بررسی تغییرات فیتوشیمیایی عصاره گیاه دارویی *Cannabis sativa* L. در مرحله رشد رویشی تحت تاثیر تنش شوری

عطاالله ربانی[۱]، محمدرضا اردکانی[۲]، حسنعلی نقدی بادی[۳]*، شمسعلی رضازاده[٤]، منصور سراجوقی[٥]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزادسلامی، کرج، ایران

[۲]استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

[۳]دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

[٤]استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

[٥]استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزادسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۲/۹

چکیده

تنش‌های محیطی از جمله شوری بر میزان و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی تاثیر زیادی دارند. در این تحقیق به‌منظور بررسی تاثیر شوری بر خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه دارویی شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تیمار شوری (۰، ۲، ٤، ٦ و ۸ دسی زیمنس بر متر) و در سه تکرار در پژوهشکده گیاهان دارویی کرج در سال ۱۳۹۸ به اجرا در آمد. میزان عناصر پتاسیم و سدیم با دستگاه فلیم‌فتومتر و کلر به روش رنگ‌سنجی در اندام‌های برگ و ریشه گیاه و همچنین میزان ترکیبات کانابینوئیدی برگ گیاه شامل تتراهیدروکانابینول (THC[۱])، کانابیدول (CBD[۲]) و کانابیکرومن (CBC[۳]) با دستگاه GC/MS مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P\leq0.01$) بین تیمارهای مختلف شوری ازنظر میزان سدیم، پتاسیم، کلر و کانابینوئیدهای THC، CBD و CBC وجود داشت. با افزایش سطح شوری، میزان یون‌های سدیم و کلر در برگ و ریشه نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و بیشترین مقدار سدیم برگ و ریشه (به ترتیب ۱۵/۸۱ ، ۱٤/۰٦ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر مشاهده شد. همچنین افزایش غلظت شوری سبب کاهش پتاسیم برگ و ریشه گیاه شد و بیشترین میزان پتاسیم برگ و ریشه (به‌ترتیب ۳٤/۸۳، ۳٤/٤٦ میلی‌گرم در گرم) مربوط به تیمار شاهد بود. بیشترین میزان THC و CBD (به‌ترتیب ۷/۹٤ و ۱/٤٥ میلی‌گرم بر گرم گیاه خشک) در غلظت شوری ٤ دیسی زیمنس بر متر و بیشترین میزان CBC در شوری ۲ دیس زیمنس بر متر (۰/۰۱۲ میلی‌گرم بر گرم برگ خشک) به دست آمد. بنابراین شوری سبب تغییر میزان کانابینوئیدهای گیاه شاهدانه شده و بیشترین میزان THC، CBD و CBC در سطوح پایین شوری حاصل شده‌است.

واژه‌های کلیدی: تتراهیدروکانابینول، تنش شوری، شاهدانه، کانابیدول، کانابیکرومن، محتوای عناصر

۱. Δ9-tetrahydrocannabinol

۲. Cannabidiol

۳. Cannabichromene

*نویسنده مسئول: naghdi@imp.ac.ir

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) گیاهی یک‌ساله و علفی از خانواده Cannabaceae است که عموماً دوپایه می‌باشد و گل‌های نر و ماده آن بر روی پایه‌های جداگانه قرار دارند. عموما گل‌های نر شاهدانه زودتر ازگل‌های ماده آن تشکیل می‌شوند (Flores - Sanchez and Verpoorte, 2008). این گیاه در غالب مناطق گرم و معتدل کشت می‌شود و منشاء اولیه این گیاه در نقاط مرکزی آسیا بوده است (Asadi et al., 2019) که امروزه انواع خودرو آن در این مناطق رشد می‌کنند. ایران، افغانّستان، بخشی از جنوب قزاقستان و حتی سیبری موطن اصلی شاهدانه می‌باشد (Iran-nejad et al., 2007). ایران یکی از رویشگاه‌های مهم این گیاه می‌باشد و نمونه‌های خودرو و زراعی آن در مناطق مختلف ایران یافت می‌شوند و به همین سبب تنوع ژنتیکی گسترده‌ای از این گیاه در ایران وجود دارد (Saadati et al., 2013).

کانابینوئیدها ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که تنها در جنس شاهدانه شناسایی‌شده‌اند (Yoshimatsu and Kitazawa, 2004) و THC (دلتا ۹ تتراهیدروکانابینول)، و CBD (کانابیدیول)، از مهم‌ترین ترکیبات کانابینوئیدی می‌باشند. مقدار THC در بخش‌های مختلف گیاه متفاوت بوده و در سرشاخه‌های گل‌دار گیاه در بالاترین حد است (Asadi et al., 2021).

امروزه به سبب اثرات درمانی ترکیبات موثره گیاه شاهدانه، فرآورده‌های دارویی متعددی از این گیاه در دنیا وجود دارد. تاکنون اثرات درمانی متعددی مانند تسکین انواع دردهای مزمن و غیر مزمن و درمان تشنج، التهاب، اضطراب و تهوع از کانابیدیول گزارش شده است. همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌است که ترکیبات موثره این گیاه در درمان سرطان سینه و سایر سرطان‌ها و تعدیل علائم اسکیزوفرنی و ام. اس، میگرن و روماتیسم و بهبود نسبی علایم ایدز موثر می‌باشند (Asadi et al., 2019).

