بررسی اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره اندام‌های مختلف گیاه دارویی *Verbascum songaricum* Schrenk.

علیرضا قهرمانی[۱]، عبداله قاسمی پیربلوطی[۲*]، حمید مظفری[۳]، داود حبیبی[٤]، بهزاد ثانی[٥]

[۱]دکتری، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]استاد، گروه گیاهان دارویی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۳]استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[٤]دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران

[٥]استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۹

چکیده

گیاه دارویی گل ماهور یا خرگوشک (*Verbascum songaricum* Schrenk.) متعلق به تیره Scrophulariaceae است که بواسطه پتانسیل سنتز متابولیت‌های ثانوی دارویی، از خواص آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد ویروس، ضدعفونی کننده برخورداراست و از آنجایی که استفاده از الیسیتورهای زیستی در نظام کشاورزی پایدار می‌تواند در ارتقای کمی و کیفی مواد موثره در گیاهان دارویی و بهبود عملکرد دارویی آنها موثر باشد، در این تحقیق به منظور ارزیابی اسپری سالیسیلیک اسید بر خصوصیات فیتوشیمیایی برگ و گل گیاه دارویی گل ماهور، **طرحی** در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه تحقیقاتی گیاهان داوریی شهرکرد در دو سال زراعی ۹۵ و ۹٦ اجرا گردید. محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید در سه سطح (شاهد، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار بر لیتر) در سه مرحله بر روی گل ماهور در چهار تکرار اعمال گردید. اندازه‌گیری میزان فنل‌کل در برگ و گل با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (فولین سیکالچو) ارزیابی شد و همچنین میزان فنولیک‌اسید بر اساس اسید گالیک و فلاونوئیدها (فلاونول کوئرسیتن) در عصاره گل ماهور با استفاده از دستگاه HPLC تعیین گردید. بر اساس یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید، باعث ارتقای ترکیبات پلی فنلی به میزان ۲٦ درصد در مقدار فلاونئید در گل از نوع فلاونول کورستین و ۲۰ درصد در میزان اسید فنولیک از نوع گالیک اسید در گل گیاه دارویی گل ماهور می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خرگوشک *V. songaricum*، سالیسیلیک اسید، شهر کرد فلاونوئید، فنولیک اسید، محلول پاشی.

*نویسنده مسئول: ghasemi955@yahoo.com

مقدمه

جنس *Verbscum* متعلق به تیره گل میمون (Scrophulariaceae)، تقریباً ۳۶۰ گونه آن، گیاهان گلدار، بومی اروپا و آسیا را شامل می‌شود (Juan et al., 1997). این جنس شامل ٤٣ گونه و سه هیبرید در ایران است که از این میان ۲۰ گونه بومی هستند (Sotoodeh et al., 2018). بیشتر گونه‌های گیاهی در این جنس خودرو هستند و هنوز مورد کشت نشده است (Jamshidi-Kia et al., 2018). گونه‌های این گیاه غنی از برخی متابولیت‌های ثانوی: گلیکوزید، فلاونوئیدها، ایروییدها، استروئید، اسید فنولیک، اسیدهای چرب و آلکالوئید هستند (Georgiev et al., 2011; Ghahremani et al., 2020). عصاره اندام هوایی به خصوص گل آن‌ها به دلیل کثرت ترکیبات فنلی و فلاونوییدی از عملکرد بهینه دارویی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی برخوردارند (Mihailović et al., 2016; Noori et al., 2018; Ghahremani et al., 2017; Rakhimzhanova et al., 2020)، همچنین عملکرد ضد التهاب، ضد سرطانی، ضد عفونی کننده زخم نیز گزارش شده است (Kayır et al., 2018) در بررسی‌های مختلف دیگر نیز از گونه‌های مختلف این گیاه به‌دلیل پتانسیل سنتز ترکیبات ترپنوییدی و فلاونوییذی (آپی ژنین، لوتیولین، ورباسکوزید) به عنوان ضدالتهاب، ضدعفونی کننده در التیام زخم، ضدتومور و ضدسرطان، ضدانگل و ضدقارچ و در درمان اسهال و عفونت‌های قارچی و حتی ویروس آنفولانزا موثر است (Kahraman et al., 2010) که از گل آن به عنوان داروی ضدسرفه و خلط آور و برای ناراحتی‌های ریوی مانند برونشیت وسیاه سرفه سرماخوردگی، التهاب حلق و گلو و رم لوزه‌ها، اسهال و بواسیر و عفونت‌های مجاری ادراری استفاده و همچنین برای درمان تب یونجه نیز استفاده می‌نمودند (Dalar et al., 2014).

