نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۳۹۶ / صفحات: ۲۶-۱۴

ارزیابی کمی و کیفی برخی متابولیت‌های اولیه و ثانویه گیاه دارویی برازمبل (*Proveskia abrotanoides* Karel.) در مراحل فنولوژیکی مختلف

سمیه صباغ[۱]، مریم نیاکان[۱*]، ابراهیم غلامعلی پور علمداری[۲]

[۱]گروه زیست‌شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

[۲]گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۳

چکیده

به‌منظور بررسی کمی و کیفی برخی متابولیت‌های اولیه و ثانویه گیاه دارویی برازمبل در مراحل فنولوژیکی مختلف اندام‌های گیاه در دو مرحله رویشی و گل‌دهی از منطقه روستای وامنان واقع در شهرستان آزادشهر جمع‌آوری و خشک گردید. در این تحقیق از عصاره از کل گیاه برازمبل در دو مرحله رویشی و گلدهی جهت شناسایی و ارزیابی کیفی تانن‌ها، ساپونین‌ها، ترکیبات آنتوسیانینی و ترپنوئیدی، فلاوون‌ها و فلاونوئیدها استفاده شد. همچنین میزان برخی متابولیت‌های اولیه نظیر کربوهیدرات‌های محلول نا محلول، پرولین و فنل کل در اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و گل مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. آنالیز کیفی کل گیاه برازمبل نشان داد در دو مرحله رویشی و گلدهی حضور ترکیبات ساپونینی و انتوسیانینی و تانن‌ها مثبت بود در حالی که وجود فلاون‌ها تنها در مرحله رویشی و ترپنوئیدها، فلاونیدها تنها در مرحله گلدهی مشاهده شد. آنالیز کمی نیز بالاترین نشاسته را در مرحله رویشی در ریشه و بیشترین کربوهیدرات‌های محلول و پرولین و ترکیبات فنلی را در برگ نشان داد.در مرحله گلدهی نیز میزان نشاسته کربوهیدرات‌های محلول پرولین و فنل کل بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد در مرحله رویشی صرف‌نظر از نشاسته برگ‌ها حاوی بیشترین قندهای محلول، پرولین و ترکیبات فنلی و در مرحله زایشی نیز ریشه از بیشترین ترکیبات یاد شده برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز کمی و کیفی، پرولین، ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی، مراحل رشد، کربوهیدرات‌ها، مراحل رشد، *Proveskia abrotanoides*

مقدمه

گیاه دارویی برازمبل (*Perovskia abrotanoides*)، متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) بوده که در مناطق شمال، شمال شرق، شرق و مرکز ایران رویش می‌یابد. تیره نعناع به لحاظ داشتن صفات اختصاصات مهم دارویی و غذایی جزء اولین تیره‌هایی است که توسط گیاه شناسان شناسایی شده است (Zargari, 2000). در ایران دارای سه گونه از جنس *Perovskia* یافت می‌شود که گونه *P. abrotanoides* از بیش‌ترین پراکنش برخوردار است (Mozafarian, 1998). گیاهانی عموماً علفی یکساله یا پایا ودارای ساقه‌های راست یا خزنده اند (Mahmoudi,2007). گونه *P.abrotanoides* Karel اغلب به صورت خودرو در حاشیه جاده‌های نیمه استپی کوهستانی اقالیم سرد و

*نویسنده مسئول: mnniakan@gmail.com

نیمه خشک استان گلستان در ارتفاع ۲۳۰۰ تا در استان خراسان شمالی در ارتفاع ۱۰۰۰ متری و در خاک‌های با PH خنثی تا قلیایی، بافت سبک شنی لومی تا لـومی رسی رویـش دارنـد (Mazandarani et al., 2009). از این گیاه برای درمان تیفوئید، سردرد و تهوع و دنـدان درد، بیماری‌های قلبی عروقی فیبـروز کبـدی و سـرفه اسـتفاده مـی‌کننـد (Tareen et al., 2010). برخـی از تاثیرات دارویی این گیاه مثل تاثیرات ضـد مسـومیت، ضـــــدالتهابی و ضدپلاســـــمودی مـــــی‌باشـــــد (Beikmohammadi, 2012). همچنین در طـب سـنتی ایران جهت تسکین دردهای روماتیسمی، کاهنده تـب، ضدعفونت و ضد مالاریا به کـار مـی رفـت (Araizi, 2013). در تحقیقی Azarnivand و همکـاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که گل و برگ و سـاقه برازمبـل دارای اسانس فراوانی است که می‌تواند در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد. این محققان علاوه بـر تعیـین مقدار اسـانس موجـود در گیـاه وجـود آلکالوئیـدهـا، تانن‌ها و فلاونوئیدهاو سـاپونین‌هـا را بـه‌طـور کیفـی مشخص نمودند که در این بین مقدار ساپونین‌ها قابـل ملاحظه بود

تحقیقـات نشـان داده اسـت کـه مـواد مـؤثره در اندام‌هـای گیـاه هیچگـاه ثابـت نیسـت و متناسـب بـا مراحل رشد گیاه و شرایط متفاوت محیطی قابل تغییـر است و بنابراین کاملاً وابسته بـه فاکتورهـای محیطـی، شرایط رویشگاهی، زمـان برداشـت، تنـوع ژنتیکـی و فنولـوژی گیـاه اسـت (Dambolena et al., 2010). گزارش شده است که مراحـل فنولـوژی و نـوع انـدام تـأثیر معنـی‌داری بـر محتـوای ترکیبـات فنلـی و فلاونوئیدی گیاه برازمبل دارد. در این راستا عنوان شد بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان متعلق به بـرگ گیاهـانی بـود کـه در مرحلـه رشـد رویشـی قـرار داشـتند (Ebrahimii, 2014).

