دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال یازدهم، شماره سی و نهم، ۱۳۹۸

اثر اسید سالسیلیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه داروئی بابونه (*Matricaria chammomile*)

فاطمه راسخ[۱]، وحید روشن[۲]، آتوسا وزیری[۳]، بهمن خلد برین[٤]

دریافت: ۹٦/۱/۲٦ پذیرش: ۹٦/۱۰/۲۳

چکیده

گیاه بابونه (*Matricaria chamomile*) گیاهی دارویی متعلق به خانواده کاسنی بوده که به دلیل داشتن ترکیبات دارویی خاص نقش مهمی در درمان های طب سنتی دارد. اسید سالسیلیک در گیاهان به میزان کم ساخته شده و باعث ایجاد مقاومت در شرایط تنش می‌شود. به منظور بررسی اثر اسید سالسیلیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بابونه، پژوهشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی روی این گیاه انجام شد. کاشت بذر گونه *M. chammomile* در محیط گلخانه با میانگین دمای شب و روز گلخانه به ترتیب ۱۷±۲ و ۲۹±٤ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی آن ۵۹±۵ و ۳۸±۵ درصد انجام شد. دو هفته قبل از شروع گلدهی ویک هفته پس از اولین محلول‌پاشی، در دو نوبت تحت تیمار سطوح مختلف اسید سالسیلیک (صفر،۱۵۰، ۳۰۰، ٤۵۰ میلی‌گرم برلیتر) قرارگرفتند براساس نتایج سطوح مختلف اسید سالسیلیک منجر به تغییر در شاخص‌های فیزیولوژیک مورد بررسی، تغییر درصد ترکیبات اسانس، محتوای پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید. مقدار و نوع ترکیبات تشکیل دهنده اسانس *M. chammomile* با دستگاه GC و GC/MS تعیین و مهمترین ترکیبات موجود در اسانس، اکسید آلفا بیزابولول A ، کامازولن و ای- ان- دی سیکلو اتر گزارش گردید. غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان کامازولن در اسانس شد. مقدار و نوع ترکیبات پلی‌فنلی با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. مهمترین ترکیبات شامل کلروژنیک اسید، کافئیک‌اسید، کاتشین، سیناپیک‌اسید، هسپریدین، الاگیک‌اسید، کوارستین و ائوژنول بودند. در این پژوهش بهترین تیمار جهت افزایش پلی‌فنل‌ها غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید بود. در کل می‌توان گفت که کاربرد غلظت‌های پایین و متوسط سالیسیلیک اسید باعث بهبود مواد موثره در گیاه داروئی بابونه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بابونه، آنتی اکسیدان، اسانس، پرولین، پلی‌فنل

راسخ، ف.، و. روشن، ا. وزیری و ب. خلدبرین. ۱۳۹۸. اثر اسید سالسیلیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه داروئی بابونه (*Matricaria chammomile*). مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۳۹: ٤۳-۳٤.

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران- مسئول مکاتبات. physiology39@yahoo.com

۲- استادیار مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، شیراز، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

٤- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، ایران

مقدمه

بابونه با نام علمی *Matricaria chamomilla* گیاهی از تیره کاسنی می‌باشد، که با توجه به کاربرد روز افزون آن در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، عطرسازی و تهیه چاشنی های غذائی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (زرگری، ۱۳٦۸). بیش از ۱۲۰ ماده شیمیایی در گل بابونه به عنوان متابولیت‌های ثانویه شناسایی شده‌اند (پیرزاد، ۲۰۰٦ و پینو، ۲۰۰۲). اسید سالسیلیک یا اسید ارتو- هیدروکسی بنزوئیک یک گروه از مواد رشد گیاهی می‌باشد که در سرتاسر سلسله گیاهی موجود است وبر بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان موثر می‌باشد. این ماده به گروه متنوع فنل‌های گیاهی تعلق دارد که دارای یک حلقه آروماتیک بایک گروه هیدروکسیل می‌باشد (فتحی و اسماعیل‌پور، ۱۳۷۹). اثرات اسید سالسیلیک و نقش‌های اساسی آن در تنظیم فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاه در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. آنا نیوا و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که تیمار اسید سالسیلیک در برگ‌های جو منجر به افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها شده است هاروات و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که اسید سالسیلیک منجر به افزایش تحمل گیاه به دمای زیاد، کم و همچنین فلزهای سنگین می‌شود. در پژوهشی، اسید سالسیلیک در شرایط سمیت بر و شوری باعث افزایش تحمل هویج شد (ارسلان و همکاران، ۲۰۰۷). پاستیروا و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که تزریق اسید سالسیلیک در محیط آبکشت بابونه آلمانی منجر به تغییراتی در ترکیب‌های کومارینی برگ‌های این گیاه شد. غریب (۲۰۰٦) اثر افشانه برگی اسید سالسیلیک را در دو گیاه تیره نعناسانان بررسی کرد و نشان داد که تمام تیمارهای اسید سالسیلیک منجر به افزایش حجم پلی‌آمین ها، کربوهیدرات‌ها و اسانس شده است. هم‌چنین اسید سالسیلیک با تغییر در فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی مانع از خسارات اکسیداتیو می‌شود (کوسومی و همکاران، ۲۰۰٦: یالی و همکاران، ۲۰۰۵). بر اساس موارد ذکر شده، تحقیقاتی روی اثرات اسید سالسیلیک بر متابولیت های ثانویه گیاهان داروئی مختلف انجام شده است، ولی در رابطه با اثر سالیسیک اسید روی خواص بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بابونه بصورت همزمان کمتر کار شده است. به این منظور پژوهشی جهت بررسی اثرات غلظت‌های مختلف اسید سالسیلیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بابونه (*M. chamomilla*) صورت گرفت.

