰	۲/٦۲	۲	۲/۲۱	۲/٤۹	۲/۷۱	۲/۱۱
۳	β-Pinene	۹۸۱	۰/۷۲	۰/۸۹	۰/۷۷	۰/۸۷	۰/۹۱	۰/۸۵	۱/۰۲	۰/٦۷	۰/۸۷	۰/۷۳	۰/۹٤	۰/۷۱
٤	Limonene	۱۰۳۰	۱۷/۸۳	۲۲/۳٦	۲۰/٦۷	۲۳/۳۹	۲۲/۵۹	۲۰/۷۹	۲۸/۲٤	۱۹/۹۸	۲۲/٤۵	۱۹/۹۷	۲٤/۵٤	۲۰/۰۸
۵	1,8-Cineol	۱۰۳۱	٤/٤٦	۷/۳۵	۵/۹	۵/٤۷	۵/۷۹	۵/۷۵	٤/٤٦	۳/۷۰	۵/۸٦	٤/۸۳	٦/۹٦	٤/۷۸
٦	cis-β-ocimene	۱۰٤۵	۲/۷۳	۲/۹٤	۲/۳۵	۲/۸۵	۳/۲٤	۳/۰٦	۳/۳۷	۲/۵۵	۲/۵۰	۲/۱۷	۲/۷٦	۲/۱٤
۷	ɣ-Terpinene	۱۰٦۰	۰/۷۳	۰/۹۳	۰/۸۸	۰/۸۲	۰/۷٤	۰/۸۷	۰/۷۵	۰/۷۰	۰/۸۳	۰/۷۵	۰/۸۳	۰/۷۷
۸	Terpinolene	۱۰۹۰	۰/۸۹	۰/۹٦	۰/۹۸	۰/۹۹	۰/۹٦	۱/۰٦	۰/۸٤	۰/۷۹	۰/۹۳	۰/۹۳	۰/۹۷	۰/۸۳
۹	cis limonene oxide	۱۱۳۸	۱/۲۷	۱	۱/۱۸	۱/۱	۱/۰۵	۱/۱۸	۰/۹۱	۱/۱۱	۱/۱۹	۱/۱۹	۰/۹۸	۱/۱۳
۱۰	cis sabinol	۱۱٤۵	۲/۲۳	۱/۸۵	۲/۰۸	۱/۹۵	۱/۹٤	۲/۱۵	۱/٦٤	۱/۸۵	۲/۰۵	۲/۱۰	۱/۸٤	۱/۹۳
۱۱	citronellal	۱۱۵۵	۳/٦	۲/۸۹	۳/٤۲	۳/۱۹	۳/۱۹	۳/۵۱	۲/٦۷	۲/۹۷	۳/۱۱	۳/۳۹	۲/۷۵	۲/۹۱
۱۲	α-terpineol	۱۱۹۳	۱/۹۵	۱/۹۳	۲/۱٤	۲/۰۷	۱/۸۸	۲	۱/٦۵	۱/۹۵	۱/۹۰	۱/۹۷	۱/۷۲	۲/۰٦
۱۳	neral	۱۲٤۰	۱۸/۰۸	۱٦/۸٤	۱۸/۰۳	۱٦/۸۱	۱۵/٤۳	۱۷/۱۳	۱۵/۱۱	۱۷/۵۹	۱۷/٦۳	۱۸	۱٦/۳۱	۱۷/۸۱
۱٤	geranial	۱۲٦۹	۲۵/٤٤	۲۲/٤٤	۲٤/٤۹	۲۲/٦۰	۲۰/٦۹	۲۳/۸۵	۱۹/۸۹	۲۳/۸۷	۲٤/۲۷	۲٤/٦۲	۲۱/٤۰	۲٤/۱۸
۱۵	geranyl acetate	۱۳۸۰	۰/۸٤	۰/۳۸	۰/٤۷	۰/٤٤	۰/٤۳	۰/٤٤	۰/٤۱	۰/٤۸	۰/۳۹	۰/٤۹	۰/٤۳	۰/۵۰
۱٦	E-caryophyllene	۱٤۲۰	۲/۷۷	۱/۹۲	۱/۹۵	۱/۹۹	۲/۹۸	۲/۱۰	۲/۱۸	۳/٤٤	۲/۲٤	۲/٦۹	۲/٤۵	۲/۹۰
۱۷	α-humulene	۱٤۵۸	۳/۸۳	۲/۵۹	۲/۷۸	۲/٦۷	۳/٦٦	۲/۷٦	۲/۷۲	٤/۳۹	۲/۸٤	۳/۵۹	۳/۰۲	۳/۸۸
۱۸	cubenol	۱۵۱۷	۱/۰۳	۰/۵٦	۰/۵۷	۰/۵۳	۰/۸۲	۰/۵٤	۰/۵۵	۱/۰۳	۰/٤۰	۰/٦۹	۰/٤۹	۰/۷۷
۱۹	Spathulenol	۱۵۸۰	۱/۲۹	۰/۹۵	۱/۲	۱/۰۷	۱/۰۵	۱/۱۰	۰/۸۹	۱/۵۳	۰/۹۸	۱/۲۷	۰/۷٤	۱/٦۹
۲۰	caryophyllene oxide	۱۵۸٦	۰/۸٤	۰/۵۷	۰/۸۵	۰/۸۲	۰/۸۰	۰/۷۹	۰/۷۱	۱/۱۰	۰/۷۳	۰/۹٦	۰/٦٤	۱/۳٤
۲۱	epi-α-cadinol	۱٦۱۱	۰/٤۷	-	۰/۳٤	۰/۳۳	۰/۳٦	۰/۳۵	۰/۲۵	۰/۵۱	۰/۳۰	۰/۳۸	–	۰/۵۳
	جمع	–	۹٦/۰٦	۹٦/۱٦	۹۷/٤۷	۹٦/۹۸	۹٦/۰۷	۹٦/۹۵	۹٦/۰۷	۹۵/٤۵	۹۷/۹۸	۹٦/۹۹	۹۷/۵۳	۹٦/٦۷

