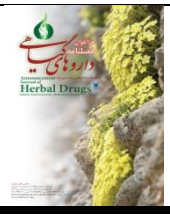


فصلنام‌هی داروهای گیاهی

Journal homepage: www.ojs.iaushk.ac.ir

اثر تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیک و فعالیت آنتی اکسیدانی بومادران بیابانی (*Achillea tenuifolia* Lam.)

شیما غریبی[۱]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۲]، قدرت الله سعیدی[۱]، سید امیرحسین گلی[۳]، مجید طالبی[۲]

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران؛

۲. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران؛

۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران؛

*** مسئول مکاتبات** E–mail: *sayedt@cc.iut.ac.ir*

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۷/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۸/۲۸

نوع مقاله: *علمی– پژوهشی*

موضوع: به زراعی– بهداشت مواد غذایی

کلید واژگان :

- ✓ *بومادران بیابانی*
- ✓ *تنش خشکی*
- ✓ *فعالیت آنتی اکسیدانی*

چکیده

مقدمه و هدف : تنش های اسمزی در گیاهان باعث تولید رادیکال های آزاد شده و گیاهان برای پاکسازی این رادیکال های سمی راهبرد های گوناگونی را در پیش میگیرند که از مهم ترین آنها تولید و تجمع متابولیت های ثانویه می باشد. امروزه این موضوع محققین را بر آن داشته است که از تنش های محیطی به خصوص تنش خشکی برای افزایش ترکیبات مهم ثانویه مانند فنول ها و آنتی اکسیدانها بهره بگیرند. از جمله گیاهان دارویی ارزشمند، گیاه بومادران بیابانی (*Achillea tenuifolia*) میباشد که گیاهی است چند ساله که دارای بسیاری از خواص دارویی است.

روش تحقیق: به منظور بررسی اثر تنش خشکی، چهار تیمار مختلف (۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪و ۱۰۰ ٪ تخلیه رطوبتی بر اساس ظرفیت مزرعه) با سه تکرار در گلدان های پلاستیکی واقع در گلخانه اعمال شد و پس از ۳۰ روز، برگ نمونه ها برداشت و آزمایشات اندازه گیری کل ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی اکسیدانی با سه مدل سیستم DPPH، قدرت احیا کنندگی آهن و روش بی رنگ شدن بتاکاروتن اندازه گیری شد. غلظت مالون دی آلدهید و میزان تجمع پرولین نیز در برگ گیاه محاسبه گردید.

نتایج و بحث : تنش خشکی در گیاه بومادران بیابانی توانست به صورت معنی داری میزان ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها (در دو مدل سیستم DPPH و بی رنگ شدن بتاکاروتن) را افزایش دهد. میزان پرولین و مالون دی آلدهید نیز با افزایش شدت تنش افزایش یافت. در حالی که بر اساس مدل قدرت احیا کنندگی، اختلاف معنی داری میان سطوح ۲۵٪ و ۵۰٪ ظرفیت مزرعه مشاهده نشد.

توصیه کاربردی /صنعتی: با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر می توان سطح ۵۰٪ ظرفیت مزرعه تخلیه رطوبتی خاک یعنی تنش ملایم را سطحی مناسب جهت تحریک بیشتر تولید ترکیبات فنولیک در این گیاه توصیه نمود. در پایان، مطالعات بیشتری در خصوص اثر تنش خشکی بر مقدار سایر ترکیبات مهم موثره در این گیاه پیشنهاد می شود.

۱. مقدمه

تنشهای محیطی اثرات زیانبار قابل توجهی را بر روی انسان ها، حیوانات و گیاهان بر جای میگذارند، اما اثرات منفی آنها بر گیاهان بیشتر است؛ زیرا گیاهان بر خلاف سایر موجودات در یک محل ثابت هستند و در شرایط نامساعد محیطی نمی توانند مکان زندگی خود را تغییر دهند. تنش خشکی زمانی در گیاه حادث می‌شود که میزان آب دریافتی گیاه کمتر از تلفات آن باشد. این امر