ترکیبات فنلی یکی از بزرگترین و مهم‌ترین گروه ترکیبات ثانویه بدون نیتروژن در گیاهان می‌باشند که نقش بسیار مهمی در افزایش سازگاری و در نهایت بقا گیاهان دارند. این گروه از ترکیبات نقش مهمی در کاهش اثرات منفی تنش‌های محیطی یا غیر زنده نظیر خشکی، شوری، سرما، اکسیداتیو، نور شدید و غیره و همچنین تنش‌های زنده شامل آفات و بیماری‌ها ایفا می کنند (Rezaei and Ghasemi Pirbalouti, 2019; Rahimi et al., 2018). گونه‌های مختلف گیاه ماهور، مانند گل ماهور، چند ساله است که به علت داشتن ترکیبات فنل‌کل و فنولیک اسید و فلاونوئیدهای بالا، آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی خوبی می‌باشد. فلاونوئیدها نیز نمایانگر گروه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که در بسیاری از نقش‌های فیزیولوژیکی از جذب گرده افشان‌ها تا محافظت در برابر تنش‌های زنده یا غیر زنده دخیل هستند (Bovy et al., 2007). فلاونوئیدها در تعدادی از محصولات باغی، دارویی و معطر که یکی از مؤلفه‌های مهم رژیم غذایی روزانه دنیا هستند ساخته می‌شوند. بنابراین، به دلیل اهمیت تغذیه‌ای آن‌ها، تلاش‌های زیادی برای افزایش سطح فلاونوئید در گونه های مورد علاقه زراعی و دارویی انجام شده است (Falcone Ferreyra et al., 2012).

اسید سالیسیلیک که غلظت آن در گیاهان به‌عنوان یک ترکیب ثانویه بسیار پایین است نقش مهمی در سازگاری گیاهان بالاخص در شرایط تنش‌های زنده (پاتوژن‌های گیاهی) و غیرزنده یا محیطی ایفا می کند و به‌عنوان یکی از محرک‌ها یا الیستورها، در رشد، نمو و عملکرد کمی و کیفی گیاهان زراعی و باغی موثر است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2014). کاربرد

الیسیتورهای غیرزیستی مانند سالیسیلیک اسید یکی از مهمترین راه‌کارهای جهت القاء تولید متابولیسم‌های ثانویه و افزایش عملکرد کمی و کیفی مواد موثره ارزشمند در گیاهان دارویی است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019).

با توجه به بررسی به عمل آمده توسط نگارندگان مقاله، تاکنون تحقیقی در خصوص اهلی کردن و کشت و زراعت گل ماهور انجام نشده است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف ارزیابی اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک‌اسید (SA) در سه سطح در سه مرحله از رشد گیاه بر روی بر خصوصیات فیتوشیمیایی گل ماهور طی دو سال در شرایط آب و هوایی شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، محل مورد مطالعه و طرح و تیمار آزمایشی: ابتدا بذرهای گل ماهور از پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه و سپس بذرها با کلرسدیم ۱ در صد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند و سه بار با آب مقطر شسته شدند. در مرحله اول، بذرها در گلدان پلاستیکی (با عمق ٤٠ سانتی‌متر و قطر بالای ۲۵ سانتی‌متر و پر از خاک طبیعی) کاشته شدند. سپس نشاهای گل ماهور در اوایل بهار سال ۹۵ به مزرعه تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۱۰ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۵ دقیقه و ارتفاع از سطح دریا ۲۰۹٦ متر و میزان متوسط بارندگی ۳٤۰ میلی‌متر با دمای روزانه حداقل ۱۰ و حداکثر ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. براساس طبقه‌بندی اقلیم به روش Köppen، منطقه مورد مطالعه دارای آب و هوا سرد، خشک و نیمه خشک و مرطوب است. ویژگی‌های آب و هوایی و خاکشناسی عمق ۳۰ سانتی متری خاک مزرعه مورد مطالعه در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است.

شکل ۱: تصویر اندام گیاه گل ماهور کشت شده در شرایط اقلیم شهرکرد (عکس از مولفان)

جدول ۱: خصوصیات آب و هوایی شهرکرد در فصل رویش گیاه گل ماهور

Soil texture	EC (dSm^{-1})	N (%)	Organic Carbon (%)	pH	K	P	Fe	Mn (ppm)	Zn	Cu	B
Clay	1.04	0.05	0.5	7.94	238	14.8	4.89	10.47	0.55	1.27	2.49

جدول ۲: خصوصیات خاک مزرعه مورد مطالعه

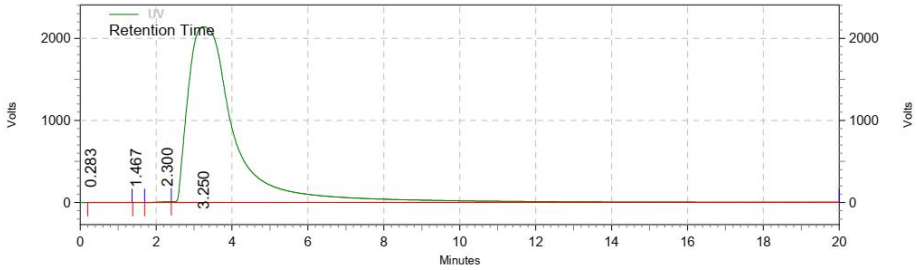
ماه فصل رویش Month	متوسط درجه حرارت Average temperature (°C)						کل بارش Total precipitation (mm)		متوسط رطوبت هوا Average humidity (%)	
	Minimum		Average		Maximum					
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
April	-4.1	-6.6	11.9	10.3	26	25.9	40.2	74.2	52	43
May	-0.4	1.3	16.2	17	31.2	31.1	13.1	4.9	34	41
June	5.9	1.2	22.7	21.2	36.5	35.7	0.2	0	29	22
July	9.9	9.8	24.1	25.2	35.3	37.4	23.4	0	26	19

تیمار محلول پاشی سالیسیلیک‌اسید (SA) در غلظت‌های مختلف شامل شاهد (حلال یا آب مقعطر)، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار بر لیتر بر روی گل ماهور در طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در دو سال ۹۵ و ۹۶ اعمال شد. پس از ۳۰ روز، ابتدا در مرحله ۱۵ الی ۲۰ برگی اقدام به محلول پاشی در یک نوبت اول در بعد از ظهر به محض خنک شدن هوا گردید. مرحله دوم محلول پاشی ۱۰ روز پس از مرحله اول و مطابق با شرایط محلول پاشی اول و مرحله سوم محلول پاشی ۱۰ روز پس از مرحله دوم انجام گردید.