همچنین بر اساس گزارشات موجود متابولیت‌های اولیه گیاهان نیز مانند متابولیت‌های ثانویـه دسـتخوش مراحل فنولوژیکی و به تبع تغییرات محیطی می‌گردند. به‌عنوان مثال با افزایش سن و آغـاز فـاز پیـری اسـید آمینه پرولین در گیاه تجمع می‌یابد که از آن بـه‌عنـوان یکی از شاخص‌های بیوشیمیایی پیـری یـاد مـی‌شـود. پرولین در سلول به‌عنوان یک ماده تنظیم کننـده اسـمز عمل کرده و از آنزیم‌ها و برخی درشت مولکول‌ها در برابر عوامل نا مناسب محافظت می‌کنـد (Hare et al., 1998). در این راستا در گل شـیپوری نشـان داده شـد که میزان پرولین بـه‌طـور معنـی‌داری در زمـان پیـری بـرگ‌هـا افـزایش مـی‌یابـد (Rabiza-Swider et al., 2004). از سوی دیگر تغییـرات محیطـی نظیـر دمـای پایین باعث القاء تغییرات متعددی در ترکیبات سـلولی ماننـــد تغییـــر در ترکیبـــات پروتئینـــی، پـــرولین و کربوهیدرات‌ها مـی‌شـود. مولکـول‌هـای پیـک کـه در سیستم انتقال سیگنال نقش دارند آنزیم‌های ویژه‌ای را برای فعال کردن مسیر تولید پرولین آیجاد می‌کننـد تـا باعث تشکیل یا تنظیم فعالیت ترکیبـات دفـاعی ماننـد پرولین شوند (Hare et al., 1998).

مقدار ذخایر کربوهیـدرات محلـول در انـدام‌هـای ذخیره‌ای نیز در طی مراحل مختلف رشد و نمـو گیـاه تغییرات قابل ملاحظه‌ای می‌یابد. به‌عنـوان مثـال پیـرو تحقیقی در مورد سه گونه گندمیان نشـان داد شـد کـه مقدار ذخایر کربوهیدرات قسمت‌های هـوایی گیاهـان مورد مطالعه در مراحـل رویشـی و گلـدهی بیشـتر از مرحله بذردهی بود در حالی کـه در مرحلـه بـذردهی میزان ذخایر کربوهیدرات محلـول در ریشـه بیشـتر از اندام هوایی بود (Hoshman Moayed et al., 2009).

انجام تحقیقـات مشـابه بـا هـدف ارزیـابی کمیـت، کیفیت و مقایسه مواد مؤثره دارویی گیاهان در اندام‌های مختلف، زمان‌های متفاوت و تنـوع رویشـگاه‌هـا بسـیار ضروری اسـت. ایـن امـر مـی توانـد ضـمن شناسـایی

مهم‌ترین نیازهای بهینه اکولوژیکی، اهلی‌سازی، استخراج و شناسایی شاخص ترین ترکیبات ثانوی گیاه و نیزموجب دست یابی به بهترین کیفیت و کمیت مواد مؤثره در اندام‌ها گردد. کشور ما غنی از این گونه‌های مهم دارویی می‌باشد و با وجود بررسی‌های صورت گرفته روی گونه‌های معطر و یا دارویی کشور، هنوز زمینه‌های فراوانی جهت شناسایی گونه‌های دارویی و ترکیبات آنها وجود دارد. یکی از این گیاهان گیاه برازمبل *Perovskia abrotanoides* است که با وجود کاربردهای متعددی که این گیاه دارد مطالعات اندکی درباره ترکیبات شیمیایی و تغییرات آنها در مراحل مختلف فنولوژیکی و محیطی صورت گرفته است که ضرورت تحقیق حاضر را توجیه می‌نماید.

مواد و روش‌ها

مشخصات جغرافیایی محل نمونه برداری: روستای وامنان یکی از روستاهای بخش چشمه ساران از توابع شهرستان آزادشهر واقع در استان گلستان می‌باشد. از نظر موقعیت جغرافیایی در مختصات ۳۷ دقیقه و یک درجه عرض شمالی و ۵۵ دقیقه و ۳۳ درجه طول شرقی و در ارتفاع ۱٤۵۰ متر از سطح دریا قرار دارد. طبق گزارش اداره کل هواشناسی استان گلستان بیشترین بارندگی در سال ۱۳۹٤ در منطقه وامنان ۲۷ میلی‌متر در دی ماه و کمترین میزان بارندگی ۱ میلی‌متر در مرداد ماه و مجموع میزان بارندگی ۳۲۵/٤ میلی‌متر بوده است.

نمونه‌برداری و نتایج آنالیز خاک: شش نمونه خاک از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری از پای بوته‌های گیاه برازمبل به‌وسیله اوگر به‌طور تصادفی برداشت شد، طوری‌که هر نمونه تقریباً حاوی ۳ کیلوگرم بود. سپس خاک هر شش نمونه با هم به‌خوبی مخلوط گردید. از نمونه مرکب حاصل، یک نمونه ٤ کیلویی تهیه و به آزمایشگاه خاکشناسی جهت اندازه‌گیری برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش منتقل گردید. نتایج درجدول ۱ آورده شده است.

عملیات اجرایی آزمایش: برای نمونه‌برداری اندام‌های مختلف گیاه برازمبل (*Proveskia karel abrotanoides*) از منطقه روستای وامنان در دو مرحله فنولوژیکی رویشی و گل‌دهی به ترتیب در اواسط ماه‌های اردیبهشت و تیر جمع‌آوری شد. سپس در آزمایشگاه علوم علف‌های هرز دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس شناسایی شد. گیاهان جمع‌آوری شده به تفکیک اندام ریشه، ساقه و برگ در مرحله فنولوژیکی رویشی و در مرحله فنولوژیکی گل‌دهی اندام گل نیز برای ازمایش‌های کمی جدا گردیدند. ابتدا نمونه‌ها در شرایط نور غیر مستقیم نیمه پژمرده و سپس با کمک آون در دمای ٤۰ در جه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. در انتها توسط آسیاب با مش ۸ خرد و تا قبل از استفاده در کیسه‌های پلاستیکی و دور از نور خورشید نگهداری شدند.

