

## بررسی تغییرات عصاره متانولی بذر خار مریم در شرایط تنش خشکی

راحله قنبری محب سراج<sup>۱</sup>، مسعود توحیدفر<sup>۲\*</sup>، مهدی بهنامیان<sup>۳</sup>، اسدالله احمدی خواه<sup>۴</sup>،  
سارا دژستان<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.  
۲- عضو هیئت علمی، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.  
۳- عضو هیئت علمی، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.  
۴- عضو هیئت علمی، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.  
۵- عضو هیئت علمی، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۱۷)

### چکیده

محتوای ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهان دارویی شامل فنل‌های کل، فلاونوئیدها، ترکیبات اسیدهای چرب و غیره عمدتاً تحت تاثیر تنش خشکی واقع می‌شوند. در این پژوهش، اثر سطوح مختلف تنش آبی (آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی، آبیاری در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و آبیاری در حد ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) بر میزان ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه دارویی خارمریم مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه‌گیری رطوبت خاک به روش وزنی انجام شد و تنش خشکی در مرحله گلدهی به مدت ۸ روز به گیاهان اعمال شد. سپس روغن‌گیری از بذور گیاهان به روش سوکسله و عصاره‌گیری به روش متانول صورت گرفت. در مرحله بعد ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره با استفاده از دستگاه GC-MS آنالیز شد. آنالیز پیک‌های GC-MS حاکی از وجود ۲۰ ترکیب در عصاره متانولی خارمریم بود. بیشترین ترکیب مشاهده شده در تیمارهای آبیاری در حد ظرفیت زراعی (۷۵/۸ درصد) و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی (۷۳/۷ درصد) مربوط به اولنیک‌اسید بوده درحالی‌که در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی مربوط به متیل‌لینولئات (۲۲/۵) بود. بجز اولنیک‌اسید که در دو تیمار ظرفیت زراعی و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین مقدار را داشت، سایر ترکیبات در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان را نسبت به دو تیمار دیگر به خود اختصاص دادند. با توجه به نتایج، تنش ملایم (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) باعث افزایش اغلب ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه می‌شود که احتمالاً به دلیل تنظیم اسمزی سلول در گیاه در شرایط کم آبی باشد، اما در شرایط تنش شدید (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) این ترکیبات کاهش داشتند که احتمالاً این متابولیت‌ها صرف‌تأمین انرژی برای رشد و زنده‌مانی گیاه شده‌اند. طبق نتایج این پژوهش، از آنجایی که بذر این گیاه دارای ترکیبات فیتوشیمیایی با اهمیتی از جمله اسیدهای چرب، فیتواسترول‌ها، متیل‌استرها، فلاونوئیدها و غیره می‌باشد، لذا می‌توان ترکیبات فوق‌را پس از استخراج و خلص‌سازی، در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و غیره استفاده نمود.

کلید واژگان: کم آبی، اسیدهای چرب، فیتواسترول‌ها، متیل‌استرها، فلاونوئیدها.

\* مسئول مکاتبات: m\_tohidfar@sbu.ac.ir

## ۱- مقدمه

گیاهان حاوی برخی ترکیبات فعال هستند که بعنوان محصولات طبیعی، ترکیبات فیتوشیمیایی یا متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند و تحت تاثیر شرایط محیطی مانند خشکی قرار دارند [۱]. تنش خشکی یا در دسترس بودن آب بعنوان عامل مهم غیرزنده در نظر گرفته می‌شود که بر رشد گیاه، نمو و فرآیندهای بیوشیمیایی مانند تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات آروماتیک تاثیر می‌گذارد [۲-۳]. در کنترل و مدیریت تولید محصولات کشاورزی، تنش خشکی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که رشد گیاه در سراسر جهان را تعیین می‌کند. محتوای ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهان دارویی شامل فنل‌های کل، فلاونوئیدها و ترکیبات اسیدهای چرب عمدتاً تحت تاثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند [۴-۵-۶]. تولید متابولیت‌ها توسط گیاهان بعنوان ظرفیت سازگاری آن‌ها در مقابله با عوامل استرس‌زا در طول تغییر محیط رشد محسوب می‌شود که ممکن است شامل تولید انواع ترکیبات شیمیایی پیچیده و تعامل پایداری ساختار و عملکرد از طریق فرآیندها و مسیرهای اعلان دهی باشد [۷]. خارمریم یا ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) متعلق به خانواده Asteraceae، گیاه دارویی مهمی است که ماده موثره بذر آن دارای فعالیت محافظت‌کنندگی کبد می‌باشد [۸]. خارمریم علاوه بر سیلی مارین که مهم‌ترین ترکیب فعال آن می‌باشد، دارای ترکیبات دیگری مانند اسیدهای چرب، هیدروکربن‌ها و استرها می‌باشد [۹]. اسیدهای چرب اشباع نشده موجود در بذر این گیاه، اجزای ضروری رژیم غذایی در بدن انسان می‌باشند [۱۰]. گزارش‌ها نشان می‌دهد که روغن گیاه خارمریم حاوی اسیدهای چرب ضروری و غیرضروری مانند لینولئیک‌اسید، اولئیک‌اسید، لینولئیک‌اسید، استئاریک‌اسید، پالمیتیک‌اسید و ترکیباتی مثل توکوفرول‌ها و فیتواسترول‌ها است که می‌تواند بعنوان روغن خوراکی مورد مصرف قرار گیرد [۱۱-۱۲].

در پژوهشی که توسط گلی و همکاران [۱۳] روی گیاه خارمریم انجام شد مشخص شد که میزان اسیدلینولئیک (۵۱/۲ درصد) و اولئیک (۲۸/۸ درصد) بیش از اسیدهای چرب دیگر است. در پژوهشی دیگر علی‌رضالو و همکاران [۱۴] میزان اسیدهای چرب روغن دانه ماریتیغال را اندازه‌گیری کرده و مشاهده کردند که در بین اسیدهای چرب اندازه‌گیری شده، بیشترین آن‌ها مربوط به لینولئیک‌اسید (۳۹ درصد) و اولئیک‌اسید (۳۶/۷ درصد) بود. سایر اسیدهای چرب شامل پالمیتیک‌اسید (۱۰/۱ درصد)، استئاریک‌اسید (۶/۸ درصد)، لینولئیک‌اسید (۳/۶ درصد)، آراشیدیک‌اسید (۲/۹ درصد) و بهنیک‌اسید (۰/۵۷ درصد) بودند. افزایش در مواد مؤثره توسط آبرئو و مازافرا [۱۵] در *Hypericum brasiliense* نیز گزارش شد. در برخی از گیاهان دارویی، تنش خشکی درصد متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد، زیرا در اثر تنش، به دلیل کاهش رشد، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید متابولیت‌های ثانویه شده و افزایش این مواد سبب جلوگیری از اکسیداسیون درون سلول‌ها می‌شود [۱۶]، اما عملکرد متابولیت‌های ثانویه تحت تنش خشکی به دلیل کاهش بیوماس تولیدی کاهش می‌یابد [۱۷]. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی (تنش ملایم، تنش شدید، بدون تنش) بر میزان ترکیبات عصاره متانولی گیاه خارمریم شامل اسیدهای چرب، فیتواسترول‌ها، متیل استرها، فلاونوئیدها و غیرهمی باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- محل انجام آزمایش

به منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان ترکیبات عصاره متانولی گیاه خارمریم، آزمایشی در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۷ در مزرعه دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.