صفات فیتوشیمیایی مورد ارزیابی: ابتدا عصاره متانولی از برگ و گل به روش ماسراسیون از اندام‌های گیاهی گیاهان رشد کرده (شکل ۱) سایه خشک شده بدست آمد (Rezaei and Ghasemi Pirbalouti, 2019). اندازه‌گیری غلظت فنل کل در عصاره‌های برگ و گل در (هر دو سال آزمایشی) با استفاده از روش فولین سیکالیتو (Folin-Ciocalteu) با اصلاحات جزئی مشخص شد (Rezaei and Ghasemi Pirbalouti, 2019). به‌طور خلاصه، هر نمونه (۰/۱ میلی‌لیتر) با ۲ درصد سدیم ۲ میلی‌لیتر کربنات ترکیب و مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، ۱۰۰ میلی‌لیتر فولین سیکالچو به مخلوط اضافه شد. پس از نیم ساعت واکنش ، جذب ماده افزودنی در ۷۵۰ نانومتر با طیف سنج UV-VIS قرائت شد. از اسید گالیک نیز به عنوان ماده مرجع و استاندارد استفاده شد. محتوای فنل کل به‌عنوان میلی‌گرم اسید گالیک در گرم از عصاره خشک (میلی‌گرم اسید گالیک / گرم عصاره خشک) بیان شد. سه اندازه‌گیری در هر نمونه انجام شد.

برای تعیین محتوی فنولیک اسید و فلاونوئید در تیمارهای عصاره گل ماهور با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. روش کروماتوگرافی مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقدار فنولیک اسید و فلاونوئید موجود در گیاه گل ماهور، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بر اساس روش مطالعه قبلی (Dalar et al., 2014) انجام شد. مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای آنالیز عصاره از دستگاه HPLC مدل Knuer برلین، آلمان مجهز به پمپ K-1001، یک دستگاه جاروبرقی و یک آشکارساز UV / Visible دیکتور استفاده شد. ترکیب فاز متحرک بکار برده شده، متانول

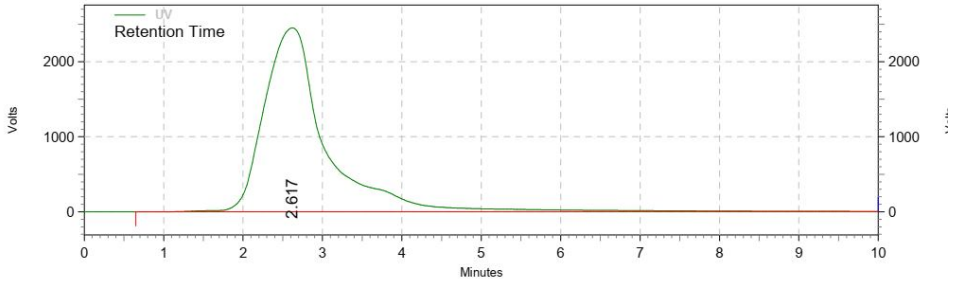
۵۹ درصد، آب ٤٠ درصد و ۱ درصد اسید ارتو فسفریک، ۸۵ درصد در ۱۰ دقیقه بود و درصد عبور فاز متحرک در زمان‌های مختلف با توجه به نوع ماده (25×0.4cm ID) 5-120 C_{18} H و قطر ستون ٤/٦ میلی‌متر و طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و اندازه ذرات پایه ۵ میکرومتر بود. دتکتور استفاده شده UV با طول موج ۲٥٤ nm و حجم هر بار تزریق برابر ۲۰ میکرولیتر بود و دمای اتاق برای انجام آزمایش، ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد تشخیص اشعه ماوراء بنفش در ۲۸۰ نانومتر برای اسید گالیک و ۳۷۰ نانومتر برای فلاونول کورستین و میزان جریان ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. قبل از تزریق HPLC، نمونه‌ها و مراحل موبایل از طریق فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر) فیلتر شدند. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. دمای ستون در ۲۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. شناسایی ترکیبات با مقایسه مقادیر زمان ماندگاری آنها با استانداردها (اسید گالیک و کوئرستین که از شرکت سیگما خریداری شده) بدست آمد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار (Knauer) جمع‌آوری و پردازش شدند (شکل ۲).