ممکن است به علت اتلاف بیش از حد آب یا کاهش جذب و یا وجود هر دو مورد باشد (Asgarirad *et al.*, 2010). نتایج پژوهش های مختلف حاکی از آن است که تنشخشکی با بر هم زدن شرایط مطلوب، سبب بروز اختلالات متابولیسمی در سلولهای گیاهی می گردند که یکی از عوامل اصلی این اختلالات افزایش تولید انواع اکسیژن فعال یا (ROS) میباشد. احیای ناقص اکسیژن اتمسفری، سبب تشکیل رادیکالهای سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل میشود (Nickavar *et al.*, 2006). نتایج تحقیقات (Schwars *et al.*, 2001) نشان داده است که غشاهای سلولی و اندامکها، اولین محل آسیب به سلولها در شرایط تنش خشکی توسط شکلهای فعال اکسیژن هستند گیاهان برای مقابله با این ترکیبات، فرآیندهایی را در خود توسعه داده اند که به طورکلی به عنوان فرآیند دفاع آنتیاکسیدانی شناخته میشوند. کمبود هر منبعی که رشد را بیش از فتوسنتز محدود کند تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Asada *et al.*, 2000). در شرایط تنش خشکی، به دلیل بسته شدن روزنه ها در طول دوره تنش و تغییر کارآیی مصرف آب، ماده خشک تولیدی گیاه کاهش می یابد. بنابراین گونه های مختلف گیاهی دامنه وسیعی از فرآیندهای مقاومت به خشکی را نشان می دهند که منجر به ایجاد سازگاری های ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی میگردد. برای مثال پرولین یکی از اسیدآمینه های فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش به سزایی دارد (قانی و همکاران، ۱۳۹۰). اگرچه پرولین در همه اندامهای گیاه در طی تنش تجمع میابد ولی سریعترین انباشت را در برگها خواهد داشت. تجمع پرولین در ریشه ها با تأخیر زمانی نسبت به تجمع در برگها صورت میگیرد.

امروزه گیاهان دارویی، یکی از محصولات بخش کشاورزی محسوب میشوند. یکی از اهداف مهم در گیاهان دارویی، بررسی چگونگی افزایش میزان ترکیبات موثره مهم در این گیاهان است. امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی اکسیدان های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه‌جات و سبزیجات را توصیه می‌نمایند زیرا مصرف آنتی اکسیدان های گیاهی علاوه بر اثرات موثر درمانی دارای عوارض جانبی کمتری می باشد. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند، می توانند باعث حفاظت سلول های بدن از آسیب های اکسیداتیو شوند و کاهش ابتلا به برخی از بیماری ها را موجب گردند Prior *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 1999).

جنس بومادران با نام علمی *Achillea* یکی از گیاهان مهم دارویی متعلق به تیره ستاره آسا یا Asteraceae است که در نواحی مختلف اروپا، نواحی معتدل آسیا (به خصوص کشور ایران) و نواحی شمالی آمریکا می روید. بومادران، گیاهی چند ساله با ساقهای ساده و برگهای پوشیده از کرک میباشد. این گیاه بیش از ۱۰۰ گونه در جهان دارد که ۱۹ گونه از آن در ایران گزارش شده است (مظفریان، ۱۳۸۷). علاوه بر این که به عنوان یک گیاه دارویی مهم در جهان مطرح است، به عنوان گیاهانی کم توقع می توانند در فضای سبز مناطق خشک مورد استفاده قرار گیرند. گونه بومادران بیابانی (*Achillea tenuifolia*) یکی ازگونه های مهم بومادران است. این گونه از جنبه های مختلف حائز اهمیت است، نتایج تجزیه فیتوشیمیایی ۴۰ نمونه تجاری از بومادران نشان داده است که درصد ترکیبات فنولیک در این گیاه بسیار بالاست. بومادران به طور متوسط حاوی ۰/۶٪ فلاوونوئید و ۱/۴۸٪ اسیدهای فنولیک است (Oberprieler *et al.*, 2000). از مطالعات مهم دیگر در این گونه می توان به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی (Asgarirad *et al.*, 2010)، ترکیبات اسانس (Aghjani *et al.*, 2000; Shafaghat *et al.*, 2009) و کیفیت روغن میوه آن (Goli *et al.*, 2009) اشاره نمود.

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی و پتانسیل پاکسازی رادیکال های آزاد در گیاهان دارویی مختلف با استفاده از مدل سیستم های گوناگون قابل اندازه گیری می باشد. نظر به وجود ترکیبات فنولیک فراوان در جنس *Achillea*، گزارشات مختلفی دربارهی کل ترکیبات فنولیک با استفاده از روش های گوناگون در گیاه بومادران ارائه شده است، ولی اکثر این مطالعات محدود به گونهی بومادران هزار برگ یا *A. millefolium* می باشد، به عنوان مثال ویتالینی و همکاران (Vitalini *et al.*, 2011) ترکیبات فنولیک بومادران هزاربرگ را مورد مطالعه قرار داده اند، آنها در مطالعه ی خود از آزمون DPPH برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده نمودند و