### ۲-۲- تهیه و کشت بذر

بذور گیاه دارویی خارمریم از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد.

کاملاً تصادفی با ۴ تکرار بود. بذور خارمریم با فاصله ۲۵ سانتی متر در قسمت داغاب پشته ها در عمق ۳ سانتی متر کشت و به فاصله هر ۳ روز بطور کامل آبیاری گردید. پس از رشد گیاهان و رسیدن به مرحله گلدهی (۹۸ روز پس جوانه زنی)، تنش آبی روی آن ها اعمال گردید (شکل ۱).

مزرعه با مساحت حدود ۱۵۰ متر مربع و با بستر خاک رس، ماسه و خاکبرگ تهیه و سپس تعداد ۱۵ جوی و پشته به فاصله یک متر در آن ایجاد شد. مساحت هر جوی و پشته ۱۰ متر مربع بود. برای هر تیمار ۴ کرت در نظر گرفته شد و ۳ کرت برای ایجاد فاصله بین تیمارها استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک های

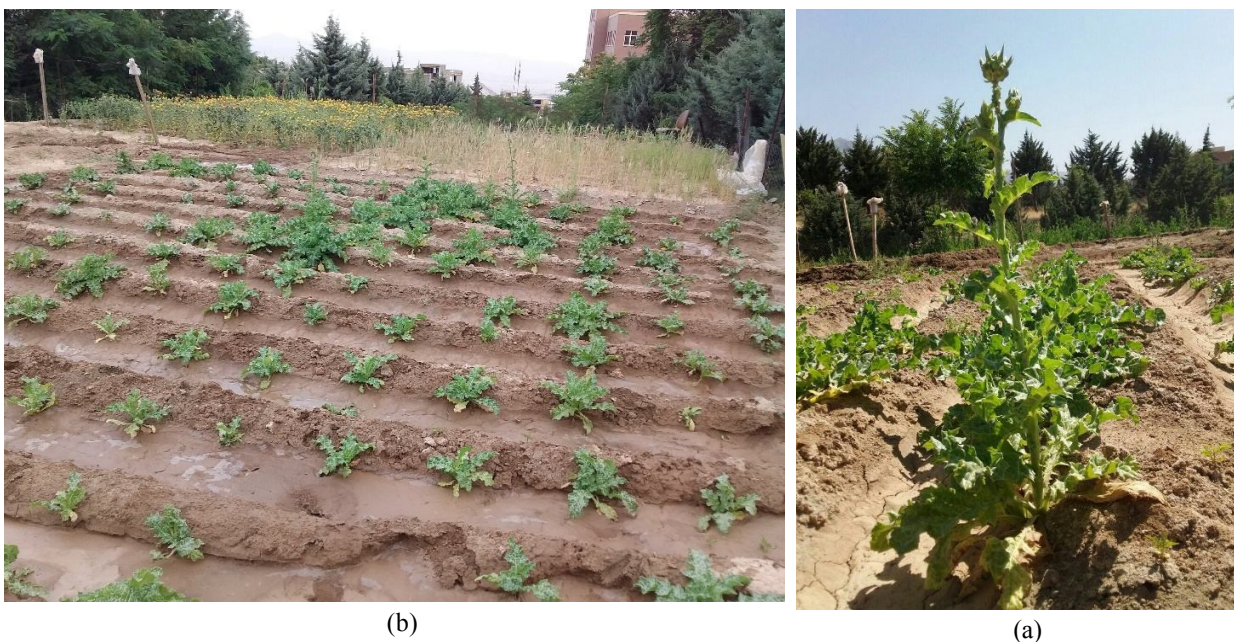


Fig 1 (a) Milk thistle plant at flowering stage (b) Milk thistle plant field.

آب آن به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی رسید، انجام شد. برای محاسبه میزان آب موجود در خاک ابتدا وزن تر خاک اندازه گیری شد سپس وزن خشک خاک نیز اندازه گیری و از وزن تر خاک کسر شد. این عمل به مدت ۸ روز انجام شد. در روز دوم خاک به ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی رسید و در روزهای چهارم و هشتم به ترتیب به ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی رسید [۲۰].

#### ۲-۴- اعمال تنش خشکی و نمونه برداری

به منظور اعمال تنش خشکی، نمونه های گیاهی مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (گیاه شاهد) به صورت یک روز در میان با ۲۵۰ لیتر آب (میزان آب تا پر شدن کامل جوی) آبیاری

#### ۲-۳- تعیین میزان رطوبت خاک

جهت تعیین میزان رطوبت خاک از روش وزنی استفاده شد [۱۸-۱۹]. بدین منظور، پس از آبیاری کامل و رسیدن رطوبت خاک به حد ظرفیت زراعی، هر روز به میزان یک کیلوگرم خاک در سه تکرار از نقاط مختلف زمین برداشته و توزین شد. سپس نمونه های خاک در آون بادامی ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و وزن آن ها اندازه گیری شد. زمانیکه خاک در سطح ظرفیت زراعی بود (مقدار رطوبت خاک پس از خارج شدن آب ثقلی، عدم چسبندگی) میزان آب آن در سطح ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و سپس نمونه برداری از خاک تا زمانی که میزان

متانول ۸۰ درصد اضافه شد و بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با همان شرایط قبلی عصاره‌گیری شدند و به عصاره اولیه اضافه شدند. سپس عصاره‌ها در هوای آزاد به مدت دو هفته تغلیظ شدند [۲۲].

## ۷-۲- آنالیز عصاره‌های پودری توسط دستگاه

### GC-MS

نمونه‌ها جهت انجام آنالیز عصاره پودری به آزمایشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شدند. تجزیه عصاره با دستگاه GC-MS (TRACE/DSQ, Thermo Finnigan, USA) مجهز به ستون DB1 به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. عصاره پودری در حلال n-هگزان حل شد و به مقدار ۱-۲ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. پس از دریافت نتایج GC-MS، داده‌ها و پیک‌های موردنظر در پژوهشکده گیاهان دارویی شهید بهشتی آنالیز شد. سپس، ترکیبات با بیشترین مقدار، شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند.

### ۳- نتایج

نتایج حاصل از GC-MS عصاره متانولی خارمریم بصورت پیک‌هایی با جرم‌های مولی متفاوت مشاهده شد (شکل ۲). به منظور شناسایی و اندازه‌گیری متابولیت‌ها، از کتابخانه طیفی حاوی اطلاعات مرجع استفاده شد و طیف‌های مشاهده شده با طیف‌های موجود در آن‌ها مقایسه شد. طبق شکل ۲ آنالیز پیک‌های GC-MS حاکی از وجود ۲۰ ترکیب در عصاره متانولی خارمریم بود.