جدول ۱: نتایج آنالیز خاک در منطقه وامنان

عمق cm	۰-۳۰
کلاس بافت خاک	Si-C-L
هدایت الکتریکی عصاره اشباع Ec(ds/m)	۰/٦٤
اسیدیته کل اشباع PH	۸/۱۸
درصد مواد خنثی شونده T.N.V	۱۵/۸
درصد کربن آلی O.C	۰/۰٦
درصد ازت کل Total N	۰/۰۰٦
فسفر قابل جذب P(ava)ppm	۱۷/٤
پتاسیم قابل جذب K(ava)ppm	۱٤٤
درصد رس Clay	۳۰
درصد لای Silt	۵۸
درصد ماسه Sand	۱۲

سنجش کیفی متابولیت‌های ثانویه: برای تهیه عصاره از کل گیاه برازمبل در دو مرحله رویشی و گلدهی، ابتدا گیاهان آسیاب و پودر شد. سپس عصاره اولیه ۵ درصد وزنی– حجمی تهیه شد. بدین‌ترتیب که ۵ گرم پودر نمونه انتخابی از هر قسمت یعنی ریشه، ساقه، برگ، گل (در مرحله گلدهی) به‌طور جداگانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر آب مقطر یا اتانول بر اساس ماده موثره تهیه شد سپس روی دستگاه لرزاننده به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد و پس از آن به وسیله کاغذ صافی فیلتر شد (Machado, 2007) .از محلول حاصل به منظور آزمایشات استفاده شد.

تانن‌ها: برای شناسایی تانن‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آبی حاصل از سوسپانسیون ۱۰ درصد نمونه گونه‌های گیاهی برداشته، به آن چند قطره از محلول یک درصد فریک کلراید (Fecl3) اضافه شد. مشاهده رنگ آبی مایل به سیاه و یا قهوه‌ای- سبز، بیانگر حضور آللوکمیکال تانن‌ها بود (Trease and Evans, 1972).

ساپونین‌ها: برای مشاهده ساپونین‌ها نیز ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آبی نمونه‌ها را برداشته، به آن چند قطره آب یونیزه شده افزوده و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد. کف دائمی برای مدت ۱۵ دقیقه بیانگر حضور آللوکمیکال ساپونین‌ها می‌باشد (Trease and Evans, 1972).

آنتوسیانین‌ها: برای تشخیص آنتوسیانین‌ها، حضور رنگ قرمز و تغییر رنگ با تغییرات pH با اضافه کردن اسیدکلریدریک یک درصد به عصاره آبی حاصل از سوسپانسیون ۱۰ درصد گونه‌های گیاهی، بیانگر حضور آنتوسیانین‌ها است (Trease and Evans, 1972).

ترپنوئیدها: شناسایی ترپنوئیدها با استفاده از روش سالکووسکی انجام گرفت. بدین‌ترتیب که پنج میلی‌لیتر از عصاره اتانولی حاصل از سوسپانسیون ۱۰ درصد نمونه گیاهی را با دو میلی‌لیتر کلروفرم مخلوط کرده و سه میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ (H_2SO_4) به مخلوط قبلی اضافه شد. محلول دارای دو فاز کف مانند و مایع در زیر آن است. وجود رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز نشان دهنده حضور ترپنوئیدها خواهد بود (Trease and Evans, 1972).

فلاوون‌ها و فلاونوئیدها: برای شناسایی متابولیت ثانویه فلاوون‌ها و فلاونوئیدها نیز یک میلی‌لیتر از عصاره اتانولی نمونه گیاهی را برداشته، به آن چند قطره اسیدکلریدریک غلیظ و مقداری براده منیزیم اضافه می‌شود. پیدایش رنگ صورتی نشان‌دهنده حضور فلاونوئیدها و رنگ نارنجی نشان‌دهنده حضور فلاوون‌ها است (Trease and Evans, 1972).

اندازه‌گیری کمی برخی متابولیت‌های اولیه و ثانویه

اندازه‌گیری محتوای کربوهیدرات کل: ابتدا ۰/۱گرم از نمونه پودر اندام خشک برازمبل برداشته شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت یک هفته در یخچال قرار داده تا قندهای محلول آن جدا شود. پس از یک هفته، از محلول رویی نمونه‌ها یک میلی‌لیتر برداشته شد و با کمک آب مقطر به حجم دو میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اضافه کردن یک میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، میزان جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom libera- S22 در طول موج ٤٨٥ نانومتر خوانده شد. میزان قندهای محلول نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گلوکز محاسبه شد (Kochert, 1978).

اندازه‌گیری محتوی نشاسته با استفاده از معرف آنترون: ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول داغ ۸۰ مخلوط گردید. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در فاز رسوب حاصل ۱۵ میلی‌لیتر معرف A (٤ میلی‌گرم کربنات سدیم+ ۸ گرم سود + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. دو فاز مایع و جامد قابل مشاهده بود که برای اندازه‌گیری نشاسته از فاز جامد استفاده شد. به فاز رسوب حاصل، ٦/٥ میلی‌لیتر ۵۲ درصد PCA (Perchloric acid) و ۵ میلی‌لیتر آب مقطراضافه می‌شود. مخلوط حاصل در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره را برداشته و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. سپس ٤ میلی‌لیتر معرف آنترون (dissolve 200 mg anthrone in 100 ml of ice –cold95%sulphuricacid) اضافه شد و در نهایت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در نقطه جذب ٦۳۰ نانومتر خوانده شد. سپس میزان نشاسته در نمونه مورد بررسی با استفاده از نمودار استاندارد، برآورد گردید (Thayumanavan and Sadasivam, 1984).

اندازه‌گیری محتوای پرولین برگ: ۵۰۰ میلی‌گرم اندام تازه گیاه برازمبل با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد مخلوط و سپس مخلوط حاصل با کاغذ صافی، صاف گشت. ۲ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل در داخل لوله آزمایش ریخته و سپس ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین هیدرین اضافه گشت. سپس ٤ میلی‌لیتر تولوئن به محلول حاصل افزوده و به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه به‌خوبی تکان داده شد به‌طوری‌که لایه رویی زرد رنگ تولوئن نمایان گردید. سپس این لایه جدا و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در نقطه ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. میزان پرولین در نمونه مورد بررسی با استفاده از نمودار استاندارد، برآورد شد (Bates et al., 1973).

اندازه‌گیری فنل‌کل: بدین ترتیب که مقدار ۰/۱ گرم از پودر اندام خشک گیاه برازمبل با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول داغ ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده و مخلوط حاصل با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن مخلوط رویی در حمام آب جوش قرارگرفت تا غلیظ شود (حدود دو میلی‌لیتر). سپس یک میلی‌لیتر از محلول تغلیظ شده با کمک آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در مرحله بعدی مجدداً نیم میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم سه میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نیم میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد به محلول حاصل اضافه گردید. بعد از سه دقیقه، دو میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن افزوده و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن جذب نمونه به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل BiochromLibera- S22 در نقطه جذب ٦۵۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت، با توجه به منحنی استاندارد گالیک اسید، میزان فنل کل نمونه بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن نمونه خشک محاسبه گردید (Malick and Singh, 1980).

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی و داده‌های غیر نرمال، توسط نرم افزار Minitab با نسخه ١٤ نرمال گردید. سپس داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS با نسخه ۹/۱ مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها و رسم نمودارها به ترتیب با کمک آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد و نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

شناسایی کیفی برخی از متابولیت‌های ثانویه در دو مرحله رویش و گلدهی: نتیجه آزمایشات کیفی گیاه برازمبل در دو مرحله رویشی و گلدهی نشان داد که در مرحله رویشی حضور ترکیبات ساپونین، فلاوون، تانن و آنتوسیانین و در مرحله گل‌دهی وجود ساپونین، ترپنوئیدها، فلاونیدها، تانن و آنتوسیانین مثبت بود (جدول۱).

جدول ۱: آنالیز کیفی برخی از متابولیت‌های ثانویه کل گیاه برازمبل در دو مرحله فنولوژیکی رویشی و گل‌دهی

مراحل فنولوژیکی	متابولیت‌های ثانویه					
	ساپونین	ترپنوئیدها	فلاونوئیدها	فلاوون ها	تانن ها	آنتوسیانین ها
مرحله رویشی	+	−	−	+	+	+
مرحله گلدهی	+	+	+	−	+	+

+ و − به ترتیب نشان‌دهنده حضور و عدم حضور متابولیت ثانویه

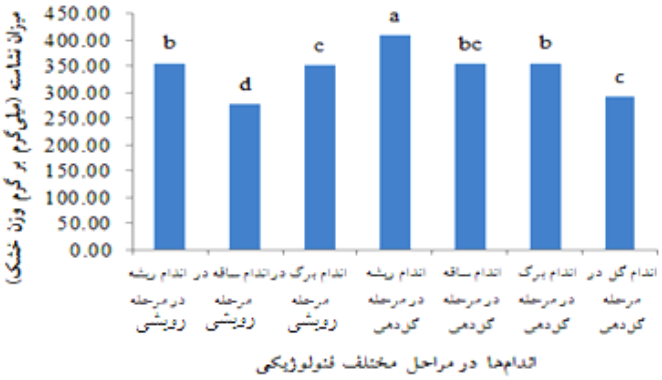
تغییرات کمی ترکیبات فیتوشیمیایی اندام‌های مختلف گیاه در دو مرحله رویشی و گلدهی: تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار اندام‌های مختلف گیاه دارویی برازمبل در مراحل فنولوژیکی رویشی و گل‌دهی از نظر میزان نشاسته، قندهای محلول، پرولین و فنل کل در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۱).

جدول ۲: تجزیه واریانس برخی ترکیبات فیتوشیمیایی اندام‌های مورد بررسی گیاه دارویی برازمبل در دو مرحله رویشی و گلدهی.

تغییرات منابع	درجه آزادی	میزان نشاسته	میزان قندهای محلول	میزان پرولین	میزان فنل کل
تیمار	٦	٥٨٤٥/١٧**	٣٣٤/٧٧**	٢٩٤٧/٣١**	١٩/١٠**
خطا	١٤	١٦/٦٣	٩/٤١	٠/٧٢	٠/٠٢١
ضریب تغییرات		١/١٩	١٢/٧٩	١/٥٤	٥/٣١

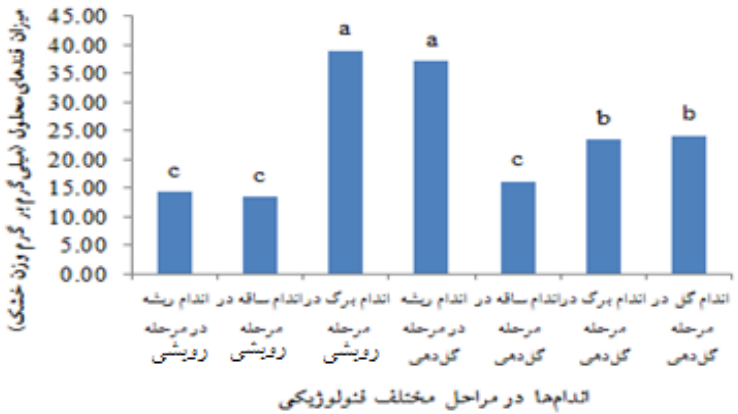
**: نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

میزان نشاسته: با توجه به نتایج بدست آمده، بیشترین میزان معنی‌دار نشاسته در اندام‌های مختلف در مراحل مختلف فنولوژیکی مربوط به اندام ریشه در مرحله گل‌دهی (معادل ٤٠٧/٨٩ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. اندام ساقه در مرحله فنولوژیکی رویشی (٢٧٨/٦٠ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) از کمترین میزان برخوردار بود (شکل ۱).



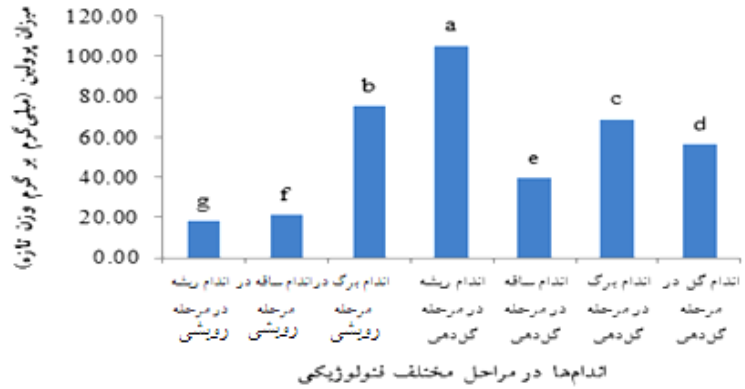
شکل ۱: میزان نشاسته در اندام‌های مورد بررسی گیاه دارویی برازمبل (*Proveskia abrotanoides*) در مراحل مختلف فنولوژیکی (رویشی و گلدهی)

میزان قندهای محلول: همان‌طوری‌که از شکل ۲، مشاهده می‌شود بیشترین میزان معنی‌دار قندهای محلول در اندام برگ برازمبل در مرحله فنولوژیکی گل‌دهی معادل ۳۹/۰۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بدست آمد که از لحاظ آماری با اندام ریشه در زمان گل‌دهی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند، لذا در یک گروه قرار گرفتند. کمترین این میزان معنی‌دار مربوط به اندام‌های ریشه و برگ در زمان رشد رویشی و ساقه در مرحله گل‌دهی به‌ترتیب معادل ۱٤/۲۷، ۱۳/٤۷ و ۱٦/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود.



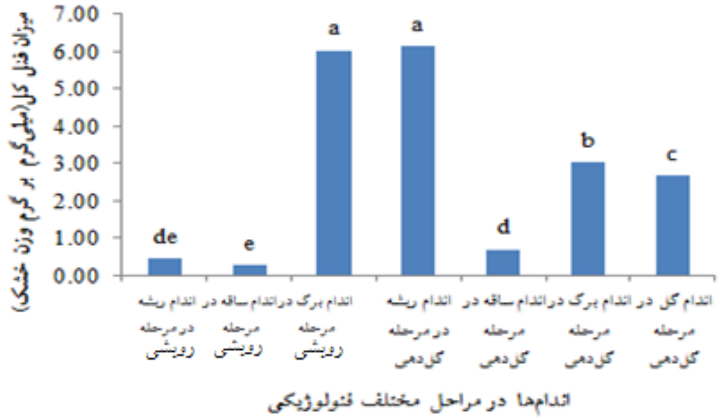
شکل ۲: میزان نشاسته در اندام‌های مورد بررسی گیاه دارویی برازمبل (*Proveskia abrotanoides*) در مراحل مختلف فنولوژیکی(رویشی و گلدهی)

میزان پرولین: براساس شکل ۳، میزان تغییرات پرولین در اندام‌های مختلف گیاه برازمبل در دو مرحله فنولوژیکی رویشی و گل‌دهی در دامنه‌ای بین ۱۰۵/۵۲ تا ۱۸/۳٤ میلی بر گرم وزن تازه بود. بیشترین میزان معنی‌دار مربوط به اندام ریشه در مرحله گل‌دهی بود. در حالی‌که کمترین این میزان به اندام ریشه در مرحله رویشی اختصاص یافت.



شکل ۳: میزان پرولین در اندام‌های مورد بررسی گیاه دارویی برازمبل (*Proveskia abrotanoides*) در مراحل مختلف فنولوژیکی(رویشی و گلدهی)

میزان فنل کل: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اندام‌های مختلف گیاه دارویی برازمبل در مراحل مختلف فنولوژیکی از لحاظ میزان ترکیبات فنلی متفاوت می‌باشند. بیشترین میزان این ترکیبات مربوط به اندام ریشه در مرحله فنولوژیکی گل‌دهی بود که ازلحاظ آماری با اندام برگ در مرحله فنولوژیکی رویشی اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند لذا از لحاظ آماری در یک گروه یکسانی قرار گرفتند. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که دو اندام ریشه و ساقه در مرحله رویشی از کمترین میزان معنی‌دار ترکیبات فنلی برخوردار بودند (شکل ٤).



شکل ٤: میزان فنل کل در اندام‌های مورد بررسی گیاه دارویی برازمبل (*Proveskia abrotanoides*) در مراحل مختلف فنولوژیکی(رویشی و گلدهی)

بحث

بررسی تغییرات کیفی متابولیت های ثانویه در اندام‌های مختلف در دو مرحله رویشی و گلدهی: در این تحقیق نتایج آزمایشات کیفی نشان داد که در عصاره کل گیاه برازمبل ساپونین‌ها در هر دو مرحله رویشی و گلدهی حضور درند. حضور آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها نیز توسط Azarnivand و همکاران (۲۰۰۹) در گیاه برازمبل تائید شد که در این تحقیق نیز مقدار ساپونین‌ها در گیاه داروئی برازمبل قابل ملاحظه بود. تحقیقات نشان داده است گروه ساپونین‌های تری‌ترپنی و استروئیدی دارای فعالیت ضد میکروبی می باشند، زیرا به محض آلودگی گیاه و خرابی بافت آنزیم ویژه‌ای رها می‌شوند، در نتیجه ساپونین‌ها می‌توانند یک حالت دفاعی علیه حمله میکروبی ایجاد کنند و از گسترش بیماری جلوگیری کنند (Hostettman and Marston, 1991). با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد ساپونین موجود مراحل رویشی و گلدهی باعث می‌شود که گیاه برازمبل در برابر عوامل بیماریزا مقاوم گردد. نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که در مرحله رویشی وجود ترپنوئیدها منفی اما در مرحله گلدهی این حضور این ترکیب مثبت بود. Cetin و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز در تحقیقات خود به وجود ترپن‌ها، پلی فنل‌ها و ترکیبات فلاوونوئیدی گیاهان برازمبل، اوکالیپتوس، اویشن اشاره نمودند که دارای اثر ضدالتهابی و ضدویروسی می‌باشد. در تحقیقی دیگرobame و همکاران ۲۰۰۸ نشان دادند که مصرف اسانس گیاه برازمبل در شستشوی زخم، دفع کرمهای حلقوی، انگل‌های پوستی و ضد قارچ موثر است که این عملکرد را به

ترپن‌های اسانس و همچنین ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی عصاره سرشاخه‌های گلدار گیاه نسبت دادند .

طبق اطلاعات حاصل از بررسی ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه برازمبل حضور فلاونوئیدها در مرحله گل‌دهی مثبت بود در صورتیکه در مرحله رویشی این ترکیبات در گیاه مشاهده نشد. فلاوون‌ها از مهمترین مشتقات فلاوونوئیدها می‌باشند که نقش ویژه‌ای در گیاهان برای حفاظت در مقابل نور ماورای بنفش، برهمکنش درون گونه‌ای دفاع و استحکام گیاه دارند (Prabhat (2007 همچنین ترکیباتی هستند که مسئول ایجاد رنگ در گل‌ها و میوه‌ها می‌باشند. فلاوونوئیدها به‌عنوان یک متابولیت ثانویه در گیاهان، با دارا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند (Khalili and Ebrahimzadeh, 2015). در این راستا اعلام شده است مهمترین اثر بیولوژیکی آن‌ها شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، مقو ی، آنتی پاتوژن، ضد قارچ و ضد ویروسی می‌باشد (Cetin et al., 2007). با توجه به بررسی‌های انجام شده، می‌توان یکی از دلایل وجود فلاونوئیدها در مرحله گلدهی در گیاه برازمبل را علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی ایجاد رنگ در گلها دانست.

نتایج بررسی در این آزمایش نشان داد که وجود تانن وآنتوسیانین‌ها در گیاه برازمبل در هر دو فاز رویشی و گل‌دهی مثبت بود. عنوان شده است وجود آنتوسیانین‌ها در برگ‌های جوان برخی گونه‌ها برای جلوگیری از حمله بعضی حشرات است، زیرا چنین برگ‌های جوان و لطیفی بهتر می‌توانند توسط برخی آفات خورده شوند. رنگدانه‌هایی مانند آنتوسیانین‌ها نقش بسیار مهمی نیز در اندام‌های زایشی گیاهان و به ویژه رنگ گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌ها دارند که برای اهداف گرده‌افشانی، تشکیل میوه و پخش میوه و بذر توسط حشرات، حیوانات و پرندگان ضروری است (Hughes, 2011).

بررسی تغییرات کمی متابولیت‌های اولیه و ثانویه در اندام‌های مختلف در مرحله رویشی و گلدهی:

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان فنل کل در مرحله رویشی در برگ و در مرحله گل‌دهی در ریشه بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد. Hirt و Shinozaki (2004) بیان نمودند انباشتگی ترکیبات فنلی نوعی پاسخ دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی است. قابل ذکر است که ریشه‌های بسیاری از گیاهان تحت تنش ترکیبات فنولیک تولید می‌کنند (Winkel-shirley, 2006). افزایش در میزان ترکیبات فنلی می‌تواند اثراتی در ظاهر گیاه را به دنبال داشته باشد از جمله افزایش در تولید لیگنین که باعث استقامت دیواره گیاه و ایجاد مانع فیزیکی در برابر ورود و نفوذ فلزات سنگین می‌شود (Liu et al., 2015). همچنین در گزارشی اعلام شد در مرحله گلدهی با افزایش حساسیت‌های گیاه نسبت به شرایط اقلیمی بر میزان مواد موثره ثانوی از جمله فنل ها افزوده می‌شود (Sardashti et al., 2013). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که میزان نشاسته در ریشه گیاه برازمبل در دو مرحله رویشی و گل‌دهی بیش‌تر از سایر اندام‌های گیاه بود. همچنین طبق نتایج بدست آمده در کل اندام گیاه برازمبل در مرحله گلدهی میزان نشاسته بیشتر از مرحله رویشی بود. بر اساس نتایج Makari و همکاران (۲۰۱٦) میزان نشاسته در اندام‌های ساقه، برگ و گل‌آذین گیاه ریواس و مخلوطی از آنها متغیر بود. این تیم تحقیقاتی علت افزایش نشاسته در ریشه گیاه ریواس در دو مرحله رویشی و زایشی را به مصرف این پلی ساکارید ذخیره ای در اندام هوایی بواسطه بالا بودن متابولیسم و مصرف کربوهیدرات‌ها در مقایسه با ریشه نسبت دادند. طبق داده‌های بدست آمده در این تحقیق

میزان کربوهیدرات‌های محلول موجود در مرحله رویشی در برگ بیش‌ترین و در اندام ریشه و ساقه کم‌ترین مقدار را دارا بود. همچنین در مرحله گل‌دهی ریشه از بالاترین و ساقه از کمترین میزان برخوردار بود.

Mohammadi در سال ۲۰۰۰ مقدار ذخایر کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی گونه *Agropyron trichophorum* در مراحل رویشی در ساقه را بیش از ریشه گزارش نمود. کربوهیدرات‌ها یکی از ذخایر غذایی مهم برای گیاه است و برای رشد و ادامه حیات گیاه به این ذخایر غذایی لازم دارند. مقدار ذخایر کربوهیدرات محلول در اندام‌های ذخیره‌ای سه گونه گندمیان به طور معنی‌داری متفاوت بود به نحوی که مقدار ذخایر کربوهیدراتی قسمت‌های هوایی گیاهان مورد مطالعه در مراحل رویشی و گلدهی بیشتر از مرحله بذردهی و در مرحله بذردهی میزان ذخایر کربوهیدرات‌های محلول در ریشه بیشتر از اندام هوایی بود (Hoshman Moayed er al., 2009). وجود کربوهیدرات‌ها برای باز شدن گل‌ها لازم است. این ماده سبب جذب بیشتر آب می‌شود، که با جذب آب، تورژسانس سلول و شادابی گلبرگ‌ها زیاد شده و در نهایت قطر گل‌ها افزایش می‌یابد (Ohkawa et al., 1999). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از بین اندام‌های مختلف گیاه برازمبل در مرحله رویشی، اندام برگ بیش‌ترین و ریشه کم‌ترین میزان پرولین را به خود اختصاص دادند. در حالی‌که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان پرولین در مرحله گل‌دهی به ترتیب مربوط به اندام ریشه و ساقه بود. نتایج به دست آمده نشان داد که گیاه در مرحله زایشی بیش‌ترین مقدار پرولین را در خود داشت. عده‌ای از محققان علت افزایش پرولین را نتیجه تخریب پروتئین ذکر کردند (Taher, 1988). گزارش شده است عواملی که باعث به تاخیر انداختن پیری در گیاهان می‌شود از تجمع پرولین جلوگیری می‌کنند، در حالی که تسریع کننده‌های پیری تجمع پرولین را در گیاهان افزایش می‌دهند (Yakimova et al., 1997). با توجه به این مطلب افزایش میزان پرولین در کل گیاه در مرحله زایشی را می‌توان به شروع فاز پیری در این مرحله نسبت داد.نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان فنل کل در مرحله رویشی در برگ و در مرحله گل‌دهی در ریشه بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. Hirtو Shinozaki (2004) بیان نمودند انباشتگی ترکیبات فنلی نوعی پاسخ دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. قابل ذکر است که ریشه‌های بسیاری از گیاهان تحت تنش ترکیبات فنولیک تولید می‌کنند (Winkel-shirley, 2002) .افزایش در میزان ترکیبات فنلی می‌تواند اثراتی در ظاهر گیاه را به دنبال داشته باشد از جمله افزایش در تولید لیگنین که باعث استقامت دیواره گیاه و ایجاد مانع فیزیکی در برابر ورود و نفوذ فلزات سنگین می‌شود (Liu et al., 2015). فنل‌ها بزرگترین گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که به‌عنوان ضد آلرژی، ضد التهاب، ضد میکروب، ضد باکتریال، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی مطرح هستند (Soobrattee et al., 2005). Pedrol و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند تولید ترکیبات فنلی در گیاهان بخشی از دفاع شیمیایی گیاه است که تحت کنترل عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارد. برای مثال هجوم علف خواران و حشرات به طور معمول سنتز ترکیبات فنلی را توسط گیاهان افزایش می دهد (Manieval et al., 2001). Zhang همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکندگی عصاره افزایش می‌یابد. در این راستا گزارش شده است که فعالیت آنتی اکسیدانی

ترکیبات فنلی عمدتا مربوط به ویژگی احیا کنندگی است که به‌عنوان احیا کننده سبب غیرفعال شدن رادیکال‌های آزاد یا ممانعت از تجزیه هیدروپراکسیدها به رادیکال آزاد می شوند (Golluce et al. 2007)

نتیجه‌گیری نهایی

آنالیز کیفی عصاره کل گیاه برازمبل در دو مرحله رویشی و گلدهی نشان از حضور ترکیبات ساپونینی، آنتوسیانینی و تانن‌ها داشت در حالی که وجود فلاون‌ها تنها در مرحله رویشی مشخص شد. ترکیبات ترپنوئیدی و فلاونوئیدی نیز تنها در مرحله گلدهی مشاهده گشت. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش سن گیاه برازمبل در مراحل اولیه رشد تا گلدهی گیاه، اسمولیت‌های سازشی نظیر پرولین، کربوهیدرات‌های محلول و نیز فنل کل افزایش یافت که میزان انباشت این ترکیبات در اندام‌های مختلف متفاوت بود.در مرحله رویشی عمدتا برگها و در مرحله گلدهی نیز عمدتاً ریشه بیشترین مقدار ترکیبات نامبرده را به خود اختصاص دادند.

References

Araizi, A., Rahimi Nejad, M. and Saidi, H. (2013). Master's Thesis, An Analysis of the Description and Morphology of *Provskia* Karel Species in Iran, Isfahan University, Faculty of Science, Department of Biology .

Azarnivand, H., Ghavam Arabani, M., Whiteen, F. and Tavili, A. (2009). Investigating the effect of ecological characteristics (soil and altitude) on the quantity and quality of essential oils of *Achillea mille* folium L. subsp. Folium. Journal of Iranian Herbs and Flowers Research. 4: 571-556.

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

Beik Mohammadi, M (2012). The evolution of medicinal properties of *Provskia abrotanoides* karel. Middle East Journal of Scientific Research. 11:189-193.

Cetin, H., Erler, F. and Yanikoglu, A. (2007). Comparative evaluation of Origanum onites essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. Pest Management Science. 63(8): 830-833.

Dambolena, J.S., Zunino, M.P., Lucini, E.I.,Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P.J. and Zygadlo, J.A. (2010). Total phenolic content, radic alscavenging properties and essential oil composition of Origanum species from different populations. Journal Agriculture Food Chemistry. 58: 1115-1120.

Ebrahimi, R. (2014). Evaluation of antioxidant activity of essential oil and extract of all parts of the plant of provskia abrotanoides at different stages of development and evaluat ion of the antioxidant properties of the strongest essential oil and extract Living Cells Abstract MSc Thesis, Ferdowsi University of Mashhad.

Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M. and Adiguzel A. and Ozken, H. (2007). Antimicrobial and antioxidantproperties of the essential oils and methanolextract from *Mentha longifolia* L. ssp. longifolia. Food Chemistry. 103: 1449-1456

Hare P.D., Cress W.A. and Van Staden J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell and Environment. 21: 535-553

Hedge, J.E. and Hofreiter, B.T. (1962). In: Carbohydrate Chemistry 17(Eds Whistle RL and Be Miller, JN) AcadmicPress, New York.

Hirt, H. and Shinozaki, K. (2004). Plant responses to abiotic stress topics in current genetics. Spring berlin/New York.

Hoshmand Moayed, S., Mesdaghi, M. and Sadeghipour, H.R. (2009). The trend of changes in soluble carbohydrates during growth of three species of wheat in National park of Golestan. Journal of Agricultural Scienes and Natural Resources of Gorgan. 16(3): 193-201.

Hostettman, K.A. and Marston, A. (1991). Saponins .Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K

Hughes, N.M. (2011). Winter leaf reddening in evergreen species. New Phytology. 190: 573-581.

Khalili, M. and Ebrahimzadeh. MA. (2015). A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 24(120): 188-208.

Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. In: Helebust, J.A., Craigiej. S(Ed): Hand book of physiological methods. Pp: 96-97 Cambridge University Press, Cambridge.

Liu, Q., Zheng, L., He, F., Zhao, F.G., Shen, Z. and Zheng, L. (2015). Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots. Plant and Soil. 6(3): 22–30.

Machado, S. (2007). Allelopathic potential of various plant species on downy brome. Journal of Agronomy. 99: 127-132.

Malick, C.P. and Singh, B.M. (1980). In plant enzymology and histo enzymologhy. Kalyani Publishers, New Dehli.

Makari, F., Gholamalipour Alamdari, A. and Beat Kohsar, J. (2016). Phytotoxicity analysis of different organs of Rheum ribes at flowering stage Case study: Highlands of the Charizak village from the functions of the city of Kashmar. Journal of Plant Environmental Physiology. 11(42): 25-36.

Manieval, S., Thierry, D. and Christiane, G. (2001). Relationship between biomass and phenolic in grain Sorghum grown under different conditions .Agronomy Journal. 93: 49-54.

Mazandarani, M., Bikmohammadi, M. and Bayat, E. (2009). Ethnofarmacology and study of the most important secondary materials of *Perovskia abrotanoides* Karel in natural habitats of Golestan and North Khorasan provinces. Quarterly journal of Plant Science. 4(4): 69-77.

Mahmoudi, M.H. (2007). Effect of nitrogen fertilizer and irrigation on the performance and metabolism of Menthapiperita L. peppermint medicinal herb. Thesis of MA in Agriculture, Islamic Azad University, Jiroft Branch.

Mohamadi, A.N. (2000). Effects of harvesting time and intensity on forage production of soluble carbohydrates in Species Agropyron trichophorum. Master thesis, College of Natural Resources, Technical University of Esfahan.

Mozafarian, V.A (1998). Culture of Plants Name of Iran. Contemporary Culture. 432-435.

Obame, L., Edou, P., Bassole, H.N. and Traone, A.S. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial essential oil of *Dracryodes edulis* from Gabon .African Journal of Microbiology. 2: 148-152.

Ohkawa, K., Kasahara, Y. and Suh, J.N. (1999). Mobility and effects on vase life of silver-containing compounds in cut rose flowers. Horticultural Science. 34: 112-113.

Pedrol, N., Gonzalez, L., and Reigosa, M.L. (2006) Allelopathy and abiotic stress, a physiological process with Ecological Implications. Netherlands: 171-209.

Prabhat, K. (2007). Metabolic engineering of yeast for the production of plant secondary metabolites.Research Exercise Summary. 4: 27-39.

Rabiza-Swider, J., Lukaszewska, A., Shutnik, E. and Leszko, M. (2004). Ammonium and proline accumulation in senescing cut leaves of Zantedeschia, Physiologia Planrum. 26: 417-422.

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., luximon Ramma, A., Aruomab, O.I. and Bohoruna T. (2005). Phenolic as

potential antioxidant therapouticagents: Mechanism and Actions Mutation Research. 579: 200-213.

Sardashti, A.R., Valizadeh, J. and Adhami, Y. (2013) Variation in the essential oil composition of *Perovskia abrotanoides* of different growth stage in Baluchestan. Middle East Journal of Scientific Research. (6): 781-4.

Taher, A. (1988). Physiologia and lipid change in some upland rice (*Oryza sativa* L.) cultivars grown under drought stress. College Laguna (Philippines).

Tareen, R.B., Bib, T., Khan, M.A., Ahmad, M. and Zafar, M. (2010). Indigennous khowledge of folk medicine by the woman of kalat and khuzdar Regions of balochistan Pakistan Journal of Botany. 42: 1465-1485.

Thayumanavan, B. and Sadasivam, S. (1984). Physicochemical basis for the preferential uses of certain rice varieties .Plant Foods for Human Nutrition. 34: 253-259.

Trease, G.E., W.C. and Evans, W.C. (1972). Pharacognosy, (Ed.), Baillere and Tindall, London, p: 383.

Winkel-shirley, B. (2006). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress.Current Opinion in Plant Biology. 2: 603-662

Yakimova, E., Atanassova, B. and Kapchina-Toteva, V. (1997). Longivity and some metabolic events in postharvest spray- carnation (D. Caryophyllus F. spray, hort) flowers. Plant Physiology. 23: 57-65.

Zargari, A. (2000). Medicinal Plants. Tehran University Press. 4:923

Zhang, Z., Liao, L., More, J., Wu, T. and Wang, Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). Food Chemistry. 113(1): 160-165.