

بررسی برخی ترکیبات زیست فعال و اسیدهای فنولیک گیاه تاج خروس گسترده در

مراحل مختلف فنولوژیکی



محمد سیاری*، مریم حمیدی، علی عزیزی و گودرز احمدوند

ایران، همدان، دانشگاه بوعالی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باگبانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۴

چکیده

جهت تعیین برخی مواد موثره گیاه تاج خروس گسترده (*Amaranthus blitoides*) در مراحل مختلف فنولوژیکی، آزمایشی در قالب طرح بلوك کامل تصادفی با ۳ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. سه مرحله رشد گیاه شامل مرحله ۸ برگی، مرحله گلدهی و مرحله بذردهی به عنوان سه تیمار آزمایش در نظر گرفته شد. سپس صفات فیتوشیمیایی و محتوی اسیدهای فنولیک کوئرستین، روتین، اسیدکلروژنیک و اسید کافئیک در این گیاه اندازه گیری شد. بیشترین محتوای کلروفیل کل (۰/۵۰ میلی گرم بر گرم) در مرحله بذردهی و کمترین آن (۰/۹۴ میلی گرم در گرم) در مرحله ۸ برگی مشاهده شد. بیشترین محتوای کلروفیل a و b در مرحله بذردهی و کمترین آن در مرحله هشت برگی مشاهده شد. بالاترین مقدار کارتنوئید، در مرحله فنولوژیکی بذردهی مشاهده شد. میزان متابولیتهاي ثانويه اين گیاه در مراحل مختلف فنولوژیکی اختلاف معنی داری نشان داد، بیشترین مقدار فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل و ظرفیت آنتی اسیدانی در مرحله گلدهی مشاهده شد. آنالیز HPLC عصاره اندام هوایی گیاه نشان داد که این گیاه دارای مقداری کوئرستین و روتین می باشد که با افزایش سن گیاه تا مرحله گلدهی مقدار روتین و کوئرستین افزایش و پس از آن مقدار این دو ترکیب کاهش یافت. همچنین عصاره گیاه دارای دو اسید فنلیک شامل کلروژنیک اسید و کافئیک اسید بود که در مرحله ۸ برگی بالاترین میزان را داشتند و در مراحل بعدی رشد کاهش یافتند. در مجموع بیشترین میزان ترکیبات زیست فعال و اسیدهای فنولیک کوئرستین و روتین این گیاه در مرحله گلدهی و بیشترین میزان رنگیزهای گیاهی در مرحله بذردهی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تانن کل، ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی اسیدانی، فلاونوئید کل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۴۴۲۵۴۰۰، پست الکترونیکی: m.sayyari@basu.ac.ir

مقدمه

است (۱۳). بنابراین شایسته است که با شناخت و مطالعه روند تولید گیاهان دارویی و توسعه تحقیقات در زمینه اهلی سازی گیاهان دارویی که هنوز وارد چرخه تولید زراعی نشده‌اند، زمینه برای تامین نیاز صنایع دارویی و افزایش سطح درآمد تولیدکنندگان و بهره‌برداران گیاهان دارویی فراهم گردد (۲۸).

اهلی کردن و کشت گیاهان دارویی و معطر نه تنها وسیله‌ای برای تامین نیازهای روزافزون ترکیبات دارویی

در کشور ما به رغم پیشینه طولانی در مصرف گیاهان دارویی و گذشته درخشنان خود در دانش گیاهان دارویی و همچنین تنوع فراوان گونه‌های دارویی، هنوز آن‌طور که شایسته است گام‌های اساسی در زمینه جمع‌آوری، کشت انبوه و شناسایی ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی برداشته نشده است. علاوه بر این بسیاری از گیاهان دارویی منحصر به فرد موجود در کشور حتی وارد مراحل اهلی‌سازی نشده و یا با برداشت بی‌رویه و غیراصولی از منابع طبیعی، زمینه انقراض و نابودی آن‌ها فراهم شده

است (۱۱). با توجه به اینکه تاج خروس گسترده گیاهی چند منظوره بوده و از نظر متابولیت‌های ثانویه مورد توجه قرار گرفته است هدف از این تحقیق بررسی اثر مراحل فنولوژیکی بر میزان برخی از مواد موثره موجود در این گیاه بوده است.