بومادران هزار برگ را به عنوان منبع مطمئنی از متابولیت های فعال زیستی برای مقاصد داروسازی معرفی نمودند. ترومبیکیت و هم-کاران (Trumbeckaite *et al*., 2011) فعالیت آنتی اکسیدانی گونه بومادران هزاربرگ و اثر آن را بر روی فعالیت های میتوکندریایی قلب موش مورد مطالعه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که اکسیداسیون پیروات از غلظت های بالاتر عصارهی بومادران هزار برگ تاثیر می پذیرد در حالی که اکسیداسیون سوکسینات حتی در غلظت های پایین عصاره بومادران هزار برگ کاهش می یابد. عسگری راد و همکاران (Asgarirad *et al*., 2010) اشاره نمودند که مقادیر بالاتر ترکیبات فنولیک در *A. tenuifolia* منجر به افزایش قدرت پاکسازی رادیکال های آزاد و ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدی می شود. با توجه به تاثیر تنشهای محیطی در افزایش متابولیتهای ثانویه در گیاهان و نظر به اینکه این تنش - ها میتوانند تأثیر متفاوتی بر کل ترکیبات فنولی ک و فعالیت آنتی - اکسیدانی در گونههای مختلف گیاهی داشته باشند . در این تحقیق بررسی تاثیر تنش خشکی بر کل ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی - اکسیدانی در گونه بومادران بیابانی مورد مطالعه قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

نمونه های گیاهی گونه *A. tenuifolia* از شهر کرج در استان البرز از ارتفاع ۱۷۰۰ متر از سطح دریا جمع آوری شد. گیاهان در سطح گیاهچه ای به گلدان های پلاستیکی ۲۵×۳۰×۳۰ سانتی متری منتقل و برای استقرار کامل به مدت ۳۰ روز به میزان کافی و یکسان آبیاری شدند. تنش خشکی در قالب طرح کامل تصادفی به روش وزنی و با استفاده از منحنی رطوبتی خاک در چهار سطح ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد تخلیه رطوبتی بر اساس ظرفیت مزرعه اعمال شد. وزن آب مورد نیاز برای هر سطح تنش خشکی محاسبه گردید. گلدان ها روزی دوبار توزین شده و به وزن مورد نظر رسانده می شدند. گلدان های شاهد نیز هر روز در حد اشباع خاک آبیاری شدند. هر تیمار شامل چهار تکرار و هر تکرار دارای سه گیاهچه بود. بعد از چهار هفته گیاهان داخل گلدان برداشت شدند و برای اندازه گیری میزان تغییرات محتوای فنولیک، پرولین ، فعالیت آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی تحت سطوح مختلف تنش به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

۲-۱. تهیه عصاره و تعیین میزان فنولیک

مقدار ۲/۵ گرم پودر برگ خشک شده گیاه به همراه ۵۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت، عصاره حاصل سه مرتبه از کاغذ صافی عبور داده شد تا محلول شفافی به دست آید. میزان کل ترکیبات فنولیک با معرف فولین سیوکالتو اندازه گیری شد (Slinkard *et al*., 1977). در این روش، ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰٪ و ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد) مخلوط شد. لوله های آزمایش بعد از تکان دادن درون حمام آب با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید تانیک استفاده شد. میزان کل ترکیبات فنولیک موجود در عصاره با استفاده از معادله به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم اسید تانیک در هر گرم وزن خشک برگ بیان شد. آزمایش ها در سه تکرار انجام و میانگین آن ها گزارش شد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولیک در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می دهد.

۲-۲. بررسی خاصیت آنتی رادیکالی به روش DPPH

برای تعیین قدرت عصاره گیاهی در به دام انداختن رادیکال های آزاد DPPH، ۰/۱ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره به ۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH در متانول ۸۰٪ افزوده شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. یک نمونه حاوی ۰/۱ میلی لیتر متانول ۸۰٪ و ۵ میلی لیتر محلول DPPH به عنوان کنترل استفاده شد. فعالیت حذف کنندگی رادیکال DPPH توسط عصاره که معیاری از میزان فعالیت آنتی رادیکالی عصاره گیاهی است، مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%RSA = \frac{OD\ control - OD\ sample}{OD\ control} \times 100$$

در این رابطه OD sample جذب نمونه ، OD control جذب کنترل و RSA میزان فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد است. برای بررسی بهتر فعالیت آنتی رادیکالی عصاره از شاخص IC_{50} نیز استفاده شد. IC_{50} بیان گر مقدار میلی گرم عصاره است که قادر به حذف ۵۰٪ درصد از رادیکال های DPPHموجود در محیط می باشد (Kulisic *et al.*, 2004). برای بررسی بهتر این فعالیت از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT(Butylated Hydroxy Toluene) به عنوان کنترل مثبت استفاده‌گردید.

۲-۳. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن

در این بررسی، آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن به روش ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2006)، با کمی تغییر انجام گرفت. پنج میلی‌گرم بتاکاروتن در ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به فلاسک ته‌گردی حاوی ۴۰ میلی‌گرم لینولئیک‌اسید و ۴۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰، اضافه شد. سپس کلروفرم محلول توسط دستگاه تقطیرکننده چرخان خارج شده و ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن به فلاسک افزوده شد. پس از آن فلاسک برای تشکیل امولسیون به شدت هم زده شده و ۵ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده به لوله‌های آزمایش که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و استاندارد BHT بود، اضافه شد و بلافاصله در زمان صفر جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت درب لوله‌های آزمایش بسته شد و پس از قرار گرفتن این نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت ۲ ساعت به صورت ۱۵ دقیقه یکبار در دمای محیط، جذب آنها در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$I = [1-(As(2) - As(0))/ (Ac(2) - Ac(0))] \times 100\%$$

در این رابطه:

As(2) = میزان جذب نمونه بعد از ۲ ساعت؛ As(0) = میزان جذب نمونه در زمان شروع؛ Ac(2) = میزان جذب شاهد بعد از ۲ ساعت و Ac(0) = میزان جذب شاهد در زمان شروع و I% = درصد بازدارندگی می‌باشد.