شرایط محیط رشد گیاهان دارویی بر میزان و کیفیت متابولیتهای ثانویه آنها تاثیر زیادی دارند و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و مسیرهای متابولیکی متناظر با آنها به شدت با شرایط رشد گیاهان ارتباط دارد (Behdad et al., 2020). شوری یکی از عوامل محیطی است که با تاثیر بر روی بیشتر فعالیت‌های مرفوفیزیولوژیکی، رشد و نمو گیاه را تغییر می‌دهد (Iraji Mareshk and Moghaddam, 2021). شوری با تاثیر بر روی جذب عناصر مختلف نظیر فسفر، پتاسیم و نیترات سبب کاهش رشد گیاه می‌شود. مسمومیت یونی و کمبود مواد معدنی که در شوری رخ میدهد سبب به هم خوردن توازن متابولیکی و در پی آن تنش می‌شوند (Aghdasi et al., 2019). شوری جذب عناصر غذایی را با اختلال مواجه می‌کند و رقابت یون سدیم با یون‌هایی مثل پتاسیم و کلسیم منجر به کمبود عناصر غذایی می‌شود (Said-Al Ahl and Omer, 2011).

شوری با کاهش محتوای آب گیاه، بطور غیرمستقیم روی رشد گیاه تاثیر می‌گذارد. با افزایش شوری و یا با افزایش نمک در محلول خاک، پتانسیل اسمزی خاک کاهش یافته و تنش کم آبی ایجاد می‌شود. این مسأله سبب اختلال در جذب آب لازم برای رشد گیاه شده و در نتیجه سرعت رشد گیاه کاهش می‌یابد و موجب تغییر در فرآیندهای متابولیک گیاه می‌شود (Munnas and Tester, 2008). همچنین با افزایش سدیم، کاتیون‌های دیگر در گیاه کاهش می‌یابند و سبب برهم خوردن تعادل کاتیونی گیاه شده و موجب کاهش میزان کلسیم، پتاسیم و منیزیم در گیاه می‌شود (Yan-de et al., 2007). در سطوح بالای شوری، مقدار یون پتاسیم به علت جایگزینی توسط یون سدیم کاهش یافته و این مسأله سبب اختلال در

تعادل یونی و سپس اختلال در متابولیسم سلولی می‌شود. زیرا پتاسیم در گیاه وظایف مهمی مانند باز و بسته شدن روزنه‌ها، فعال کردن آنزیم‌های فتوسنتزی و تنظیم اسمزی دارد. برخی از این وظایف به علت نقش پتاسیم در پتانسیل اسمزی سلول‌های محافظ و تغییر تورژسانس آن‌ها است (Hassibi et al., 2010).

در تحقیقی نشان داده شد که با افزایش سطوح شوری، میزان سدیم و کلر هم در ریشه و هم در ساقه بابونه بطور معنی‌داری افزایش یافته است ولی غلظت این عناصر در اندام هوایی بیشتر از ریشه بوده است (Baghalian et al., 2008). بررسی اثر شوری روی گیاه دارویی زنیان در یک آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که با افزایش سطح شوری، وزن‌تر و خشک‌ریشه و ساقه، میزان کلسیم و پتاسیم بطور معنی‌داری کاهش و میزان سدیم در اندام هوایی و ریشه بطور معنی‌داری افزایش یافته‌است (Ashraf et al., 2004). بهرحال در شرایط شور، عموما رشد گیاه کاهش می‌یابد که دلایلی متعددی دارد اما این کاهش رشد گیاه بیشتر ناشی از غلظت بالای یون سدیم، کلر و همچنین کمبود یون پتاسیم است (Zhang et al., 2010). مطالعات مختلفی در رابطه با تاثیر تنش شوری بر روی گیاهان مختلف و ازجمله گیاهان خانواده *Datura*، *Physalis*، *Hyoscyamus*، *Lycopersicon* و *Solanum* انجام شده است (Claussen, 2005; Bojović et al., 2010; Ali et al., 2011; Yildirim et al., 2011; Abdel Rahman et al., 2013; Gupta and Huang, 2014) نتایج نشان داده که میزان آلکالوئیدها در شرایط شوری افزایش‌یافته است.

به هرحال، گیاه دارویی شاهدانه به سبب داشتن ترکیبات کانابینوئیدی بسیار ارزشمند در صنایع دارویی، اهمیت زیادی در صنعت داروسازی دارد و تاکنون تاثیر شوری بر روی این گیاه دارویی و متابولیت‌های دارویی آن ارزیابی نشده است. با توجه به اهمیت دارویی شاهدانه و همچنین افزایش گستره اراضی شور در ایران و دنیا، در این مطالعه ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه شاهدانه در سطوح متفاوت شوری در مرحله رویشی مورد ارزیابی قرار گرفته‌است.

مواد و روش‌ها

در راستای بررسی تاثیر شوری بر ویژگی‌های فیتوشیمیایی در اندام‌های مختلف گیاه دارویی شاهدانه، مطالعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تیمار شوری (۰، ۲، ٤، ٦ و ۸ دسی زیمنس بر متر) و در سه تکرار در پژوهشکده گیاهان دارویی کرج واقع در هلجرد کرج (عرض جغرافیایی ۳۵ درجه، ٥٤ دقیقه و ۱۷ ثانیه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه، ۵۳ دقیقه و ۷ ثانیه و ارتفاع ١٤٦١ متر از سطح دریا) در بهار سال ۱۳۹۸ به اجرا در آمد. هر واحد آزمایشی شامل ۳ گلدان بوده و بذور در داخل گلدان‌ها کشت گردید. گلدان‌ها با مخلوطی از خاک مزرعه، خاک‌برگ، کود حیوانی و ماسه پر شده‌بودند. برای اعمال سطوح مختلف شوری، گلدان‌ها با آب محتوی سطوح مربوطه شوری آبیاری گردیدند. واحدهای آزمایشی (گلدان‌ها) در داخل گلخانه در شرایط کنترل‌شده نگهداری شدند. تیمار شور در گیاه از مرحله چهار برگی با توجه به نیاز گیاه هر ۳ روز یکبار تا مرحله هشت برگی انجام گردید. در طول آزمایش پس از هر بار آبیاری، EC و pH زه آب اندازه‌گیری و ثبت گردید. در پایان میزان عناصر سدیم، کلر و پتاسیم در اندام‌های مختلف گیاه و همچنین میزان آلکالوئیدهای THC، CBD و CBC اندازه‌گیری گردیدند.