مواد و روشها

بذر گیاه تاج خروس گسترده از روی بوتهای مادری جمع آوری شد. منطقه جمع آوری بذور محوطه اطراف دانشکده کشاورزی دانشگاه بولی سینا با طول جغرافیایی ۳۳ درجه و ۹۵ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی و ۴۷ درجه و ۳۴ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی بود. در ابتدا از بین بذور بوجاری شده (بذرها از مواد خارجی، بذرهای نرسیده، پوک و شکسته جدا شدند)، بذرهایی با اندازه یکسان، یکنواخت و بدون شکستگی انتخاب و با استفاده از هیپوکلریت سدیم تجاری یک درصد ضدغذونی و سپس با آب مقطر سه بار شستشو داده شدند. بذرها در قالب یک طرح بلوك کامل تصادفی با ۳ تکرار با فواصل ۱۰ سانتی‌متری در کرت‌هایی به ابعاد ۱×۲ به عمق ۵ سانتی‌متر در اسفند ماه سال ۱۳۹۸ کاشته شدند. آزمایش در قالب طرح بلوك‌های کامل تصادفی با اعمال ۳ تیمار صورت گرفت که هر کدام از مراحل فنولوژیکی ۸ برگی، ابتدای گلدهی و رسیدگی فیزیولوژیکی گیاه (رسیدن بذور در روی گیاه) یک تیمار در نظر گرفته 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 هریک از مراحل فنولوژیکی گیاه، برگ‌های سالم و تازه در هر کرت به صورت جداگانه انتخاب، جمع آوری و جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی ذیل (فنل کل،

حال و آینده می‌باشد بلکه وسیله‌ای جهت کاهش فشار بر جوامع گیاهان وحشی نیز محسوب می‌شود (۱۳). توده‌های وحشی یک گونه، از نظر مورفو‌لوزی، تیپ رشدی و تیپ شیمیایی ناهمگن هستند. علاوه بر این برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی، ارقام همگن با درصد بالای ماده موثره و عملکرد بالای اندام دارویی مورد نیاز می‌باشد (۲۸). بنابراین برای استفاده اصولی و صنعتی از این گیاهان لازم است که هویت و ماهیت آنان از جنبه‌های مختلف شیمیایی و تولیدی بررسی شود.

از مهم‌ترین گیاهانی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته، گونه‌های مختلف گیاه تاج خروس (*Amaranthus spp.*) است. این گیاهان با شرایط محیطی مختلفی سازگار بوده و جز گیاهان چهار کربنه محسوب می‌شود (۳، ۵، ۹). خصوصیاتی مانند مقاومت محیطی سودمند و مصرف موثر آب منجر به فعالیت‌های اخیر در تولید این گیاهان به عنوان یک منع دانه‌ای، سبزی یا دارویی شده است (۲۲، ۴، ۲). گیاه تاج خروس گسترده با نام علمی *Amaranthus blitoides* به عنوان یک گیاه کم توقع و یک منع ارزان از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی است و به عنوان یک محصول آینده‌دار با عملکرد فوق العاده و کیفیت تغذیه‌ای خوب می‌تواند پاسخگوی تقاضای امروزی بشر باشد (۲۴، ۵، ۳).

گیاهان خانواده تاج خروس به دلیل دارا بودن فنول‌ها، آکالالوئیدها، ساپونین‌ها، ترپن‌وئیدها مورد کشت و کار قرار می‌گیرند و در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴، ۲۷).

در گیاهان داروئی که استخراج متابولیت‌های ثانویه به عنوان ماده داروئی مدنظر است عوامل مختلفی روی بیوسنتر این ترکیبات اثر می‌گذارند که یکی از مهم‌ترین عوامل، مراحل فنولوژیک گیاه می‌باشد. هر ماده داروئی در مرحله خاصی از رشد گیاه به حداکثر میزان خود می‌رسد و جهت استحصال حداکثر میزان ماده موثره گیاهی در واحد سطح، به دست آوردن مناسب‌ترین مرحله رشدی گیاه لازم

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^a و b^b همچنین ۴۷۰ نانومتر برای کاروتینوئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (شمیدزو مدل-UV-1280) اندازه‌گیری و در نهایت با استفاده از رابطه‌های زیر، میزان کلروفیل a^a, b^b, کل و کاروتینوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تازه محاسبه گردید (۲۹).

فلاؤنوتین، تانن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اسیدهای فنولیک روئین و کوئرستین) به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بخشی از برگ‌های تازه نیز برای اندازه‌گیری صفات کلروفیل و کاروتینوئید مورد استفاده قرار گرفت.