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.283	2161	0.00	47	0.00
1.467	322	0.00	33	0.00
2.300	196536	0.11	9228	0.43
3.250	184052990	99.89	2140712	99.57
Totals	184252009	100.00	2150020	100.00

استاندارد فلاونول کورستین



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.617	131410525	100.00	2450173	100.00
Totals	131410525	100.00	2450173	100.00

استاندارد گالیک اسید

شکل ۲: منحنی کالیبراسیون و کروماتوگرام HPLC

به‌طور خلاصه مشخصات دستگاه و مواد مصرفی شامل متانول، آب مقطر دیونیزه و استو نیتریل مصرفی با گرید HPLC، استانداردهای اسیدگالیک و کویرسیتن شرکت سیگما، مدل پمپ HPLC: ea4300 K-1001 pump، مدل ستون: C18 column H 25 × (0.4 cm ID Germany) با فاز متحرک CAN, H2O, ortho-phosphoric acid, 85 %، مشخصات ستون: HPLC Column EC 250/4/6 Nucleosil 100-5 C18 E4310, UV detector2500, Knauer,) MPN Germany) بودند. شناسایی ترکیبات فنلی موجود در نمونه های مختلف با مقایسه زمان‌های ماندگاری و طیف‌ها با ترکیبات استاندارد بر اساس روش استاندارد خارجی با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون در محدوده ۱۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. نتایج به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره خشک بیان شد. در نهایت میزان فنولیک اسید و فلاونوئید در نمونه‌های عصاره گل ماهور با استفاده از دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲) در این قسمت از آزمون برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد.

تجزیه آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از SAS Ver. 9.2 انجام شد. مقایسه میانگین با استفاده (طبق آزمون دامنه چندگانه دانکن) با احتمال ۵ درصد و همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از LSD و انحراف استاندراد (SD).

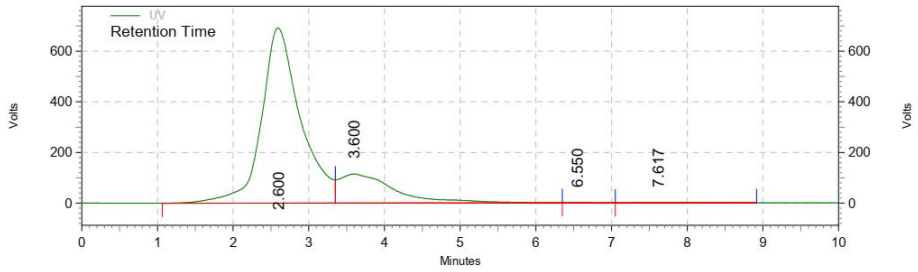
نتایج

نتایج خصوصیات رشدی گیاه در جدول ۳ نشان داد که این گیاه در سال اول تنها رشد رویشی یا روزت دارد و در سال دوم بعد از گذراندن سرمای زمستان و بهاره سازی پس از رشد مجدد و تحمل نسبی مناسب در برابر سرما و یخبندان در شرایط اقلیمی شهرکرد وارد فاز گلدهی می‌شود که در سال دوم ارتفاع گیاه بین ۷۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر و بعضاً تا ۱۵۰ سانتی‌متر رشد کرده و پوشش مناسب و سبزی را در هر دو سال در مزرعه ایجاد می‌کند و به خصوص در سال دوم رقابت نسبی خوبی با علف‌های هرز مزرعه دارد. گل‌های زرد این گونه با گل آذین به ارتفاع بین ۳۰ تا ۵۰ سانتی متر در اواسط بهار تا قبل از شروع زمستان ظاهر می‌شود.

نتایج عصاره‌گیری از برگ و گل ماهور حاکی از آن بود که کارآیی عصاره الکلی در گل‌ها حدود ۱۵ درصد و در برگ ۲۰ درصد بود که در کل عصاره سبز تیره از برگ و زرد رنگ از گل‌ها به‌دست آمد. در خصوص عملکرد عصاره الکلی (اتانول) چهار گونه دیگر گل ماهور سایر پژوهشگران (Mihailović et al., 2016; Dalar et al., 2014) نیز نتایج نزدیک به نتایج تحقیق حاضر را گزارش کردند.

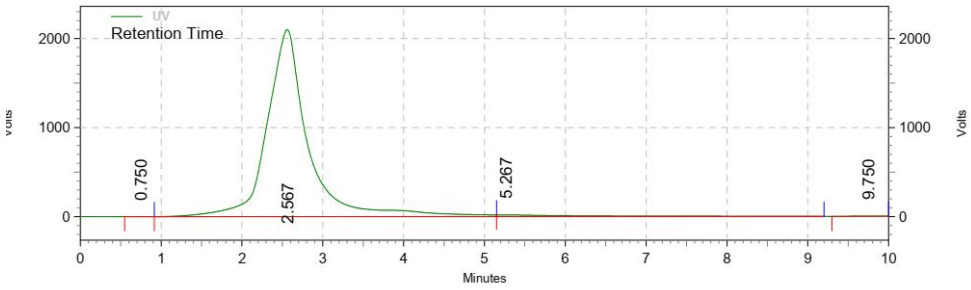
در مطالعه حاضر میزان ترکیبات فنلی ابتدا بر مبنای میزان فنل کل (TPC) در برگ و گل به‌طور مجزا به روش فولین سیکالچو با استاندارد اسید گالیک تعیین شد. به‌طوری‌که نتایج در این مطالعه نشان داد که دامنه مقادیر فنل کل بین ۱۶۰ تا ۱۹۰ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در عصاره خشک برگ و یا گل بود که در تحقیقات مشابه نیز (Mihailović et al. 2016) بیشترین میزان فنل کل روش فولین سیکالچو با استاندارد اسید گالیک در عصاره متانولی گونه *Verbascum nigrum* در حدود ۱۳۵ میلی گرم معادل اسید گالیک بوده است (جدول ۳).

