بررسی تغییرات فیتوشیمیایی اسانس گیاه دارویی *Dracocephalum moldavica* L. تحت تنش‌های مختلف شوری و کاربرد هیومیک و آسکوربیک اسید

رسول نریمانی[۱]، محمد مقدم[۲*]، عبداله قاسمی پیربلوطی[۳]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۲]دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۳]استاد، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۶/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۳

چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های اکولوژیکی است که باعث کاهش قابلیت تولید محصول می‌شود. اسید هیومیک به‌عنوان یک اسید آلی و آسکوربات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌توانند در جهت بهبود عملکرد گیاهان در شرایط تنش شوری مؤثر واقع شوند. در این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر اسید آسکوربیک و اسید هیومیک بر میزان و ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه (*Dracocephalum moldavica* L.) تحت تنش شوری، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹٤-۱۳۹۵ اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل شوری در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار)، اسید هیومیک و اسید آسکوربیک در سه سطح (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود.اسانس گیاه از سرشاخه‌های هوایی گل‌دار و به روش تقطیر با بخار آب از طریق دستگاه کلونجر استخراج و با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی اجزای تشکیل دهنده آن تفکیک و شناسایی گردید. میزان اسانس با افزایش تنش شوری به‌شدت کاهش یافت و کاربرد تعدیل کننده‌های تنش شوری (هیومیک و آسکوربیک اسید) سبب بهبود این صفت گردید. به‌طوری که در تنش ۱۵۰ میلی‌مولار شوری به کمترین میزان خود (۰/۲ درصد) رسید و کاربرد اسید هیومیک ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش ۵۱/٦۱ درصدی اسانس نسبت به تیمار شاهد گردید. بیشترین اجزای تشکیل دهنده اسانس بادرشبو در تیمار شاهد (عدم کاربرد تعدیل کننده‌ها و شرایط بدون شوری) شامل ژرانیال (۳٦/٦۵ درصد)، نرال (۳۱/۹٤ درصد)، ژرانیول (۱۵/۵٦ درصد)، ژرانیل استات (۱۱/٦٦ درصد)، ترانس- ۲،٤- هپتادینال (۱/۲۵ درصد)، لینالول (۱/۰۹ درصد)، پولگون (۰/۹۵ درصد) و وربنول (۰/٤ درصد) می‌باشد که ۹۹/۵ درصد از اجزای اسانس را شامل می‌شوند. در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک در سطوح مختلف تنش شوری تعداد زیادی ترکیب نسبت به تیمار شاهد و کاربرد تعدیل کننده‌های تنش شوری (کاربرد ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک) مشاهده شد. ازجمله این ترکیب‌ها می‌توان به آلفا-پینن، بتا-پینن، کامفن، کامفور، آلفا-توژون، نرول و تیمول اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، اسید هیومیک، بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.)، ژرانیال، شوری، نرال.

*نویسنده مسئول: m.moghadam@um.ac.ir

مقدمه

گیاه بادرشبو *Dracocephalum moldavica* L. گیاهی علفی، بومی آسیای مرکزی و اهلی شده در مرکز و شرق اروپاست و متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد (Dastmalchiet al., 2007; Kamalizadeh et al., 2015). جنس *Dracocephalum* شامل ۱۸٦ گونه می‌باشد که ۸ گونه از آن در ایران می‌روید (Kamalizadeh et al., 2015). اسانس گیاه بادرشبو از نظر ترکیبات تشکیل دهندهٔ آن بسیار شبیه بادرنجبویه که بومی مناطق مدیترانه‌ای است، می‌باشد. تمام اندام‌های گیاه بادرشبو حاوی اسانساست و مقدار آن در قسمت‌های مختلف متفاوت می‌باشد. گل و اندام‌های رویشی بادرشبو (برگ ها و ساقه‌ها) دارای بیشترین درصد اسانس می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند که ازاسانس این گیاه تعداد ٦٦ ترکیب شناسایی و جداسازی شده است که به‌ترتیب ترکیبات: ژرانیلاستات، ژرانیال، ژرانیول و نرال ترکیب‌های اصلی شناخته شده آن هستند. این ترکیب‌ها مونوترپن‌های اکسیژن داری هستند که ۹۰ درصد اجزاء اسانس را تشکیل می‌دهند (Maham et al., 2013 ; Holm et al., 1988). اسانس بادرشبو بدلیل وجود سیترال (ژرانیل+نرال) در آن دارای اثرات ضدعفونی کننده، ضدباکتری، ضدویروس و ضدقارچ است و در صنایع مختلف داروسازی، غذایی و آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود (Abd El-Bakyet al., 2008). از عصاره بادرشبو برای رفع سردرد، سرماخوردگی، ضعف عمومی بدن، مسکن دردهای عصبی و اسپاسم‌های معدی و کلیوی، برای شستشوی دهان و در تسکین دندان درداستفاده می‌شود، عصاره آبی بادرشبو به‌دلیل وجود ترکیبات فنلی مانند رزمارنیک اسید و کلروژنیک اسید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدویروس، ضدآلرژی، ضدالتهاب و ضدسرطان می‌باشد. همچنین خواص آرام‌بخشی عصاره نیز گزارش شده است (Hussein et al., 2006; Kamalizadeh et al., 2015; Said et al., 2015).

متابولیت‌های ثانویه اساساً با کنترل و هدایت ژنتیکی سنتز می‌شوند ولی ساخت آن‌ها به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و نیز در مقدار و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، اسانس‌ها و امثال آن می‌گردد (Ameri et al., 2008). طی ۳ تا ٤ دهه اخیر نیاز به آبیاری ۳۰۰ درصد افزایش یافته که منجر به استخراج بیش از پیش آب‌های با کیفیت پایین از منابع تحت‌الارض شده است که این امر باعث شور شدن بیشتر خاک شده است (Mostafazade-Fard et al., 2007). هر سطحی از عوامل محیطی از جمله شوری و خشکی که باعث تفاوت معنی‌دار در سازگاری گیاه گردد تنش محسوب می‌شود. تنششوریاز مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تغییر رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه است (Aminiand Ehsanpour, 2004; Nikolova and Ivancheva, 2005). در همین رابطه حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2016) بر روی آویشن باغی گزارش نمودند که تنش شوری برروی صفات مورفولوژیک گیاه تاثیر معنی‌دار داشت و با افزایش سطحشوری میزان تیمولو کارواکرول افزایش یافتند. نفاتی و همکاران (Neffati and Marzouk, 2008) در بررسی اثر سطوح مختلف (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار) کلرید سدیم بر عملکرد اسانس در برگ‌های گیاه گشنیز گزارش نمودند که با افزایش سطوح شوری تا سطح ۵۰ میلی‌مولار عملکرد اسانس افزایش و در سطح ۷۵ میلی‌مولار کاهش یافت. همچنین در تحقیقی مشخص شد که شوک‌های ملایمخشکی (۵۰ درصد ظرفیت مزرعه) و شوری (۱۰۰ میلی‌مولار در لیتر سدیم کلرید) سبب افزایش

متابولیت‌های ثانویه در آویشن باغی شدند (Fabriki ourang anddavoodnia, 2018). در مطالعه‌ای که بر روی گیاه بادرشبو انجام گرفت مشاهده شد که تنش ملایم خشکی به همراه ۳ تن در هکتارکود دامی بیشترین میزان اسانس را دارا بود (Rahbarian et al., 2014). در پژوهشی دیگر بیشترین میزان اسانس در گیاه بادرشبو در تنش خشکی ٤٠ درصد ظرفیت مزرعه حاصل شد (Safikhani et al., 2007).