مواد وروش‌ها

بذرهای بابونه از مرکز پاکان بذر اصفهان تهیه و پس از تایید توسط هرباریوم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی در گلدان‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری حاوی کود برگ، ماسه و خاک به نسبت ۱:۲:۲ در اول آبان در گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی فارس کاشته و با آب مقطر آبیاری شدند بعد از سبز شدن بذور عمل تنک انجام شد به طوری که در هر گلدان ٤ تا ٦ گیاه باقی ماند. بعد از گذشت ٤ ماه افشانه برگی اسید سالسیلیک در ٤ سطح صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ٤۵۰ میلی‌گرم در لیتردر دو مرحله (دوهفته قبل از شروع گلدهی ویک‌هفته پس ازاولین افشانه برگی) انجام شد. اندازه‌گیری صفات مورد نظر، درصد و ترکیبات اسانس، پلی‌فنل‌ها، فعالیت آنتی اکسیدانی، کلروفیل a و b و پرولین درمرحله گلدهی کامل با برداشت شاخساره گلدار گیاه صورت گرفت.

سنجش پرولین

برای این منظور ۰/۵ گرم نمونه‌های تازه گیاهی ریز شد و درون ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک سه درصد ریخته شد و به مدت ٤۸ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول به لوله آزمایش انتقال داده شد و ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و۲ میلی‌لیتر اسیداستیک غلیظ اضافه گردید و به مدت یک ساعت درون حمام آب‌گرم ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس لوله‌ها درون یخ قرار داده شد و پس از سرد شدن محلول‌ها، ٤ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه گردید و به مدت ۳۰ – ۱۵ ثانیه توسط دستگاه Vortex بهم زده شد، سپس فاز رویی آن را برداشته و در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از پرولین استاندارد جهت رسم نمودار غلظت‌های مختلف استفاده گردید و اعداد خوانده شده با استفاده از منحنی به میکرومول پرولین در گرم بافت تازه تبدیل گردید (باتیس و همکاران، ۱۹۷۳).

استخراج عصاره و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه به روش DPPH[1] مورد سنجش قرار گرفت. برای تهیه عصاره متانولی، ۱۰گرم پودر نمونه خشک شده را در ۲۰۰ میلی لیتر متانول ریخته‌پس از ٤۸ساعت، عصاره با استفاده از کاغذ صافی صاف و جهت حذف حلال، در دستگاه روتاری قرار داده شد. جذب نوری نمونه‌ها درطول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت و درصد مهار رادیکال‌های آزاد

۱ – روشی است که مبتنی بر به دام اندازی میزان رادیکال های آزاد ماده ای به نام ۲ و ۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از عوامل آنتی اکسیدانی می باشد.

DPPH با استفاده ازفرمول زیرمحاسبه گردید.

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

ضمن تعیین رابطه بین غلظت و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی IC_{50} (غلظتی از ترکیب که باعث ۵۰ ٪ بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می شود)، فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های عصاره با استفاده ازمنحنی استاندارد برحسب میکرومول اسید گالیک برگرم وزن خشک عصاره (µmol/g) محاسبه شد (برویتس و همکاران ۲۰۰۱). کلروفیل a و b توسط روش آرون (۱۹٤۹) با اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٤٥ و ٦٦۳ نانو متر و قرار دادن در فرمول مربوط خوانده شد. اندازه گیری پلی فنل‌ها توسط دستگاه HPLC و به روش جاسوسن و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و برای آنالیز واریانس داده ها از نرم افزار SPSS و میانگین تیمارها بوسیله آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شد.