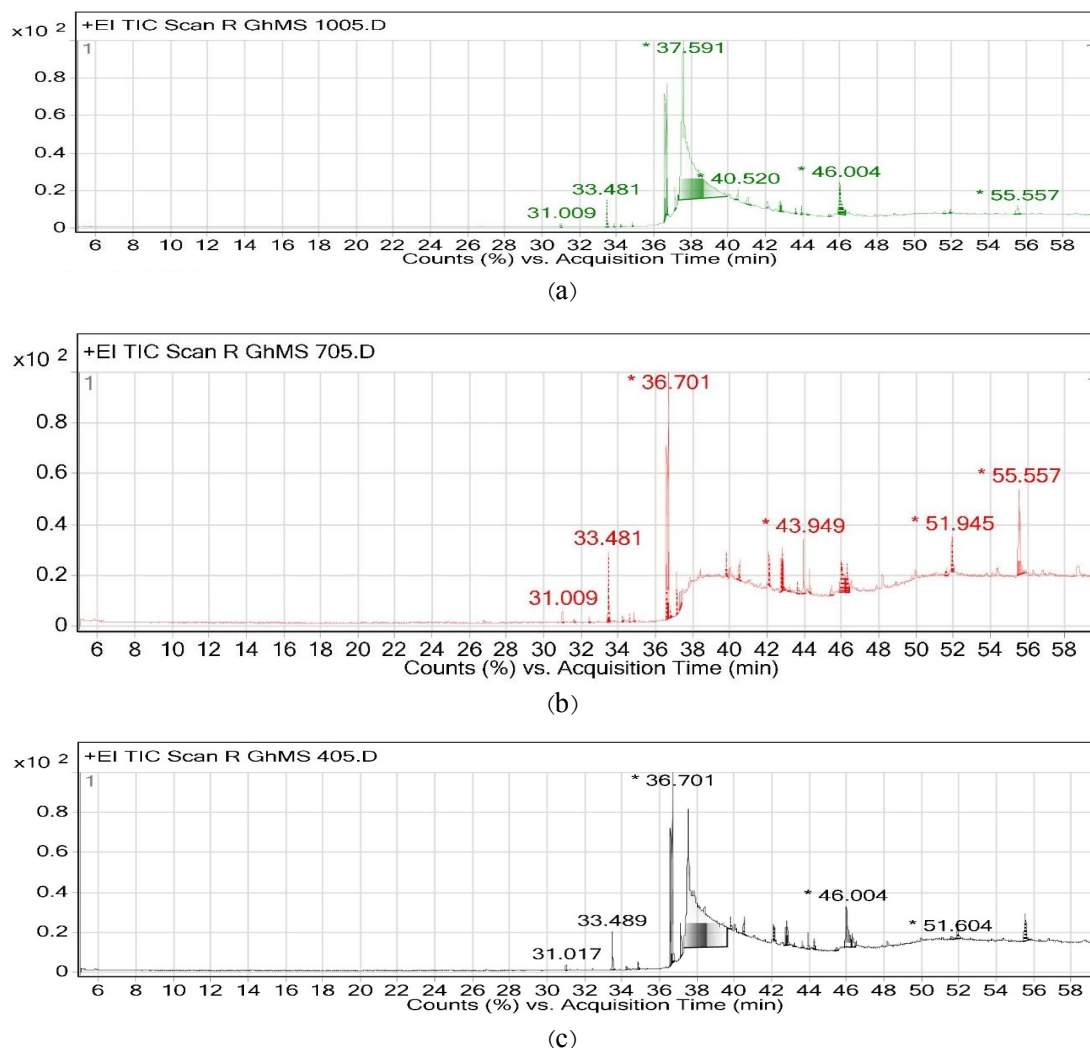
شدند و گیاهان مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به فاصله هر چهار روز با ۱۷۵ لیتر آب و نمونه‌های مربوط به تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به فاصله هر هشت روز با ۱۰۰ لیتر آب آبیاری شدند. پس از رسیدن به سطح تنشی موردنظر، گیاهان ۸ روز در این شرایط باقی ماندند و سپس نمونه‌برداری جهت استخراج عصاره انجام گرفت. برای این منظور، سه بوته گیاه (بعنوان تکرار) بطور تصادفی روی هر پشته انتخاب شده و بذره‌های آن‌ها پس از برداشت با هم ترکیب شده و به مدت یک ماه در دمای اتاق خشک شد [۱۸-۱۹].

## ۵-۲- استخراج عصاره روغنی بذور خارمریم

نمونه‌های بذر خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب به‌طور کامل پودر شده و استخراج عصاره روغنی گیاه با استفاده از دستگاه سوکسله انجام گرفت. بدین‌منظور به میزان ۱۰ گرم از پودرهای حاصل وزن شده و عصاره روغنی آن‌ها با استفاده از حلال هگزان استخراج شد. دمای مورد استفاده برای عصاره‌گیری ۷۰ درجه و مدت زمان عصاره‌گیری ۶ ساعت بود. پس از پایان کار شیر سوکسله بسته شد تا هگزان موجود در عصاره بخار شود. سپس پودر روغن‌گیری شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شد [۲۱].

## ۶-۲- استخراج عصاره متانولی بذور خارمریم

عصاره متانولی نمونه‌ها با استفاده از حلال متانول استخراج شد. بدین‌منظور ۲ گرم از پودر فاقد روغن نمونه‌ها وزن شده و به هر یک از آن‌ها ۲۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت دو روز توسط شیکر هم زده شد و بعد نمونه‌ها با کاغذ صافی صاف شدند، به باقیمانده ۲۰۰ میلی لیتر دیگر



**Fig 2** Chromatogram peaks obtained from GC-MS analysis in Milk thistle plant under drought stress. (a) Irrigation treatment at Field capacity (b) Irrigation treatment at 70% field capacity (c) Irrigation treatment at 40% field capacity.

ترکیبات غالب تشکیل دهنده عصاره گیاه شامل متیل پالمیتات (۱/۳-۶/۶)، متیل-۹-اکتادکنوات (۱۴/۷-۵/۲)، متیل لینولات (۶/۱-۲۲/۵)، متیل استئارات (۱-۳/۶)، اولئیک اسید (۰-۷۵/۸)، لینولئیک اسید اتیل استر (۰/۳-۳/۸)، گلیسرول بتا استئارات (۰/۶-۳/۸)، متیل بهنات (۰/۲-۱/۶)، فتالیک اسید، دیوکتیل استر (۰-۴/۸)، بتامونولینولئین (۵/۲-۱۰/۷) و کلسترول (۰-۴/۸) است.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای سطوح مختلف آبیاری (ظرفیت زراعی، ۷۰٪ ظرفیت زراعی و ۴۰٪ ظرفیت زراعی) از لحاظ مقادیر ترکیبات فیتوشیمیایی (جدول ۳) تفاوت معنی داری وجود داشت ولی بین بلوکها در هیچیک از ترکیبات اندازه گیری شده تفاوت معنی داری مشاهده نشد. نام هر یک از ترکیبات به همراه فرمول شیمیایی و درصد آنها در تیمارهای مختلف تنش خشکی در جدول ۲ ذکر شده است.

**Table 1** ANOVA analysis of some phytochemical compounds measured in Milk thistle

Sources of Variation	Block	Stress treatment	Error	coefficient of variation
df	3	2	6	
Octadecane	0.0378 <sup>ns</sup>	0.3675 <sup>**</sup>	0.0136	29.16
Methyl palmitate	2.361 <sup>ns</sup>	19.942 <sup>**</sup>	0.739	35.07
Methylx	0.0102 <sup>ns</sup>	0.0300 <sup>**</sup>	0.0011	26.66
Dibutyl phthalate	0.0200 <sup>ns</sup>	0.1575 <sup>**</sup>	0.0058	25.45
n-Eicosane	0.0377 <sup>ns</sup>	0.2325 <sup>**</sup>	0.0086	23.19
Methyl 9-octadecenoate	17.65 <sup>ns</sup>	64.96 <sup>**</sup>	2.41	24.04
Methyl linoleate	36.21 <sup>ns</sup>	182.98 <sup>**</sup>	6.78	28.37
Methyl stearate	0.881 <sup>ns</sup>	4.553 <sup>**</sup>	0.169	26.49
Oleic Acid	618 <sup>ns</sup>	4193 <sup>**</sup>	155	33.27
Eicosanoic acid, methyl ester	0.0725 <sup>ns</sup>	0.1575 <sup>**</sup>	0.0058	14.54
Linoleic acid ethyl ester	0.524 <sup>ns</sup>	8.693 <sup>**</sup>	0.322	46.31
Glycerol β-stearate	0.820 <sup>ns</sup>	6.367 <sup>**</sup>	0.236	32.37
Methyl behenate	0.1000 <sup>ns</sup>	1.3725 <sup>**</sup>	0.0508	37.57
Phthalic acid, dioctyl ester	1.078 <sup>ns</sup>	16.657 <sup>**</sup>	0.617	46.20
β-Monolinolein	12.144 <sup>ns</sup>	22.282 <sup>**</sup>	0.825	16.90
Cholesterol	0.650 <sup>ns</sup>	16.268 <sup>**</sup>	0.602	57.49
β-Sitosterol	8.42 <sup>ns</sup>	186.19 <sup>**</sup>	6.90	58.35
Butyl isobutyl phthalate	0.0125 <sup>ns</sup>	0.2700 <sup>**</sup>	0.0100	44.44
Hexadecanoic acid, 2-(octadecyloxy)ethyl ester	0.0378 <sup>ns</sup>	1.2675 <sup>**</sup>	0.0469	54.16
Methyl 18-methylnonadecanoate	0.0111 <sup>ns</sup>	0.1875 <sup>**</sup>	0.0069	41.66

<sup>\*</sup>significance at P<0.05, <sup>\*\*</sup>significance at P<0.01, <sup>ns</sup> no significance

**Table 2** Percentage composition of methanol extract of Milk thistle at different levels of drought stress

Extract components	Chemical formula	F.C	70%F.C	40%F.C
Octadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	0.2 <sup>b</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.2 <sup>b</sup>
Methyl palmitate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	1.3 <sup>b</sup>	6.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>b</sup>
Methylx	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Dibutyl phthalate	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	0.1 <sup>b</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.2 <sup>b</sup>
n-Eicosane	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	0.2 <sup>b</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.3 <sup>b</sup>
Methyl 9-octadecenoate	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	5.6 <sup>b</sup>	14.7 <sup>a</sup>	5.2 <sup>b</sup>
Methyl linoleate	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	6.1 <sup>b</sup>	22.5 <sup>a</sup>	7.8 <sup>b</sup>
Methyl stearate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	1.0 <sup>b</sup>	3.6 <sup>a</sup>	1.3 <sup>b</sup>
Oleic Acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	75.8 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	73.7 <sup>a</sup>
Eicosanoic acid, methyl ester	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	0.3 <sup>b</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>
Linoleic acid ethyl ester	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0.5 <sup>b</sup>	3.8 <sup>a</sup>	0.3 <sup>b</sup>
Glycerol β-stearate	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	0.6 <sup>b</sup>	3.8 <sup>a</sup>	1.3 <sup>b</sup>
Methyl behenate	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	0.3 <sup>b</sup>	1.6 <sup>a</sup>	0.2 <sup>b</sup>
Phthalic acid, dioctyl ester	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	0.4 <sup>b</sup>	5.3 <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>
β-Monolinolein	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	5.2 <sup>b</sup>	10.7 <sup>a</sup>	5.3 <sup>b</sup>
Cholesterol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	0.3 <sup>b</sup>	4.8 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
β-Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	0.9 <sup>b</sup>	16.4 <sup>a</sup>	0.4 <sup>c</sup>
Butyl isobutyl phthalate	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	0 <sup>b</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Hexadecanoic acid, 2-(octadecyloxy)ethyl ester	C <sub>36</sub> H <sub>72</sub> O <sub>3</sub>	0 <sup>b</sup>	1.3 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Methyl 18-methylnonadecanoate	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0.5 <sup>a</sup>

مقدار را داشت، سایر ترکیبات در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان را نسبت به دو تیمار دیگر به خود اختصاص دادند. مقدار کل سطح پیک در ترکیبات فیتوشیمیایی اندازه‌گیری شده در عصاره متانولی در تیمار ظرفیت زراعی، ۱۳۰/۷۲، در تیمار ۷۰٪ ظرفیت زراعی، ۴۳۹/۱۹ و در تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی، ۱۳۵/۳۴

بیشترین ترکیب مشاهده شده در تیمارهای آبیاری در حد ظرفیت زراعی (۷۵/۸ درصد) و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی (۷۳/۷ درصد) مربوط به اولئیک‌اسید بوده ولی در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی مربوط به متیل‌لینولئات (۲۲/۵) می‌باشد. بجز اولئیک‌اسید که در دو تیمار ظرفیت زراعی و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین

نسبت به دو تیمار دیگر بالاتر است (شکل ۳).