صفات اندازه گیری شده: صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان کلروفیل a^a و b^b در برگ، میزان فنل کل، میزان فلاؤنوتین کل و میزان تانن کل اندام هوایی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ، محتوای کوئرستین، روئین، اسید کلروفوئنیک و اسید کافئیک در عصاره برگ بود.

$$\text{Chl a} = (12.25 \times A664) - (2.55 \times A645)$$

فرمول (۱)

$$\text{Chl b} = (20.31 \times A645) - (4.91 \times A664)$$

فرمول (۲)

$$\text{Chl T} = (17.76 \times A645) - (7.34 \times A664)$$

فرمول (۳)

$$\text{کاروتینوئید} = (1000 \times A470 - 1.82 \times \text{Chla} - 85.02 \times \text{Chlb}) / 198$$

فرمول (۴)

از منحنی استاندارد اسیدگالیک و در نظر گرفتن نسبت رقیق شدن، مجموع فنل به صورت میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم وزن عصاره بیان شد (۶).

برای اندازه‌گیری غلظت فلاؤنوتین 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 نیتریت 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 اسپکتروفوتومتر قرائت شد. از آب مقطر به عنوان بانک استفاده شد. برای محاسبه غلظت فلاؤنوتین کل با استفاده از روئین منحنی استاندارد رسم گردید و غلظت فلاؤنوتین کل در برگ بر حسب میلی‌گرم روئین (کوئرستین ۳-روتینوزید) در گرم وزن تر بیان شد (۲۰).

برای سنجش میزان فنل کل، فلاؤنوتین و تانن کل ابتدا از نمونه‌ها عصاره گیری انجام شد (۸). بدین منظور ۵/۰ گرم نمونه تازه برگ گیاه به همراه ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۵٪ در ۱۲۰ هاون سائیده شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه در شیکر دور در دقیقه گذاشته شد. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز روبی جدا شده و برای فاز زیرین همان مراحل قبلی تکرار شد و به فاز روبی 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 روحی شیکر در دمای اتاق و شرایط تاریکی قرار داده شد، در نهایت جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده

دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی برداشته و درون تیوب جدید ریخته شد. برای اطمینان از شفاف بودن عصاره، دوبار سانتریفیوژ صورت گرفت. قسمت فوکانی محلول پس از گذشتن از فیلتر سرسرنگی $0.45\text{ }\mu\text{m}$ میکرومتر به میکروتیوب منتقل شد. سپس عصاره با میانول 80 mL درصد، 10 mL برابر رقیق شد و آماده تزریق به دستگاه HPLC شد.

برای سنجش میزان کوئرستین، روتین، اسید کلروژنیک و اسید کافنیک از دستگاه HPLC ساخت شرکت کنور آلمان مجهز به پمپ مدل اسمارت لاین 2050 C18 ، ستون به طول 150 mm و قطر داخلی $4/6\text{ mm}$ میلی‌متر استفاده گردید. دتکتور از نوع UV-Detector بود که روح طول موج 330 nm تنظیم گردید. استونیتریل (0.95%) و ارتوفسفریک (1%) به عنوان فاز متحرک دستگاه مورد استفاده قرار گرفتند. میزان حجم هر تزریق نمونه 20 mL میکرولیتر و سرعت جريان فاز متحرک 1 mL/min در دقیقه بود. پس از تزریق استاندارد، نمونه‌ها تزریق شدند و با مقایسه گروماتوگرام نمونه‌ها و بر اساس زمان بازداری پیک‌های خروجی و مطابقت پیک‌های استاندارد، مقدار و نوع ماده خروجی از ستون شناسایی، تعیین و میزان اسیدهای فنولیک پس از محاسبات لازم بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه مشخص گردید (19).

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: تجزیه آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات مختلف، با نرم‌افزار SAS نسخه $9/4$ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چندامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% انجام پذیرفت و نمودارها با نرم‌افزار Excell 2013 R گردیدند.

نتایج و بحث

میزان رنگیزه‌های گیاهی در مراحل مختلف فنولوژیکی: اثر مراحل فنولوژیکی (مرحله 8 mL برگی، مرحله گلدهی و مرحله بذردهی) بر میزان کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل

بهمنظر اندازه‌گیری تانن کل نیز 250 mL میکرولیتر از عصاره میانولی با 1375 mL میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید، سپس 125 mL میکرولیتر فولین-سیکالتون به آن اضافه شد. پس از 3 min 250 mL میکرولیتر از محلول سدیم کربنات به همراه 8 mL میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از انجام شیکر به مدت 60 s دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج 725 nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و برای محاسبه غلظت تانن کل با استفاده از اسید تانیک منحنی استاندارد رسم شد و در نهایت غلظت تانن کل در برگ بر حسب میلی‌گرم تانیک اسید در 100 g وزن تر بیان گردید (31).