استخراج اسانس و بررسی اجزاء تشکیل‌دهنده آن

اسانس‌گیری توسط روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر انجام گرفت. اسانس‌گیری از زمان به جوش آمدن مایع درون بالن به مدت ۳ ساعت انجام و اسانس حاصل تا زمان استفاده، پس از آبگیری درون ظرف درب‌دار تیره رنگ ریخته و در دمای ٤ درجه نگه‌داری شد. تعیین عناصر تشکیل دهنده آن با استفاده از گاز کروماتوگرافی و جرم سنجی (GC, GC/MS)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

ویژگی‌های دستگاه GC و GC/MS

گازکروماتوگراف Agilent technologies و مدل A ۷۸۹۰، ستون HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی متر ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برنامه‌ریزی دمایی ستون از ٦۰ تا ۲۱۰ درجه سانتیگراد با افزایش دمای سه درجه سانتیگراد در دقیقه، نوع آشکارساز: FID با دمای ۲۹۰ درجه سانتیگراد ، گاز حامل: نیتروژن با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتیگراد.

گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی از نوع Agilent technologies و مدل A ۵۹۷۵، ستونHP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ٦۰ تا ۲۱۰ درجه سانتیگراد با افزایش دمای سه درجه سانتیگراد در دقیقه، و ۲۱۰ تا ۲٤۰ با افزایش دمای بیست درجه سانتیگراد در دقیقه، دمای محفظه تزریق: ۲۸۰ درجه سانتیگراد ، انرژی یونیزاسیون: ۷۰ الکترون ولت، گاز حامل: هلیوم.شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از بررسی طیف‌های جرمی توسط کتابخانه Nist و Adams و Willy دستگاه GC/MS صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای مختلف اسید سالسیلیک بر روغن های فرار

نتایج نشان دادکه اسید سالسیلیک روی صفات فیزیولوژیک مورد بررسی تاثیر معنی‌داری داشته است(جدول ۱). نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف اسید سالسیلیک بر مقدار و نوع ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در گیاه بابونه در جدول یک مشاهده می شود. در اسانس گیاه شاهد ۳۱ ترکیب مختلف، ۹۹/۳۵ درصد از کل ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. در بین ترکیبات ترپنی تشکیل دهنده اسانس ***M. chamomilla*** در گیاه شاهد اکسید آلفا بیزابولول A (٤۳/۷۸ ٪)[1]، کامازولن[2] (۱۸/٦۳ ٪) و ای- ان- دی سیکلو اتر (۱٤/۸۹ ٪) را تشکیل داده اند (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها با افزایش غلظت اسید سالسیلیک بیشترین ترکیبات اکسید آلفا بیزابولول A در هر سه غلظت اسید سالسیلیک ، ابتدا کاهش نشان داد که بیشترین آن مربوط به تیمار اسید سالسیلیک ۱۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر بود(شکل ۱). بیشترین مقدار کامازولن در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۲۱/۹۹ ٪) بود که نسبت به شاهد (۱۸/٦۳ ٪) معادل ۱۷/۹۷٪ تغییر نشان داد (شکل ۲). ترکیب ای- ان- دی سیکلو اتر در تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به گروه شاهد کاهش نشان دادند (شکل ۳). همچنین ترکیب اکسید آلفا بیزابولول B در تمام سطوح اسید سالسیلیک از ۳/۳٤ درصد در شاهد به ۵/۱۹ درصد در ٤۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۵/۱۸ درصد در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش پیدا کرد که این افزایش معادل ۵۵/۳۸٪ مقدار تیمار شاهد بود. بیشترین افزایش در مقدار اکسید آلفا بیزابولول A در سطح اسید سالسیلیک ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول ۲). در تحقیقی محلول پاشی برگی اسید سالسیلیک باعث افزایش رشد و جذب عناصر و تغییر در تعداد غده‌های ترشحی و بیوسنتز مونوترپن‌ها و نیز افزایش میزان اسانس گردید (آیدرس و همکاران، ۲۰۱۰: غریب، ۲۰۰٦). به نظر می‌رسد که تیمار اسید سالسیلیک بر تعداد ترکیبات نیز اثر گذاشته است و تعداد ترکیبات با افزایش غلظت اسید سالسیلیک افزایش نشان می‌دهد البته این افزایش فقط به بالاترین غلظت اسید سالسیلیک محدود می‌شود. این درحالی است که ترکیبات

1α - Bisabolol oxide A
2 - Chamazulene

عمده بالای ۲ درصد در سطوح مختلف اسید سالسیلیک حفظ شده است. تغییر در درصد و حفظ ترکیبات اصلی با تحقیقات انجام شده توسط پی‌رزتورتوزا و همکاران (۲۰۱۲) و غریب (۲۰۰۶) مطابقت دارد.