اندازه‌گیری پتاسیم و سدیم: برگ‌های گیاه در مرحله هشت برگی بعد از برداشت در هوای آزاد کاملا خشک شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از هاون پودر شدند. ۰/۳ از نمونه‌های پودر شده را توزین کرده و به مدت ٦ ساعت در کوره با دمای ۵۰۰ درجه

سانتی‌گراد خاکستر شدند و سپس در ۵ میلی‌لیتر از اسید نیتریک ۲ مولار حل شدند. سپس حجم این محلول با آب مقطر دو بار تقطیر شده به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد و با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. سپس با دستگاه فلیم‌فتومتری (مدل PFP7 ساخت کمپانی JENWAY انگلستان) اندازه‌گیری شد (Chapman and Pratt, 1961).

اندازه‌گیری کلر: برای اندازه‌گیری میزان کلر، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده گیاه درون لوله فالکن ریخته‌شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید ۰/۵ مولار اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده‌شد و سپس عصاره‌گیری انجام شد. مقدار یک میلی‌لیتر از عصاره برای قرائت کلر طبق روش رنگ سنجی در طول‌موج ٤٨٠ نانومتر توسط دستگاه اپوچ استفاده شد (Munns and Tester, 2008).

استخراج ترکیبات کانابینوئیدی: برای استخراج کانابینوئیدها، ۲۵ گرم گیاه شاهدانه در ۵۰۰ میلی لیتر n-hexane به مدت ۱۰ روز خیسانده شد و سپس تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس برای آنالیز بعدی حلال آن تبخیر شد. برای آماده‌سازی نمونه جهت فرآیند کروماتوگرافی گازی – طیف سنجی جرمی (GC-MS)، ۵۰۰ میکرولیتر محلول به داخل ویال کروماتوگرافی ۲ میلی لیتری منتقل شد. ویال را در حمام داغ (۱۵۰ درجه سانتی‌گراد)به مدت ۱۲ دقیقه حرارت داد تا حلال تبخیر و دکربوکسیل شد. پس از آن باقیمانده در ۱,۵ میلی لیتر اتانول حل شده و تکان داده شد (Tayyab and Shahwar, 2015).

شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) متصل به طیف‌سنج جرمی (MS) انجام شد که مشخصات آن بشرح ذیل بود:

ستون: با طول ۱۵ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرون؛ فاز: ۵٪ دی فنیل – ۹۵٪ دی متیل پلی سیلوکسان؛ گاز: هیدروژن به عنوان گاز حامل ، با سرعت جریان ۱,۱ میلی لیتر در دقیقه ؛ دمای اتاقک تزریق: ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد؛ نسبت تقسیم: به صورت split ۱ به ۲۰؛ برنامه دمایی: دمای اولیه آون ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۲دقیقه توقف در این دما، افزایش دما به میزان ۱۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه تا ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه توقف در این دما؛ آشکارساز: MS 300 C، H؛ ۳۵ میلی‌لیتر در دقیقه ، هوا ۳۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه استاندارد داخلی: تریبنزیل آمین (TBA) در اتانول (۰,۵) میلی گرم در میلی لیتر؛ مقدار تزریق نمونه : ۱,۵ میکرولیتر، به صورت Split بود.

نتایج

میزان سدیم برگ و ریشه: نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها شوری ازنظر میزان سدیم برگ و ریشه در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱) و افزایش غلظت شوری سبب افزایش سدیم برگ و ریشه گیاه شد. بیشترین مقدار سدیم برگ (۱۵/۸۱ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و کمترین مقدار آن (۲/۲٦ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شاهد گزارش شد. همچنین بیشترین مقدار سدیم ریشه (۱٤/۰٦ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد (۲/۲۱ میلی‌گرم در گرم) گزارش شد (شکل ۱).

میزان پتاسیم برگ و ریشه: بین تیمارهای شوری ازنظر میزان پتاسیم برگ و ریشه تفاوت معنی‌داری ($P\leq0.01$) وجود داشت (جدول ۱). با افزایش سطح شوری، مقدار پتاسیم برگ و ریشه گیاه کاهش یافت. بیشترین مقدار پتاسیم برگ (۳٤/۸۳ میلی‌گرم در گرم)

در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن (۲۰/۳۳ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر گزارش شد. همچنین بیشترین مقدار پتاسیم ریشه (۳٤/٤٦ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر (۲۰/۳۳ میلی‌گرم در گرم) مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه شاهدانه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		سدیم برگ	سدیم ریشه	پتاسیم برگ	پتاسیم ریشه	کلر برگ	کلر ریشه
تکرار	۲	۰/۸٤ ns	۱/۱٤ ns	۲/٦ ns	۱/۱۸ ns	٤/۰٦ ns	٥/۰۱ ns
شوری	٤	۱۰۱ **	۷۰/۹ **	۱۲۱/۹ **	۱٦/۹ **	۱٥٤۹ **	۲٥۸٦ **
خطا	۸	۰/٦٥	۰/٦۳	٤/۰۱	۱/۲۱	۹/۰٦	۲۳/۱۹
ضریب تغییرات		۱۱/۸	۱۲/۱	٦/٦	۳/۳	۹/۱۹	۹/۱