برای سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی، ابتدا محلول دی فیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) با غلظت 0.5 mM میلی‌مولار تهیه گردید. این محلول برای اندازه‌گیری درصد بازدارندگی به شکل روزانه تهیه گردید. در مرحله بعد 500 mL میکرولیتر عصاره گیاهی برداشته و به آن 500 mL میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و با 10000 mL دور در دقیقه به مدت 5 min دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس 75 mL میکرولیتر از این محلول برداشته و به آن 2925 mL میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید. جذب نمونه‌ها در دقیقه صفر با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 515 nm قرائت شد. سپس نمونه‌ها به مدت 30 min دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد و دوباره میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی با استفاده از فرمول 5 محاسبه گردید (18): فرمول (5)

$$\text{A515} = ((\text{A515T0} - \text{A515T30}) / \text{A515T0}) \times 100$$

A515T0 = مقدار جذب در دقیقه صفر،
 A515T30 = مقدار جذب در دقیقه 30

برای تعیین غلظت اسیدهای فنولیک گیاه تاج خروس گستردۀ با استفاده از دستگاه HPLC ابتدا استخراج آنها صورت گرفت. بدین منظور مقدار 100 mg از نمونه برگی به همراه 1 mL لیتر میانول 85 mL درصد (با درجه $HPLC$) داخل لوله فالکون 15 mL میلی‌لیتری ریخته شد، سپس 30 min دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با دمای 30°C درجه سانتی-گراد قرار داده شد و سپس به مدت 10 min دقیقه با دور 3500

تأثیر مراحل فنولوژیکی بر صفات فیتوشیمیایی: تأثیر مرحله فنولوژیکی بر مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تانن کل در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۳). بیشترین محتوای فنل کل در مرحله گلدهی به مقادیر $60.2/22$ میلی‌گرم در 100 گرم وزن تر مشاهده شد که اختلاف معنی داری با مرحله بذردهی و 8 برگی داشت و کمترین محتوای فنل کل در مرحله 8 برگی با مقادیر $34.5/22$ میلی‌گرم در 100 گرم وزن تر مشاهده شد که اختلاف معنی داری با تیمار مرحله بذردهی نداشت (جدول ۴).

بیشترین محتوای فلاونوئید کل در مرحله گلدهی به مقادار $39.2/72$ میلی‌گرم بر 100 گرم وزن تر مشاهده شد که اختلاف معنی داری با مرحله گلدهی و 8 برگی داشت و کمترین محتوای فلاونوئید کل در مرحله 8 برگی با مقادیر $8.3/32$ میلی‌گرم بر 100 گرم وزن تر مشاهده شد و اختلاف معنی داری با مرحله گلدهی نداشت (جدول ۴).

کل و کارتونوئید کل در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۱). بیشترین محتوای کلروفیل کل در مرحله فنولوژیکی بذردهی به مقادار 20.5 میلی‌گرم در گرم وزن تازه به دست آمد در حالی که کمترین محتوای کلروفیل کل به مقادار 0.94 میلی‌گرم بر گرم وزن تر در مرحله هشت برگی مشاهده شد. بیشترین محتوای کلروفیل a و b در مرحله بذردهی به ترتیب به مقادار 1.58 و 0.44 میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین مقادار کلروفیل a و b در مرحله هشت برگی به ترتیب با مقادار 0.77 و 0.15 میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که کمترین مقادار کلروفیل b اختلاف معنی داری با مرحله گلدهی نداشت (جدول ۲). بالاترین مقادار کارتونوئید کل معادل 0.63 میلی‌گرم در گرم وزن تر در مرحله فنولوژیکی بذردهی مشاهده شد و کمترین مقادار در مرحله هشت برگی با مقادار 0.39 میلی‌گرم بر گرم مشاهده شد که اختلاف معنی داری با تیمار مرحله گلدهی نداشت (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر مراحل مختلف فنولوژیکی (مرحله هشت برگی، مرحله گل دهی و مرحله بذردهی) گیاه تاج خروس گسترده بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a ، کلروفیل b و کارتونوئید کل