جدول ۱- میانگین مربعات و سطح معنی داری تاثیر سطوح مختلف اسید سالسیلیک بر صفات مورد بررسی

منابع تغییر	درجه آزادی	پرولین	کلرفیل a	کلرفیل b	آنتی اکسیدان
سالسیلیک اسید	۳	۲٦۲٦/۲٥۰/۰۰۰**	/۰٤۸ ۰/۰۱۳*	۰/٥۲٦۰/۰۰۰**	۲٥۷۱۱٦/۲۰/۰۰۰**
خطای آزمایش	۸	۳/۸۷	۰/۰۰۳	۰/۰۲۳	٥۲۱/۱
ضریب تغییر (٪)=		٤/۸٦	۱۰/٥۸	۱٤/۱۲	۱/۸۳

** : معنی داری در سطح یک درصد* :معنی دار در سطح ۵ درصد

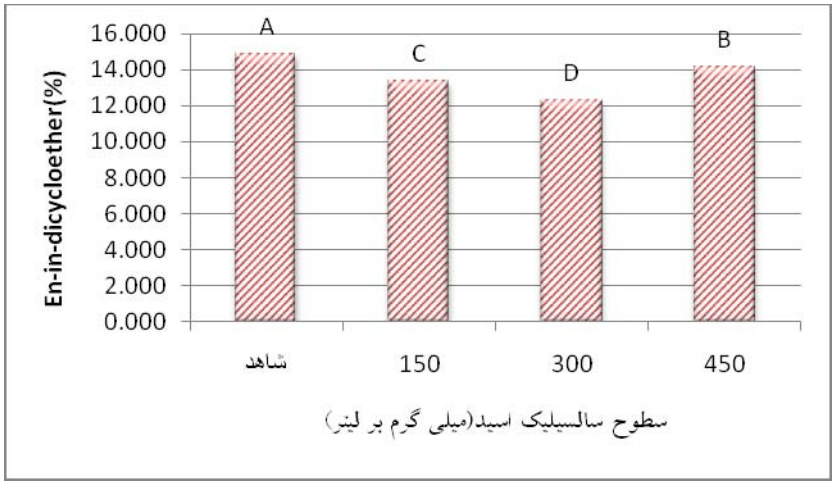
جدول ۲- آنالیز GC/MS ترکیبات موجود در اسانس گیاه بابونه تحت تیمار سالسیلیک اسید(مقادیر بر حسب درصد)

ردیف	ترکیبات (درصد)	شاخص بازداری	شاهد	اسید سالسیلیک ۱۵۰میلیگرم بر لیتر	اسید سالسیلیک ۳۰۰میلیگرم بر لیتر	اسید سالسیلیک ٤٥۰میلیگرم بر لیتر
۱	α-Thujene	۹۲۷	۰/۰٥	-	-	۰/۰۳
۲	Yomogi alcohol	۹۹۹	۰/۰٥	-	۰/۰۲	۰/۰۳
۳	α-Terpinene	۱۰۱۷	۰/۰٤	-	-	۰/۰۲
٤	P-cymene	۱۰۲٤	۰/۰٥	-	-	۰/۰٤
٥	Limonene	۱۰۲۸	-	-	-	۰/۰۳
٦	1,8-cineole	۱۰۳۲	۰/۱٤	۰/۰۳۸	۰/۰۳	۰/۰۹
۷	(Z)-B-ocimene	۱۰۳٥	۰/۰۷	-	۰/۰۲	۰/۰۹
۸	(E) - B-ocimene	۱۰٤٥	۰/۳۹	۰/۰۸٦	۰/۱۰	۰/٥۳۹
۹	γ-Terpinene	۱۰٥۸	۰/۲۲	۰/۲٥	-	۰/۲۱۹
۱۰	Artemisia ketone	۱۰٥۹	۰/۹٤	۰/۰۸	۰/۲۳	۰/۸۹
۱۱	Artemisia alcohol	۱۰۸۲	۰/۲٥	۰/۰۳۸	۰/۱۳	۰/۱۹
۱۲	Linalool	۱۱۰۳	-	-	۰/۰۲	۰/۰٤
۱۳	Terpinene-4-ol	۱۱۷۸	۰/۰٥	-	۰/۰۲	۰/۰۳
۱٤	α–Terpineol	۱۱۹۱	۰/۰٥	-	۰/۰٤	۰/۰٤
۱٥	Linalylformate	۱۲۱۸	۰/۱۲	-	-	۰/۰۹
۱٦	(E) -Caryophyllene	۱٤۱۹	۰/۱۳	۰/۲۱	۰/۱۲	۰/۱٤
۱۷	Aromadendrene	۱٤۳۹	۰/۱٥	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۱
۱۸	(E) -B-Farnesene	۱٤٥٦	٥/۱۷	٥/٥۹	٥/۱۹	٤/۳٥
۱۹	γ-Muurolene	۱٤۷٦	۰/۱٦	۰/۱۱	۰/۱۷	۰/۱٥
۲۰	γ–Curcumene	۱٤۸۱	۰/۷٤	-	۰/۱٦	۰/۳۹
۲۱	β-selinene	۱٤۸٦	۰/۰٦۱	۰/۱۳	۰/۱٥	۰/۱٥
۲۲	Viridiflorene	۱٤۹٥	۰/٥۸	۰/٥۲	۰/٥۷	۰/٥٥
۲۳	(E,E) -α-Farnesene	۱٥۰٤	۰/۲٥	۰/۲۸	۰/۳۰	۰/۲٥
۲٤	γ-Cadinene	۱٥۱۳	۰/۱۳	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۱۷