۲-۴. بررسی قدرت احیاءکنندگی آهن

برای تعیین قد رت احیاءکنندگی آهن، محلولی از ۱۰۰ میکروگرم عصاره در ۱ میلی لیترآب مقطر تهیه گردید. یک میلی لیتر از این محلول با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH= ۶/۵) و ۲/۵ میلی لیتر محلول آبی یک درصد فری‌سیانید پتاسیم $[K_3Fe(CN)_6]$ مخلوط و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد اسید تری‌کلرواستیک به‌مخلوط اضافه شد . محلول به‌دست آمده به‌مدت ده دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت، ۲/۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول کلرید فریک ($FeCl_3$) مخلوط و جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم قدرت احیاءکنندگی بیشتر عصاره (آنتی اکسیدانی) خواهد بود (گلی موحد و همکاران، ۱۳۸۳).

۲-۵. اندازه گیری میزان پرولین

سنجش پرولین گیاه به کمک روش بیتز و همکا ران صورت گرفت (Bates *et al.*, 1973). در این روش ۰/۵ گرم از برگ تازه گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر محا ول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده گر دید. از مخلوط همگن حاصل پس از صاف‌کردن، ۲ میلی‌لیتر بر داشته شد و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر معر ف اسید نین‌هید رین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک خالص در بن ما ری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس آن‌ها را در حمام آب یخ گذاشته و پس از اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر تولوئن، مقدار جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد آن به دست آمد.

۲-۶. سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا با استفاده از روش زاهو و همکاران (Zhou *et al.*, 2007) انجام شد.

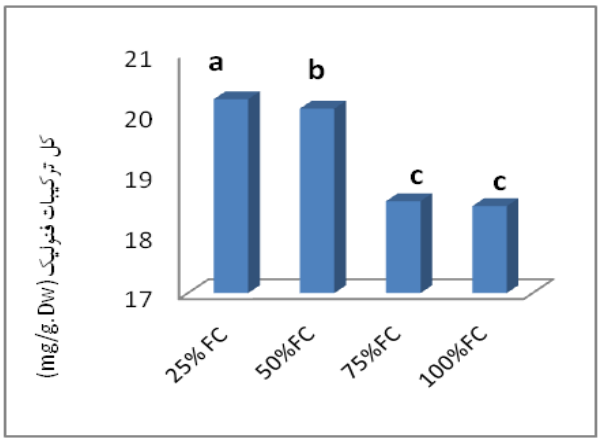
عصاره‌گیری از برگ با استفاده از تری‌کلرواستیک اسید ٪ ۰/۱ (TCA) و با نسبت ۱ گرم برگ در ۲۵ میلی لیتر TCA انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب غیر اختصاصی سایر ترکیبا ت موجوددر محلول در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و از میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر کم شد. در نهایت غلظت کمپلکس مالون دی آلدئید به‌صورت میکرومول مالون دی آلدئید درگرم وزن مرطوب نمونه اعلام‌گردید.

۲-۷. تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، تیمارها در سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده از آزمون های مربوط به اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنولیک و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال های آزاد، قدرت احیاءکنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل) در قالب طرح کامل تصادفی تجزیه واریانس شدند و سپس مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. تجزیه های آماری با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