**: معنی‌دار در سطح ۱٪، *: معنی‌دار در سطح ٥٪، ns: غیر معنی‌دار.

جدول ۲: تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه شاهدان

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		THC	CBD	CBC
تکرار	۲	۰/۲٦ ns	۰/۰۰٦ ns	۰/۰۰۰۰۰۰۰۳ ns
شوری	٤	۷/۰۸ **	۰/۲۸٥ **	۰/۰۰۰۰۱٤ **
خطا	۸	۰/۳٤	۰/۰۱	۰/۰۰۰۰۰۰۱
ضریب تغییرات		۱۰/۱۳	۱۰/۳۰	٤/٦۳

**: معنی‌دار در سطح ۱٪، *: معنی‌دار در سطح ٥٪، ns: غیر معنی‌دار.

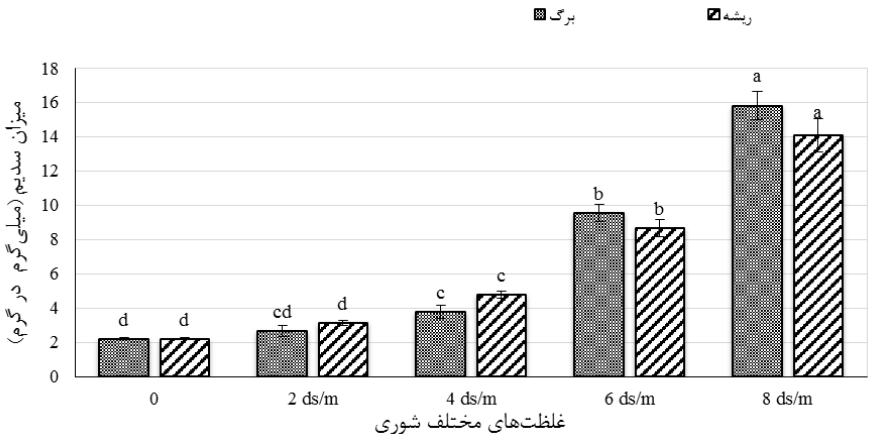
میزان کلر برگ و ریشه: ازنظر میزان کلر برگ و ریشه در بین تیمارهای شوری تفاوت معنی‌داری ($P\leq0.01$) وجود داشت (جدول ۱). نتایج نشان داد که افزایش غلظت شوری سبب افزایش مقدار کلر برگ و ریشه گیاه شد. بیشترین مقدار کلر برگ (۷۰/٦ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و کمترین مقدار آن (۱٤/۱ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شاهد گزارش شد. همچنین بیشترین مقدار کلر ریشه (۹۲/٦ میلی‌گرم در گرم) در تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد (۲۱/۲ میلی‌گرم در گرم) گزارش شد (شکل ۳).

میزان کانابینوئیدهای THC، CBD و CBC: آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه نشان‌دهنده وجود ترکیبات کانابینوئیدی مختلف در گیاه می‌باشد(شکل ٤). تجزیه واریانس نتایج نشان داد شوری تاثیر معنی‌داری ($P\leq0.01$) بر میزان کانابینوئیدهای تتراهیدروکانابینول (THC)، کانابیدول (CBD) و کانابیکرومن (CBC) داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر شوری بر میزان THC نشان داد که با افزایش سطح شوری از صفر به ٤ دیسی زیمنس بر متر میزان THC افزایش یافت و به‌تدریج با افزایش شوری (٦ و ۸ دیسی زیمنس بر متر) این میزان کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان THC در شوری ٤ دیسی زیمنس بر متر (۷/۹٤ میلی‌گرم بر گرم گیاه خشک) و کمترین مقدار در شوری ۸ دیسی زیمنس بر متر (٤/۱۲ میلی‌گرم بر گرم گیاه خشک) به دست آمد (شکل ٥).

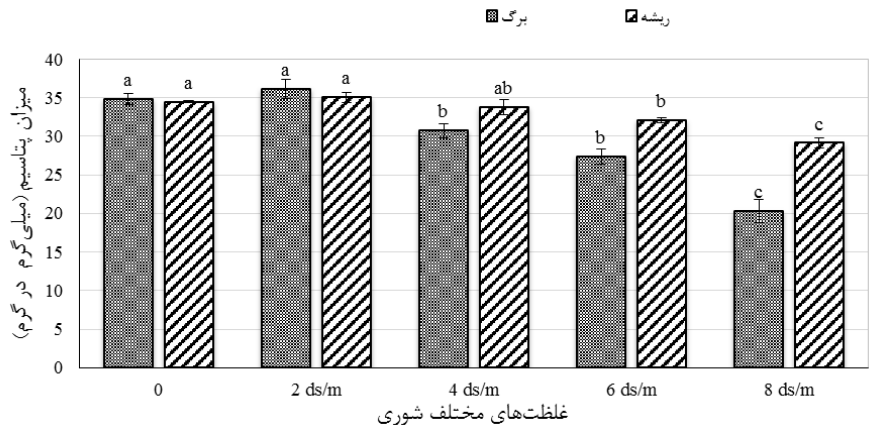
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان دادند با افزایش غلظت شوری، مقدار کانابیدول (CBD) در گیاه شاهدانه افزایش یافت به‌طوری‌که در غلظت ٤ دسی زیمنس بر متر بیشترین مقدار (۱/٤٥ میلی‌گرم بر گرم گیاه خشک) و در تیمار شاهد (۰/۷۰ میلی‌گرم بر گرم

گیاه خشک) کمترین مقدار به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد تیمارهای شاهد، ٦ و ٨ دیسی زیمنس بر متر از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند و بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ٦).