۲۵	δ-Cadinene	۱۵۲۲	۰/۲٤	۰/٤۷	۰/٤۲	۰/۲۸
۲٦	α-Cadinene	۱۵۳٦	-	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰٤
۲۷	(E) -Nerolidol	۱۵٦۱	۰/۲۵	۰/۳۹	۰/٤۱	۰/٤۰
۲۸	Spathulenol	۱۵۷۸	۰/۳۳	۰/٤۳	۰/٤۱	۰/۳۸
۲۹	Caryophyllene oxide	۱۵۸٤	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۷
۳۰	α-Bisabolol oxide B	۱٦۵۸	۳/۳٤	٤/۱۷	۵/۱۹	۵/۱۹
۳۱	α-Bisabolone oxide A	۱٦۸۵	۷/۸۳	۱۱/۱۹	۸/۲٤	۱۰/٦۲
۳۲	Chamazulene	۱۷۳۲	۱۸/٦٤	۲۱/۰۹	۲۱/۹۹	۱۸/۵۲
۳۳	α- Bisabolol oxide A	۱۷٤۹	٤۳/۷۸	۳۹/۲۲	٤۱/۸۳	٤۰/۹۸
۳٤	En-in-dicycloether	۱۸۷۳	۱٤/۸۹	۱۳/۰۵	۱۲/۳۱	۱٤/۱۸

نمودار ۱- اثر سطوح مختلف اسید سالسیلیک بر درصد ترکیب Chamazulene اسانس گیاه بابونه (حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد)

نمودار ۲- اثر سطوح مختلف اسید سالسیلیک بر درصد ترکیب α-Bisabolol oxide A اسانس گیاه بابونه (حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد)



نمودار ۳- اثر سطوح مختلف اسید سالسیلیک بر درصد ترکیب En-in-dicycloether اسانس گیاه بابونه (حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد)

اثر اسید سالسیلیک بر میزان تجمع پرولین، کلرفیل a و b و فعالیت آنتی کسیدانی

اثر تنش شوری بر مقدار تجمع آمینواسید پرولین در *Matricaria chamomilla* در جدول ۳ مشاهده می شود. نتایج آنالیز آماری میانگین ها نشان می دهد کاربرد اسید سالسیلیک منجر به کاهش معنی‌دار در غلظت پرولین در بافت های بابونه گردیده است. ولی در سطح سالسیلیک ٤٥٠ میلی‌گرم بر لیتر مقدار تجمع پرولین را در بافت رویشی به طور معنی داری نسبت به سطوح ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش نشان می‌دهد.نتایج این تحقیق با نتایج یزدان‌پناه و همکاران که نشان دادند افزودن اسیدسالسیلیک درغلظت‌های مختلف می‌تواند باافزایش مقدار پرولین سبب بهبود مقاومت گیاه درشرایط تنش خشکی شود(یزدان‌پناه، ۲۰۱۰)مطابقت ندارد.

از طرفی کشاورز و همکاران(۲۰۱۲) بیان داشتند که اسیدسالسیلیک درغلظت‌های بالا سبب بروزتنش درگیاه می‌گردد. در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد که افزایش غلظت تا ٤٥٠ میلی‌گرم در لیتر شرایطی مانند حالت تنش ایجاد کرده است و باعث افزایش پرولین شده است، زیرا هر ماده‌ای حتی هورمون ها در غلظت های بالا می‌توانند حالت تنش زا و یا حتی سمیت ایجاد کنند.