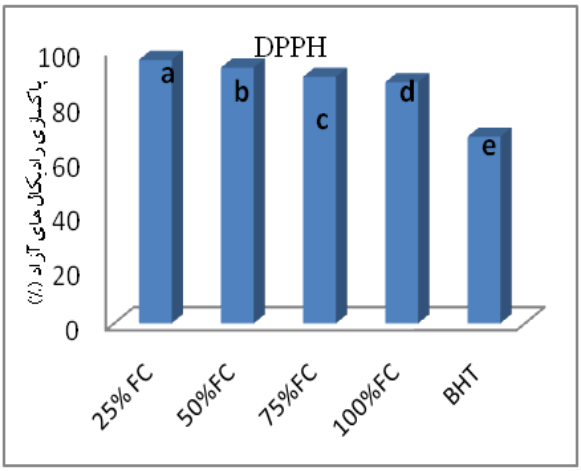
۳. نتایج و بحث

در تحقیق حاضر با افزایش شدت تنش خشکی، میزان کل ترکیبات فنولیک در گونه *A. tenuifolia* افزایش یافت (شکل ۱)؛ که بیشترین میزان افزایش از سطح تنش سه (۱۸/۵۳ mg/gDw) به دو (۲۰/۰۷ mg/gDw) مشاهده شد و مقایسه میانگین ها داده ها تفاوت معنی داری را میان سطوح سه و چهار نشان نداد. این نتایج با گزارش گونزالز (Gonzalez, 1989) و پترلونگر و همکاران (*et al.*, Peterlunger 2000) همسو بود. در هر دو مطالعه افزایش چند برابری فنولیک کل در گیاه انگور تحت تنش کم آبی مشاهده شد. با تجمع رادیکال های آزاد در شرایط تنش، گیاه دچار صدمه شده و برای ادامه حیات خویش ترکیباتی که اغلب جزو متابولیت های ثانویه هستند از خود آزاد میکنند، این ترکیبات میتوانند از صدمات ناشی از رادیکال های آزاد بکاهند. در گیاهان مختلف به دلیل وجود درجات متفاوتی از مقاومت به خشکی، میزان تجمع ترکیبات فنولیک برای پاکسازی رادیکال های آزاد متغیر است.

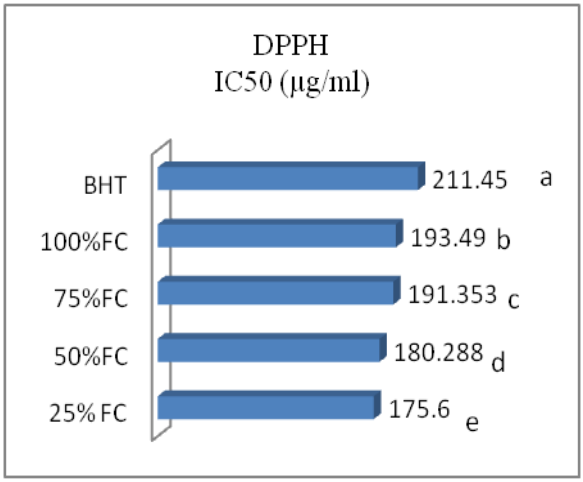


شکل۱. تغییرات کل ترکیبات فنولیک در سطوح مختلف تنش خشکی (سطح۱، ۲۵٪ FC ، سطح۲، ۵۰٪ FC ، سطح۳، ۷۵ ٪ FC ، سطح ۴، ۱۰۰FC ٪ یا شاهد)

نتایج آزمون DPPH به دو صورت گزارش گردید (شکل ۲). قدرت پاکسازی رادیکالهای آزاد DPPH توسط عصاره گیاه مورد نظر در مقایسه با آنتی اکسیدان مصنوعی (٪ ۶۸/۱۶) BHT بیشتر بود و داده های به دست آمده بیانگر افزایش تدریجی پاکسازی رادیکال های آزاد از سطح چهار تنش (٪ ۸۸/۰۸) به سطح یک (٪۹۶/۲۱) تنش خشکی می باشد. نتایج نشان داد که با افزایش سطح تنش میزان IC_{50} کاهش یافته است . احمد و همکاران (Ahmed *et al* ., 2012) در مطالعه خود اثر تنش خشکی و شوری را بر کل ترکیبات فنولیک، فلاونویید و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه شاهی مطالعه نمودند و مشابه تحقیق حاضر از آزمون (DPPH) برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده نمودند. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که عصاره متانولی این گیاه در تیمار با غلظت ۹۰ میلی مولار NaCl بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی (٪ ۵۷/۲) را در مقایسه با سایر تیمارها دارد.



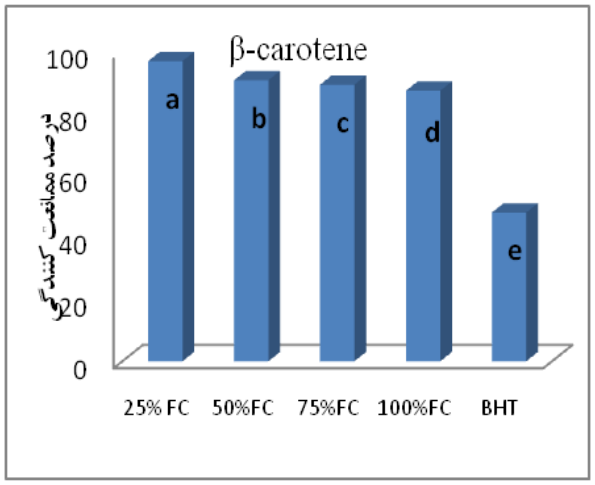
(الف)



(ب)

شکل۲. الف) تغییرات درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره بومادران تحت سطوح مختلف تنش خشکی، ب) IC50 (µg/ml) عصاره بومادران تحت سطوح مختلف خشکی