همچنین برای تعیین نوع و میزان اسید فنولیک نیز در گل گیاه گل ماهور یا گونه *V. songaricum* از HPLC استفاده شد (شکل ۲) و نتایج مندرج در جدول ۳ مشخص کرد که بیشترین میزان اسید فنولیک شناسایی شده در عصاره‌ها از نوع اسید گالیک بود در حالی که سایر اسیدهای فنولیک مانند وانیلیک اسید، اپی جنین، سینامیک اسید و استوزید بسیار کم و ناچیز به‌دست آمد (شکل ۲).



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2.600	24778936	80.46	691412	85.42
3.600	5884037	19.11	114838	14.19
6.550	31587	0.10	1045	0.13
7.617	100712	0.33	2107	0.26
Totals	30795272	100.00	809402	100.00



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
0.750	4749	0.01	441	0.02
2.567	73458482	98.07	2099483	98.96
5.267	1393304	1.86	19723	0.93
9.750	44235	0.06	1809	0.09
Totals	74900770	100.00	2121456	100.00

شکل ۳: کروماتوگرام HPLC گل ماهور تحت تیمار محلول پاشی اسید سالیسلیک بر میزان اسید گالیک

در این تحقیق، نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) در خصوص اثر محلول پاشی بر خصوصیات فیتوشیمیایی برگ گیاه گل ماهور یا گونه *V. songaricum* سال اول آزمایش (۱۳۹۵) نشان داد محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر روی میزان فنل کل (TPC) به روش فولین سیکالچو معنی‌دار نبوده و میزان فنل کل برگ در سال اول در یک دامنه ١٦٤ تا ١٦٦ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در عصاره خشک قرار داشت (جدول ۳)؛ ولی نتایج سال دوم (۱۳۹٦) نشان داد که محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر روی میزان فنل کل (TPC) به روش فولین سیکالچو معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده و بیشترین مقدار فنل در برگ تحت محلول پاشی ۰/۵ میلی‌مولار بر لیتر اسید سالیسلیک به میزان ۱۷۸ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم از عصاره خشک حاصل گردید (جدول ۳).

در خصوص اثر محلول پاشی اسید سالیسلیک بر میزان فنل کل (TPC) اندازه گیری شده به فولین سیکالچو در گل‌های خرگوشک یا *V. songaricum*، تنها در سال دوم آزمایش (۱۳۹۶) نشان داد که اثر تیمار محلول پاشی بر مقدار فنل کل (TPC) در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود و بالاترین میزان فنل کل (TPC) در گل به عنوان اصلی ترین اندام دارویی گونه *V. songaricum* تحت محلول پاشی ۱ میلی‌مولار بر لیتر اسید سالیسلیک به میزان ۱۸۹ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم از عصاره خشک به دست آمد (جدول ۳). به‌طور مشابه، در مورد اثر اسپری اسید سالیسلیک بر میزان فلاونوئید اندازه گیری شده به روش HPLC در گل‌های خرگوشک یا *V. songaricum* از نوع فلاونول کورستین در سال دوم آزمایش مشخص شد تیمار محلول پاشی بر میزان فلاونوئید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود و به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان آن در گل تحت محلول پاشی ۱ میلی‌مولار بر لیتر اسید سالیسلیک و شاهد به مقادیر ۸۸ و ۷۰ میلی‌گرم فلاونول کورستین در گرم از عصاره خشک به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳: اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک‌اسید بر خصوصیات‌فیتوشیمیایی گل ماهور

تیمارهای آزمایش Treatments	میزان فنل کل در برگ Total phenol content or TPC (mg GAE/g DW)	میزان فنل کل در گل Total phenol content or TPC (mg GAE/g DW)	میزان فلاونئید در گل از نوع فلاونول کورستین به روش HPLC Flavonol quercetin (mg QUR/g DW)	اسید فنولیک از نوع گالیک اسید در گل به روش HPLC Gallic acid (mg GAE/g DW)
سطوح مختلف محلول پاشی Salicylic acid		سال اول ۱۳۹۵		
S1	164 a	-	-	-
S2	165 a	-	-	-
S3	166 a	-	-	-
تجزیه واریانس ANOVA	$P \geq 0.05$	-	-	-
		سال دوم ۱۳۹۶		
S1	167 ab	180 ab	70.09 c	105.54 c
S2	178 a	171 b	75.91 b	114.02 ab
S3	146 b	189 a	87.80 a	126.72 a
تجزیه واریانس ANOVA	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$

روف غیر مشابه در یک ستون به مفهوم معنی داری در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه ای دانکن.

[b]The different letters in columns indicate significant difference among each category based on Duncan's test ($p \leq 0.05$)

بحث

در تحقیق حاضر عصاره گیری از برگ و گل ماهور بیانگر آن بود که کارآیی عصاره‌های الکلی بین ۱۵ تا ۲۰ درصد است که در خصوص عملکرد عصاره الکلی (اتانول) چهار گونه دیگر گل ماهور سایر پژوهشگران (Mihailović et al., 2016; Dalar et al. 2014) نیز نتایج نزدیک به نتایج تحقیق حاضر را گزارش کردند. همچنین در مورد میزان فنل کل اندازه‌گیری به روش فولین سیکالچو با استاندارد اسید گالیک در گونه مورد مطلعه تحقیق حاضر بین ۱۶۰ تا ۱۹۰ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بود که مشابه با نتایج این مطالعه سایرین Mihailović et al. (2016) نیز گزارش کردند که بیشترین میزان فنل کل روش فولین سیکالچو با استاندارد اسید گالیک در عصاره متانولی گونه *Verbascum nigrum* در حدود ۱۳۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بوده است.