نتایج حاصل از آنالیز آماری میانگین ها در هر دو رنگیزه-های کلروفیل a و b نشان می دهد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش معنی دار مقدار رنگیزه ها گردیده که این کاهش از نظر آماری و در سطح $\alpha \leq ۰/۰۵$ معنی دار می باشد. با افزایش غلظت اسید سالسیلیک تفاوت معنی داری نسبت به شاهد در مقدار هر سه نوع رنگیزه مشاهده نشد(جدول ۳). این نتایج با نتایج کشاورز و همکاران(۲۰۱۲) که بیان کردندافزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی،نشان‌دهنده کاهش خسارت اکسیداتیو و نقش اسید سالسیلیک در افزایش تحمل به تنش می‌باشد و آروین و همکاران (۲۰۱۱) که گزارش‌کردند اسیدسالسیلیک باعث افزایش معنی‌دار سطح برگ و وزن خشک اندام‌های هوایی و مقدار کلروفیل کل در مقایسه باعدم مصرف اسید در شرایط تنش خشکی می‌گردد، مطابقت ندارد. شاید نوع ساختار برگ گیاه بابونه نسبت به گیاهان برگ پهن در این مغایرت دخیل باشد. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *M. chamomilla* به وسیله اثر عصاره های برگ این گیاه بر خنثی سازی رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. افزایش سطوح اسید سالسیلیک منجر به کاهش معنی‌دار مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی(افزایش عددی) نسبت به گیاهان شاهد گردید (جدول ۳). عصاره برگ بابونه در تیمار شاهد بیشترین فعالیت خنثی سازی رادیکال های آزاد DPPH را در گیاه نشان داد. در تحقیقی اسید سالسیلیک باعث کاهش رزمارینیک اسید درعصاره متانولی *Thymus membranaceus* و از طرفی باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در ترکیبات فنلی شد. گزارش شده است که اسید سالسیلیک در فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش دارد (پی‌رز تورتوزا و همکاران۲۰۱۲). به نظر می‌رسد از آنجا که اسید سالسیلیک روی تعدیل شرایط تنش نقش دارد و در آزمایشی مشاهده شد که اسید سالسیلیک درغلظت‌های پایین‌تر

در رفع آسیب اکسایشی نقش موثردارد(کشاورز و همکاران۲۰۱۲)، و از طرفی در شرایط تنش میزان فعالیت آنتی اکسیدنی افزایش می‌یابد، لذا اسید سالسیلیک نقش عکس تنش ایجاد کرده باشد.

.جدول ۳- مقایسه میانگین‌های پرولین، کلروفیل **a** و**b** در سطوح مختلف شوری با آزمون دانکن درسطوح ۵ درصد

اسید سالسیلیک (میلی‌گرم بر لیتر)	آنتی اکسیدان IC_{50} ($\mu g\ ml^{-1}$)	کروفیل a (میلی‌گرم برگرم وزن تر)	کروفیل b (میلی‌گرم برگرم وزن تر)	پرولین ($\mu mol\ g^{-1}\ FW$)
شاهد	۲۳۰۹/۱۳ d	۰/۵٦ a	۱/۱۷۷ a	۸٤/۱۸۰ a
۱۵۰	۲۷۲۹/۵۰ c	۰/٤۲ b	۰/۳۱۳ b	۲٤/۰۸۳ c
۳۰۰	۲۸۷۷/٦٤ b	۰/۵۳ a	۱/۱٤۰ a	۲۰/۷۵۳ c
٤۵۰	۲۹۷۱/۷٦ a	0/55 a	۱/۱۳۳ a	۳۲/۸۲۷ b

* میانگین هایی که در هر ستون دارای حروف یکسانی می باشند، در سطح احتمال ۵٪ آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند

اثر اسید سالسیلیک بر میزان ترکیبات پلی‌فنلی

با تزریق استاندارد از شرکت سیگما و عصاره گیاه، ١٦ پلی-فنل عمومی مورد ارزیابی قرار گرفت. از این ١٦ پلی‌فنل، ۸ مورد آن در هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد(جدول ٤). این ترکیبات عبارت بودند از گالیک اسید، روتین، پی کوماریک اسید، ترانس فرولیک اسید، رزمارینیک اسید، کومارین و هسپرتین. بر اساس نتایج بدست آمده، پلی فنل‌های کلروجنیک اسید، کافئیک اسید، کاتشین، سیناپیک اسید، هسپریدین، الاگیک‌اسید، کوارستین و ائوژنول در عصاره گیاه بابونه شناسایی شد. بیشترین میزان کلروجنیک، کاتشین، هسپریدین، الاگیک‌اسید، ائوژنول وسیناپیک اسید در تیمار اسید سالسیلیک ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود بطوری که سیناپیک اسید در این تیمار(۲۷۱/۸۹ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به شاهد (۱٦۵/۰۷ میلی‌گرم در لیتر) ٦٤/۷۱٪ و کلروجنیک اسید نیز ۳۱/۱٦٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد و بیشترین مقدار کافئیک اسید و کوئرسیتین در تیمار اسید سالسیلیک ۳۰۰ میلی-گرم بر لیتر بدست آمد. با توجه به نتایج آنالیز در بین تمام پلی-فنل‌ها، سیناپیک‌اسید و ائوژنول از نظر مقدار در تمام تیمارها بیشترین بودند(جدول ٤). در کل می‌توان گفت که اکثر پلی‌فنل‌ها در تیماراسید سالسیلیک ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش نشان دادند.