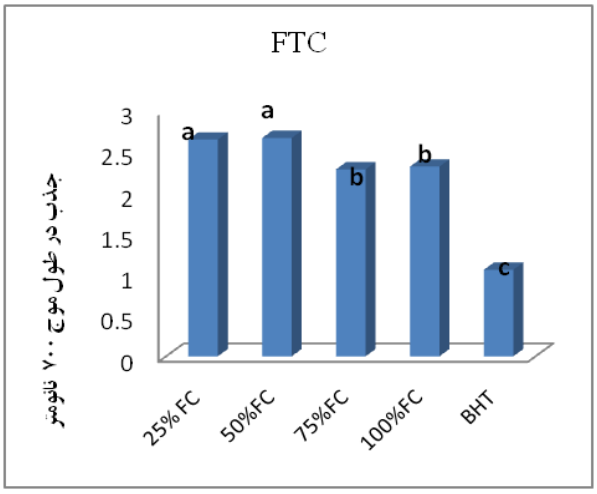
در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش بی‌رنگ شدن بتاکاروتن مشاهده گردید که درصد ممانعت کنندگی توسط آنتی – اکسیدان های موجود در عصاره گیاهی بومادران در همه ی سطوح تنش، در مقایسه با آنتی اکسیدان BHT بیشتر بوده که این خود نشاندهنده خاصیت آنتی اکسیدانی بالای عصاره حاصل از این گونه می باشد (شکل ۳). اعمال تنش خشکی نیز در این گیاه موجب شده که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یابد. بتایب ربی و همکاران (Bettaieb Rebey *et al.*, 2012) در مطالعه مشابهی اثر تنش خشکی را بر ترکیبات بیوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی بذور گیاه زیره سبز مطالعه و افزایش قابل توجهی را در کل ترکیبات فنولیک با شدت بخشیدن میزان تنش مشاهده نمودند. آنها هم چنین از چهار مدل سیستم برای بررسی اثر تنش خشکی بر خاصیت آنتی اکسیدانی استفاده کردند که در این بین آزمون DPPH نشان داد که بیشترین IC_{50} در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار تنش شدید می باشد که گزارش آنها با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر همخوانی دارد. اما در مدل سیستم بتاکاروتن بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به تیمار تنش متوسط بود.



شکل۴. قدرت آنتی اکسیدانی توسط عصاره بومادران در سطوح مختلف تنش خشکی به روش بتاکاروتن

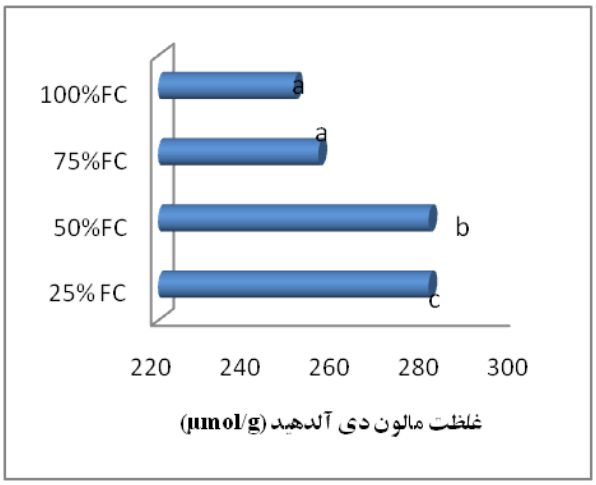
آزمایش قدرت احیاکنندگی آهن نشان داد که با شدید شدن میزان تنش خشکی، جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر بیشتر شده که نشاندهنده بیشتر شدن فعالیت آنتی اکسیدان ها در این سطوح می-باشد (شکل ۴). همچنین عدد جذب از سطح تنش سه به دو افزایش شدیدی نشان داده است . مقایسه میانگین ها در سطح پنج تنش درصد تفاوت معنی داری را میان سطوح یک و دو تنش نشان نداد که این موضوع می تواند بیانگر سازگاری تدریجی گیاه در مقابل تنش باشد که پس از یک کاهش ناچیز از سطح چهار به سه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی خود را از سطح سه به دو افزایش داده است و از سطح دو به یک این میزان را تقریبا ثابت نگاه داشته است. در مطالعه بتایب ربی و همکاران (Bettaieb Rebey *et al.*, 2012) نیز با افزایش سطح تنش قدرت احیاکنندگی از تیمار کنترل به تیمار تنش متوسط و شدید به ترتیب ۱/۴۲ و ۲/۰۴ برابر افزایش یافته است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. بنابراین از لحاظ

این مدل سیستم با توجه به بیشتر بودن عدد جذب عصاره این گیاه نسبت به آنتی اکسیدان مصنوعی BHT(۱/۰۵) و مقایسه سطوح مختلف تنش احتمالا میتوان سطح تنش دو یعنی ٪۵۰ FC را به عنوان سطحی قابل قبول برای افزایش خاصیت احیا کنندگی عصاره گیاه دانست.