برای غلبه بر اثرات منفی شوری، افزودن مواد آلی مختلف به‌عنوان عوامل بهبوددهنده رشد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Walker and Bernal, 2008). استفاده از ترکیبات و کودهای آلی طبیعی در خاک به‌منظور تقلیل اثرات تنش شوری از این جهت دارایارزش و اولویت هستند که این مواد اثرات مخرب زیست‌محیطی نداشته و جزیی از طبیعت هستند. یکی از این ترکیبات آلی ودوست‌دار محیط زیست، هیومیک اسید می‌باشد. ترکیبات هوموسی مواد آلی دارای دو نوع اسید آلی مهم بنام هیومیک اسید وفولویک اسید هستند که از منابع آلی مختلف تامین می‌شوند (Albayrak and Camas, 2005). اسید هیومیک از منابع مختلف نظیر خاک، هوموس، پیت، لیگنیت اکسیدشده و زغال‌سنگ استخراج می‌شود که در اندازه مولکولی و ساختار شیمیایی متفاوت‌اند و جهت بالا بردن عملکرد به خصوص در شرایط متغیرمحیطی می‌تواند موثر واقع شود (Sebahattin and Necdet, 2005; Khaled and Fowey, 2011). گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل موجود در اسید هیومیک باعث فعالیت بیوشیمیایی آن می‌شود که به شیوه هورمون‌های گیاهی بر گیاهان تأثیر می‌گذارند (Ertaniet al., 2013). اسید آسکوربیک (AsA) یک ترکیب آنتی‌کسیدانی قوی با وزن مولکولی کم و محلول در آب بوده که می‌تواند نقش عمده‌ای را در خنثی کردن فعالیت رادیکال‌های آزاد و غیرسمی کردن پراکسید هیدروژن داشته باشد (Smirnoff, 2005). آسکوربات به طور مستقیم رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید را حذف و H_2O_2 را به کمک آسکوربات پراکسیداز به آب احیا می‌کند (Sairam and Tyagi, 2004). بنابراین با توجه به این‌که کنترل شوری یکی از کلیدهای مدیریت منابع طبیعی است که پایداری و ثبات تولید و استفاده بهینه از زمین را تضمین می‌نماید و در اثر شوری، محصول تولیدی تغییرمی‌کند و هزینه تولید افزایش می‌یابد، لذا تحقیقات پیرامون افزایش مقاومت گیاهان در برابر شوری از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر اسید هیومیک و اسید آسکوربیک بر میزان و ترکیبات اسانس گیاهان دارویی بادرشبو تحت تنش شوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر اسید آسکوربیک و اسید هیومیک بر میزان و ترکیبات گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) تحت تنش شوری در طی بهار و تابستان ١٣٩٤ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد واقع در عرض جغرافیایی ٣٦ درجه و ١٨ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ٥٩ درجه و ٣١ دقیقه شرقی و ارتفاع ٩٨٥ متری از سطح دریا اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی انجام شد. تنش شوری با سه تکرار و هر تکرار شامل دو گلدان در چهار غلظت (٠، ٥٠، ١٠٠ و ١٥٠ میلی‌مولار) و اسید آسکوربیک در سه غلظت به‌صورت محلول‌پاشی (٠، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر) و اسید هیومیک نیز در سه غلظت (٠، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر) همراه با آب آبیاری اعمال شد.جهت بررسی ترکیبات اسانس سه تکرار آزمایشی با همدیگر مخلوط شده و آنالیز اسانس صورت پذیرفت. ابتدا بذور سالم در

گلدان‌هایی از جنس پلاستیک، قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و دارای زهکشی مناسب به‌صورت کپه‌ای و در چهار نقطه گلدان در اواسط فروردین ماه کاشته شد. پس از سبز شدن بذرها و در مرحله دو برگی تنک کردن صورت گرفت به‌طوری که در هر نقطه یک گیاهچه سالم (چهار بوته در هر گلدان) از بین آنها انتخاب شد. خاک گلدان‌ها از ترکیب یکسان خاک زراعی، ماسه و خاک برگ تشکیل شده بود (جدول ۱). با استقرار کامل گیاه در مرحله شش برگی آبیاری با آب شور هر دو روز یکبار به گونه‌ای انجام گرفت که محتوای آب گلدان به حد ظرفیت زراعی برسد و آبشویی گلدان به منظور جلوگیری از تجمع نمک هر دو هفته یکبار انجام گرفت. تیمار با اسید آسکوربیک و اسید هیومیک یک هفته قبل از اعمال تنش آغاز و با فاصله زمانی هر هفت روز یکبار تا پایان دوره آزمایش حدودا ٦ بار تکرار شد و هنگامی که گیاه به ۸۰ درصد گلدهی رسید؛ صفات مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

استخراج اسانس: استخراج اسانس در آزمایشگاه گروه باغبانی دانشکده کشاورزی و به‌صورت تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر انجام شد. برای استخراج اسانس، ۲۵ گرم پیکر رویشی خشک شده از هر تکرار توزین گردید و پس از آسیاب شدن مختصر در ٦۰۰ میلی‌لیتر آب در داخل دستگاه کلونجر به‌مدت ۳ ساعت جوشانده شد. پس از این مدت اسانس در محل جمع‌آوری اسانس که مدرج می‌باشد جمع گردید. از آنجا که اسانس با در شبی سبک‌تر از آب است، بر روی آب قرار می‌گیرد. پس از خواندن حجم اسانس استخراج شده در محل جمع‌آوری اسانس، با بازکردن شیر پایین دستگاه ابتدا آب و پس از آن اسانس خارج شد که اسانس حاصل از هر سه تکرار یک تیمار را در داخل یک ظرف شیشه‌ای مخصوص جمع‌آوری کردیم. باید دقت شود که اسانس حتی‌الامکان عاری از آب گردد، زیرا در غیر این صورت وجود آب باعث هیدرولیزاسترهای موجود در اسانس و تبدیل آن به اسید و الکل می‌شود. برای این منظور از سولفات سدیم خشک استفاده گردید. نمونه‌های اسانس در شرایط خنک و تاریک یخچال برای آنالیز بعدی با دستگاه‌های GC و GC-MS نگهداری شدند.

آنالیز اسانس: به‌منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی- طیف‌سنج جرمی استفاده شد. پس از آماده سازی اسانس و تزریق آن به دستگاه کروماتوگرافی گازی مناسب‌ترین برنامه‌ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس به‌دست آمد. همچنین درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده هر اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه گردید. سپس اسانس‌ها به دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی تزریق شد و طیف جرمی ترکیب‌ها بدست آمد. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (IR)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد.

مشخصات دستگاه: برای آنالیز کروماتوگرافی گازی اسانس از گاز کروماتوگراف آجیلنت ۷۸۹۰ مجهز به آشکار ساز FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن) با ستون غیرقطبی از نوع HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرون استفاده شد. از گاز نیتروژن (N2) با سرعت ۰/۸ میلی‌متر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای

اولیه ستون ٦٠ درجه بود و برنامه‌ریزی شد که ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش پیدا کند تا به ٢٨٠ درجه سانتی‌گراد برسد. دما قسمت تزریق و آشکارساز به‌ترتیب ٢٨٠ و ٣٠٠ درجه سانتی‌گراد بود. نسبت شکاف ١:١٠٠ برای رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شد. اسانس تزریق شده به دستگاه نیز ٠/١ میکرولیتر بود.