در این بررسی به منظور جداسازی و تعیین مقدار فنولیک اسید و فلاونوئید موجود در گیاه گل ماهور از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Dalar et al., 2014) انجام شد. نتایج حاکی از آن است که بالاترین میزان اسید فنولیک شناسایی شده در عصاره‌ها از نوع اسید گالیک بود در حالی که سایر اسیدهای فنولیک مانند وانیلیک اسید، اپی جنین، سینامیک اسید و استوزید بسیار کم و ناچیز به دست آمد. نتایج مطالعه‌ای توسط .Dalar et al (2014) بیانگر تشابه نتایج با تحقیق حاضر بود در حالی که مخالف نتایج .Mihailović et al (2016) بود. نتایج مطالعه‌ای توسط .Dalar et al (2014) بیانگر تشابه نتایج با تحقیق حاضر بود در حالی که مخالف نتایج .Mihailović et al (2016) بود.

اسید سالیسیلیک نقش مهمی در افزایش فنل کل، فنولیک اسید و فلانوئیدها و ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی دارد. (Ghasemi Pirbalouti et al., 2014; Ghasemi Pirbalouti et al., 2014). کاربرد اسید سالیسیلیک به صورت‌های مختلف در کشت سلول و بافت یا کاربرد اسپری برگی می تواند در سنتز متابولیسم‌های ثانویه و افزایش عملکرد کمی و کیفی مواد موثره و ارزشمند در گیاهان دارویی نقش مهمی ایفا کند. همچنین اسید سالیسیلیک می تواند در شرایط تنش به خصوص تنش‌های محیطی مانند خشکی اثرات مثبتی بر تولید و سنتز متابولیت‌های ثانویه، تحمل نسبی گیاه به تنش‌ها و کاهش اثرات منفی خشکی بر تولید مواد موثره گیاهان دارویی مانند پلی فنل‌ها و فلاونوئیدها شوند (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019; Mohammadi et al., 2019). نتایج تحقیقات قبلی در خصوص اثرات محلول پاشی اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مختلف در مراحل رشدی متفاوت روی خصوصیات فیتوشیمیایی تعدادی گونه‌های گیاهان دارویی نظیر علف لیمو (Idrees et al., 2010)، ملیس یا بادرنجبویه (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019)، نعناع فلفلی (Saharkhiz and Goudarzi, 2014)، رازیانه (Forouzandeh et al., 2019) و انواع گونه‌های آویشن (Ghasemi Pirbalouti et al., 2014; Mohammadi et al., 2019) حاکی از تغییرات (کاهشی یا افزایشی) کمیت و کیفیت ماده موثره گیاهان دارویی می‌باشد.

در یک تحقیق (Pablo Preciado et al., 2019) اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر روی خیار در شرایط هیدروپونیک در پنج غلظت مختلف (۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار) و یک گروه شاهد (آب مقطر) به‌طور هفتگی بر روی گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید باعث افزایش عملکرد و محتوای فیتوشیمیایی و غلظت‌های زیاد آن سبب کاهش ترکیبات فعال زیستی می شود، به طور کلی مشخص شد که غلظت‌های متوسط سالیسیلیک اسید بر روی خیار، باعث افزایش عملکرد و ترکیبات فیتوشیمیایی ترکیبات فنول و فلاونوئیدها می‌شود.

نتایج تحقیقات مشابه در این خصوص نشان داد که مهمترین عملکرد ضد التهابی و آنتی اکسیذانی عصاره برگ و گل گونه‌های مختلف این جنس مربوط میشود به ترکیبات ثانوی : فنلی و فلاونوییدی گیاه و یک رابطه مثبت معنی دار بین میزان این ترکیبات با عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره‌ها وجود دارد و از متابولیت ثانوی ورباسکوزید (118.60 mg/g of dry extract) مخصوصا در گونه *V.nigrum* که در مقایسه با بقیه گونه‌ها از بیشترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوییدی کویرستین و گالیک اسید برخوردار بود به تناسب آن از بیشترین میزان عملکرد آنتی اکسیدانی در شرایط invitro برخوردار بود. به‌عنوان مهمترین ترکیب آنتی‌اکسیدان در عصاره گونه‌های مختلف این جنس نام برده شده است بنابراین بعنوان یک منبع

غنی از ترکیبات ثانوی آنتی‌اکسیدان به کارخانه‌های داروسازی پیشنهاد می‌گردد (Mihalovic et al., 2016) در همین رابطه تحقیقات مشابه نیز مهمترین عملکرد دارویی و آنتی اکسدانی اندامهای گیاهان این جنس را به ترکیبات فنلی و فلاونوییدی آن نسبت داده است که مصارف سنتی دارویی و غذایی آن را قابل بحث می‌سازد (Jamshid –Kia et al., 2018; Ghahramani et al., 2020).

در پژوهش دیگری (Ranjbaran et al., 2011) اثر محلول پاشی اسید سالیسیلیک سبب تجمع پروتئین‌های آنتی اکسیدانی و تجمع ترکیبات فعال بیولوژیکی نظیر میزان فنل کل و فلاونوئید کل در انگور شد و مشخص گردید ترکیبات فنلی و فلاونوییدهای بتاکاروتن و لینولییک اسید آن از بیشترین عملکرد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی برخوردار بوده است و در بررسیهای مشابه مهمترین عملکرد ضد باکتریایی عصاره اندامهای گونه‌های مختلف آن مخصوصا گونه *V. speciosum* را به ترکیبات فنلی و فلاونوییدی آن نسبت داده اند (Karamian et al., 2013).