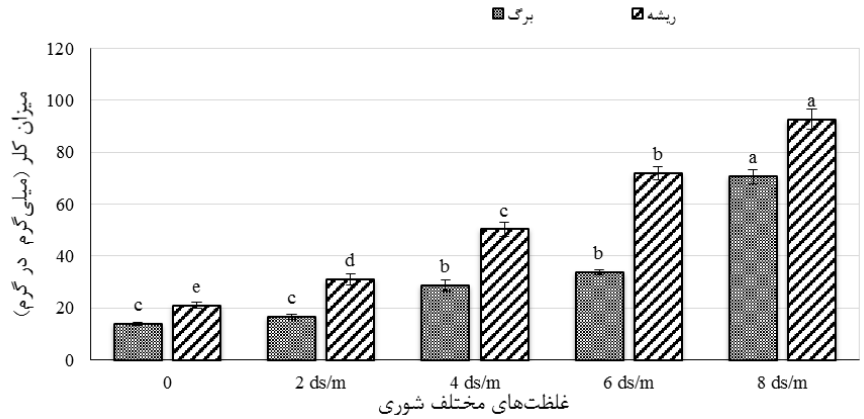
مقایسه میانگین اثر سطوح شوری بر میزان CBC در گیاه شاهدانه نشان داد که با افزایش سطح شوری از صفر به ۲ دسی زیمنس بر متر میزان CBC افزایش یافت و به‌تدریج با افزایش غلظت شوری (٤، ٦ و ٨ دیسی زیمنس بر متر) این میزان کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان CBC در شوری ۲ دیسی زیمنس بر متر (۰/۰۱۲ میلی‌گرم بر گرم گیاه خشک) و کمترین مقدار در شوری ٨ دیسی زیمنس بر متر (۰/۰۰٦ میلی‌گرم بر گرم گیاه خشک) به دست آمد. همچنین با توجه به نتایج مشخص شد که بین غلظت‌های شوری ٦ دیسی زیمنس و ٨ دیسی زیمنس بر متر تفاوت معنی‌داری دیده نشد در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۷).



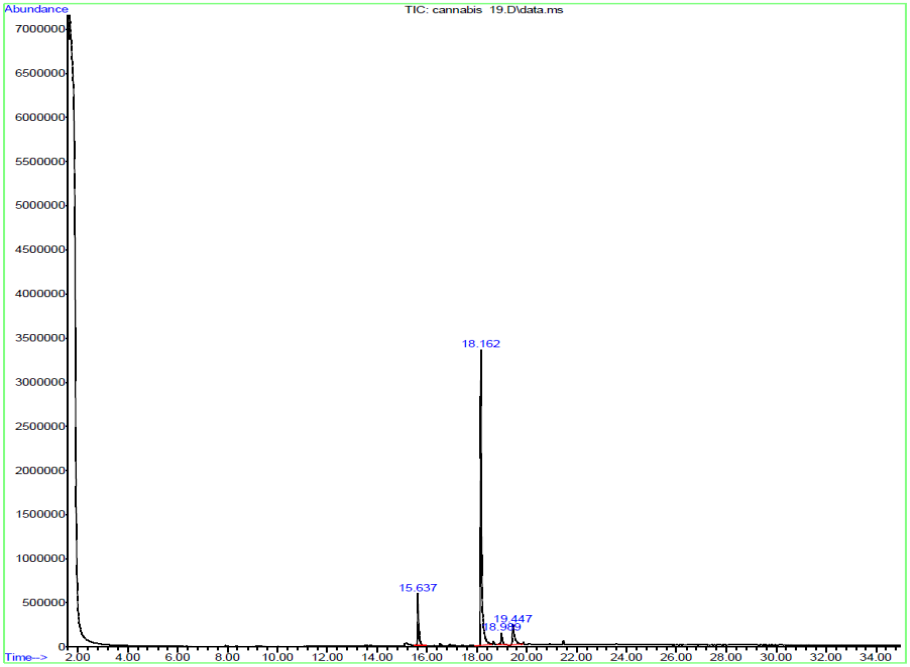
شکل ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان سدیم در گیاه شاهدانه



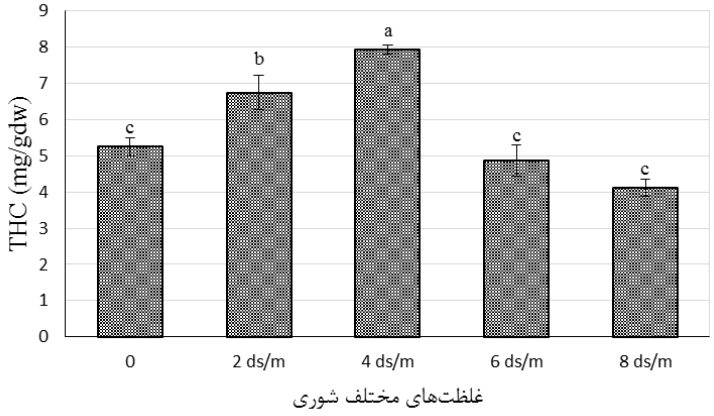
شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان پتاسیم در گیاه شاهدانه