برای آنالیز اسانس از دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی مجهز به ستون HP-5MS به طول ٣٠ متر و قطر داخلی ٠/٢٥ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ٠/٢٥ میکرومتر استفاده شد. از گاز هلیوم با سرعت ٠/٨ میلی‌متر بر دقیقه به‌عنوان حامل استفاده شد. دما برنامه‌ریزی شد که با سرعت افزایش ٤ درجه بر دقیقه از ٦٠ درجه سانتی‌گراد به ٢٨٠ درجه برسد. از انرژییونیزاسیون ٧٠ الکترون ولت استفاده گردید.

پردازش آماری: آزمایش به‌صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ٣ تکرار و هر تکرار دارای ٢ گلدان انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار JMP8 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و نمودار میزان اسانس با استفاده از نرم‌افزارExcel 2010 رسم گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ٥ درصد انجام شد.

جدول ١: خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک محل آزمایش.

هدایتالکتریکی EC (dS/m)	اسیدیته کل اشباع (pH)	شن (%)	لای (%)	رس (%)	بافت خاک
١/٢	٧/٩	٢٩	٣٠	٤١	لومی رسی

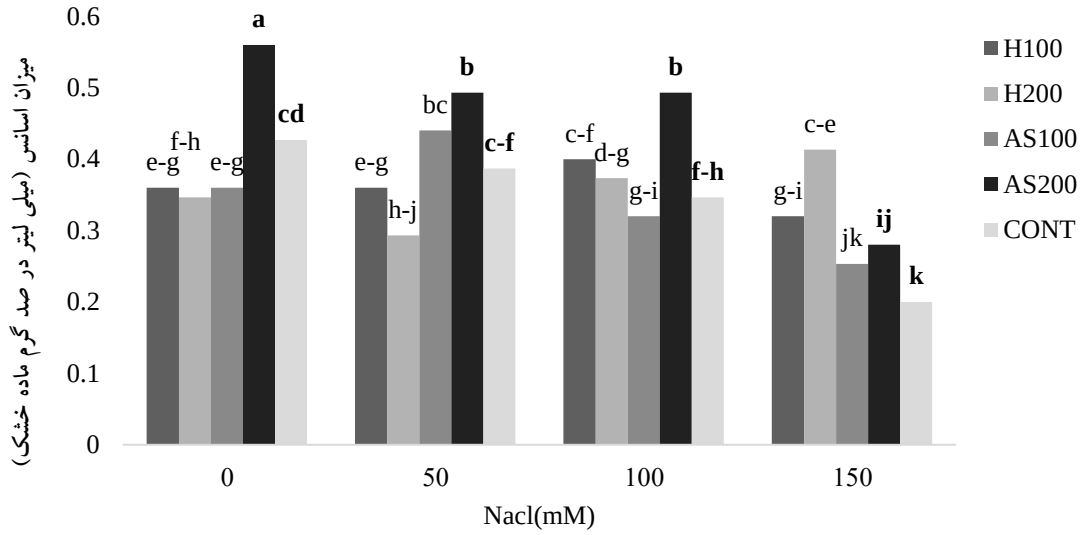
نتایج

میزان اسانس: اثرات متقابل تنش شوری و تعدیل کننده‌ها در سطح ١ درصد بر میزان اسانس بادرشبو معنی‌دار شد (جدول ٢). افزایش تنش شوری به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای میزان اسانس را در گیاه بادرشبو کاهش داد. به‌طوری‌که از ٠/٤٢ درصد در تیمار شاهد (عدم کاربرد تعدیل کننده‌ها و شرایط بدون تنش) به ٠/٢ درصد در تنش شوری ١٥٠ میلی‌مولار در شرایط بدون کاربرد تعدیل کننده‌ها رسید. درحالی‌که میزان اسانس در تیمار ٥٠ میلی‌مولار شوری و عدم کاربرد تعدیل کننده‌ها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (شرایط بدون شوری و تعدیل کننده) نشان نداد. بیشترین میزان اسانس در شرایط بدون تنش و با کاربرد ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک حاصل شد. همچنین سطح ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک در تنش ٥٠ و ١٠٠ میلی‌مولار با افزایش ٢١/٦٢ و ٢٩/٧٢ درصدی اسانس نسبت به شاهد (عدم کاربرد تعدیل کننده) سبب جبران خسارت تنش شوری گردید. در تنش شوری ١٥٠ میلی‌مولار میزان اسانس به‌شدت تقلیل یافت به‌طوری‌که در شرایط عدم کاربرد تعدیل کننده به کمترین مقدار خود رسید؛ ولی استفاده از اسید هیومیک در سطح ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر با افزایش ٥١/٦١ درصد نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش قابل‌ملاحظه میزان اسانس در این سطح شوری گردید (شکل ١).

جدول ۲: تجزیه واریانس درصد و اجزای اسانس گیاه بادرشبو تحت شرایط تنش شوری و کاربرد تعدیل کننده‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		درصد اسانس
تخفیف دهنده	٤	۰/۰۲۸۱**
تنش	۳	۱/۰٤۲۰**
تخفیف دهنده*تنش	۱۲	۰/۰۱۵۲**
خطا	٤۰	۰/۰۰۱۵
CV%		۲٤/۳۷

ns، ** و * به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪



شکل ۱: اثر متقابل تنش شوری و کاربرد ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک (H) و اسید آسکوربیک (AS) بر میزان اسانس گیاه بادرشبو

ترکیبات اسانس: همانطور که در شکل ۲ و ۳ مشخص شده است بر طبق نتایج آنالیز اسانس بیشترین ترکیب اسانس گیاه بادرشبو را ژرانیال، نرال، ژرانیول و ژرانیل استات تشکیل داد (شکل ۲ و ۳). با افزایش تنش شوری میزان نرال در اسانس به‌طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت به طوری که از ۳۱/۹٤ درصد در تیمار شاهد به ۲۵/۵٦ درصد در تنش ۱۵۰ میلی‌مولار رسید. همچنین کاربرد تعدیل کننده‌های تنش (هیومیک و آسکوربیک اسید) سبب کاهش میزان نرال گردید که اثر کاهشی کاربرد اسید هیومیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به وضوح در جدول ۳ مشخص می‌باشد.

کاربرد تعدیل کننده‌ها بویژه سطح ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک و آسکوربات در سطوح تنشی ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار شوری باعث افزایش درصد ژرانیول در اسانس گردید. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود اسید هیومیک و آسکوربات ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش ژرانیول از ۱۵/۵٦ درصد (عدم وجود تنش و تعدیل کننده) به ۳۵/٤۷ و ۱۹/۱۷ درصد در تیمار شاهد (عدم وجود شوری) گردید.

میزان ژرانیال اسانس با کاربرد تعدیل کننده‌هادر سطوح مختلف شوری کاهش قابل توجهی را نشان داد. به‌طوری کمترین میزان این ترکیب مربوط به

کاربرد اسید هیومیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. با افزایش تنش شوری میزان ژرانیال استات در اسانس افزایش یافت و کاربرد تعدیل کننده ها بویژه سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آن‌ها به ترتیب سبب افزایش ۳۷/۹۷، ۳۹/۹۵، ۳۱/۱٤ و ۲۳/۷۸ درصدی این ترکیب در سطوح شوری ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد (عدم کاربرد تعدیل کننده) گردید.