بحث

عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس به‌لیمو لیمونن، ژرانیال، نرال، ۱،۸-سینئول، آلفاپینن و سیترونلال بودند. کمترین میزان نرال، ژرانیال و سیترونلال در تیمار ژرانیال ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر و بیشترین مقدار نرال، ژرانیال و سیترونلال در تیمار شاهد بود ولی، بیشترین میزان لیمونن و آلفاپینن از ترکیبات منوترپن دو حلقه‌ای با اثرات ضدالتهابی، ضدتشنجی و آرام‌بخشی (Bagherpour et al., 2018) در تیمار ژرانیال ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر و کمترین میزان لیمونن و آلفاپینن در تیمار شاهد مشاهده شد. با توجه به خواص ارزشمند درمانی آلفاپینن و لیمونن (Bagherpour et al., 2018) می‌توان اذعان نمود محلول‌پاشی با ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر ژرانیال، باعث ایجاد کیفیت بالای اسانس به‌لیمو شده و می‌تواند به‌عنوان بهترین تیمار در نظر گرفته شود. بیشترین میزان ۱،۸-سینئول در تیمار محلول‌پاشی با آب مقطر و کمترین میزان آن در تیمار سیترال ۱۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر مشاهده شد. ۱،۸-سینئول یک اکسیدترپنوئیدی است که در اسانس بسیاری از گیاهان دارویی یافت می‌شود. این ترکیب به علت تأثیر مهارکنندگی که در تشکیل پروستاگلندین‌ها و سایتوکاین‌های مونوسیت دارد به عنوام یک عامل ضدالتهاب و درد شناخته شده و جزء مهمی از دهانشویه‌هاست (Vaez Shahrestani and Sefidkon, 2018). شناخت عوامل تأثیرگذار بر مقادیر کمی و کیفی مواد مؤثره گیاهان دارویی در وحله اول و افزایش این ترکیبات جهت اثربخشی بیشتر، اولویت بعدی پژوهشگران است (Hosseini et al., 2017). با توجه به اینکه هدف اصلی کشت گیاهان دارویی استفاده از مواد مؤثره آنهاست، هرچه مقدار این مواد مؤثره و متابولیت‌های ثانویه بیشتر باشد اقتصادی‌تر است (Sayyadi et al., 2014). در پژوهشی تعداد ۱۵ ترکیب در اسانس به‌لیمو شناسایی شد که عمده‌ترین ترکیبات اسانس شامل ژرانیال، نرال، لیمونن و ۱،۸-سینئول بود. این چهار ترکیب دارای ارزش دارویی و صنعتی زیادی هستند و در بین آنها نرال و ژرانیال از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Zarea et al., 2015b). در مطالعه‌ای روی اسانس مرزه ۱۵ ترکیب مهم شناسایی شد که عمده‌ترین آنها پاراسیمن، گاماترپینن و کارواکرول بود (Salehi et al., 2017). در پژوهشی جهت مطالعه ترکیبات اسانس به‌لیمو طی مراحل مختلف رشدی، در مجموع ۱۳، ۱۲ و ۱۱ ترکیب اسانس به ترتیب در مراحل رویشی، تمام گل و تشکیل میوه شناسایی شد. ترکیبات اصلی سه مرحله ژرانیال و نرال بودند. ژرانیال در مرحله رویشی بالاترین مقدار و تمام گل کمترین میزان را دارا بود. بیشترین و کمترین میزان نرال به‌ترتیب در مرحله رویشی و تشکیل میوه مشاهده شد (Shahhoseini et al., 2013). همچنین در تجزیه اسانس به‌لیمو مهترین ترکیبات شناسایی شده به ترتیب سیترال، لیمونن و نرال گزارش شد (Khani et al., 2012). گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد برخی از متابولیت‌ها تنها تحت تأثیر ژنتیک گیاه نیستند بلکه با توجه به الگوهای محیطی نیز تغییر می‌کنند (Sayyadi et al., 2014). مواد مؤثره اگرچه اساساً با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند ولی ساخت آن‌ها به‌طور بارزی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد (Heidari et al., 2008). یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار در میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان، تنش‌های اعمال شده بر آنهاست. گیاهان در شرایط تنش با تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، خودشان را در این شرایط حفظ می‌کنند. تنش خشکی در گیاه آویشن، میزان تیمول، کافئیک‌اسید، فرولیک اسید، پاراکوماریک‌اسید، کلروژنیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید و وانیلیک‌اسید را افزایش ولی رزمارینیک‌اسید و روتین را کاهش

می‌دهد. همچنین در گیاه آویشن و مریم گلی با افزایش فواصل آبیاری، به‌ترتیب درصد نسبی تیمول و رزمارینیک‌اسید افزایش می‌یابد (Sayyadi et al., 2014) ولی پژوهش حاضر اثر مثبت محلول‌پاشی با آب مقطر بر بازده اسانس و میزان ۱،۸-سینئول را نشان داد. مطالعات دیگری نیز برخلاف پژوهش حاضر، رابطه معکوس رطوبت و بازده اسانس را نشان می‌دهد (Bagherpour et al., 2018).

نتیجه‌گیری نهایی

ارزیابی بازده اسانس به‌لیمو نشان داد که محلول‌پاشی با سیترال و ژرانیال و به خصوص غلظت‌های کم آنها (۱۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر) و آب مقطر اثر مثبتی بر افزایش درصد اسانس تولیدی دارد. در تجزیه فیتوشیمیایی اسانس نیز ۲۱ ترکیب شناسایی و مهمترین ترکیبات شناسایی شده لیمونن، ژرانیال و نرال بود. محلول‌پاشی غلظت‌های بالای ژرانیال (۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر) و سیترال (٤۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر) موجب افزایش میزان لیمونن تولیدی شد ولی، محلول‌پاشی سیترال و ژرانیال اثر مثبتی بر میزان نرال و ژرانیال نشان نداد. برعکس، بیشترین میزان لیمونن و آلفاپینن در تیمار ژرانیال ۵۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر و کمترین میزان لیمونن و آلفاپینن در تیمار شاهد مشاهده شد.

References

1. Bagherpour, L., Rowshan, V. and Monfared, A. 2018. Investigation and comparing the phytochemical of essential oil of different *Teucrium persicum* Boiss, ecotypes in Fars province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 6(2): 69-80.
2. Chakraborty, A. and Chattopadhyay, S. 2008. Stimulation of menthol production in *Mentha piperita* cell culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 44: 518-524.
3. Ebadi, M.T., Sefidkon, F., Azizi, M. and Ahmadi, N. 2016. Effects of air velocity and infrared radiation intensity on drying factors of lemon verbena (*Lippia citriodora* Kunth.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(1): 161-173.
4. Farzaneh, A., Ghani, A. and Azizi, M. 2010. The effect of water stress on morphological characteristic and essential oil content of improved sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Plant Production, 17(1): 103-111.
5. Firoozi, A. 2008. Suspension Culture of Marigold Herb (*Silybum Marianum*), investigation of the production of silymarin and clonal diversity by ISSR markers. MSc Thesis, Agriculture Faculty, Tabriz University, Tabriz, 130p.
6. Habibi Khaniani, B., Moieni, A. and Abdollahi, M. 2005. Production of secondary metabolites and pharmaceutical constituents through tissue and cell culture. Journal of Medicinal Plants; 2(14): 1-6.
7. Heidari, F., Zehtab Salmasi, S., Javanshir, A., Aliari, H. and Dadpoor, M.R. 2008. The effect of plant density on yield and production of essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of Water and Soil Science, 12(45): 501-510.
8. Hosseini, B., Nikhkhah Amirabad, H., Fattah, M. and Gosta, Y. 2017. Effect of altitude and different phonological stages on essential composition and antioxidant activity of *Ferula angulata* (Schlecht.) Boiss from Dena altitudes. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(1): 16-29.
9. Iijima, Y., Gang, D.R., Fridman, E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E. 2004., Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. Plant Physiology, 134: 370–379.
10. Karimi, S.R., Shahhoseini, R. and Zakeri, S. 2013. Assessment of drying process, quantity of essential oil and

mathematical modeling of lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) using hot air. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(4): 684-698.
11. Khani, A., Basavand, F. and Rakhshani, E. 2012. Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil. Journal of Crop Protection, 1(4): 313-320.
12. Nourafcan, H. 2014. Elicitors, precursors and culture medium components effect on some growth characteristics, citral percentage and antimicrobial activity of essential oil of lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) *in vitro* and greenhouse conditions. PhD Thesis, Agriculture Faculty, Tabriz University, Tabriz, 130p.
13. Omidi, M. and Abdollahi, P. 2014. Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. Modern Genetics Journal, 9(4): 391-402.
14. Omidi, M. and Farzin, N. 2012. Biotechnological strategies for increasing the efficiency of plants. Modern Genetics Journal, 7(3): 209-220.
15. Prins, C.L., Freitas, S.P., Gomes, M.M.A., Vieira, I.J.C. and Gravina, G.A. 2013. Citral accumulation in *Cymbopogon citratus* plant as influenced by N6-benzylaminopurine and light intensity. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 25(2): 159-165.
16. Salehi, S., Rezayatmand, Z. and Ghasemi Pirbalouti, A. 2017. The effect of foliar application of chitosan on yield and essential oil of savory (*Satureja isophylla* L.) under salt stress. Journal of Herbal Drugs, 8(2): 101-108.
17. Sayyadi, A., Ahmadi, J., Asghari, B. and Hosseini, S.M. 2014. Effect of drought stress and salinity on phenolic compounds of *Thymus vulgaris* L. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 2(4): 50-61.
18. Shahhoseini, R., Beyraghdar, A., Karimi, S.R. and Ebadi, M.T. 2013. Essential oil content and composition of lemon verbena (*Lippia citriodora* Kunth.) during different phenological stages. Journal of Medicinal Plants and By-products, 2: 205-208.
19. Vaez Shahrestani, A. and Sefidkon, F. 2018. Essential oil composition in different plant parts of *Achillea biebersteinii* Afam. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 34(1): 40-49.
20. Wielanek, M. and Urbanek, H. 2006. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. Plant cell, tissue and organ culture, 86: 177-186.
21. Zare Dehabadi, S., Asrar, Z. and Mehrabani, M. 2010. Biochemical changes in terpenoid compounds of *Mentha spicata* essential oils in response to excess zinc supply. Iranian Journal of plant Biology, 2(3): 25-34.
22. Zarea, A.A., Malakouti, M.J., Bahrami, H.A., Sefidkon, F. and Shahhosseini, R. 2015. Effect of balanced fertilization, biofertilizers and superabsorbent polymer on the yield and chemical compound characteristics of lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30(6): 999-1011.
23. Zuniga, O.P., Fide, M., Ramirez, M., Franco, J.M., Hoyos-Saavedra, O.L. and Ochoa, G.C. 2016. Epoxidation of neral/geranial using a Jacobsen-Katsuki Mn catalyst by chemical and electrochemical methods. Journal of the Mexican Chemical Society, 60(1): 3-12.

Effect of citral and geranial foliar application on quantity and quality of essential oil of *Lippia citriodora* Kunth.

Nourafcan, H.*

Assistant Prof., Department of Horticulture, Factuly of Agriculture, Miyaneh branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.

Received: 2018-11-7 Accepted: 2019-5-15

Abstract

Biotransformation is the process of converting an inert precursor into a medicinally valuable product. In this research, a pot experiment was conducted to evaluate the effect of artificial citral and geranial spraying in concentrations of 100, 200, 300, 400 and 500 ppm, besides distilled water and without spraying (control) on essential oils quality and quantity of lemon verbena (*Lippia citriodora* Kunth.) with in greenhouse conditions at Islamic Azad University – Miyaneh Branch, Iran in 2015. The first foliar application was done when the plantlets reached the height of 25. The second and the third spraying were done with 7 and 14 days span after the first spraying respectively. One week after the last spraying, lemon verbena leaves were harvested. The essential oils were extracted from the leaves by hydro distillation method using Clevenger apparatus. Citral and geranial especially in low concentrations (100 ppm) and distilled water spraying had positive effect in essential oils yield. The chemical composition of essential oils was analyzed by GC and GC-MS. Overal, 21 components were identified and the most important components were limonene, geranial and neral. Citral and geranial spraying especially in high concentrations increased limonene content and the highest limonene content was 28.24 and 24.54%, using geranial 500 ppm and citral 400 ppm spraying respectively. Also, the lowest limonene content was 17.83% in control. However, citral and geranial spraying had not positive effect on neral and geranial content.

***Keywords*:** Foliar application, Essential oil, Citral, Geranial, Verbena

*Corresponding author; hassannourafcan@gmail.com