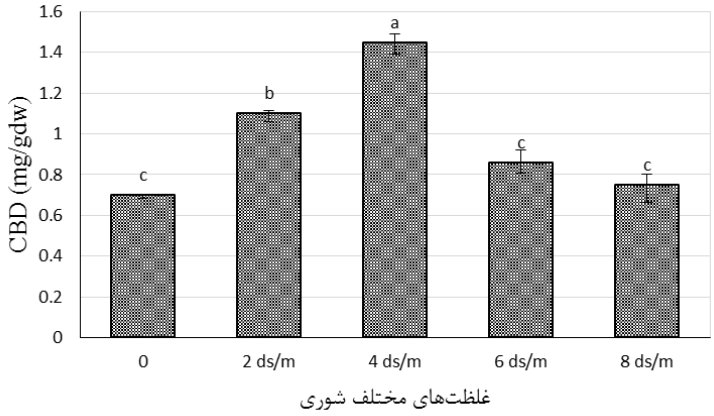
شکل ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان کلر در گیاه شاهدانه



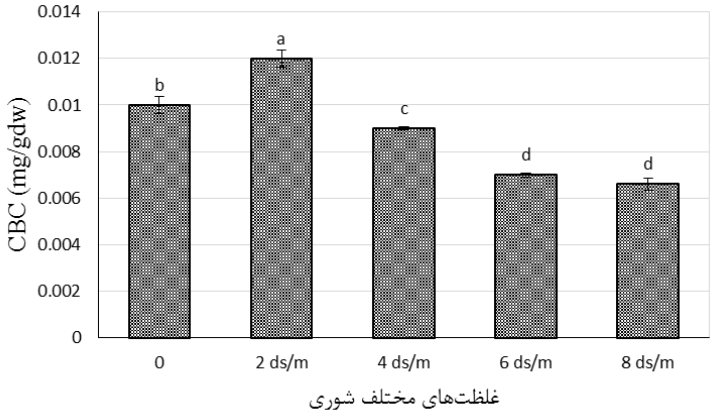
شکل ٤: کروماتوگرام ترکیبات کانابینوییدی عصاره برگ گیاه شاهدانه



شکل ٥: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان تتراهیدروکانابینول (THC) در گیاه شاهدانه



شکل ٦: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان کانابیدول (CBD) در گیاه شاهدانه



شکل ۷: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر میزان کانابیکرومن (CBC) در گیاه شاهدانه

بحث

بطورکلی نتایج نشان داد که شوری بر میزان سدیم، پتاسیم و کلر اثر معنی‌داری ($P\leq0.01$) داشته است و با افزایش سطوح شوری، میزان پتاسیم کاهش و میزان سدیم و کلر افزایش یافته‌است. شوری با ایجاد عدم تعادل یونی و دسترسی کم به آب سبب تنش یونی و تنش اسمزی می‌شود (Passamani et al., 2017) و سبب افزایش غلظت سدیم و کلرید در سیتوزول می‌شود که به طور بالقوه به سلول و در نتیجه گیاه آسیب می‌رساند. همچنین افزایش سطوح شوری باعث کاهش جذب کلسیم، منیزیم و پتاسیم می‌شود که این یون ها از عناصر اصلی و ضروری هستند که رشد و نمو گیاه نقش کلیدی دارند (Ghassemi and Raei, 2021).

در مطالعه حاضر نیز با افزایش شوری مقدار پتاسیم برگ و ریشه شاهدانه کاهش یافت. پتاسیم از عناصر غذایی پرمصرف است که نقش زیادی در واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی به‌خصوص شوری دارد. افزایش میزان جذب پتاسیم از طریق ریشه می‌تواند اثرات منفی یون سدیم را کاهش دهد. از آنجاییکه پتاسیم موجب پایین نگه‌داشتن پتانسیل اسمزی سلول‌های ریشه می‌شود، برای حفظ و ایجاد فشار تورژسانس و تنظیم تعادل آبی گیاه نقش کلیدی دارد (Yan-de et al., 2007). بهرحال یکی از اثرات

شوری، کاهش دسترسی به مواد غذایی ضروری مانند پتاسیم می‌باشد و با کاهش فشار تورگر سلولی سبب کاهش رشد گیاه می‌شود (Ghassemi and Raei, 2021).

نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه اثر شوری بر روی گیاه آتریپلکس (Khan et al., 2000) و بابونه (Baghalian et al., 2008) مطابقت داشت. بهرحال شوری جذب مواد غذایی را با مانع مواجه می کند و باعث عدم تعادل محتوای مواد معدنی در گیاه می شود و معمولا غلظت زیاد نمک باعث جلوگیری از جذب آهن، کلسیم ، پتاسیم ، روی ، بر و منیزیم می شود. شوری در برگها عموما باعث کاهش محتوای N، K و Zn و در ریشه ها باعث کاهش P، K، Ca و Mg می‌شود که در نهایت سبب تغییر در رشد و سایر فعالیت‌های فیزیولوژیکی و ... می‌شود (Arif et al., 2020).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شوری بر میزان کانابینوئیدهای THC، CBD و CBC تاثیر معنی‌داری ($P\leq0.01$) داشته است. متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در سازگاری گیاهان به شرایط محیطی دارند و مقدار آنها در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی تجمع می‌یابد و این ترکیبات در گیاهان، نقش مهمی در رابطه گیاه با محیط نامطلوب دارند (Mahajan et al., 2020). بهرحال یکی از پاسخ‌های گیاهان در هنگام مواجهه شدن با تنش‌ها، افزایش القا متابولیسم ترکیبات فیتوشیمیایی و در نتیجه افزایش تولید این ترکیبات به عنوان ترکیبات دفاعی می‌باشد (Elhaak et al., 2014) و تحقیقات متعددی نشان داده است که ساخت ترکیبات فیتوشیمیایی توسط فاکتورهای محیطی مختلفی نظیر تنش شوری، خشکی و شدت نور تنظیم می‌شود (Muthulakshmi et al., 2015).