جدول ٤- میزان ترکیبات پلی‌فنل در عصاره متانولی بابونه(میلی گرم بر لیتر وزن خشک)

تیمار(میلی‌گرم بر لیتر)	chloregenic acid	caffeic acid	catechin	hesperedin	ellagic acid	quercetin	eugenol	sinapic acid
اسید سالسیلیک ۱۵۰	۵۱/۱۰	٤/٤۹	٤۷/۷٦	۲۷/٦۵	۱۳٤/۱٤	۱۸/۵۷	۲۵۱/۳۹	۲۷۱/۸۹
اسید سالسیلیک ۳۰۰	۳۰/٤۱	٦/۸۲	۳۲/۵۱	۲۱/۷٤	۱۱٤/۱٤	۱۹/٦۵	۲۲۸/٦٦	۲۵٤/۹۰
اسید سالسیلیک ٤۵۰	۲٦/۷۱	۵/۵۸	۳۲/۷۵	۱۹/۲۵	۹۸/۲۵	۱۷/٦۲	۱۸۹/۷۱	۲۲۳/٦۱
شاهد	۳۸/٦۹	۳/۵٤	٤۱/۱۰	۱۹/۸۰	۱۱۱/۵۸	۱۷/۵۲	۲۱۵/٤۱	۱٦۵/۰۷

نتیجه گیری

دراین پژوهش مشخص شد که اسید سالسیلیک باعث افزایش بیوسنتز ترکیبات پلی‌فنلی در عصاره و برخی ترکیبات مهم دارویی از جمله کامازولن در اسانس شد. در بین تمام پلی-فنل‌ها سیناپیک اسید و ائوژنول از نظر مقدار در تمام تیمارها بیشترین بودند. در کل می‌توان گفت که اکثر پلی‌فنل‌ها در تیمار اسید سالسیلیک ۱۵۰میلی‌گرم در لیتر افزایش نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی میزان تجمع رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که افزایش سطوح اسید سالسیلیک منجر به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی(افزایش عددی) می‌شود و میزان پرولین نیز کاهش پیدا کرد. در کل می‌توان گفت که کاربرد غلظت‌های پایین و متوسط سالیسیلیک اسید باعث بهبود مواد موثره در بابونه می‌شود.

منابع

فتحی، ق.، اسماعیل پور، و. ب. ۱۳۷۹. مواد تنظیم کننده رشد گیاهی اصول و کاربرد (برگردان). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۸۸ صفحه.

زرگری، ع. ۱۳٦۸. گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران. ۸۹٤ صفحه.

Ananieva, E.A., K.N. Christov and L.P. Popova. 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. J. Plant Physiol. 16: 319-328

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast.Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*.Plant Physiology.24: 1-15

Arvin M.J., A. Beidshki, B. Kramtand K. Maghsodi. 2011. The study salicylic acid (SA) role in contrast with drought stress by affecting on morphological and physiological parameters in garlic plant. In: Proceeding of 7th Iranian Horticultural Science Congress, Isfahan Industrial University, Iranian 4-7 September 2011. (In Persian)

Ashrafi M., A. Ghasemi Pirbalouti, M. Rahimmalek and B. Hamedi. 2012. The effect of foliar application of jasmonic acid on *Thymus daenensis*Celak. Planta Med 78:35

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

Belkadhi A., H. Hediji, Z. Abbes, I. Nouairi, Z. Barhoumi, M. Zarrouk, W. Chaïbi andW. Djebali. 2010. Effects of exogenous salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linumusitatissimum* L. Ecotox. Environ.Safe. 73: 1004–1011

Bruits M, k. Asres andF. Bucar. 2001. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia Afra*, *Artemisia byssinica*and *Juniperusprocera*. Phytother Res. 15: 103- 108

El-Tayeb, M.A. 2005. Responsof barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regulation 45: 215-224

Eraslan, F.A. Inal, A. Gunes and M. Alpaslan. 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Sci. Hort. 113: 120-128

Ervin, E.H., X. Zhangh and R.E. Schmidt. 2005. Exogenous salicylic acid enhances post–transplant success of heatedKentucky bluegrass and tall fescue sod**.** Crop Sci.Soc.Amer. 45: 240-244

Ganes, A., A. Inal, M. Alpaslan, F. Eraslan, E.G. Bagci and N. Cicek. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters systematic for oxidative stress and mineral nutrition in maize grown under salinity. J. Plant Physiol.164: 728-736 [Abstract]

Gharib, F. 2006. Effect of salicylic acid on the growth,metabolic activities and oil content of basil and marjoram.Int. J. Agr. Biol. 4: 485-492

Harvath, E., G. Szalai and T. Janda. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. J. Plant Growth Reg. 26: 290-300 [Abstract]

Hayat, S., Q. Hayat, M. N. Alyemeni, A.S. Wani, and J. Pichtel. 2012. Ahmad A., Role of proline under changing environments. Plant Signaling and Behav. 7(11): 1456–1466