همانطور که در جدول ۳ مشخص می‌باشد با کاربرد اسید آسکوربیک ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به طور قابل ملاحظه‌ای میزان لینالول در اسانس نسبت به شاهد در سطوح مختلف تنش افزایش یافت. نتایج آنالیز اسانس گیاه بادرشبو بیانگر این بود که در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک در سطوح مختلف تنش شوری تعداد زیادی ترکیب نسبت به تیمار شاهد و کاربرد تعدیل کننده‌های دیگر (کاربرد ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک) مشاهده شد. ازجمله این ترکیب‌ها می‌توان به آلفا-پینن، بتا-پینن، کامفن، کامفور، آلفا-توژون، نرول و تیمول اشاره کرد.

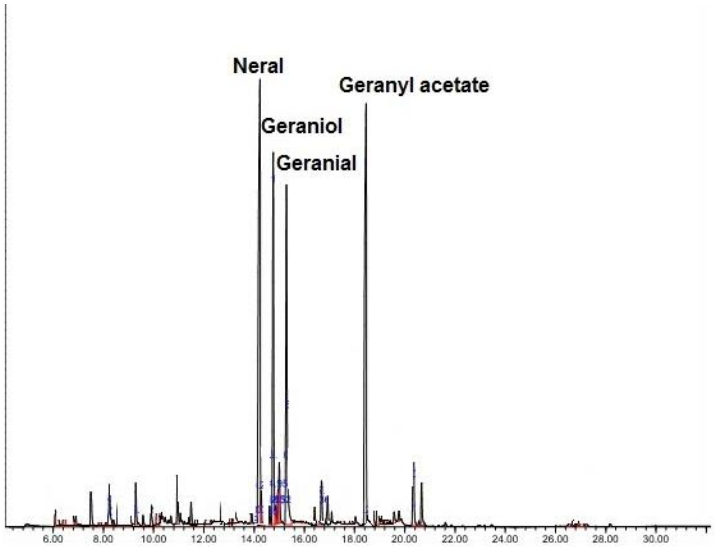
جدول ۳: مقایسه تغییرات کمی و کیفی ترکیبات اسانس گیاه دارویی بادرشبو تحت تنش شوری و کاربرد هیومیک و آسکوربیک اسید

ترکیبات اسانس (٪)	Inhibition index	آسکوربیک اسید ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطوح مختلف شوری(Mm)				آسکوربیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطوح مختلف شوری(Mm)				عدم استفاده از تعدیل کننده تنش و سطوح مختلف تنش شوری (Mm)			
		۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
trans-2,4-Heptadienal	٦/۳۹	۱/۷۱	۱/۲۵	۱/۱۳	۰/۷۹	۰	۱/۱۷	۱/۱	۰/۷۷	۱/۲۵	۱/٦	۰/۵۷	۱/٦۳
Linalool	۹/۵۸	۱/۵۷	۲/۰٤	۱/۷٤	۱/۵۹	۱/۸۸	۲/۰٤	۲/٤۲	۲/۳۲	۱/۰۹	۱/۸	۰/۸۳	۱/۸٦
Verbenol	۱۱/٦۱	۰/۳۸	۰	۰	۰	۰	۰/٦٤	۰/۵۷	۰	۰/٤	۰/۸۸	۰/٦۹	۰/٦۷
Pulegone	۱۲/۲	۰/۷۸	۰/۸۹	۰	۰	۰	۱/۲۵	۱/۱۲	۰/۸۷	۰/۹۵	۱/٦٤	۱/۲	۱/۳٤
Nerol	۱۳/۷	۰	۰	۰	۰	۸/۵۸	۰/٦٤	۰/٤۱	۰	۰	۰	۰	۰/٦
Neral	۱٤/۱۹	۲٦/۹۵	۲۵/۵۳	۲۸/٦۳	۲٦/۰٤	۱٦/۹۵	۲٤/۰۲	۲٤/٦٦	۲۵/۵۵	۳۱/۹٤	۳۰/۱٦	۲۹/۱۱	۲۵/۵٦
Geraniol	۱٤/٦۲	۱۸/٦۷	۲۲/۹۳	۱٤/۹۱	۱۹/۲۷	۳۵/٤۷	۱۷/۳۳	۱۸/۳۲	۱۸/۵۱	۱۵/۵٦	۱۳/٤۸	۱٤/۵٦	۱۹/۱٤
Geranial	۱۵/۱۸	۲۹/٦	۳۰/۲٦	۳۲/۷۹	۳۰/۰۷	۲۰/۷۷	۲۷/٦۸	۲٤/۸٤	۲۹/۱۸	۳٦/٦۵	۳۳/۹۲	۳٤/۲۷	۲۹/٦۳
Neryl acetate	۱۸/۰۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۷۲	۰/٦۹	۰/۷۱	۰	۰	۰/٤٦	۰/٦۲
Geranyl acetate	۱۸/۷۱	۱٦/۹۹	۱۷/۰۹	۲۰/۰۸	۲۲/۲۳	۱٦/۳۵	۲۲/٦٦	۲۱/۵۹	۲۲/۰۹	۱۱/٦٦	۱٤/۹۲	۱۷/۰۹	۱۷/۳
Germacrene D	۲۱/۷۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰/٤٤	۰/۵۳	۰	۰	۰	۰	۰

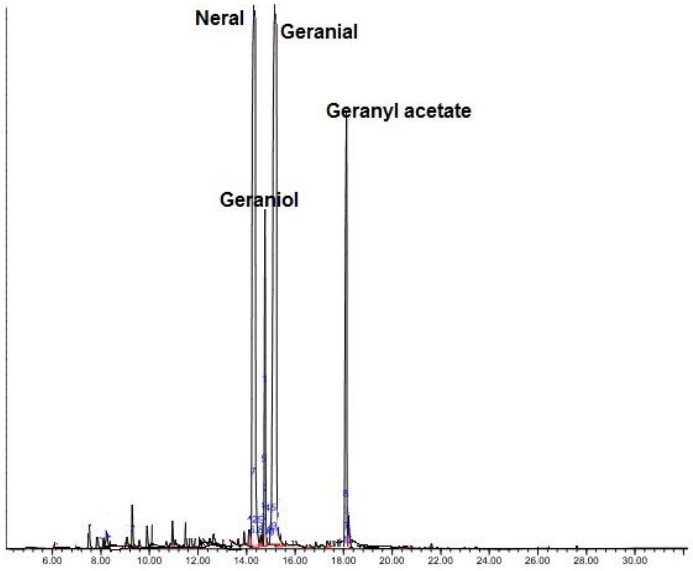
ادامه جدول ۳: ترکیبات اسانس گیاه دارویی بادرشبو تحت تنش شوری و کاربرد هیومیک و آسکوربیک اسید

ترکیبات اسانس (٪)	Inhibition index	هیومیک اسید ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطوح مختلف شوری (Mm)				هیومیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطوح مختلف شوری (Mm)			
		۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
α-Pinene	۵/۲۳	۰/۱۹	۰/۱	۰/۱۱	۰/۰۹	۰/۱٤	۰	۰	۰
Camphene	۵/۵٦	۰/۳۱	۰/۱۵	۰/۱٦	۰/۱	۰	۰	۰	۰
β-Pinene	٦/۲۱	۰	۰/٤٤	۰/۳۵	۰	۰	۰	۰	۰
trans-۲,٤-Heptadienal	٦/۳۹	۰/۸۱	۱/٤۲	۱/۱٦	۱/۳٤	۱/۷۵	۱/۱۵	۱/۲۳	۱/۳۳
Δ-۳-Carene	۷/۰٤	۰	۰/۰۸	۰/۱۲	۰/۰۹	۰	۰	۰	۰
p-Cymene	۷/٤۱	۰/۰۵	۰/۰٤	۰/۰٤	۰/۰۵	۰	۰	۰	۰
۱,۸-Cineole	۷/٦۱	۰/۸٦	۰/٤۳	۰/٤٤	۰/۳	۰	۰	۰	۰
trans-β-Ocimene	۸/۰٤	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۵٤	۰/۲۵	۰/۵	۰	۰	۰

Linalool	۹/۵۸	۱/۸۲	۱/٤۷	۱/۷۱	۱/۸۵	۱/۷۹	۱/٤٦	۱/٦۲	۱/۸٦
α-Thujone	۹/۸۷	۲/۸٦	۱/٤۲	۲/٤۳	۱/۰۹	۰	۰	۰	۰
β-Thujone	۱۰/۱۷	۰/۷٤	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/۰۸	۰	۰	۰	۰
Camphor	۱۱/۰۳	۲/٤٤	۱/۳	۱/۲۲	۰/۹٦	۰	۰	۰	۰
Verbenol	۱۱/٦۱	۰/۸۳	۱/۱	۱/۷۷	۰/٦۵	۰/۹۲	۰/۵۱	۰	۰/۷۵
Bornanol	۱۱/۷۲	۰/٤	۰/۲	۰/۲	۰/۱۵	۰	۰	۰	۰
Rose furan epoxide	۱۱/۹۷	۰/۲۲	۰/۳٤	۰/۲۹	۰/۱۸	۰/۲۸	۰	۰	۰
Pulegone	۱۲/۲	۱/۲۷	۱/۷۳	۱/۳۹	۱/۱٦	۱/۵۵	۰/۹٤	۱/۰٤	۱/۲۷
Nerol	۱۳/۷	۰/٦۳	۰/٦۲	۰/۱۲	۰/٦۸	۰/٤۲	۰	۰	۰
Neral	۱٤/۱۹	۱٦/۲	۱۹/۹٦	۱۹/٦٤	۱۸/٦۲	۲٤/۲۹	۲٤/٤۸	۲٤/۷۲	۲۵/۰۲
Geraniol	۱٤/٦۲	۱۷/۱٦	۱۷/۵۸	۱۵/۲٦	۱۸/۹۵	۱۹/۱۷	۱۷/٤٤	۱۷/۲۲	۱٦/٦۲
Geranial	۱۵/۱۸	۱۷/۷۲	۱۷/۱۵	۱۵/٦	۲۲/۷۵	۲٦/۹۲	۲۸/۷۱	۲۹/۳۵	۲۸/٤۷
Thymol	۱۵/۷۷	۰/۵۲	۰/۱۵	۰/۱٤	۰/۵	۰	۰	۰	۰
Carvacrol	۱٦/۰۹	۰/۵٤	۰/۱۷	۰/۱۱	۰/۱۱	۰	۰	۰	۰
Myrtenyl acetate	۱٦/۸۳	۰/٦٦	۰/۸۱	۰/۷	۰/۷۹	۰	۰	۰	۰
Neryl acetate	۱۸/۰۵	۰/٦٤	۰/۱۸	۱/۰٦	۱/۰۸	۰/۵۵	۰	۰	۰/۷
α-Copaene	۱۸/٤۵	۰/۸٤	۰/٦۹	۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۲۲	۰	۰	۰
Geranyl acetate	۱۸/۷۱	۱۵/۱	۱۸/۸۷	۲۰/۲٦	۱۵/۲۹	۱۸/۸	۲٤/۸۵	۲٤/۸۲	۲۲/۷
β-Caryophyllene	۱۹/۸٤	۰/۸۷	۰/٦۹	۰/۷۲	۰/٤۹	۰/۲۷	۰	۰	۰
Germacrene D	۲۱/۷۱	۱/۵۳	۰	۰/۹۱	۰/۳۵	۰/٤۸	۰/٤٦	۰	۰/۳٦
β-Bisabolene	۲۲/۵	۰/۳۹	۰/۲۸	۰/۲٤	۰/۱	۰	۰	۰	۰
Δ-Cadinene	۲۲/۹۵	۰/۳	۰/۱۹	۰/۲۳	۰/۱۲	۰	۰	۰	۰



شکل ۲: کروماتوگرام تیمار هیومیک اسید ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطح شوری ۵۰ میلی‌مولار



شکل ۳: کروماتوگرام تیمار آسکوربیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطح شوری ۵۰ میلی‌مولار

بحث

در پژوهش حاضر تنش شوری باعث کاهش میزان اسانس گردید در حالی که کاربرد تعدیل‌کننده‌های تنش بخصوص اسیدآسکوربیک توانست سبب بهبود میزان اسانس در سطوح مختلف شوری گردد. گیاهان دارویی تحت تأثیر تنش به‌شدت از خود واکنش نشان می‌دهند که برحسب شدت و نوع آن تغییراتی در تولید ترکیبات شیمیایی خود ازجمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و اسانس‌ها ایجاد می‌کنند (Petropoulos et al., 2008). در تحقیق حاضر تنش شوری سبب کاهش میزان اسانس شده است در حالی که نتایج محققین دیگر (Rahbarian et al., 2014; Safikhani et al., 2007) نشان از افزایش میزان اسانس در گیاه بادرشبی تحت تنش خشکی دارد بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که نوع تنش به عنوان عامل تاثیرگذار در میزان اسانس در گیاه بادرشبی می‌تواند عمل کند. کاهش میزان اسانس ممکن است به‌دلیل اختلال در فتوسنتز (همبستگی بین متابولیت‌های اولیه و ثانویه) و تولید کربوهیدرات تحت شرایط تنش شوری باشدکه باعث جلوگیری از رشد گیاه می‌شود (Flexas and Medrano, 2002). محدود شدن عرضهٔ سیتوکنین از ریشه‌ها به شاخه‌ها و در نتیجه تغییر نسبت بین سیتوکنین و اسید آبسیزیک برگ و به هم خوردن نسبت هورمونی در گیاه عامل دیگر کاهش میزان اسانس در تنش شوری می‌تواند باشد (Barrett-Lennard., 2003). نتایج آنالیز اسانس گیاه مرزه رشینگری نشان داد که تغییرات میزان کارواکرول به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب شناخته شده در اسانس از روندهای منظم افزایشی یا کاهشی تبعیت نمی‌کند و تنش شوری باعث ایجاد تغییراتی در ترکیب‌های اصلی اسانس گیاه می‌شود (Amiri and gasemi, 2018). در تحقیق مشابهی، الفا و همکاران (Olfa Baatour et al., 2009) اثر تنش شوری را بر مرزنجوش بررسی کرده و دریافتند که شوری باعث کاهش تعداد برگ‌ها و مقدار اسانس گردیده و مقدار مواد موجود در ترکیب اسانس گیاه نیز به شدت تحت تاثیر شوری قرار گرفته است. کاهش میزان اسانس تحت تأثیر تنش شوری در رازیانه (Ashraf et al., 2004)، زنیان (Ashraf & Akhtar, 2004)، ریحان (Hassani, 2002) و بادرنجبویه (Gorgini et al.,

2016) نیز گزارش شده است. در تحقیق حاضر نیز میزان و ترکیبات اسانس روند منظم کاهشی یا افزایشی در شوری و کاربرد هیومیک و آسکوربیک اسید نداشتند و مشاهده گردید تا حدودی گیاه بادرشبو مقاوم به تنش ملایم (۵۰ میلی‌مولار) بود و میزان اسانس تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. در اکثر تحقیقات انجام شده (Khorasaninejad et al., 2010) مشاهده گردیده است خانواده نعناعیان به تنش شوری ملایم مقاوم هستند. در همین راستا خراسانی‌نژاد و همکاران (Khorasaninejad et al., 2010) در بررسی اثر تنش شوری روی نعناع فلفلی، مشاهده کردند تیمارهای مختلف شوری اثرات قابل توجه و معنی‌داری بر کلیه صفات مورفولوژیکی، کمیت اسانس و ترکیب اجزای اسانس نعناع فلفلی دارند و می‌توان اذعان داشت که نعناع فلفلی تحمل متوسطی نسبت به تنش شوری ملایم دارد به‌طوری‌که در اکثر خاک‌های کشاورزی مشروط بر این که حد شوری آن‌ها از ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم بیشتر نباشد، می‌توانند پرورش یابد. اجزایی از اسانس بادرشبو که تعیین کننده کیفیت آن می‌باشند با افزایش تنش شوری پاسخ متفاوتی نشان می‌دهند به‌طوری‌که نرال و ژرانیال با افزایش شوری مقدارشان در اسانس کاسته می‌شود در حالی که بر مقدار ژرانیول و ژرانیل استات افزوده می‌شود و اگر هدف افزایش ژرانیول در اسانس باشد استفاده از هیومیک ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان بهترین تیمار توصیه می‌شود. تغیرات انجام شده در کیفیت اسانس تحت تاثیر تنش شوری و کاربرد تعدیل‌کننده‌های تنش در این تحقیق، در گیاهان دارویی دیگر نیز گزارش شده است به‌طوری که این تغییرات را می‌توان به‌دلیل صرف بیشتر انرژی در گیاه برای جذب آب در شرایط تنش، تغییر و افزایش غلظت پروتوپلاست، تغییر در مسیرهای تنفسی و مسیر فسفات‌پنتوز مربوط دانست که به‌نوعی در تولید آنزیم‌های تولید کننده اسانس در گیاه اختلال ایجاد کرده و در نتیجه سبب تغییر در اجزای اسانس می‌شوند و می‌تواند نوع ترکیب‌های اسانس را نیز تغییر دهد (Afzali et al., 2007). تغییرات میزان و کیفیت اسانس در شوری ۵۰ میلی‌مولار تا حدودی برای گیاه بادرشبو قابل چشم‌پوشی می‌باشد ولی شوری بالاتر از این سطح به‌طور قابل توجهی کمیت و کیفیت اسانس این گیاه را تحت تاثیر قرار می‌هد و مناسب نمی‌باشد. در تحقیق حاضر شوری ۱۵۰ میلی‌مولار میزان اسانس را به شدت کاهش داد در حالی که کاربرد هیومیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر توانست سبب افزایش میزان اسانس در این سطح شوری گردد. در توجیه این نتیجه به دست آمده می‌توان گفت که اسید هیومیک با افزایش فعالیت آنزیم رابیسکوسبب افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه (Delfine et al., 2005) و در نتیجه تولید فرآورده‌های فتوسنتزی می‌شود و چون اسانس‌ها از گروه شیمیایی‌ترپن‌ها بوده و به این دلیل که گلوکز به‌عنوان پیش ماده مناسب در سنتز اسانس و به ویژه منوترپن‌ها مطرح هست، فتوسنتز و تولیدفرآورده‌های فتوسنتزی ارتباط مستقیمی با تولید اسانس دارد (Niakan et al., 2005). تحقیقات زیادی نیز گزارشکردند که استفاده از کودهای آلی باعث افزایش درصد اسانس درگیاهان دارویی می‌شوند (Kapoor et al., 2004; Badran and Safwat, 2004; Darzi et al., 2007). نتایج پژوهش حاضر نشان داد در سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار شوری کاربرد آسکوربیک اسید به‌طور قابل توجهی میزان اسانس را بهبود می‌بخشد که می‌توان دلیل آن را رابطه مثبت بین فتوسنتز و ساخت متابولیت‌های ثانویه دانست به‌طوری که تیمار برون زای گیاهان با آسکوربیک اسید می‌تواند با حفظ فتوسنتز و رنگدانه های فتوسنتزی در شرایط تنش شوری رشد گیاهان را بهبود بخشد (Hamada and Al-Hakimi, 2009).

ونسکوشنز و همکاران و جلالوند و همکاران (Venskutonis et al., 1995; Jalalvand et al., 2018) در گیاه بادرشبو ٦٦ ترکیب به روش GC و GC/MS شناسایی کردند که ژرانیال استات، ژرانیال، ژرانیول و نرال اصلی‌ترین ترکیب‌های شناخته‌شده هستند که با نتایج آنالیز اسانس در این آزمایش هم‌سو می‌باشد. ترکیب‌های معطر موجود در بادرشبو در طعم‌دهندگی و فرآوری انواع چای گیاهی کاربرد دارد و برخی از این ترکیبات در گیاهان چند ساله همچون نپتا موجود می‌باشند (Venskutonis et al., 1995). سینگ و انور (Singh and Anwar., 1985) مشاهده کردند که شوری بالا هیچ اثری روی اجزای اصلی اسانس علف لیمو (*Cymbopogon* sp.) نداشته است که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد و همانطور که در این تحقیق مشاهده شد ترکیبات اصلی اسانس تنها از نظر کمیت دستخوش تغییر شدند. بر اساس جدول آنالیز اسانس (جدول ۳) در شرایط عدم استفاده از تعدیل کننده‌ها در سطوح مختلف شوری، با افزایش تنش میزان ژرانیول، ژرانیل استات و پولگون افزایش و مقدار نرال و ژرانیال کاهش می‌یابد. در تحقیق جلالوند و همکاران (Jalalvand et al., 2018) روی گیاه بادرشبو تحت تنش خشکی بیشترین ترکیب اسانس، ژرانیل‌استات با مقدار ٤٩/٣١ درصد بود در حالی که در تحقیق حاضر بیشترین مقدار ترکیب اسانس، ژرانیال می‌باشد. بنابراین نوع تنش و شرایط محیطی می‌تواند سبب تغییر در ترکیبات اسانس گردد. تغییر در مواد مؤثره گیاهان در اثر شوری در تحقیقات مورالس‌و همکاران (Morales et al., 1993) نیز گزارش شده است به‌طوری‌که شرایط شوری متوسط باعث افزایش مقادیر کاردنولاید در برگ‌های گل انگشتانه می‌شود. تغییر در ترکیبات اسانس در گیاهان بسته به گونه و کولتیوار و نوع تنش متفاوت است. در شرایط تنش خشکی مقدار ژرانیول در گونه *Cymbopogon. martini* افزایش ولی در گونه *C. witerianus* کاهش یافت (Farooqi et al., 2005). دلیل افزایش ژرانیول، جلوگیری از تبدیل ژرانیول به ژرانیل استات در شرایط تنش خشکی ذکر شده است همچنین در گونه *C. witerianus* در شرایط تنش خشکی، میزان سیترونلال کاهش و سیترونلول افزایش یافت. در این گونه در ابتدا ژرانیول به سیترونلول تبدیل و بعد سیترونلول به سیترونلال تبدیل می‌شود. بنابراین دراین گونه در شرایط خشکی تبدیل ژرانیول به سیترونلول تسریع و در مرحله بعد تبدیل سیترونلول به سیترونلال باز داشته می‌شود (Fatima et al., 2002). در پژوهشی دیگر، سعید آل اهل و عبدو (Said-Al Ahl and Abdou, 2009) نشان دادند که مقدار ژرانیال در گیاه بادرشبو تحت شرایط خشکی افزایش و ژرانیول کاهش یافت. تغییر در ترکیبات اسانس به‌دلیل اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز مونوترپن‌ها می‌باشد. فعالیت ژرانیول دهیدروژناز که در کاتالیز ژرانیول-سیترال نقش دارد، در شرایط تنش خشکی تغییر کرده است. به‌عبارتی تجمع مونوترپن‌ها در گیاهان تحت تنش خشکی، نقش فیزیولوژیکی و اکولوژیکی به‌عنوان یک حفاظت‌کننده در مقابل تنفس نوری دارد. بنابراین با توجه به موارد گفته شده شرایط محیطی و ژنوتیپ از جمله عوامل تأثیرگذار بر کیفیت اسانس می‌باشند و افزایش ژرانیول به همراه کاهش ژرانیال در این تحقیق را علاوه بر نقش آنزیم‌های دخیل می‌توان نتیجه موارد ذکر شده دانست.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد گیاه بادرشبو دارای تحمل متوسطی نسبت به تنش شوری می‌باشد به‌طوری‌که در اکثر خاک‌های کشاورزی مشروط بر این که حد شوری آن ها از ٥٠ میلی‌مولار کلرید

سدیم بیشتر نباشد، می‌تواند پرورش یابد. نکتهٔ قابل تأمل دیگر که در این تحقیق وجود دارد این است که چون اختلاف بین تیمار ۵۰ میلی‌مولار شوری با تیمار شاهد از نظر میزان اسانس معنی‌دار نشده است و از طرفی چون گیاهان تولید شده در شرایط شوری ۵۰ میلی‌مولار کوچک‌تر از تیمار شاهد بوده و حجم کمتری را اشغال می‌نمایند و گیاه بادرشبو مقاوم به این سطح تنش است، بنابراین شاید بتوان با افزایش تراکم کاشت در آبیاری با آب شور تا حد ۵۰ میلی‌مولار، میزان اسانس را نسبت به شرایط بدون تنش افزایش داد و به عملکرد قابل قبولی از اسانس دست یافت. همچنین استفاده از آسکوربیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطوح شوری ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار و هیومیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار شوری می‌توان سبب افزایش میزان اسانس به‌طور قابل ملاحظه‌ای گردد. ترکیبات اصلی اسانس (کیفیت اسانس) تحت تاثیر تنش شوری و کاربرد هیومیک و آسکوربیک اسید قرار می‌گیرند. به‌طوری که می‌توان به شکل هدفمندی یک ترکیب را کاهش یا افزایش داد. ژرانیال و نرال به عنوان بیشترین ترکیب موجود در اسانس در این تحقیق با افزایش مقدار تنش شوری کاهش می‌یابد و مقدار ژرانیول و ژرانیل استات با افزایش تنش شوری بیشتر می‌شوند به‌طوری‌که بیشترین مقدار این ترکیبات به ترتیب با کاربرد آسکوربیک اسید و هیومیک اسید ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد.

References

1. Abd El-Baky, HH. and El-Baroty, GS. 2008. Chemical and biological evaluation of the essential oil of Egyptian Moldavian balm. Advances in food sciences, 30(3): 170-175.
2. Afzali, SFAD., Shariatmadari, H., Hajiabbasi, MA. and Moatar, F. 2007. Salinity and drought stresses effects onflower yield and flavonol-o-glycosides in Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Iranian Journal of Medicinal andAromatic Plants, 3(37): 382-390. (In Persian)
3. Albayrak, S. and Camas, N. 2005. Effects of different levels and application times of humic acid on root and leaf yield and yield components of forage turnip (*Brassica rapa* L.). Journal of Agronomy, 4:130-133.
4. Ameri, AA., Nasiri-Mahallati, M. and Rezvani-Moghaddam, P. 2008. The effect of different amounts of nitrogen and plant density on nitrogenuse efficiency, yield and active ingredients of marigold plant (*Calendula afficinalis* L.). Iranian Journal of Field Crops Research, 5(2): 315-325.
5. Amini, F. and Ehsanpour, AA. 2004. Selection of salt tolerant cell lines from cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa*). Journal Science, 5:145-150.
6. Amiri, H. and gasemi, Z. 2018. The effects of salinity on chemical composition of essential oil of *Satureja rechingeri*. Journal of Plant Researches, 31(2): 505-515.
7. Ashraf, M. and Akhtar, N. 2004. Influence of salt stress on growth, ion accumulation and seed oil content in sweet fennel. Bologna Plantarum, 48(3): 461-464.
8. Ashraf, M., Mukhtar, N., Rehman, S. and Rha, ES. 2004. Salt-induced changes in photosynthetic activity and growth in a potential medicinal plant Bishop's weed (*Ammimajus* L.). Photosynthetica, 42(2): 543-550.
9. Badran, F.S. and Safwat, MS. 2004. Response of fennel plants to organic manure and bio-fertilizers in replacement of chemical fertilization. Egyptian Journal of Agricultural Research, 82(2): 247.
10. Barrett-Lennard, EG. 2003. The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. Plant and Soil, 253(1): 35-54.
11. Darzi, MT., Ghalavand, A., Sefidkon, F. and Rejali, F. 2007. The effects of

mycorrhiza, vermicompost and phosphaticbiofertilizer application on quantity and quality of essential oil in Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(4): 396-413. (In Persian).

12. Dastmalchi, K., Dorman, HD., Koşar, M. and Hiltunen, R. 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. LWT-Food Science and Technology, 40(2): 239-248.
13. Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E. and Alvino, A. 2005. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. Agronomy for sustainable Development, 25(2): 183-191.
14. Ertani, A., Pizzeghello, D., Baglieri, A., Cadili, V., Tambone, F., Gennari, M. and Nardi, S. 2013. Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. Journal of Geochemical Exploration, 129:103-111.
15. Fabriki ourang, S. and davoodnia, B. 2018. Changes in growth characteristics and secondary metabolites in *Thymus vulgaris* L. under moderate salinity and drought shocks. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 6(2): 27-39.
16. Farooqi, AHA., Fatima, S., Khan, A. and Sharma, S. 2005. Ameliorative effect of chlormequat chloride and IAA on drought stressed plants of *Cymbopogon martinii* and *C. winterianus*. Plant growth regulation, 46(3): 277-284.
17. Fatima, S., Farooqi, AA. and Sharma, S.2002. Physiological and metabolic responses of different genotypes of *Cymbopogon martinii* and *C. winterianus* to water stress. Plant growth regulation, 37(2): 143-149.
18. Flexas, J. and Medrano, H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. Annals of botany, 89(2): 183-189.
19. Gorgini, SH., Fakhri, BA. and Mohammadpor, VR. 2016. Effects of different levels of salinity and drought stress on growth parameters and essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Crop Science, 4(46): 673-686. (In Persian)
20. Hamada, A. and Al-Hakimi, A. 2009. Exogenous ascorbic acid or thiamine increases the resistance of sunflower and maize plants to salt stress. Acta Agronomical Hungarica, 57(3): 335-347.
21. Hassani, A. 2002. Investigate the effects of drought and salinity-induced morphological and physiological sodium chloride on some varieties of basil Kshkny Lulu. Ph.D. Thesis, Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University.
22. Holm, Y., Hiltunen, R. and Nykanen, I. 1988. Capillary gas chromatographic -mass spectrometric determination of the flavour composition of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). Flavour and fragrance Journal, 3(3):109-112.
23. Hosseini, H., Mousavi-Fard, S., Fatehi, F. and Qaderi, A. 2016. Changes in phytochemical andmorpho - physilogical traits of Thyme (*Thymus vulgaris* CV Varico 3) under different salinity levels. Journal of Medicinal Plants, 16(1): 1-13.
24. Hussein, M.S., EI-Sherbeny, S.E., Khalil, MY., Naguib, N.Y. and Aly, S.M. 2006. Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. Journal of Scientica Horticulture, 108: 322-331.
25. Jalalvand, A., Alibi, B. and Tavakoli, A. 2018. Evaluation the effects of cycocel and salicylic acid on some physiological characteristic and essential oil under normal and drought conditions in medical plant Dragonhed (*Dracocephalum moldavica* L.). Environment Stresses in Crop science, 24(4): 111-128. (In Persian)
26. Kamalizadeh, M., Bihamta, M.R., Peyghambari, SA. and Hadian, J. 2015. The effect of different levels of titanium dioxide nanoparticle on production of two major phenolic compounds in dragonhead herb (*Dracocephalum moldavica* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 31(3): 428-435.

27. Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, KG. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in Foeniculum vulgare mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresource Technology, 93(3): 307-311.
28. Khaled, H. and Fowey, HA. 2011. Effect of different levels of humic acids on the nutrient content. plant growth, and soil properties under conditions of salinity. Soil and Water Research, 6(3): 21–29.
29. Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K. and Khalighi A. 2010. The Effect of salinity stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). World Applied SciencesJournal, 11 (11): 1403-1407.
30. Maham, M., Akbari, H., and Delazar, A. 2013.Chemical composition and anti nociceptive effect of the essential oil of *Dracocephalum moldavica* L. Pharmaceutical sciences, 18(4): 187-192.
31. Masciandaro, G., Ceccanti, B., Ronchi, V., Benedicto, S. and Howard, L. 2002. Humic substances to reduce salt effect on plant germination and growth. Communications in soil science and plant analysis, 33(3-4): 365-378.
32. Morales, C., Cusido, RM., Palazon, J. and Bonfill, M. 1993. Response of *Digitalis purpurea* plants to temporary salinity. Journal of plant nutrition, 16(2): 327-335.
33. Mostafazade-Fard, B., Heidarpour, M., Aghakhani, A. and Feizi, M. 2007. Effects of Irrigation water salinity and leaching on soil chemical properties in an arid region. International Journal of Agriculture and Biology, 3:466-462.
34. Neffati, M. and Marzouk, B. 2008. Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. Industrial crops and products, 28(2): 137-142.
35. Niakan, M., Khavarinejad R. and Rezaei, MB. 2005. Effect of three ratios of fertilizer N, P, K on fresh weight, dryweight, leaf area and the essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). Medicinal and Aromatic Plants Research, 21(2): 148-131. (In Persian).
36. Nikolova, M.T. and Ivancheva, S.V. 2005. Quantitative flavonoid variations of *Artemisia vulgaris* L. and *Veronica chamaedrys* L. in relation toaltitude and polluted environment. Acta Biological Szeged sciences, 49(3-4): 29-32.
37. Olfa Baatour R., Kaddour W., Aidi Wannes, M. and Lachaal Marzouk B. 2009. Salt effects on the growth, mineralnutrition, essential oil yield and composition of marjoram (*Origanum majorana*). Acta Physiology Plantaroom, 10: 0374-4.
38. Petropoulos, SA., Dimitra, D., Polissiou, MG. and Passam, HC. 2008. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. Sciatica Horticulture, 115: 393-397.
39. Rahbarian, P. and Salehi Sardoei, A. 2014. Effects of drought stress and manure on dray herbyield and essential oil of Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in Jiroft area. International Journal of Bioscience, 4(9): 212-217.
40. Safikhani, F., Heydarye Sharifabadi, H., Siadat, A., Sharifi Ashorabadi, A., Syednedjad, M. and Abbazadeh, B. 2007. The effect of droughton yield and morphologic characteristics of *Deracoceohalum moldarica* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23(2): 183-194. (In Persian)
41. Said-Al Ahl, HAH. and Abdou, MAA. 2009. Impact of water stress and phosphorus fertilizer on fresh herb and essential oil content of dragonhead. International Agrophysics, 23: 403-407.
42. Said-Al Ahl, HAH., Sabra, AS., El Gendy, ANG., Aziz, EE. and Tkachenko, KG.2015. Changes in content and chemical composition of *Dracocephalum moldavica* L. essential oil at different harvest dates. Journal of Medicinal Plants Studies, 3(2): 61-64.
43. Sairam, R. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science-Bangalore, 86(3): 407-421.
44. Sebahattin, A. and Necdet, C. 2005. Effects of different levels and application times of humic acidon root and leaf yield and yield components of forage turnip

(*Brassica rapa* L.). Agronomy Journal, 4:130-133.
45. Singh, DV. and Anwar, M. 1985. Effect of soil salinity on herb and soil Yield quality of some *cymbopogon* sp. Journal of the Indian Society of Soil Science, 33:362.
46. Smirnoff, N. 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. Antioxidants and reactive oxygen species in plants, 53-86 pp.
47. Vaughan, D. and Linehan, D.J. 1976. The growth of wheat plants in humic acid solutions under axenic conditions. Plant and Soil, 44(2): 445-449.
48. Venskutonis, PR., Dapkevičius, A. and Baranauskienė, M. 1995. Flavour composition of some lemon-like aroma herbs from Lithuania. In Developments in food Science, 37: 833-847
49. Walker, D.J. and Bernal, M.P. 2008. The effects of olive mill waste compost and poultry manure on the availability and plant uptake of nutrients in a highly saline soil. Bioresearch Technology, 99: 396-403.

Phytochemical changes of *Dracocephalum moldavica* L. Essential oil under different salinity stresses and application of humic and ascorbic acid

Narimani, R.[1], Moghaddam, M.[*2], Ghasemi Pirbaloti, A.[3]

[1]Ph.D student., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[2]Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[3]Prof., Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received: 2018-9-10 ; Accepted: 2020-1-13

Abstract

Salinity is one of the most important ecological stresses which reduces productivity. Humic acid as an organic acid and ascorbate as a strong antioxidant can be effective in improving plant yield under salinity stress.In this study, to investigate the effect of ascorbic acid and humic acid on the amount and chemical constituents of essential oil (*Dracocephalum moldavica* L.) under salinity stress, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted at research greenhouse of faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Treatments included salinity at four levels (0, 50, 100 and 150 mM), humic acid and ascorbic acid at three levels (0, 100 and 200 mg / l).The aerial parts of plant in blooming were collected and were extracted by steam distillation method using Clevenger apparatus and its components were separated and identified by gas chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The essential oil content decreased with increasing salinity stress and application of salt stress moderators (ascorbic acid and humic acid) improved this trait. So that at 150 mM salinityit reached to the lowest level (0.2%) and application of 200 mg / l humic acid increased 51.61% of essential oil compared to control. Most of the essential oil constituents in control treatment (no use of moderators and no salinity conditions) were geranial (36.65%), neral (31.94%), geraniol (15.56%), geranyl acetate (0.66), Trans- 4,2- heptadienal (1/25%), linalool (1.09%), pulegone (0.95%) and verbenol (0.4%) which included 99.5% of the essential oil components respectively by 36.65, 31.94, 15.56, 11.66, 1.25, 1.09, 0.95 and 0.4 percent. In different levels of salinity stress with 100 mg/l of humic acid treatment and application of salt stress moderators (100 and 200 mg/l ascorbic acid and 200 mg/l of humic acid) a large number of combinations was observed compared to control treatment. These includedalpha-pinene, beta-pinene, camphene, camphor, alpha-thujone, nerol and thymol.

***Keywords*:**

Dracocephalum moldavica L., Essential oils, Geranial, Humic acid, Neral, Salinity, Neral.

[*]Corresponding author; m.moghadam@um.ac.ir