در مطالعه حاضر مقدار THC، CBD و CBC در تیمار شوری نسبت به تیمار شاهد افزایش‌یافته است. دایره محیطیه در ریشه محل ساخت آلکالوئیدها بوده و آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آن‌ها در این محل قرار دارند (Oksman Caldentey and Hiltunen, 1996). آلکالوییدها، متابولیت های ثانویه مهمی هستند که دارای خواص دارویی بسیار خاص و متنوع می‌باشند که از اسیدهای آمینه مانند اورنیتین، لیزین، فنیل آلانین، تریپتوفان، تیروزین، هیستیدین و اسید آسپارتیک مشتق می شوند. این آلکالوئیدها، اتم نیتروژن خود را از طریق ترانس آمیناسیون به دست می آورند و تولید آن‌ها طی تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌یابد (Mahajan et al., 2020). قبلا نیز گزارش شده است مقادیر آلکالوئیدهای گونه *Hyoscyamus muticus* و *Datura stramonium* تحت تنش شوری افزایش یافته است (Ali et al., 2011). همچنین اعمال تنش شوری در دو گونه از جنس *Datura* شامل *D. metel* و *D. stramonium* منجر به افزایش محتوای آلکالوئیدها گردید (Abdel Rahman et al., 2013). مقدار آلکالوئیدهای گیاه *Catharanthus roseus* به‌طور معنی‌داری در شرایط شوری افزایش یافت (Abdul Jaleel et al., 2008). بهرحال گیاهان برای مقابله با شوری، راهکارهای متعددی را بکار می‌برند که یکی از این راهکارها تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که در برخی از گیاهان گزارش شده است (Arif et al., 2020).

نتیجه‌گیری نهایی

بطورکلی نتایج نشان داد که میزان سدیم، پتاسیم، کلر و کانابینوئیدهای THC، CBD و CBC تحت تاثیر تیمارهای مختلف شوری قرار گرفتند و با افزایش سطح شوری، میزان یون‌های سدیم و کلر در برگ و ریشه نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و میزان پتاسیم برگ و ریشه گیاه کاهش یافت. بیشترین میزان THC و CBD در مرحله رشد رویشی گیاه در غلظت

شوری ٤ دیسی زیمنس بر متر و بیشترین میزان CBC در شوری ۲ دیس زیمنس بر متر حاصل شد. بنابراین در سطوح پایین شوری (کمتر از ٤ دسی زیمنس بر متر)، میزان کانابینوئیدهای گیاه شاهدانه شامل THC، CBD و CBC افزایش یافته است.

References

1. Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A. and Hayat, S. 2020. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 156: 64-77.
2. Abdel Rahman, R., Gomma, S.E., Abdelsalam, N.R., El-Wakil, H.M.F., Khaled, A.S. and Hassan, H. M. 2013. Effect of sodium chloride on tropane alkaloids accumulation and proline content in *Datura metel* and *D. stramonium* callus cultures. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 1:197-210.
3. Abdul Jaleel, Ch., Sankar, B., Sridharan, R.and Panneer Selvam, R. 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. Turkish Journal of Biology, 32:79-83.
4. Aghdasi, M, Fatemi, M. and Asadi A. 2019. The impact of salt stress on growth and some biochemical parameters of (*Echinaceae purpurea* L.). Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 53:1-15.
5. Ali, S.Gh., Rab, A., Khan, N.U. and Nawab, K. 2011. Enhanced proline synthesis may determine resistance to salt stress in tomato cultivars. Pakistan Journal of Botany, 43: 2707-2710.
6. Asadi, S., Moghadam, H., Naghdi Badi, H., Naghavi, M. and Salami, S.A. 2019. Review on agronomic, phytochemical and pharmacological aspects of cannabis (*Cannabis sativa* L.). J. Med. Plants, 18 (70):1-20.
7. Ashraf, M., Mukhtar, N., Rehman, S. and Rha E.S. 2004. Salt induced changes in photosynthetic activity and growth in a potential medicinal plant Bishop`s weed (*Ammi majus* L.). Photosynthetica. 42(4): 543-550.
8. Baghalian, K., Haghiry, A., Naghavi, M.R., and Mohammadi, A. 2008. Effect of saline irrigation on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.). Scientia Horticulturae, 116: 437-441.
9. Behdad, A., Mohsenzadeh, S., Azizi, M. and Moshtaghi, N., 2020. Salinity effects on physiological and phytochemical characteristics and gene expression of two *Glycyrrhiza glabra* L. populations. phytochemistry, 171: 112236.
10. Bojović, B., Delić, G., Topuzović, M. and Stanković, M. 2010. Effects of NaCl on seed germination in some species from families Brassicaceae and Solanaceae. Kragujevac Journal of Science, 32:83-87.
11. Chapman, H.D., and Pratt, P.F. 1961. Methods of analysis for soils, plants and waters. Division of Agric. Sci., University of California, Riverside, U.S.A. pp 161-175.
12. Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. Plant Science 168:241-248.
13. Elhaak, M.A., Abo-Kassem, E.M. and Saad-Allah, K.M. 2014. Effect of the combined treatment with sodium and calcium chlorides on the growth and medicinal compounds of *Cichorium* intybus. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3:613-630.
14. Ghassemi, S. and Raei, Y., 2021. Evaluation of ion content, productivity and essential oil quality of garlic under saline conditions and biochar and polyamine treatments. Journal of Food Composition and Analysis, 96: 103720.
15. Gupta, B. and Huang, B. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical and Molecular Characterization. International Journal of Genomics, 1-18.