Huang, R.H., J.H. Liu, Y.M. Lu and R.X. Xia. 2008. Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Caracara' navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) at different storage temperatures.Posthar.Biol. and Techno. 47: 168-175

Hussein, M.M., L.K. Balbaa and M.S. Gaballah. 2007. Salicylic asid and salinity effects on growth of maize plants. J. Agr. Biol. Sci. 3: 321-328

Idrees M, M.M.A. Khan, T. Aftab, M. Naeem andN. Hashmi. 2010. Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. J Plant Interact 5: 293–303

Justesen, U., P. Knuthsen and T. Leth. 1998. "Quantilative analysis of flavonols, flavones and flavonones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection", J Chromatogr A, Vol. 799

Kshavrz H., S.A.M. ModaresSanavi, F. ZarinKamr, A.Dolatabadian, M. Panahi andK. SadajAsilan. 2012. Evolution effect salicylic acid foliar on same traits biochemical two *Brasicanapus*L. under cool stress. Iran. J. of Agri. Sci, 42: 723-734

Kusumi K, T. Yaeno, K. Kojo, M. Hirayama andD. Hirokawa. 2006. The role of salicylic acid in the glutathione-mediated protection against photooxidative in rice.Physiol.Plant.128: 651-661

Parvaiz, A andM. Satyawati, 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants- a review.Plant Soil and Environment. 54: 89-99

Pastirova, A., M. Repack and A. Eliasova. 2004. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricariachamomilla* L. Plant Sci. 167: 819-824

Pe´rez-Tortosa V., A. Lo´pez-Orenes, A. Martı´nez-Pe´rez, M.A. Ferrer andA.A. Caldero´n.2012.Antioxidant activity and rosmarinic acidchanges in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chem 130: 362–369

Pino JA, F. Bayat, R. Marbot andJ. Aguero.2002. Essential oil of *Chamomillarecutita* (L.) Rausch.From Iran. J Essent Oil Res.; 14: 407–8

Pirzad A, M.R. Alyari, S. Shaliba, Zehtab-Salmasi andA. Moammadi.2006. Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricariachamomilla* L.) at different irrigation regimes. J Agron. 5: 451–5

Stevens J, T. Senaratna andK. Sivasithamparam. 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersiconesculentum*cv.Roma): associated chages in gas exchange, water relations and membrane stabilization. Plant Growth Rgul. 49: 77-83

Yali, H., Y. Liu, W. Cao, M. Huai, B. Xu and B. Huang. 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. Crop Sci. Soc. Amer. 45: 988-995

Yazdanpanah S., F. Abasi andA.Baghzadeh. 2010. Effect of salicylic acid and ascorbic acid on proline, sugar and protein content in *Saturejahortensis*L. under aridity stress. Proceeding of the First National Conference of Environmental Stress in Agricultural Science 28-29 Juan 2010. The University of Birjand.

Effects of salicylic acid on biochemical and physiological characteristics of *Matricariachamomile*

F. Rasekh[1], V. Rowshan[2], A. Vaziri[1], B. Kholdebarin[3]

Received: 2017-4-15 Accepted: 2018-1-23

Abstract

The *Matricaria chamomile* are medicinal and aromatic plants belonging to the Asteraceae family, which have many pharmaceutical properties. Salicylic acid naturally occurs in plants at a very low concentration. It is a common plant-produced signal molecule that is responsible for inducing tolerance to a number of mutation. The present study was performed to evaluate the effect of various concentrations of salicylic acid on biochemical and physiological characteristics of *M. chammomile*. The seeds of *M. chammomile* were grown in the greenhouse with the mean day/night temperature and relative humidity of 29 ± 4˚C, 38 ± 5% RH/17 ± 2˚C, 59 ± 5% RH respectively. To investigate the effects of salicylic acid on morphological characteristics of *M. chammomile* .Fourteen weeks old plants were subjected to different levels of salicylic acid [control, 150, 300, and 450 mg l^{-1}]. Our results showed that salicylic acid caused a significant change in proline content, photosynthetic pigments and antioxidant activity in *M. chammomile* but phenolic compounds has shown different profiles. The essential oil components of *M. chammomile*were identified and analyzed by GC/MS and GC technique. Polyphenol components were identified and analyzed by HPLC method. The main components of essential oil were α-Bisabolol oxide A, Chamazulene and En-in-dicycloether. The main components of polyphenols wereChloregeni acid, Caffeic acid, Catechin, Sinapic acid, Hesperidin, Ellagic acid, Quercetin, Eugenol. The proportions of these main compounds and synthesis of some important essential oil components were induced by salicylic acid.

Keywords:*Matricariachamomile*,antioxidant activity, essential oil, proline, polyphenol

1- Department of Biology, Payame Nour University, Tehran, Iran
2- Department of Natural Resources, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran
3- Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran