

اندازه‌گیری محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه زیست فعال و برخی فلاونوئیدهای گیاه سلمکی (*Atriplex patula* L.) در مراحل مختلف فنولوژیکی

محمد سیاری^{۱*}، سامیه قائلونی^۲ و علی عزیزی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشیار، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۴)

چکیده

در این آزمایش تأثیر مراحل فنولوژیکی گیاه بر برخی ترکیبات زیست فعال و فلاونوئیدهای روتین و کوئرستین گیاه سلمکی (*Atriplex patula* L.) مورد بررسی قرار گرفت. سه مرحله فنولوژیکی رویشی (هشت برگ)، گل‌دهی و بذردهی به عنوان سه تیمار آزمایش لحاظ گردید. در سه مرحله فنولوژیکی برخی از ترکیبات بیوشیمیایی و کوئرستین و روتین گیاه اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد بیش‌ترین و کمترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید به ترتیب در مرحله بذردهی و مرحله رویشی یافت شد. بیشترین مقدار فنل کل (۱۳۲/۷۶ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر)، تانن کل (۰/۰۵۷ میلی‌گرم اسید تانیک در ۱۰۰ گرم وزن تر) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۵۰/۲۸ درصد) در مرحله گل‌دهی و کمترین مقدار فنل کل (۹۲/۲۴ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر)، تانن کل (۰/۰۴۱ میلی‌گرم اسید تانیک در ۱۰۰ گرم وزن تر) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۶/۹۵ درصد) در مرحله رویشی مشاهده شد. بیش‌ترین و کمترین میزان فلاونوئید کل (۸۷/۰۵ و ۳۵/۸۹ میلی‌گرم روتین در ۱۰۰ گرم وزن تازه) به ترتیب در مرحله بذردهی و رویشی مشاهده شد. بیش‌ترین و کمترین مقدار کوئرستین به ترتیب در مرحله بذردهی و رویشی (۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) مشاهده شد. بیش‌ترین و کمترین مقدار روتین (۲/۱۱ و ۱/۸۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در مرحله بذردهی و مرحله رویشی یافت گردید. با توجه به میزان بالای برخی از ترکیبات بیوشیمیایی در گیاه سلمکی می‌توان در آینده از پتاسیل دارویی این گیاه بهره برد.

واژه‌های کلیدی: تانن، روتین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، کوئرستین.

Evaluating the content of some bioactive secondary metabolites and flavonoids in *Atriplex patula* at different phenological stages

Mohammad Sayyari^{1*}, Sameya Ghaeloni² and Ali Azizi³

1, 2, 3. Associate Professor, Graduated M. Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, BuAli Sina University, Hamedan, Iran

(Received: Jan. 26, 2021- Accepted: Apr. 13, 2022)

ABSTRACT

This experiment was performed to determine the content of some bioactive compounds and flavonoids of *Atriplex patula* L. at different phenological stages. Three phenological stages, including vegetative (eight-leaf), flowering and seed production stages, were considered as three treatments of experiment. Some biochemical parameters and also rutin and quercetin were measured at different growth stages. The results showed that the highest (2.06 mg g⁻¹) and lowest (0.88 mg g⁻¹) total chlorophyll content was observed at seed production and vegetative stages, respectively. Also, the highest chlorophyll 'a', chlorophyll 'b' and carotenoids contents were observed in the seed production and vegetative stages, respectively. The highest amount of total phenols (132.76 mg gallic acid 100g⁻¹ FW), total tannin (0.057 mg tannic acid 100g⁻¹ FW) and antioxidant capacity (50.28%) were found at flowering stage, while the lowest amount of total phenols (92.24 mg gallic acid 100g⁻¹ FW), total tannin (0.041 mg tannic acid 100g⁻¹ FW) and antioxidant capacity (16.95%) were observed at vegetative stage. The highest and lowest (88.05 and 35.95 mg rutin 100g⁻¹ FW) amount of total flavonoid was found at seed production and vegetative stages. The highest and lowest quercetin levels were observed in seed production and vegetative stages (0.05 and 0.01 mg g⁻¹ dry weight), respectively. Also, the highest and lowest (2.11 and 1.85 mg g⁻¹ dry weight) amount of rutin were found in the seed production and vegetative stages. Due to the high amount of some biochemical compounds in *Atriplex patula*, the medicinal potential of this plant can be used in the future.

Keywords: Antioxidant capacity, quercetin, rutin, tannin, total phenolics.

* Corresponding author E-mail: m.sayyari@basu.ac.ir

مقدمه

گیاه سلمکی یا آتریپلکس با نام علمی *Atriplex patula* L. گیاهی از خانواده‌ی اسفناج (Chenopodiaceae) بوده و بسیار متحمل به خشکی، شوری و درجه حرارت بالا است. این گیاه در خاک‌های شور باعث افزایش مواد آلی خاک می‌شود (Zhang et al., 2016). مطالعات صورت گرفته روی این گیاه اندک است، اما می‌تواند به‌عنوان منبع ارزشمند مواد مؤثره نیز مورد توجه قرار گیرد و ممکن است با داشتن برخی از متابولیت‌ها، به‌عنوان یک گیاه دارویی هم مورد استفاده قرار گیرد. در مورد مصارف دارویی گیاه سلمکی در آمریکا شمالی، در گزارشی آمده است که این گیاه از ۱۸۰۰ میلادی برای مردم بومی کانادا شناخته شده بوده و علاوه بر مصارف تغذیه‌ای و علوفه‌ای در طب سنتی هم کاربرد داشته است (Bassett & Munro, 1987). مظفریان بیان کرده است گونه *Atriplex hortensis* به‌عنوان سبزی صحرایی مانند اسفناج مصرف می‌شود و در طب سنتی، کاربرد ضد التهابی برای زخم دارد. تقریباً تمامی گونه‌های دیگر جنس *Atriplex* در فرهنگ درمانی اروپا (برای تسکین زخم و زردی و یرقان) و در طب سنتی بومیان آمریکای شمالی (درمان گزیدگی حشرات) مصرف دارد. با توجه به اینکه استفاده از این گیاه فقط در غالب نسخه‌های طب سنتی بوده و داروی گیاهی ثبت شده‌ای از آن در داروسازی مدرن موجود نیست، هنوز وارد فهرست فرماکوپه‌های ملل مختلف نشده است (Mozaffarian, 2012).

در تحقیقات انجام شده روی ترکیبات فیتوشیمیایی برخی گونه‌های آتریپلکس از جمله *A. nummularia* و *A. halimus* گزارش شده است که این گونه‌ها دارای برخی متابولیت‌های ثانویه از جمله ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، تریپنوئیدها و آلکالوئیدها و همچنین دارای اسیدهای آمینه و الکل‌ای زنجیره‌ای هستند که در طول دوره رشد گیاه و مراحل مختلف فنولوژیکی متغیر می‌باشند (Clouser et al., 2013; Srivarathan et al., 2020).

ظهور مراحل فنولوژیکی در هر گیاه از عوامل محیطی و ژنتیکی ناشی می‌شود که تاثیر مستقیم بر عملکرد گیاه و تولید متابولیت‌های بیوشیمیایی دارد.

فنولوژی بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه مخصوصاً بر کیفیت و مقادیر ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارد (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). لذا برای دستیابی به عملکرد مطلوب و میزان مواد مؤثره قابل قبول در هر گیاه دارویی لازم است که ظهور مراحل مختلف رشدی، ثبت و مورد مطالعه قرار گیرد؛ زیرا ترکیب‌های مؤثره گیاهان از نظر کمی و کیفی در طول دوره رویش دچار تغییر و تحول می‌شوند. همچنین از مزایای بررسی فنولوژی یک گیاه، استفاده بهینه از منابع محیطی و نیز شناسایی مراحل حساس زندگی گیاه نسبت به تنش‌های محیطی و مدیریت بهینه و به هنگام برای آن‌ها در جهت دستیابی به عملکرد بالا می‌باشد (Mirzahoseini et al., 2017).

نتایج برخی از پژوهش‌ها نشان داده است که کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان در رویشگاه‌های مختلف و زمان‌های مختلف رشد گیاهان (Kanani et al., 2021) و حتی مراحل مختلف رسیدن میوه (Shams et al., 2021) متفاوت است که این موضوع در کیفیت عملکرد دارویی گونه‌ها مؤثر بوده است. عوامل محیطی می‌تواند اثرات چشم‌گیری بر مقادیر کمی و کیفی مواد مؤثره گونه‌های گیاهی داشته باشد که نشان از اهمیت عوامل محیطی مؤثر بر تنوع ترکیب‌های شیمیایی این گیاهان دارد. بنابراین شناخت عوامل تأثیرگذار مهم (از جمله مرحله فنولوژیکی گیاه) بر مقادیر کمی و کیفی مواد مؤثره گیاهان دارویی در وهله اول و افزایش این ترکیبات جهت اثر بخشی بیشتر اولویت بعدی محققین مربوطه بوده است (Hosseini et al., 2017). با توجه به موارد ذکر شده و لزوم دستیابی به اطلاعاتی در خصوص پتانسیل دارویی گیاه سلمکی و میزان برخی مواد مؤثره در مراحل مختلف فنولوژیکی گیاه این تحقیق انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی میزان برخی مواد مؤثره گیاه آتریپلکس و ارزیابی اثر مراحل فنولوژیکی گیاه، ابتدا بذرها، گیاه سلمکی جهت انجام آزمایش‌های مربوط به جوانه‌زنی، شکستن خواب بذر و دماهای کاردینال جوانه‌زنی، از اطراف دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا شهر همدان با ارتفاع ۱۸۲۰ متر از سطح دریا و طول

$$\text{Chl b} = (20.31 \times A_{645}) - (4.91 \times A_{664}) \quad (2)$$

$$\text{Chl T} = (17.76 \times A_{645}) - (7.34 \times A_{664}) \quad (3)$$

$$\text{کاروتنوئید} = (1000 \times A_{470} - 1.82 \times \text{Chl a} - 85.02 \times \text{Chl b}) / 198 \quad (4)$$

برای سنجش میزان فنل کل، فلاونوئید و تانن کل ابتدا از نمونه‌ها عصاره‌گیری انجام شد (Bedreag *et al.*, 2014). بدین منظور ۰/۵ گرم نمونه تازه برگ گیاه به همراه ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۵٪ در هاون کوبیده شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه در شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه گذاشته شد. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز رویی جدا شده و برای فاز زیرین همان مراحل قبلی تکرار شد و به فاز رویی مرحله قبل اضافه شد و به عنوان عصاره مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه برای سنجش میزان فنل کل از معرف فولین-سیکالتو (Folin-Ciocalteu) استفاده شد. بدین منظور به ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی، ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین - سیکالتو رقیق شده با نسبت یک به ده اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به آن ۱۲۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه روی شیکر در دمای اتاق و شرایط تاریکی قرار داده شد، در نهایت جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک ($Y = 0.1543x - 0.1439$; $R^2 = 0.99$) و در نظر گرفتن نسبت رقیق شدن، مجموع فنل به صورت میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم وزن عصاره بیان شد (Ainsworth & Gillespie, 2007).

برای اندازه‌گیری غلظت فلاونوئید کل اندام هوایی، ۰/۲۷۵ میلی‌لیتر از عصاره برگ با ۸۲۵ میکرولیتر آب مقطر به حجم ۱/۱ میلی‌لیتر رسانده شد سپس ۰/۳ میلی‌لیتر نیتريت سدیم ۵ درصد به محلول اضافه گردید پس از سپری شدن مدت زمان ۵ دقیقه ۰/۶ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و بعد از ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید (سود) ۱ مولار به همراه یک میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردید. شدت جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. از آب مقطر به عنوان بلنک استفاده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید کل با

جغرافیایی ۳۳ درجه و ۹۵ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی از خط استوا و ۴۷ درجه و ۳۴ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی در اواخر ماه آبان از روی بوته‌های مادری جمع‌آوری و پس از بوجاری، بذرها با اندازه یکسان، یکنواخت و بدون شکستگی در معرض هوا خشک شدند و تا بهار سال بعد نگهداری و در اردیبهشت ماه در مزرعه مورد کشت قرار گرفتند.

آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. در این آزمایش سه مرحله فنولوژیکی گیاه شامل (۱) مرحله رویشی (۸ برگی)، (۲) ابتدای مرحله گل‌دهی و (۳) مرحله بذردهی به عنوان سه تیمار آزمایش در نظر گرفته شد. با لحاظ سه تیمار و سه تکرار برای هر تیمار، ۹ واحد آزمایشی (هر واحد آزمایشی شامل یک کرت به ابعاد ۱×۱ متر) وجود داشت که در آن‌ها بذر گیاه سلمکی کاشته شد. وارد شدن ۷۵ درصد گیاهان موجود در کرت‌های مشخص شده به یک مرحله فنولوژیکی، معیار ثبت تاریخ مراحل فنولوژیکی در نظر گرفته شد. اولین برداشت در مرحله هشت برگی، دومین برداشت در مرحله گل‌دهی گیاه و سومین برداشت در زمان بذردهی صورت گرفت.

در هر یک از مراحل فنولوژیکی گیاه، برگ‌های سالم و تازه در هر کرت به صورت جداگانه انتخاب، جمع‌آوری و جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی ذیل (فنل کل، فلاونوئید، تانن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی) به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بخشی از برگ‌های تازه نیز برای اندازه‌گیری صفات کلروفیل و کاروتنوئید مورد استفاده قرار گرفته و تعدادی از برگ‌ها هم خشک شده تا برای اندازه‌گیری روتین و کوئرستین مورد استفاده قرار گیرند. برای سنجش غلظت کلروفیل ابتدا محتوای کلروفیل از نمونه برگ تازه استخراج و سپس جذب نمونه‌های حاوی رنگیزه در طول موج‌های ۶۶۴ و ۶۴۵ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a، b و همچنین ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شیمادزو مدل ۱۲۸۰) اندازه‌گیری و در نهایت با استفاده از رابطه‌های زیر، میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تازه محاسبه گردید (Stevens *et al.*, 2006).

$$\text{Chl a} = (12.25 \times A_{664}) - (2.55 \times A_{645}) \quad (1)$$

میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد (با درجه HPLC) داخل لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی برداشته و درون تیوپ جدید ریخته شد. برای اطمینان از شفاف بودن عصاره، دوبار سانتریفیوژ صورت گرفت. قسمت فوقانی محلول پس از گذشتن از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر به میکروتیوپ منتقل شد. سپس عصاره با متانول ۸۰ درصد، ۱۰ برابر رقیق شد و آماده تزریق به دستگاه HPLC شد.

برای سنجش میزان کوئرستین و روتین، از دستگاه HPLC ساخت شرکت کنور آلمان مجهز به پمپ مدل اسمارت لاین ۲۰۵۰، ستون C₁₈ به طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر استفاده گردید. دتکتور از نوع UV-DETECTOR بود که روی طول موج ۳۳۰ نانومتر تنظیم گردید. استونیتریل (۹۵٪) و ارتوفسفریک (۱٪) به عنوان فاز متحرک دستگاه مورد استفاده قرار گرفتند. میزان حجم هر تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر و سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. پس از تزریق استاندارد، نمونه‌ها تزریق شدند و با مقایسه کروماتوگرام نمونه‌ها و بر اساس زمان بازداری پیک‌های خروجی و مطابقت پیک‌های استاندارد، مقدار و نوع ماده خروجی از ستون شناسایی و تعیین شد و میزان کوئرستین و روتین پس از محاسبات لازم بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه مشخص گردید (Kumar et al., 2009).

داده‌های صفات مختلف پس از بررسی و انجام آزمون نرمال بودن داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴) تجزیه واریانس شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در مراحل مختلف فنولوژیک، گیاه آتریپلکس دارای میزان متفاوتی از ترکیبات فیتوشیمیایی است و اثر مرحله فنولوژیک بر کلیه صفات ارزیابی شده معنی‌دار بوده است (جدول ۱).

استفاده از روتین منحنی استاندارد (Y = 0.1388 - 0.1295; R²=0.965) رسم گردید و غلظت فلاونوئید کل در برگ برحسب میلی‌گرم روتین (کوئرستین ۳-روتینوزید) در گرم وزن تر بیان شد (Li et al., 2006).

به منظور اندازه‌گیری تانن کل نیز ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۳۷۵ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید، سپس ۱۲۵ میکرولیتر فولین-سیکالتو به آن اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول سدیم کربنات به همراه ۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از انجام شیکر به مدت ۶۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و برای محاسبه غلظت تانن کل با استفاده از اسید تانیک منحنی استاندارد (Y = 0.1928x - 0.1798; R²=0.97) رسم شد و در نهایت غلظت تانن کل در برگ بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن تر بیان گردید (Taira & Ono, 1996).

برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ابتدا محلول دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار تهیه گردید. این محلول برای اندازه‌گیری درصد بازدارندگی به شکل روزانه تهیه گردید. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی برداشته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۷۵ میکرولیتر از این محلول برداشته و به آن ۲۹۲۵ میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید. جذب نمونه‌ها در دقیقه صفر با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر قرائت شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد و دوباره میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی با استفاده از فرمول (۵) محاسبه گردید (Kulkarni & Aradhya, 2005):

$$AA = \left[1 - \frac{A_{515}(\text{Sample})}{A_{515}(\text{Contro})} \right] \times 100 \quad (5)$$

A₅₁₅T₀ = مقدار جذب در دقیقه صفر

A₅₁₅T₃₀ = مقدار جذب در دقیقه ۳۰

AA = درصد بازدارندگی

برای تعیین غلظت کوئرستین و روتین در گیاه سلمکی با استفاده از دستگاه HPLC ابتدا استخراج فلاونوئیدها صورت گرفت. بدین منظور مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه برگی خشک شده گیاه به همراه ۱

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر مراحل فنولوژیکی بر میزان برخی ترکیبات فیتوشیمیایی و فلاونوئیدهای روتین و کوئرستین آتریپلکس.

Table 1. Analysis of variance of phenological stages effect on some phytochemical compounds and flavonoids quercetin and rutin of *Atriplex patula*.

Source of variance	d.f.	Mean of squares									
		Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Carotenoids	Total phenols	Flavonoids	Tannins	Antioxidant activity	Quercetin	Rutin
Replication	2	0.007	0.001	0.006	0.000003	51.26	2.12	0.00001	1.27	0.000001	0.005
Phenological stage	2	0.26**	0.046**	1.14**	0.029**	1286.5**	2099**	0.0002*	1405**	0.0013**	0.05*
Error	4	0.01	0.001	0.012	0.0009	51.54	13.0	0.00001	2.55	0.000005	0.004
C.V. (%)	-	10.48	14.73	8.3	8.41	6.52	6.07	8.55	6.23	4.8	3.46

***, **, *، ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۱، ۵ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

***, **, ns: Significantly difference at 1% and 5% level and no- significantly difference, respectively.

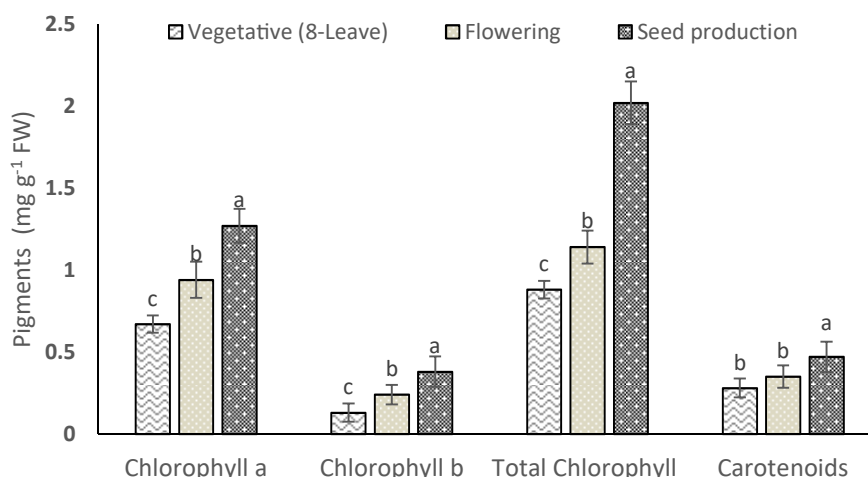
می‌تواند اطلاعات خوبی در خصوص وضعیت فیزیولوژیکی برگ‌ها در اختیار ما قرار دهد. بررسی پژوهش Pelden & Meesawat (2019) روی گیاه *Annona muricata* نشان داد که با افزایش سن گیاه مقدار کلروفیل و کاروتنوئید افزایش یافته است که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. طی مطالعه‌ای که روی برگ‌های کلم در سنین مختلف انجام شد مشخص شد که میزان کلروفیل a تا رسیدن به مرحله بلوغ برگ افزایش یافت ولی کلروفیل b افزایش بسیار جزئی را نشان داد (Lefsrud et al., 2007). همچنین Candan & Tarhan (2003) اظهار داشتند که متناسب با افزایش سن گیاه *Mentha pulegium* میزان کلروفیل افزایش می‌یابد. در مجموع نتایج این آزمایش با بیشتر گزارش‌های صورت گرفته مطابقت داشت و با افزایش سن گیاه میزان رنگیزه‌ها در گیاه افزایش پیدا کرد. نتایج این تحقیق بیانگر آن هست که رنگ‌دانه‌های گیاهی مانند کلروفیل و کاروتنوئیدها از نشانگرهای فیزیولوژیکی افزایش سن برگ‌ها بوده و همراه با نمو برگ و کلروپلاست‌ها، تولید آن‌ها نیز به‌منظور تأمین انرژی مورد نیاز افزایش می‌یابد.

میزان فنل، فلاونوئید و تانن کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مراحل مختلف فنولوژیکی گیاه تأثیر مراحل فنولوژیکی بر مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در سطح ۱ درصد و بر مقدار تانن کل در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

میزان رنگیزه‌های گیاهی در مراحل مختلف فنولوژیکی

اثر مراحل فنولوژیکی (مرحله ۸ برگی، مرحله گل‌دهی و مرحله بذردهی) بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در این پژوهش افزایش سن گیاه منجر به افزایش میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید شد. بیش‌ترین محتوای کلروفیل کل در مرحله فنولوژیکی بذردهی به مقدار ۲/۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به‌دست آمد در حالی که کمترین محتوای کلروفیل کل در مرحله ۸ برگی به میزان ۰/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. بیش‌ترین محتوای کلروفیل a و b نیز در مرحله بذردهی به ترتیب به مقدار ۱/۲۷ و ۰/۳۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین محتوای کلروفیل a و b در مرحله ۸ برگی به ترتیب به مقدار ۰/۶۷ و ۰/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. بیشترین میزان کاروتنوئید در مرحله بذردهی به مقدار ۰/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین میزان در مرحله فنولوژیکی ۸ برگی به مقدار ۰/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. در مقدار محتوای کاروتنوئید بین تیمار مرحله فنولوژیکی ۸ برگی و مرحله گل‌دهی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد اما بین تیمار مرحله بذردهی با دو تیمار گل‌دهی و ۸ برگی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱).

ویژگی‌های فیزیولوژیکی برگ‌ها به سن و موقعیت آن‌ها روی ساقه بستگی دارد. به دلیل اهمیت رنگدانه‌ها در فعالیت برگ، مطالعه محتوای رنگدانه‌ها



شکل ۱. مقایسه میانگین محتوای کلروفیل (a, b و کل) و کارتنوئید آتریپلکس در مراحل مختلف رشد.

Figure 1. Mean comparison of chlorophyll (a, b, and total) and carotenoids content of *Atriplex patula* at different phenological stages.

فنولوژیکی دارای اختلاف معنی‌دار بود و کم‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله بذردهی به مقدار ۹/۶۹ درصد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با دو مرحله فنولوژیکی مذکور داشت (جدول ۲).

تولید ترکیبات فنلی در گیاهان بخشی از دفاع شیمیایی گیاه است که تحت کنترل عوامل محیطی و ژنتیکی قرار می‌گیرد (Sellami *et al.*, 2009). Jakovljevic *et al.* (2013) گزارش کردند که مقدار فنل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه مامیران کبیر (*Chelidonium majus*) به مرحله فنولوژیکی گیاه بستگی دارد. (Naghiloo *et al.* 2012) طی تحقیقاتی که روی گیاه *Astragalus compactus* انجام دادند عنوان کردند که مقادیر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره این گیاه، به مرحله نموی گیاه بستگی داشته و بالاترین مقادیر در مرحله میوه دهی دیده شده است. در گیاه مورد آزمایش این تحقیق نیز با بلوغ گیاه و پیشرفت مراحل نموی گیاه ترکیبات فنلی بیشتری سنتز شده و خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری هم در عصاره‌های استخراج شده مشاهده شد (جدول ۲) که با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد گیاه بالغ سلمکی از خواص دارویی بیشتری برخوردار است. شاید بتوان ادعا کرد که افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل ممکن است با مرحله گل‌دهی کامل و شروع مرحله پیری در ارتباط باشد.

بیش‌ترین محتوای فنل کل به مقدار ۱۳۲/۷۶ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم وزن تر در مرحله گل‌دهی مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با مرحله فنولوژیکی ۸ برگی و بذردهی داشت و کمترین محتوای فنل کل به مقدار ۹۲/۲۴ میلی‌گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم وزن تر در مرحله ۸ برگی مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با مرحله بذردهی نداشت. بیش‌ترین محتوای فلاونوئید کل در مرحله بذر دهی به مقدار ۸۸/۰۵ میلی‌گرم روتین بر ۱۰۰ گرم وزن تر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با مرحله فنولوژیکی رویشی (۸ برگی) و گل‌دهی داشت و کمترین محتوای فلاونوئید کل در مرحله رویشی به مقدار ۳۵/۸۹ میلی‌گرم روتین بر ۱۰۰ گرم وزن تر مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با مرحله گل‌دهی و بذردهی داشت (جدول ۲). بیشترین مقدار تانن کل در مرحله گل‌دهی به مقدار ۰/۰۵۷ میلی‌گرم اسید تانیک بر ۱۰۰ گرم وزن تر به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با مرحله فنولوژیکی بذردهی نداشت اما با مرحله رویشی دارای اختلاف معنی‌دار بود و کم‌ترین میزان تانن کل در مرحله رویشی به مقدار ۰/۰۴۱ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با مرحله گل‌دهی و بذردهی داشت (جدول ۲). بیش‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به مقدار ۵۰/۲۸ درصد بازدارندگی در مرحله گل‌دهی مشاهده شد که با سایر مراحل

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر مراحل فنولوژیکی بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آتریپلکس.

Table 3. Mean comparison of phenological stages effect on total phenolics, total flavonoids, total tannins and antioxidant capacity of *Atriplex patula*.

Phenological stage	Total phenols (mg gallic acid 100 ⁻¹ g fresh weight)	Flavonoids (mg rutin 100 ⁻¹ g fresh weight)	Tannins (mg Tannic acid 100 ⁻¹ fresh weight)	Antioxidant activity (%)
8-leaves	92.2 b	35.89 c	0.41 b	16.95 b
Flowering	132.7 a	54.3 b	0.057 a	50.28 a
Seed production	105.09 b	88.05 a	0.053 a	9.69 c

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Values within the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% probability level.

نتایج این آزمایش و گزارش دیگر محققین که به بخشی از آنها اشاره شد شاید بتوان این چنین گفت که با پیشرفت نمو گیاه تجمع ترکیبات بیوشیمیایی به حد بلوغ می‌رسد و گیاه خود را برای تولید نسل جدید با تشکیل بذر آماده می‌کند.

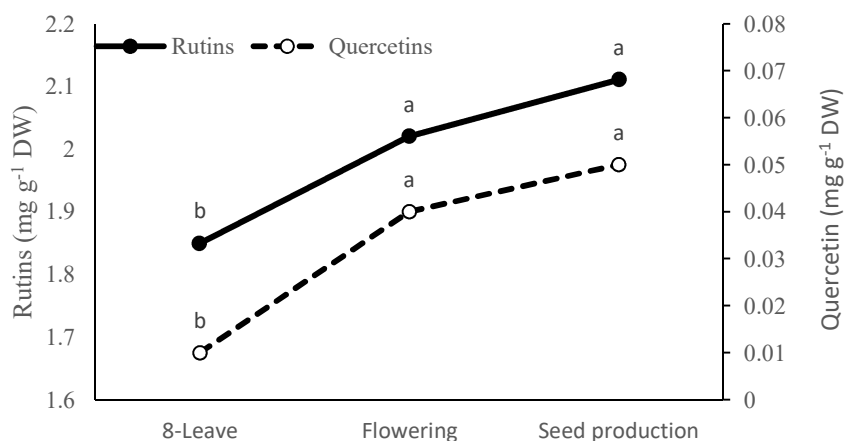
مقدار روتین و کوئرستین در مراحل مختلف فنولوژیک گیاه

تأثیر مراحل فنولوژیکی بر مقدار فلاونوئیدهای کوئرستین و روتین در گونه *A. patula* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش سن گیاه از مرحله فنولوژیکی رویشی تا مرحله بذردهی میزان این دو ترکیب افزایش یافته است. بیش‌ترین مقدار کوئرستین و روتین در مرحله فنولوژیکی بذردهی به ترتیب به مقدار ۰/۰۵ و ۲/۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. کمترین مقدار کوئرستین و روتین در مرحله فنولوژیکی ۸ برگی به ترتیب به مقدار ۰/۰۱ و ۱/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با مراحل فنولوژیکی گل‌دهی و بذردهی داشت. تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار مرحله گل‌دهی و بذردهی مشاهده نشد (شکل ۲).

در پژوهشی گزارش شده است بیش‌ترین مقدار کوئرستین در مرحله گل‌دهی و بیش‌ترین مقدار روتین در مرحله رویشی گیاه مرزنجوش تجمع می‌یابد (Sellami et al., 2009). با بررسی ترکیبات فنولیک در تیره کنوپودیاسه از جمله چند گونه از گیاه آتریپلکس نیز مشاهده شد که گیاهان این تیره غنی از ترکیبات فنولیک از جمله کوئرستین به‌خصوص در برگ‌ها هستند و روتین نیز در برگ‌های برخی از گونه‌ها یافت می‌شود.

Alirezaie Noghondar et al. (2016) در

پژوهشی تأثیر مراحل مختلف فنولوژیکی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه ترشک وحشی را مورد بررسی قرار دادند که بیش‌ترین مقدار فنل و فلاونوئید و آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی در مرحله رسیدن بذر وجود داشت. در پژوهشی مشخص شد که مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل گیاه سیاه دانه در مرحله بذردهی بیش‌ترین مقدار را نسبت به دیگر مراحل رشد داشت (Zribi et al., 2019). در پژوهش انجام شده توسط Sellami et al. (2009) مشخص شد که تغییرات غلظت فنل کل در طول رشد مرزنجوش بستانی (*Origanum majorana* L.) نیز توسط مراحل فنولوژیکی و هم توسط فاکتورهای آب و هوایی تحت تأثیر قرار گرفتند و مقدار فنل به طور معنی‌داری با مرحله رشد تغییر پیدا کرد. در پژوهشی مشخص شد که مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ترشک در مرحله گل‌دهی بیش‌تر از مرحله بذردهی می‌باشد (Feduraev et al., 2019). با بررسی عصاره گیاه هندوانه ابوجهل در مراحل مختلف فنولوژیکی رشد نیز مشخص شده است که بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و بالاترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی در مرحله گل‌دهی تجمع می‌یابد (Saberi et al., 2018). نتایج آزمایش حاضر نیز با یافته‌های بیشتر تحقیقات ذکر شده در بالا همخوانی داشت و بیش‌ترین ترکیبات فنلی که می‌توانند خواص دارویی داشته باشند در مراحل پیشرفته‌تر رشد گیاه (مرحله تولید بذر و بلوغ گیاه) مشاهده گردیدند. به طوری که بیش‌ترین میزان فنل کل، تانن کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله گل‌دهی و بیش‌ترین مقدار فلاونوئید کل در مرحله بذردهی مشاهده شد. با توجه به



شکل ۲. مقایسه میانگین میزان فلاونوئیدهای روتین و کوئرستین آتریپلکس در مراحل مختلف رشد.

Figure 2. Mean comparison of flavonoids rutin and quercetin content of *Atriplex patula* at different phenological stages.

نتیجه‌گیری کلی

مراحل فنولوژیکی بر میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه آتریپلکس مؤثر می‌باشد و بیش‌ترین مقدار فنل کل، تانن کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله فنولوژیکی گل‌دهی و بیشترین مقدار فلاونوئید کل در مرحله فنولوژیکی بذردهی مشاهده شد. با افزایش سن گیاه میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید افزایش یافت و در مرحله فنولوژیکی بذردهی بیش‌ترین مقدار مشاهده شد. این گیاه دارای فلاونوئیدهای کوئرستین و روتین می‌باشد که بیش‌ترین مقدار در مرحله بذردهی و کم‌ترین مقدار در مرحله فنولوژیکی رویشی مشاهده شد که میزان حضور آنها در مرحله بذردهی همانند فلاونوئید کل بود.

همچنین محتوای کوئرستین در برگ و گل‌آذین گونه آتریپلکس پاتلا به‌ترتیب به میزان ۲۱۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۱۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک گزارش شد (Dadáková *et al.*, 2013). Boutaoui *et al.* (2018) گونه *Atriplex mollis* را منبعی غنی از روتین عنوان کردند و بیان کردند که می‌تواند به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شود. روتین و گلیکون کوئرستین نقش فعال آنتی‌اکسیدانی در بدن موجود زنده و خارج از آن دارند و می‌توانند به‌طور مستقیم با واکنش‌های اکسایش-کاهش و به‌طور غیر مستقیم با کلات کننده‌ها عمل کنند. روتین علاوه بر اثر آنتی‌اکسیدانی، خواص دارویی در خور توجیهی نیز دارد (Kreft *et al.*, 2002).

REFERENCES

- Ainsworth, E. A. & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877.
- Alirezaie Noghondar, M., Azizi, M., Neamati, S. H., Rezvani Moghaddam, P. & Rezazadeh, S. (2016). Variation of some phytochemical compound in shoot and root of *Rumex turcomanicus* Czerep. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Plants*, 15(58), 25-36. (In Farsi).
- Bassett, I. J. & Munro, D. B. (1987). The biology of Canadian Weeds: 81. *Atriplex patula* L., *A. prostrata* Boucher ex DC., and *A. rosea* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 67(4), 1069-1082.
- Bedreag, C. F. G., Trifan, A., Bucur, L. A., Arcus, M., Tebrencu, C., Miron, A. & Costache, I. I. (2014). Chemical and antioxidant studies on *Crataegus pentagyna* leaves and flowers. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(6), 9859.
- Boutaoui, N., Zaiter, L., Benayache, F., Benayache, S., Cacciagrano, F., Cesa, S., Secci, D., Carradori, S., Giusti, A. M. & Campestre, C. (2018). *Atriplex mollis* Desf. aerial parts: Extraction procedures, secondary metabolites and color analysis. *Molecules*, 23(8), 1962.
- Candan, N. & Tarhan, L. (2003). Changes in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Mentha pulegium*. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(1), 21-30.

7. Clauser, M., Dall'Acqua, S., Loi, M. C. & Innocenti, G. (2013). Phytochemical investigation on *Atriplex halimus* L. from Sardinia. *Natural Product Research*, 27(20), 1940-1944.
8. Dadáková, E., Vrchotová, N., Tříška, J. & Děkanová, Z. (2013). Content of phenolic substances in the selected species of the Chenopodiaceae family. *Journal of Agrobiology*, 30(2), 127-135.
9. Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N. & Skrypnik, L. (2019). Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages. *Antioxidants*, 8(7), 237.
10. Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. (2007). Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, 30(2), 374-381.
11. Hosseini, B., Nikhkhah Amirabad, H., Fattah, M. & Gosta, Y. (2017). Effect of altitude and different phenological stages on essential composition and antioxidant activity of *Ferula angulata* (Schlecht.) Boiss. from Dena altitudes. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 5(1), 16-29. (In Farsi).
12. Jakovljevic, Z. D., Stankovic, S. M. & Topuzovic, D. M. (2013). Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. *EXCLI Journal*, 12, 260.
13. Kanani, M., Chamani, E., Shokouhian, A. A. & Torabi, G. M. (2021). Investigation on quality changes of damask rose essential oil during different phenology stages in Oroumieh region. *Iranian Journal of Horticultural Science* 51(4), 955-963. (In Farsi).
14. Kreft, S., Štrukelj, B., Gaberščik, A. & Kreft, I. (2002). Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC methods. *Journal of Experimental Botany*, 53(375), 1801-1804.
15. Kulkarni, A. P. & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93(2), 319-324.
16. Kumar, B. A., Lakshman, K., Jayaveera, K., Krishna, N. V., Manjunath, M. & Suresh, M. (2009). Estimation of rutin and quercetin in *Amaranthus viridis* Linn. by HPLC. *Asian Journal of Experimental Science*, 23(1), 51-54.
17. Lefsrud, M., Kopsell, D., Wenzel, A. & Sheehan, J. (2007). Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. *Scientia Horticulturae*, 112(2), 136-141.
18. Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260.
19. Mirzahoseini, M., Sadat Noori, S. A., Amanzadeh, Y. & Ghorbani Javid, M. (2017). Evaluation of phenological characteristics and amount of essential oils in some native ecotypes of Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(3), 435-448. (In Farsi).
20. Mozaffarian, V. (2012). *Recognition of medicinal and aromatic plants of Iran*. Farhang Mo'aser Publication. (In Farsi).
21. Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S. & Dadpour, M. R. (2012). Ontogenetic variation of volatiles and antioxidant activity in leaves of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *EXCLI Journal*, 11, 436.
22. Pelden, D. & Meesawat, U. (2019). Foliar idioblasts in different-aged leaves of a medicinal plant (*Annona muricata* L.). *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 41(2).
23. Saberi, M., Niak Nahad Ghermakhar, H., Heshmati, G. A., Barani, H., & Shahreyari, A. R. (2018). Evaluation of the content and performance of some active ingredients extracts of *Citrullus colocynthis* organs from two habitats of Sistan and Balochestan province in different growth stages [Research]. *Plant Ecosystem Conservation*, 5(11), 49-63. (In Farsi).
24. Sellami, I. H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W. A., Kchouk, M. E. & Marzouk, B. (2009). Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, 30(3), 395-402.
25. Shams, Z., Eshghi, S., Tafazoli, E. & Gharaghani, A. (2021). Assessment of antioxidant activity, phenolic components, photosynthesis pigments and fruit quantitative traits in four blackberry (*Rubus sanctus*) accessions at different fruit maturity stages. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 52(1), 153-169. (In Farsi).
26. Srivarathan, S., Netzel, M. E., Thi Phan, A. D. & Sultanbawa, Y. (2020). Exploring the nutritional profile and bioactive potential of Australian grown saltbush (*Atriplex* sp.). *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 36(1), 83.
27. Stevens, J., Senaratna, T. & Sivasithamparam, K. (2006). Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regulation*, 49(1), 77-83.

28. Taira, S. & Ono, M. (1996). Reduction of astringency in persimmon caused by adhesion of tannins to cell wall fragments. I International Persimmon Symposium 436.
29. Zhang, R., Wang, Y. R., Baskin, J. M., Baskin, C. C., Luo, K., & Hu, X. W. (2016). Germination and persistence in soil of the dimorphic diaspores of *Atriplex centralasiatica*. *Seed Science Research*, 26(3), 273-283.
30. Zribi, I., Ghezal, N., Sbai, H., Richard, G., Fauconnier, M. L. & Haouala, R. (2019). Biochemical composition of Tunisian *Nigella sativa* L. at different growth stages and assessment of the phytotoxic potential of its organic fractions. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(2), 205-212.