16. Hassibi, P., Zandiehe, C., Ghaemmaghami, N., Rashidi Rezvan, N., Najafi, H. and Ghaemmaghami, F. 2010. Study of some physiological characteristcs of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under NaCl and CaCl2 salinity stress. Iranian Journal of Crop physiology, 2: 3-24.
17. Iraji Mareshk, M. and Moghaddam M. 2021. Physiological and biochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to mycorrhizal fungi application under salinity stress condition. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 60: 79-94.
18. Iran-nejad, H., Poshtkohi, M., Piri, P. and Javanmardi, Z. 2007. Medicinal plants crop: cannabis, Flaxseed and Castor. (Vol.1). Ayij Publication, Tehran. Iran. 128 p.
19. Jalali, S, Salami, S.A., Sharifi, M. and Sohrabi, S. 2019. Signaling compounds elicit expression of key genes in cannabinoid pathway and related metabolites in cannabis. Industrial Crops and Products, 133:105-10.
20. Khan, M.A., Ungar, I.A., and Showalter, A.M. 2000. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte *Suadea fruticosa* Forssk. J. Arid Environ. 45: 73–84.
21. Mahajan, M., Kuiry, R. and Pal, P.K., 2020. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 18 :100255.
22. Munnas, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59: 651-681.
23. Muthulakshmi, S.M., Gurulakshmi, S.G. and Rajathi, S. 2015. Effect of salt stress on physiological and biochemical characterization in *Solanum nigrum* L. International Journal of Science and Research, 4: 567-571.
24. Oksman Caldentey, K.M. and Hiltunen, R. 1996. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. Field Crops Research, 45: 57 - 69.
25. Passamani, L.Z., Barbosa, R.R., Reis, R.S., Heringer, A.S., Rangel, P.L., Santa-Catarina, C., Grativol, C., Veiga, C.F., Souza-Filho, G.A. and Silveira, V., 2017. Salt stress induces changes in the proteomic profile of micropropagated sugarcane shoots. PLoS One, 12(4): e0176076.
26. Saadati, A., Pourtahmasebi, K., Salami, S.A. and Oladi, R. 2013. Bast Fiber Properties of Six Iranian Hemp Population. Iranian Journal of Natural Resources, 68 (1): 121-132.
27. Said-Al Ahl, H.A.H. and Omer, E.A. 2011. Medicinal and aromatic plants production under salt stress: a review. Kerla Polonica, 57:72-87.
28. Tayyab, M. and Shahwar, D. 2015. GCMS analysis of *Cannabis sativa* L. from four different areas of Pakistan. Egyptian Journal of Forensic Sciences, 5(3): 114-125.
29. Yan-de, J., Zhen-Li, H.E. and Xiao-e, Y. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Journal of Zhejiang University Science, 8: 192-207.
30. Yildirim, E., Karlidag, H. and Dursun, A. 2011. Salt tolerance of physalis during germination and seedling. Pakistan Journal of Botany, 43:2673-2676.
31. Yoshimatsu, K., Iicla, O. and Kitazawa, T. 2004. Growth characteristics of *Cannabis sativa* cultivated in a phytotron and in the field. Bulletin on Natural Instruction of Health Science, 122: 16-20.
32. Zhang, J.L., Flowers, T.J. and Wang, S. M. 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. Plant Soil, 326: 45-60.

Study on phytochemical changes of *Cannabis sativa* L. extract at vegetative growth stage under salinity stress

Rabbani, A.[1], Ardakani, M. [1], Naghdi Badi, H.[2*], Rezazadeh, SH.[2], Sarajooghi, M.[1]

[1]PhD Student, Department of Agronomy, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
[2]Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
[3]Associate Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
[3]Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
[5]Assistant Professor, Department of Agronomy, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: 12-12-2020; Accepted: 29-4-2021

Abstract

Environmental stresses such as salinity have a great impact on the amount and quality of secondary metabolites of medicinal plants. To investigate the effect of salinity on phytochemical attributes of cannabis (*Cannabis Sativa* L.), an experiment in the form of a randomized complete block design with three replications and 5 salinity treatments (0, 2, 4, 6 and 8 dS/m) was conducted in 2019 in medicinal plants research center, Karaj, Iran. In this study, the amount of potassium (K) and sodium (Na) elements and chlorine (Cl) in leaf and root organs of the plant were measured by a flame photometer and colorimetric method, respectively. The content of cannabinoids compounds in leaves including tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) and cannabichromene (CBC) were measured by GC/MS. The results showed that there was a significant difference ($P \leq 0.01$) among different salinity treatments in terms of Na, K, Cl and cannabinoids THC, CBD and CBC. With increasing salinity level, the amount of Na and Cl ions in leaves and roots increased compared to the control treatment and the highest amount of leaf and root Na (15.81, 14.06 mg/g, respectively) was observed in salinity treatment of 8 dS/m . Also, increasing the salinity concentration caused a decrease in leaf and root K of the plant and the highest amount of leaf and root K (34.83, 34.46 mg / g, respectively) was related to the control treatment. The highest amount of THC and CBD (7.94 and 1.45 mg / g of dried plant, respectively) at salinity concentration of 4 dS / m and the highest amount of CBC at salinity of 2 dS / m (0.012 mg / g dry leaf) were obtained. Therefore, salinity changes the amount of cannabinoids in cannabis and the highest levels of THC, CBD and CBC are obtained at low salinity levels.

Keywords: *Cannabis sativa* L., Cannabichromene, Cannabidiol, Ion content, Tetrahydrocannabinol, Salinity stress.

*Corresponding author: naghdi@imp.ac.ir