در بررسی Abedaljasim et al. (2013) مشخص شد که ترکیبات فنلی گالیک اسید ، کومارین ، اوژنول و تیمول موجود در عصاره برگ و گل گیاه نقش مهمی را به عنون آنتی اکسیدان و عملکرد دارویی گیاه دارد (Abedaljasim et al., 2017). در تحقیقی دیگر نیز از ترپنوییدهای اسانس گونه *V. songaricum* مثل: اوژنول، بیسابولول و ترکیبات فنلی و فلاونوییدی: روتین، کویرستین، رزمارینیک اسید، سالیسیلیک اسید و فرولیک اسید و کومارین به‌عنوان طیف وسیع ترکیبات ثانوی دارویی در عصاره گیاه نام برده شد که به آن خاصیت آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی می‌بخشد (MohammadSelseleh et al., 2019) و در تحقیقی دیگر مشخص شد که عصاره گیاه بواسطه این ترکیبانت دارای عملکرد بهینه در مهار باکتری‌های گرم مثبت و منفی S. aureus, L. monocytogenes, B. anthracis, B. cereus and S. typhimurium دارد (Nofuzi et al., 2016).

همچنین هوانگ و همکاران (Huang et al., 2008) گزارش کردند که اسید سالیسیلیک برخی از سیستم‌های دفاعی گیاهان را تحریک می‌کند و بیوسنتز ترکیبات دفاعی نظیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. هنگامی‌که گیاه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی روبرو می‌شود، غلظت این فیتوهورمون در گیاه بالا رفته و سبب افزایش تحمل در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد (Hayat and Ahmad, 2007). نتایج بررسی دیگری توسط Forouzandeh et al., (2019) در خصوص اثرات محلول‌پاشی برگی سالیسیلیگ اسید به عنوان یک الیسیتور زیستی بر تغییرات عملکردی، شاخص‌های فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) نشان داد که کاربرد برگی ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک، میزان فنل، فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز را به‌ترتیب ۷۶/۳، ۷۱/٤ و ۵۵/۷ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. ایشان گزارش کردند که محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک از طریق افزایش رنگیزه-های فتوسنتزی و اسمولیت‌های محلول، همچنین محافظت در برابر خسارت نشت الکترولیتی توانایی گیاه رازیانه را بهبود بخشیده و از این طریق عملکرد میوه را افزایش داد.

نتیجه گیری نهایی

تحقیق حاضر برای نخستین بار بر روی کشت کونه دارویی گل ماهور یا خرگوشک *V. songaricum* در شرایط اقلیمی شهرکرد (نیمه خشک با زمستان‌های سرد) انجام شد. ویژگی رشدی گیاه نشان داد که این گیاه در سال اول رشد رویشی داشته و در سال دوم

بعد از گذراندن سرمای زمستان وارد فاز زایشی یا گلدهی می شود. نتایج بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی عصاره الکلی گل ماهور مشخص کرد که بیشترین میزان فنل کل در گل و بیشترین نوع اسید فنولیک از نوع اسید گالیک بود. همچنین، با اعمال تیمار محلول پاشی اسید سالیسلیک، میزان اسید فنولیک، فنل کل و فلاونوئید از نوع فلاونول کوئرستین در گل گیاه خرگوشک افزایش یافت. البته دلیل این ادعا نیاز به بررسی مسیرهای بیوسنتزی تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه می باشد.

References

1. Bovy, A., Schijlen, E. and Hall, R.D. 2007. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*)*:* The potential for metabolomics. Metabolomics, 3: 399-412.
2. Dalar, A., Guo, Y. and Konczak, I. 2014. Phenolic composition and potential anti-inflammatory properties of *Verbascum cheiranthifolium* var. *cheiranthifolium* leaf. Journal of Herbal Medicine, 4: 195-200.
3. Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P. and Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science. 3: 222
4. Forouzandeh, M., Mohkami, Z. and Fazelinasab, B. 2019. Evaluation of biotic elicitors foliar application on functional changes, physiological and biochemical parameters of fennel (*Foeniculum vulgare*), Journal of Plant Production Research, 25: 49-65.
5. Georgiev, M.I., Ali, K., Alipieva, K., Verpoorte, R. and Choi, Y.H. 2011. Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. Phytochemistry, 72: 2045–2051
6. Ghahremani, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Mozafari, H., Habibi, D. and Sani, B. 2020. Phytochemical and morpho-physiological traits of mullein as a new medicinal crop under different planting pattern and soil moisture conditions. Industrial Crops and Products, 145: 111976.
7. Ghasemi Pirbalouti, A., Nekoei, M., Rahimmalek, M. and Malekpoor, F. 2019. Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 19: 101144.
8. Ghasemi Pirbalouti, A., Samani, M.R., Hashemi, M. and Zeinali, H. 2014. Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under reduced irrigation. Plant Growth Reguluation, 72: 289-301.
9. Hayat, S. and Ahmad, A. 2007. Salicylic acid a plant hormone. Department of Botany Aliga Muslim University. Springer, India.
10. Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L. and Xu, Y. 2008. Effect of pre-harvest salicylic acid spray treatment on postharvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinenisis* L. Osbeck). Journal of the Science of Food and Agriculture, 88: 229–236
11. Idrees, M., Khan, M.M.A., Aftab, T., Naeem, M. and Hashmi, N. 2010. Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. Journal of Plant Interaction, 5: 293-303.
12. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Asgari, S. and Saeidi, K. 2018. Iranian species of *Verbascum*: a review of botany, phytochemistry, and pharmacological effects. Toxin Reviews, 38: 255-262.
13. Juan, R., Fernandez, I. and Pastor, J. 1997. Systematic consideration of micro-characters of fruits and seeds in the genus *Verbascum* (Scrophulariaceae). Annals Botany, 80: 591–598.
14. Kayır, S., Demirci, Y., Demirci, S., Ertürk, E., Ayaz, E., Doğan, A. and Şahin, F. 2018. The in vivo effects of *Verbascum speciosum* on wound

healing. South African journal of Botany, 119: 226-229.
15. Mihailović, V., Kreft, S., Benković, E.T., Ivanović, N., and Stanković, M.S. 2016. Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. Industrial Crop and Products, 89: 141-151.
16. Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F. and Hashempour, H. 2019. Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. Industrial Crop and Products, 129: 561-574.
17. Noori, M., Malayeri, B., Moosaei, M., Pakzad, R. and Piriye, M.H. 2012. Effects of heavy metals on the antibacterial properties of *Verbascum speciosum* Schard. Revista Cientifica UDO Agricola, 12: 463–471.
18. Preciado-Rangel, P., Reyes-Pérez, J.J., Ramírez-Rodríguez, S.C., Salas-Pérez, L., Fortis-Hernández, M., Murillo-Amador, B. and Troyo-Diéguez, E. 2019. Foliar aspersion of salicylic acid improves phenolic and flavonoid compounds, and also the fruit yield in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plants, 8: 44.
19. Rahimi, Y., Taleei, A. and Ranjbar, M., 2018. Long-term water deficit modulates antioxidant capacity of peppermint (*Mentha piperita* L.). Scientia Horticulturae, 237: 36-43.
20. Rakhimzhanova, A., Aydin, C., Mammadov, R. and Tischenko, O. 2017. Determination antioxidant activities of different solvent extracts from *Verbascum glomeratum* Boiss. In: The 3rd International Symposium on Eurasian Biodiversity, Minsk – Belarus.
21. Ranjbaran, E., Sarikhani, H., Wakana, A. and Bakhshi, D. 2011. Effect of salicylic acid on storage life and postharvest quality of grape (*Vitis vinifera* L. cv. *Bidaneh Sefid*). Journal Faculty of Agriculture Kyushu University, 56: 263-274.
22. Rezaei, M. and Ghasemi Pirbalouti, A. 2019. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of extracts from two species herbs under different extraction solvents. Journal of Food Measurement and Characterization, 13: 2470-2480.
23. Saharkhiz, M.J. and Goudarzi, T. 2014. Foliar application of salicylic acid changes essential oil content and chemical compositions of peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17: 435-440.
24. Sotoodeh, A., Attar, F., Andalo, C., Mirtadzadini, M. and Civeyrel, L. 2018. Focusing on three *Verbascum* L. taxa (Scrophulariaceae) of the Flora of Iran. Adansonia, 40: 171-181.

Evaluation of the effect of salicylic acid foliar application on phytochemical properties of extracts of different parts of *Verbascum songaricum* Schrenk.

GhahramaniA[1]., Ghasemi Pirbalouti, A.[2*], Mozafari, H.[3], Habibi D.[4], D., Sani, B.[5]

[1]Ph.D, Department of Agronomy, faculty of Agriculture, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Professor, Department of Medicinal Plants., Shahr-e-Qods Branch, Iran

[3]Assisstant Professor, Department of Agronomy, faculty of Agriculture, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[4]Accossiate Professor, Department of Agronomy, faculty of Agriculture, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[5]Assisstant Professor, Department of Agronomy, faculty of Agriculture, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 2020-4-6 ; Accepted: 2020-8-9

Abstract

Verbascum songaricum Schrenk. as a perennial herb belonging to the Scrophulariaceae family has antioxidant, anti-inflammatory, anti-viral, and antiseptic properties due to its potential for the synthesis of secondary drug metabolites.. Application of bio-elicitors increases secondary metabolites in sustainable agricultural systems and improves the quantity and quality of active ingredients in medicinal plants. In this study, to evaluate the effect of the foliar-applied salicylic acid on phytochemical properties of leaves and flowers of mulch, a randomized complete block design (RCBD) at the field of research center for medicinal plants of Shahrekord was conducted during 2016 and 2017.The foliar-applied salicylic acid was used at three levels (control, 0.5 and 1 mM / l) in three stages on the flower in four replications. Total phenol content (TPC) in the leaves and flowers was determined by spectrophotometric method and the phenolic acid based on gallic acid and flavonoids (flavonol quercetin) were measured by HPLC. Based on the findings, the effect of salicylic acid on the TPC, phenolic acid and flavonoids of the extract was significant. In conclusion, the foliar application of salicylic acid promotes of polyphenolic compounds by 26% in the amount of flavonoids (flavonol quercetin) in flowers and 20% in the amount of phenolic acids (gallic acid) in the flowers of *Verbascum songaricum*.

Keywords: Flower extract, Flavonoid, Total phenol, Phenolic acid, *Verbascum songaricum*.

[*]Corresponding author; ghasemi955@yahoo.com