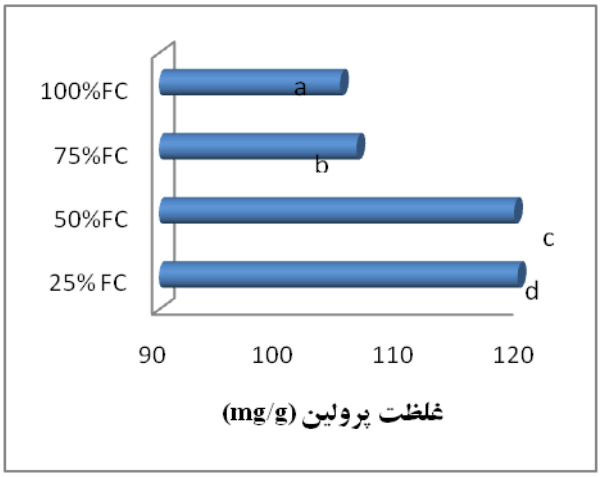
شکل۴. قدرت احیا کنندگی آهن توسط عصاره بومادران در سطوح مختلف تنش خشکی

اندازه گیری میزان غلظت مالون دی آلدئید نشان داد که از سطح چهار خشکی یا نمونه شاهد(µmol/g ۲۵۰/۳۶) به سطوح سه و دو تنش پراکسیداسیون لیپید ها افزایش یافته و از سطح دو به یک تنش خشکی از سرعت افزایش آن کاسته شده است (شکل ۵). یکی از اجزای مهم سلول های گیاهی که توسط رادیکالهای آزاد تولید شده در اثر تنش های محیطی به ویژه تنش خشکی آسیب میبیند غشای سلولی میباشد؛ که رادیکالهای آزاد با پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باعث نشت اجزای داخل سلولی به بیرون و در نتیجه مرگ سلولی میشوند. در تحقیق حاضر مقایسه میانگینها در سطح پنج درصد تفاوت معنی داری را میان سطوح یک و دو نشان نداد، که این موضوع میتواند حاکی از حضور و نقش مهم آنتی اکسیدانها در مواجه با تنش خشکی شدید در این گیاه باشد. این نتایج با گزارشها ی عطایی شیخ (۱۳۸۴) در نخود و دادنیا (۱۳۸۴) در آفتابگردان مطابقت داشت. نتایج آنها نیز نشاندهنده افزایش غلظت مالون دی آلدئید و ثبات تدریجی آن با افزایش سطوح تنش می باشد. همچنین متز و همکاران (MatÉs *et al.*, 1999) نیز گزارشاتی مبنی بر افزایش تدریجی میزان مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی اظهار نموده اند . بررسی آزمایشات پوراسماعیل (۱۳۸۵) نشان میدهد که در هر سه رقم لوبیا ی مورد آزمایش با کاهش میزان آب و تنش خشکی میزان این ماده افزایش پیدا کرده است. با ایجاد تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع و لیپیدها افزایش مییابد و در اثر حملهٔ رادیکالهای آزاد به لیپیدها، آلدئیدهای گوناگونی از جمله مالون دی آلدئید ایجاد می شود.



شکل۵. تغییرات پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی بومادران در سطوح مختلف تنش خشکی

همانطور که قبلا ذکر گردید پرولین میتواند در گیاهان نقش آنتی اکسیدانی داشته باشد و در تعادل بخشیدن به بسیاری از اعمال سلولی و حذف رادیکالهای آزاد نقش موثری ایفا کند. در تحقیق حاضر با افزایش شدت خشکی میزان پرولین در برگ گونه مورد نظر افزایش یافته است و از سطح دو به یک از سرعت افزایش آن کاسته شده است که میتواند نشاندهنده ایجاد ثبات و تعادل در اعمال سلولی و در نتیجه عدم نیاز به افزایش بیشتر این ماده در گیاه باشد (شکل ۶).



شکل۶. تغییرات غلظت پرولین در برگ گیاه بومادران در سطوح مختلف تنش خشکی

۴. نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنش خشکی به صورت معنی داری باعث افزایش متابولیتهای ثانویه بخصوص ترکیبات فنولیک در گیاهان می گردد. مقایسه سطوح مختلف تنش خشکی در بومادران بیابانی نشان داد که بالاترین میزان ترکیبات فنولیک در تیمار آبیاری ۲۵٪ ظرفیت مزرعه حاصل شد. بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس دو مدل DPPH و β–Carotene نیز در همین تیمار مشاهده شد که نشان دهنده همبستگی بالای کل ترکیبات فنولیک و دو مدل سیستم مذکور می باشد. این در حالیست که بر اساس مدل قدرت احیا کنندگی اختلاف معنی داری میان سطوح ۲۵٪ و ۵۰٪ ظرفیت مزرعه مشاهده نشد. در مجموع میتوان در این گیاه برای جلوگیری از عوارض و آسیب های ناشی از تنش شدید خشکی سطح ۵۰٪FC را برای تولید و تجمع سطح قابل قبولی از متابولیت های ثانویه معرفی نمود.

۵. منابع

احمدی، ل. ۱۳۷۸ . *تحقیقات گیاهان دارویی و معطر (۴)* .وزارت جهاد سازندگی معاونت آموزش و تحقیقات. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع.

پور اسماعیل، پ. ۱۳۸۵. *تاثیرات پلیمر سوپر جاذب بر کارایی مصرف آب و عملکرد در لوبیای قرمز*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

دادنیا، م. ۱۳۸۴. *بررسی اثر کمبود آب بر روی خصوصیات فیزیولوژیکی و زراعی ارقام مختلف آفتابگردان*. پایان نامه دکتری زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی اهواز.

عطائی شیخ، ا. ۱۳۸۳. *بررسی تنش خشکی بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و سطح فعالیتهای آنزیمهای آنتی اکسیدانت در ارقام مختلف نخود* . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

قانی، ف.، قاسمی پیربلوطی، ع.، حامدی، ب.، ف. ملک پور. ۱۳۹۰. بررسی اثر سطوح مختلف آب و نیتروژن بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی بابونه اورآ (*Matricaria aurea* L) . *داروهای گیاهی*، ۲(۲):۱۰۱–۱۱۱.

گلی موحد، غ. ۱۳۸۳ ، *بررسی اثر روش استخراج و نوع ماده اولیه بر قدرت آنتی اکسیدانی عصاره استحصالی از برگ گیاه چای (Camellia sinensis)*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی.

Ahmed, A.R., Gabr, A.M.M., AL–Sayed, H.M. and Smetanska, I. 2012. Effect of drought and salinity stress on total phenolic, flavonoids and flavonols contents and antioxidant activity in in vitro sprout cultures of garden cress (*Lepidium sativum*). *Journal of Applied Sciences Research*. 8: 3934–3942.

Asada, K. 2000. The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 355: 1419–1431.

Asgarirad, H., Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., Saeidnia, J., Ebrahimzadeh, S. and Lotfi, F. 2010. In vitro antioxidant analysis of *Achillea tenuifolia*. *African Journal of Biotechnology*. 9 (24): 3536–3541.

Bates, L.S., Waldern, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water–stress studies. *Plant and Soil*. 39(1): 205–207.

Chung, H. S., Chang, L. C., Lee, S. K., Shamon, L. A., van Breemen, R. B., Mehta, R. G., et al., 1999. Flavonoid constituents of Chorizanthe diffusa with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(1), 36–41.

Esteban, M. A., Villanueva, M. J. and Lissarrague, J. R. 1999. Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids, and mineral elements. *American Journal of Enology and Viticulture*. *50*(4): 418–434.

Gonzalez, M. L. 1989. Comportaminto de compuestos de metabolismo secandario en lu maduracian de La uva de Vitis vinifera L. Tesis universidad Autonoma de Madrid.

MatÉs, J. M., Pérez–Gómez, C. and De Castro, I. N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. *32*(8): 595–603.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85: 633 – 40.

Nickavar, B., Kamalinejad, M., HajYahya, M. and Shafagh, B. 2006. Comparison of the free radical scavenging activity of six Iranian *Achillea* species. *Pharmaceutical Biology*. 44: 208–212.

Oberprieler, C. and Vogt, R. 2000. The position of Castrilanthemum Vogt & Oberprieler and the phylogeny of Mediterranean Anthemideae (Compositae) as inferred from nrDNA ITS and cpDNA trnL/trnF IGS sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*. 225: 145–170.

Peterlunger, E., Siviloti, P., Celoti, E. and Zironi, R. 2000. Water stress and polyphenolic quality in red grapes. 6th International symposium on grapevine physiology and biotechnology, Heraklion, Greece.

Prior, R.L. and Cao, G. 2000 .Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Horticultural Science*. 35: 588–92.

Schwars, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I. and Hopia, A., et al., 2001. Investigation of plant extracts for antioxidant assay based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Food Research Technology*. 212: 319–328.

Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49–55.

Trumbeckaite, S., Benetis, R., Bumblauskiene, L., Burdulis, D., Janulis, V., Toleikis, A., et al., 2011. *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. *Food Chemistry*. 127: 1540–1548.

Vitalini, S., Giangiacomo, B. Iriti, M. Orsenigo, S. Iorizzi, M. and Gelsomina, F. 2011. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochimica Polonica*. 58: 203–209.

Zhang, H., Feng, C. and Wang, X. 2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Chemistry*. 39: 833 –839.

Zhou, S. and Abaraha A. 2007. Response to heat stress in warm season and cool season turf grass cultivars. *Scientific Research and Essays*. 2: 95–100.