بود. همانطور که در شکل ۲ مشخص است مجموع ترکیبات فیتوشیمیایی در تیمار آبیاری در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی

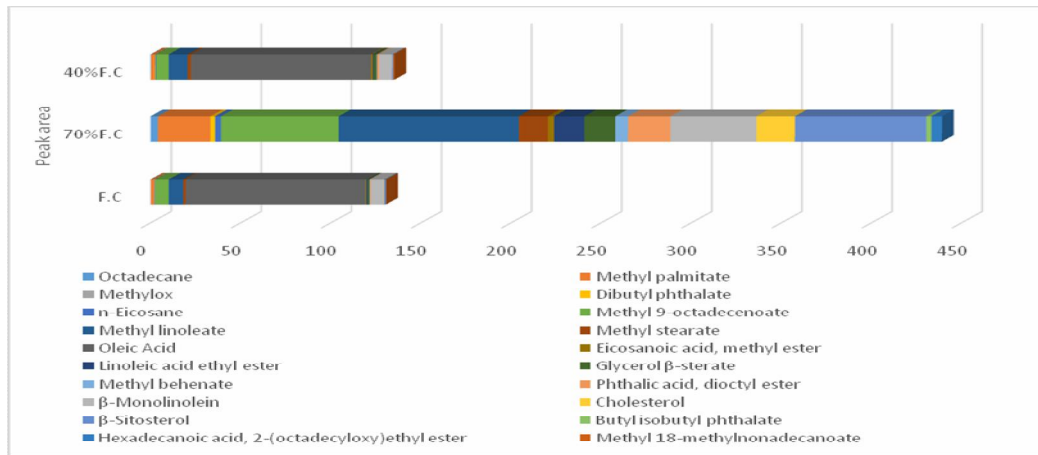


Fig 3 Phytochemical composition of Milk thistle in different levels of irrigation

پیام‌رسانی بواسطه چربی‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی رخ می‌دهد [۲۴]. علاوه بر نقش آن‌ها در پیام‌رسانی، چربی‌ها همچنین به عنوان کاهش دهنده شدت تنش عمل می‌کنند [۲۵-۲۶]. استرول‌های گیاهی، که بطور کلی به عنوان فیتواسترول‌ها شناخته می‌شوند، اجزای تشکیل دهنده لایه لیپید غشایی هستند. در هنگام استرس محیطی، گیاهان تمایل به تجمع استرول‌ها دارند که به نوبه خود نقش فیتواسترول‌ها را در مقاومت به تنش نشان می‌دهد [۲۷-۲۸].

با توجه به نتایج بدست آمده در این آزمایش، تیمار آبیاری ۷۰ درصد ظرفیت زراعی منجر به افزایش اغلب ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه می‌شود که احتمالاً به دلیل متعادل کردن تنظیم اسمزی سلول در شرایط کم آبی باشد، اما در شرایط تنش شدید این ترکیبات کاهش داشتند که به نظر می‌رسد این متابولیت‌ها صرفاً تامین انرژی برای رشد و زنده ماندن گیاه شده باشند. تیمار آبیاری در حد ظرفیت زراعی که بعنوان کنترل در این آزمایش استفاده شده بود، ترکیبات فیتوشیمیایی کمتری نسبت به تنش ملایم داشت.

مهم‌ترین ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده در عصاره متانولی خارمریم در این آزمایش شامل متیل پالمیتات، متیل ۹-اکتادکنوات، متیل لینولات، متیل استئارات، اولئیک‌اسید، لینولئیک‌اسید اتیل استر، متیل‌بهنات، فتالیک‌اسید، دیوکتیل استر، بتامونولینولین، کلاسترول و بتاسیتوسترول بود. ترکیبات شناسایی شده در عصاره خارمریم

با توجه به نتایج بدست آمده، تنش خشکی باعث کاهش ترکیبات فیتوشیمیایی تشکیل دهنده عصاره شده است. ترکیب غالب عصاره در تیمار آبیاری در حد ظرفیت زراعی و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی شامل اولئیک‌اسید می‌باشد، در حالیکه ترکیبات غالب عصاره در تیمار آبیاری ۷۰ درصد ظرفیت زراعی شامل متیل لینولات، بتا سیتواسترول، متیل ۹-اکتادکنوات، بتا مونولینولین، فتالیک‌اسید دیوکتیل استر و متیل پالمیتات می‌باشد. نتایج حاکی از بالا بودن تعداد و مقادیر ترکیبات عصاره خارمریم در تیمار آبیاری ۷۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به دو تیمار دیگر می‌باشد (شکل ۳).

#### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

خشکی به عنوان استرس چند بعدی شناخته می‌شود زیرا باعث تغییر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، زیست محیطی و مولکولی در گیاهان می‌شود [۲۳]. روغن گیاه خارمریم شامل اسیدهای چرب ضروری و غیرضروری، هیدروکربن‌ها، فلاونوئیدها، استرها و فیتواسترول‌ها است که می‌توانند در تنظیم اسمزی و مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی نقش داشته باشند. چربی‌ها ترکیبات اصلی و حیاتی سلولی هستند، زیرا پایه ساختار غشای سلولی و انرژی برای متابولیسم را فراهم می‌سازند. آن‌ها همچنین می‌توانند شرایط خارج سلولی را حس کنند.



در آرایه‌وپسیس تنظیم می‌کند [۴۳]. در پژوهشی که توسط گلی و همکاران [۱۳] روی گیاه ماریتیغال انجام شد مشخص شد که میزان اسید لینولئیک (۵۱/۲ درصد) و اولئیک (۲۸/۸ درصد) بیش از اسیدهای چرب دیگر است. لینولئیک اسید اتیل استر دارای خاصیت هیپوکلسترول، نماتدکش، ضدورم مفاصل، محافظت از کبد، ضد آندروژنیک، هیپوکلسترول، مهار کننده ۵-آلفا ردوکتاز، آنتی هیستامین، ضد انقباض، حشره‌کش، ضد آگزومی و ضد آکنه [۴۲]. ضد التهاب و پیشگیری کننده از سرطان می‌باشد [۴۳]. محققان مختلف این استر رادر گیاهان *Eichhornia crassipes* (۲۶/۲۶ درصد)، *Fluggea leucopyrus Willd.* (۵/۷۸ درصد)، *Rumex vesicarius L.* (۲/۸۱ درصد)، *Marchantia convolute* (۴/۶۳ درصد) گزارش کردند [۴۲-۴۴]. ترکیب متیل‌بنئات در گیاه *Globularia meridionalis* [۴۵] و *Magydaris tomentosa* [۴۶] شناسایی شده است. استرهای فتالیک اسید در گل‌های *Leea indica* بعنوان ترکیب عمده (۹۵/۶ درصد) بود و فعالیت ضدباکتری و ضدقارچی خوبی نشان داد [۴۷].

غشاهای اهداف اصلی فرآیندهای تخریب ناشی از تنش خشکی هستند و نشان داده شده است که در اثر تنش آب، کاهش محتوای لیپیدی غشا [۴۸-۴۹] با مهار بیوسنتز لیپید [۵۰ و ۵۱] و تحریک فعالیت‌های لیپولیتیک و پراکسیداتیو [۵۵-۵۲] همبستگی دارد. گیگون و همکاران [۵۶] نشان دادند تحت تنش خشکی محتوای کل لیپید برگ به تدریج کاهش می‌یابد. بتا سیتوسترول متعلق به گروه فیتواسترول‌ها است و حدود ۹۰ درصد فیتواسترول‌های گیاه را شامل می‌شود [۵۷]. فیتواسترول‌ها مولکول‌های استروئیدی مهم هستند که باعث استواری لایه‌های فسفولیپید غشاهای سلولی در گیاهان می‌شود، دارای عملکرد ساختاری و بیولوژیکی مشابه با کلسترول است و گروه عمده‌ای از ترکیبات فعال زیستی با فعالیت زیستی اثبات شده است [۵۸]. این ترکیب در گیاه *Clerodendrum hippophae rhamnoides* [۵۹]، *Moringa oleifera infortunatum L.* [۶۰]، گزارش شده است. بتا سیتوسترول به مدیریت پیری، هایپرلیپیدمی، جذب کلسترول و تنظیم سیستم ایمنی کمک می‌کند، همچنین برای درمان سرطان پستان و سرطان غده پروستات مفید است [۶۲-۶۳]. همچنین فیتواسترول‌ها به دلیل

علاوه بر نقش در تحمل شرایط نامساعد، بعنوان ترکیبات دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. متیل‌پالمیتات یک ترکیب گیاه شناسی رایج است که به‌طور طبیعی در بسیاری از گیاهان مشاهده می‌شود [۲۹]. اسیدهای چرب و استرهای متیل آنها دارای عملکرد سیستمیک هستند و سیستم عصبی و غدد را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۳۰]. نتایج حاصل نشان داد عصاره این گیاه دارای ترکیبات متیل‌پالمیتات (۳/۹۵ درصد)، متیل‌لینولات (۲/۹۶ درصد)، متیل‌استارات (۱/۲۱ درصد) و غیره می‌باشد. نتایج پیتو و همکاران [۳۱] حاکی از وجود متیل‌پالمیتات در سویا (۱۲/۷۱ درصد)، ذرت (۱۲/۹۲ درصد)، آفتابگردان (۶/۹۹ درصد) و *Annona cornifolia* (۱۶/۹ درصد) بود. از دیگر ترکیبات استخراجی از گیاه متیل-۹-اکتادکنوات می‌باشد که محققین مختلف وجود این ترکیب را در گیاهان *Tinospora cordifolia* به میزان ۱۹/۷۴ درصد [۳۲]، *Spirulina platensis* به میزان ۰/۶۰ درصد [۳۳]، *Calotropis procera* به میزان ۱۷/۹۸ درصد [۳۴]، *Cyperus articulatus L.* به میزان ۳/۳۳ درصد [۳۵] گزارش کردند. متیل‌لینولات پیش از این به‌منظور مهار تکثیر آزمایشگاهی لاین‌های سلولی تومور انسانی مورد بررسی قرار گرفته است [۳۶]. پیتو و همکاران [۳۷] بیان کردند متیل‌لینولات اثر ضدقارچی روی *P. brasiliensis* نشان داده است، آن‌ها همچنین دریافتند که این ماده منجر به تولید میزان قابل توجهی اکسیژن فعال نسبت به کنترل در آفتابگردان و ذرت شده است. پیتو و همکاران [۳۸] ترکیب متیل‌لینولات را در گیاهان سویا (۵۵/۶۷ درصد)، ذرت (۴۸/۳۸ درصد)، آفتابگردان (۶۵/۹۳ درصد)، *Annona cornifolia* (۱۹/۱ درصد) گزارش کردند. همچنین این ترکیب در گیاهان *Leonotis nepetifolia* (۴۶/۹۸ درصد) [۳۹]، *Melia azedarach L.* (۹/۸ درصد) [۴۰] و *Anacyclus cyrtolepidioides* [۴۱] مشاهده شده است. اولئیک اسید که از ترکیبات عمده استخراج شده از تیمارهای آبیاری در حد ظرفیت زراعی و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بوده استمی‌تواند به عنوان محرک آنزیم پیام‌رسان فسفولیپاز D (PLD) عمل کند که نقش ضد مرگ سلولی دارد [۴۲]. اولئیک اسید همچنین سطوح پروتئین مرتبط با نیتریک اکسید را تعدیل کرده و بنابراین پیام‌رسانی دفاعی بواسطه نیتریک اکسید را



- (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 86: 190-197.
- [7] Edreva A, Velikova V, Tsonev T, et al. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol.* 2008;34(1-2):67-78.
- [8] Abenavoli, L.; Izzo, A.A.; Milić, N.; Cicala, C.; Santini, A.; Capasso, R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother. Res.* 2018, 32, 2202-2213.
- [9] Ramasamy K, Agarwal R (2008). Multitargeted therapy of cancer by Silymarin. *Cancer Lett.*, 269: 352-362.
- [10] Huang MCH, Brenna JT (2001). On the relative efficacy of  $\alpha$ -linolenic acid and preformed docosahexaenoic acid as substrates for tissue docosahexaenoate during perinatal development. *Fatty Acids: Physiological and behavioral functions*, edited by David I. Mostofsky, Shlomo Yehuda, and Norman Salem Jr., 6: 99.
- [11] Fathi-Achachlouei, B. and Azadmard-Damirchi, S. 2009. Milk thistle seed oil constituents from different varieties grown in Iran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86: 643-649.
- [12] El-Mallah MH, El-Shami SM, Hassanein MM (2003). Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum* (L.) seed oil. *Grasasy Aceites*, 54: 397-402.
- [13] Goli, E., Kadivar, M., Bahrami, B. Sabzalian, M. 2007. Physical and chemical properties of Milk thistle seed oil. *Journal of Food Science and Technology*, 4 (4): 27-32.
- [14] Alirezalo, K., Hesari, J., Alirezalo, A., Mohammadi, M., Fathi Achachloo, B. 2010. Investigation of Physicochemical Characteristics and Fatty Acid Composition of Milk thistle Seed Oil, *Journal of Food Industry Research*, 21 (1): 25-33.
- [15] Abreu IN and Mazzafera P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant. Physiol. Biochem.* 2005; 43(3):241-248.
- [16] Selmar D and Kleinwächter M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Ind Crop Prod.* 2013; 42:558-568.
- خاصیت کاهش دهنده کلسترول اخیرا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۶۳-۶۴]. این ترکیب همچنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضد آرتروسکلروز می‌باشد [۵۷]. پیش از این ترکیبات فلاونوئیدی این گیاه توسط محققین مختلف استخراج شده و تاثیر آن در بیماری‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفته است اما ترکیبات روغنی آن زیاد مورد توجه نبوده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، از آنجایی که بذر این گیاه دارای ترکیبات با اهمیتی از جمله اسیدهای چرب، فیتواسترول‌ها، متیل‌سترها و غیره می‌باشد، لذا می‌توان با اعمال تنش ملایم، میزان ترکیبات فوق را افزایش داده و پس از استخراج، برای مصارف دارویی متعدد استفاده نمود.

## ۵- منابع

- [1] Ahmadian A, Ghanbari A, Siah SAR B, Haydari M, Ramroodi M, et al. (2011) Study of chamomiles yield and its components under drought stress and organic and inorganic fertilizers usage and their residue. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3(2): 23-28.
- [2] Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J, Shiranirad AH, Khalvati MA (2009) Medicinal and aromatic plants farming under drought conditions. *Journal of Horticulture and Forestry* 1(6): 086-092.
- [3] Tátrai ZA, Sanoubar R, Pluhár Z, Mancarella S, Orsini F, et al. (2016) Morphological and Physiological Plant Responses to Drought Stress in *Thymus citriodorus*. *International Journal of Agronomy* p. 8.
- [4] Saeidnejad AH, Kafi M, Khazaei HR, Pessarakli M (2013) Effects of drought stress on quantitative and qualitative yield and antioxidative activity of *Bunium persicum*. *Turkish journal of Botany* 37: 930-939.
- [5] Gnanasekaran N, Kalavathy S (2017) Drought Stress Signal Promote the Synthesis of more Reduced Phenolic Compounds (Chloroform Insoluble Fraction) in *Tridax procumbens*. *Free Radicals and Antioxidants* 7(1): 128-136.
- [6] Rajabbeigi E, Eichholz I, Beesk N, Ulrichs C, Kroh LW, et al. (2013) Interaction of drought stress and UV-B radiation-impact on biomass production and flavonoid metabolism in lettuce

- [26] Okazaki, Y., Otsuki, H., Narisawa, T., Kobayashi, M., Sawai, S., Kamide, Y., Kusano, M., Aoki, T., Hirai, M.Y. and Saito, K. 2013b. A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion. *Nature Communications*, 4:1510.
- [27] Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., Mongrand, S., Perrier-Cornet, J., Simon-Plas, F., 2008. Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22 (11), 3980e3991.
- [28] Kumar, Sujith & Ali, Kishwar & Dahuja, Anil & Tyagi, Aruna. (2015). Role of Phytosterols in Drought stress Tolerance in Rice. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale.* 96. 83-89. 10.1016/j.plaphy.2015.07.014.
- [29] Zhao, L., Clarke, S.R., Sun, J. 2009. Methyl Palmitate, an Acaricidal Compound Occurring in Green Walnut Husks. *J. Econ. Entomol.* 102(1): 196-202.
- [30] McFarlane, J. E. 1968. Fatty acids, methyl esters and insect growth. *Comp. Biochem. Physiol.* 24: 377-384.
- [31] Pinto, M.E., Araújo, S.G., Morais, M.I., Sá, N.P., Lima, C.M., Rosa, C.A., Siqueira, E.P., Johann, S., & Lima, L.A. (2017). Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 89 3, 1671-1681.
- [32] Sharma, Upendra & Bala, Manju & Verma, Praveen & Rampal, Geetanjali & Kumar, Neeraj & Singh, Bikram & Arora, Saroj. (2011). Antimutagenic extract from *Tinospora cordifolia* and its chemical composition. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4. 2488-2494.
- [33] Kumar, Vinay & Bhatnagar, A & Srivastava, J. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research.* 5. 10.5897/JMPR11.1175.
- [34] Verma, Suman & Gupta, Rajiv. (2013). Comparative estimation of  $\beta$ -sitosterol in roots, leaves and flowers of *Clerodendrum infortunatum* L.. *International Journal of Green Pharmacy.* 7. 131. 10.4103/0973-8258.116394.
- [35] Farrag, H.F. and Fawzy, M. 2012. 566.
- [17] Hendawy SF, Hussein MS, Youssef AA and EL-Mergawi RA. Respnse of *Silybum marianum* plant to irrigation intervals combined with fertilization. *Nusant Ara Bioscience.* 2013; 5:22-29.
- [18] Ahmadvpour, R., Armand, N., Hosseinzadeh, S. and Rigi, G. 2018. Effect of compost fertilizer on some photosynthetic parameters in three growth stages of lentil (*Lens culinaris* Medik) under drought stress. *Journal of Plant Research*, 31 (4): 916-926.
- [19] Rafiipour, M., Gholami, M. and Sarikhani, H. 2018. Effect of deficit irrigation on some morphological and physiological characteristics of three strawberry cultivars. *Journal of Plant Research*, 31 (4): 806-817.
- [20] Boutraa T, Akhkha A, Al-Shoaibi A, Alhejeli A (2010) Effect of water stress on growth and water use efficiency (WUE) of some wheat cultivars (*Triticum durum*) grown in Saudi Arabia. *J Taibah Univ Sci* 3:39-48. [https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60019-3](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60019-3)
- [21] Krzyczkowska, J., Kozłowska, M. Effect of Oils Extracted from Plant Seeds on the Growth and Lipolytic Activity of *Yarrowia lipolytica* Yeast. *J Am Oil Chem Soc* 94, 661–671 (2017) doi:10.1007/s11746-017-2975-1
- [22] Haji Aghaei, R., Reza Zadeh, Sh., Ghafarzadegan, R., Mohammadnejad, A. and Tavakoli, M. 2018. On the effect of solvent consumption, input feed and the method of oiling in three standardized silly marines., *Journal of Medicinal Plants*, 17 (2): 167-176.
- [23] Salehi-Lisar SY, Bakhshayeshan-Agdam H (2016) Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: Hossain, M.A., Wani, S., Burritt, D.J., Tran, L.S.P. (Eds.). *Drought Stress Tolerance in Plants* 1:1–16.
- [24] Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W. and Welti, R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research*, 45:250-278.
- [25] Gasulla, F., Vom Dorp, K., Dombrink, I., Zahringer, U., Gisch, N., Dörmann, P. and Bartels, D. 2013. The role of lipid metabolism in the acquisition of desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: a comparative approach. *The Plant Journal*, 75:726741.

- Vijayvergia, Rekha. (2015). GC-MS Analysis OF Bioactive Phytoconstituents From Rumex Vesicarius L.. International Research Journal of Pharmacy. 6. 269-272. 10.7897/2230-8407.06459.
- [44] Sudha T, Chidambarampillai S and Mohan V.R GC-MS Analysis of Bioactive Components of Aerial parts of *Fluggea leucopyrus* Willd. (Euphorbiaceae). J App Pharm Sci. 2013; 3 (05): 126-130.
- [45] Tundis, Rosa & Bonesi, Marco & Menichini, Federica & Loizzo, Monica & Conforti, Filomena & Statti, Giancarlo & Pirisi, Filippo & Menichini, Francesco. (2012). Antioxidant and Anti-cholinesterase Activity of *Globularia meridionalis* Extracts and Isolated Constituents. Natural product communications. 7. 1015-20.
- [46] Autore, G., Marzocco, S., Formisano, C., Bruno, M., Rosselli, S., Jemia, M. B., & Senatore, F. (2015). Cytotoxic activity and composition of petroleum ether extract from *Magydaris tomentosa* (Desf.) W. D. J. Koch (Apiaceae). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(1), 1571–1578. doi:10.3390/molecules20011571
- [47] Ramalakshmi, S., & Muthuchelian, K. (2011). Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Mallotus tetraococcus* (roxb.) Kurz, by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(6), 1449.
- [48] Pham-Thi AT, Borrel-Flood C, Vieira da Silva J, Justin AM, Mazliak P. 1985. Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochemistry* 24: 723–727.
- [49] Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Zuily Fodil Y, Ferrari-Iliou R, Vieira da Silva J, Mazliak P. 1993. Effect of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata* Plant Physiology and Biochemistry 31: 707–715.
- [50] Pham-Thi AT, Borrel-Flood C, Vieira da Silva J, Justin AM, Mazliak P. 1987. Effects of drought on [1-14C]-oleic and [1-14C]-linoleic acid desaturation in cotton leaves. *Physiologia Plantarum* 69:147–150.
- [51] Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Vieira da Silva J, Justin AM, Demandre C, Mazliak P. Phytoremediation Potentiality of *Cyperus articulatus* L., *Life Science Journal*, 9(4):4032-4040.
- [36] Lampronti I, Martello D, Bianchi N, Borgatti M, Lambertini E, Piva R, Jabbar S, Choudhuri Msk, Khan Th And Gambari R. 2003. In vitro antiproliferative effects on human tumor cell lines of extracts from the Bangladeshi medicinal plant *Aegle marmelos* Correa. *Phytomedicine* 10: 300-308.
- [37] Oliveira, Ana. (2015). GC-MS analysis of esterified fatty acids obtained from leaves of wild and cultivated specimens of *Leonotis nepetifolia*. *Journal of medicinal plant research*. 10.5897/JMPR2014.5550.
- [38] Hadjiakhoondi, A., Vatandoost, H., Khanavi, M., Sadeghipour Roodsari, H., Vosoughi, M., Kazemi, M., Abai, M. (2006). Fatty Acid Composition and Toxicity of *Melia azedarach* L. Fruits against Malaria Vector *Anopheles stephensi*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 97-102.
- [39] Hammami, Saoussen & Bergaoui, Afifa & Amel, Bouzidi & Ciavatta, Maria & Cimino, Guido & Abreu, Pedro & Gannoun, Sana. (2011). Isolation and Structure Elucidation of Flavonol Glycosides, Methyl linoleate and Fatty Acids from *Anacyclus cyrtolipidioides* (Pomel) Growing in Tunisia. *Analytical Chemistry Letters*. (5&6). 384-392. 10.1080/22297928.2011.10648242.
- [40] Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R. and Wang, X. 2003. The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H2O2-induced cell death in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15:2285-2295.
- [41] Mondul, AM., Moore, SC., Weinstein, SJ., Karoly, ED., Sampson, JN., Albanes, D. 2015. Metabolomic analysis of prostate cancer risk in a prospective cohort: the alpha-tocolpherol, beta-carotene cancer prevention (ATBC) study. *International Journal of Cancer*, 137:2124–2132.
- [42] Tyagi, Tulika & Mala, Agarwal. (2017). Phytochemical and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms.. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 6. 195-206.
- [43] Shah, Ankita & Singh, Tribhuwan &

- pharmaceutical technology & research. 4. 146-150. 10.4103/2231-4040.116783.
- [58] Azeez, Rand & Abaas, Ibrahim & Kadhim, Enas. (2018). Isolation and characterization of  $\beta$ -sitosterol from *elaegnus angustifolia* cultivated in iraq. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 11. 442. 10.22159/ajpcr.2018.v11i11.29030.
- [59] Sajfirtoová, M., Ličková, I., Wimmerová, M., Sovová, H., & Wimmer, Z. (2010).  $\beta$ -Sitosterol: Supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1842-1850.
- [60] Anwar, Farooq & Latif, Sajid & Ashraf, Muhammad & Gilani, Anwar-ul. (2007). *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy research : PTR*. 21. 17-25. 10.1002/ptr.2023.
- [61] Becker M, Staab D, Von Bergman K. Long-term treatment of severe familial hypercholesterolemia in children: Effect of sitosterol and bezafibrate. *Pediatrics* 1992;89:138-42.
- [62] Best MM, Duncan CH. Modification of abnormal serum lipid patterns in atherosclerosis by administration of sitosterol. *Ann Intern Med* 1956;45:614-22.
- [63] Trautwein EA, Demonty I. Phytosterols: Natural compounds with established and emerging health benefits. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 2007;14:259-66
- [64] Cicero AF, Fiorito A, Panourgia MP, Sangiorgi Z, Gaddi A (2002). Effects of a new soy/beta-sitosterol supplement on plasma lipids in moderately hypercholesterolemic subjects. *J. Am: Diet Assoc.* 102: 1807-11.
1990. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Science* 66: 185–193.
- [52] Ferrari-Iliou R, d'Arcy-Lameta A, Pham-Thi AT, Zuily-Fodil Y, Mazliak P. 1994. Effect of drought on photodynamic peroxidation of leaf total lipophilic extracts. *Phytochemistry* 37: 1237–1243.
- [53] Sahseh Y, Campos P, Gareil M, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT. 1998. Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiologia Plantarum* 104: 577–586.
- [54] El Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Pham-Thi AT. 1999. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* (L.). *Plant Molecular Biology* 39: 1257–1265.
- [55] Matos AR, d'Arcy-Lameta A, França M, Petres S, Edelman L, Kader J, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT. 2001. A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Letters* 491: 188–192.
- [56] Gigon, A., Matos, A. R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2004). Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of botany*, 94(3), 345–351. doi:10.1093/aob/mch150
- [57] Gahlaut, Anjum & Shirolkar, Amey & Hooda, Vikas & Dabur, Rajesh. (2013).  $\beta$ -Sitosterol in different parts of *Saraca asoca* and herbal drug ashokarista: Quali-quantitative analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of advanced*

## Investigation of methanolic extract variations in milk thistle seeds under drought stress conditions

Ghanbari Moheb Seraj, R. <sup>1</sup>, Tohidfar, M. <sup>2\*</sup>, Behnamian, M. <sup>3</sup>, Ahmadikhah, A. <sup>4</sup>,  
Dezhsetan, S. <sup>5</sup>

1. Ph.D Candidate, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Faculty member, Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3. Faculty member, Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4. Faculty member, Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
5. Faculty member, Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding group, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: 2019/12/22 Accepted: 2020/09/07)

The content of phytochemicals of medicinal plants including total phenols, flavonoids, fatty acid compounds, etc. are mainly affected by drought stress. In this study, the effects of different levels of water stress (Full irrigation at field capacity, irrigation at 70% of field capacity and irrigation at 40% of field capacity) on the phytochemicals of the medicinal plant of Milk thistle were evaluated. Soil moisture was measured by weight method and drought stress was applied to plants during the flowering stage for 8 days. Then, the seeds were oiled by Soxhlet and methanol extracted. Next, the phytochemicals of the extract were analyzed using GC-MS. GC-MS peak analysis indicated that 20 compounds were present in methanolic extract of Milk thistle. Oleic acid was the most abundant compound in irrigation treatments of Field Capacity (F.C) (75.8%) and 40%F.C. (73.7%), while methyl linoleate (22.5%) was highest in 70%F.C. Except of oleic acid, which had the highest amount in F.C and 40%F.C, the other compounds had the highest amount in 70%F.C compared to the other two treatments. According to the results, mild stress increased most of the plant's phytochemical compounds, possibly due to the osmotic regulation of the plant in dehydration. However, under extreme stress, these compounds were reduced, and these metabolites may have been used to provide energy for plant growth and survival. According to the results of this study, since the seeds of this plant have important phytochemical compounds such as fatty acids, phytosterols, methyl esters, flavonoids, etc. Therefore, the above compounds can be used in the food, pharmaceutical, health and other industries after extraction and purification.

**Keywords:** Water deficit, Milk thistle, Fatty acids, Phytosterols, Methyl esters, Flavonoids.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: m\_tohidfar@sbu.ac.ir