میانگین مرباعات (MS)						
منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتونوئید
بلوک	۲	0.01^{ns}	0.005^{ns}	0.004^{ns}	0.001^{ns}	$>0.004^{ns}$
مرحله فنولوژیکی	۲	0.98^{**}	0.53^{**}	0.06^{**}	0.06^{**}	0.04^{**}
خطای آزمایشی	۴	0.009	0.006	0.008	0.001	>0.001
ضریب تغییر (درصد)	-	$6/91$	$7/18$	$16/79$	$6/62$	$8/32$

** نشان‌دهنده معنی دار بودن در سطح ۱ درصد و ns بیانگر عدم معنی داری می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر مراحل فنولوژیکی (مرحله هشت برگی، مرحله گل دهی و مرحله بذردهی) گیاه تاج خروس گسترده بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a ، کلروفیل b و کارتونوئید کل

فناولوژیک	مرحله	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم)	کارتونوئید (میلی‌گرم بر گرم)	وزن تر (وزن تر)
برگی	۸	0.94^c	0.77^c	0.15^b	0.39^b	0.040^{ns}
گلدهی	۱/۲۳ ^b	0.98^b	0.24^b	0.06^b	0.44^b	0.044^{ns}
بذردهی	۲/۰۵ ^a	1.58^a	0.44^a	0.06^a	0.63^a	0.063^{ns}

حرروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

بیشترین ظرفیت آنتیاکسیدانی با مقدار ۴۳/۶۹ درصد بازدارندگی در مرحله گلدهی و کمترین ظرفیت آنتیاکسیدانی در مرحله ۸ برگی با مقدار ۲/۹۴۴ درصد مشاهده شد. تمامی تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۴).

بالاترین مقدار تانن کل در مرحله گلدهی ۱۹۲/۶۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر) به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر مراحل فنولوژیکی داشت و کمترین مقدار تانن کل در مرحله ۸ برگی ۱۲۰/۰۹ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با مرحله گلدهی و بذردهی داشت (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر مراحل فنولوژیکی (مرحله هشت برگی، مرحله گل دهی و مرحله بذردهی) گیاه تاج خروس گسترده بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل و ظرفیت آنتیاکسیدانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)	فناول کل	فناولنوئید کل	تانن کل	ظرفیت آنتیاکسیدانی	فناول کل
بلوک	۲						
مرحله فنولوژیکی	۲	۱۹/۰۳ ^{ns}	۶۷/۴۶ ^{ns}	۵۰۴/۸۴ ^{ns}	۲۰۰۸/۷۲ ^{ns}	۱۲۷۶/۲۳ ^{**}	۴۶۹۱/۸۴ ^{**}
خطای آزمایشی	۴	۳/۵۸	۱۹۰/۴۷	۷۳۳/۱۹	۲۷۰۸/۱۴	۸۴۰۴۳/۸۴ ^{**}	۵۰۸۲۳/۹۶ ^{**}
ضریب تغییر	-	۷/۵۲	۸/۵۶	۱۳/۳۸	۱۱/۲۶	۱۳/۳۸	۸/۵۶

* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد و ns بیان‌گر عدم معنی‌داری می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر مراحل فنولوژیکی (مرحله هشت برگی، مرحله گل دهی و مرحله بذردهی) گیاه تاج خروس گسترده بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل و ظرفیت آنتیاکسیدانی

مرحله فنولوژیک	فنل کل (میلی گرم بر فناولنوئید کل تانن کل (میلی گرم بر ظرفیت آنتیاکسیدانی (درصد))	فنل کل (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر)	۱۰۰ گرم وزن تر	فناولنوئید کل	تانن کل	ظرفیت آنتیاکسیدانی	(درصد)
۸ برگی	۲۸/۸۶ ^c	۱۲۰/۰۹ ^c	۸۳/۳۲ ^b	۳۴۵/۲۲ ^b			
گلدهی	۴۲/۶۹ ^a	۱۹۹/۶۲ ^a	۳۹۲/۷۷ ^a	۶۰۲/۲۲ ^a			
بذردهی	۲/۹۴ ^b	۱۶۴/۱۱ ^b	۱۲۹/۹۸ ^b	۴۳۷/۸۷ ^b			

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

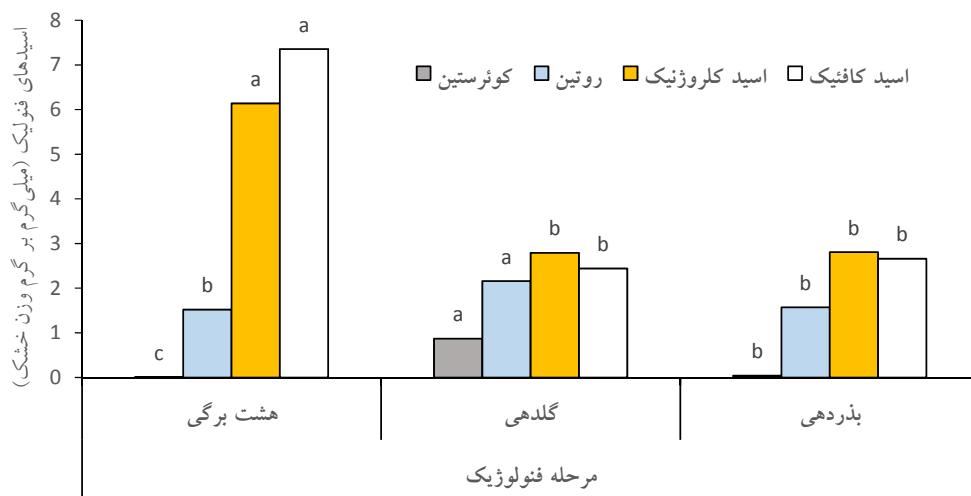
مرحله گلدهی مقدار این دو ترکیب افزایش و سپس کاهش یافته است. همچنین بیشترین مقدار اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک در مرحله ۸ برگی به ترتیب با مقدار ۶/۱۳ و ۷/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین مقدار در مرحله بذردهی به ترتیب با مقدار ۲/۴۴ و ۲/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با مرحله گلدهی مشاهده نشد. با افزایش سن گیاه مقدار این دو ترکیب به طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۱).

اثر مراحل فنولوژیکی بر مقدار اسیدهای فنولیک روتین، کوئرستین، اسیدکافئیک و اسیدکلروژنیک: تاثیر مراحل فنولوژیکی بر مقدار اسیدهای فنولیک از جمله روتین، کوئرستین، اسیدکلروژنیک و اسیدکافئیک در گیاه تاج خروس گسترده معنی‌دار بود (جدول ۵). با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین مقدار روتین و کوئرستین در مرحله گلدهی به ترتیب به مقدار ۲/۱۶ و ۰/۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین مقدار در مرحله ۸ برگی به ترتیب به مقدار ۱/۵۲ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ مشاهده شد. یعنی با افزایش سن گیاه تا

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر مراحل فنولوژیکی (مرحله هشت برگی، مرحله گل دهی و مرحله بذردهی) گیاه تاج خروس گسترده بر میزان برخی اسیدهای فنولیک

میانگین مربعات						منابع تغییر
مقدار	مقدار	مقدار	مقدار روتین	درجه آزادی		
اسید کافئیک	اسید کلروژنیک	کوئرستین				بلوک
۰/۲۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}	۲		مرحله فنولوژیکی
۲۳/۱۲**	۱۱/۱۵**	۰/۷۰**	۰/۳۸**	۲		خطای آزمایشی
۰/۱۰	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۶	۰/۰۱۹	۴		ضریب تغییرات
۷/۹۶	۲/۱۶	۳/۹۸	۷/۹۵	-		

* نشان‌دهنده معنی دار بودن در سطح ۱ درصد و ns بیان‌گر عدم معنی داری می‌باشد.



شکل ۱- میزان اسیدهای فنولیک روتین، کوئرستین، اسید کلروژنیک و اسید کافئیک در مراحل مختلف رشد (مرحله هشت برگی، مرحله گل دهی و مرحله بذردهی) گیاه تاج خروس گسترده.

حرروف مشابه در هر ستون و در هر اسید فنولیک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

نیاز افزایش می‌یابد (۱۰). افزایش کلروفیل کل برگ از مرحله جوانی تا بلوغ در گیاهان آفتابگردان و کاسیا (*Cassia alata*) نیز مشاهده شده است (۱۵، ۲۶). در گیاه گراویلا (*Annona muricata L.*) نیز با افزایش سن گیاه مقدار کلروفیل و کارتوئین افزایش یافته (۲۳) که نتایج این آزمایش نیز با آن مطابقت دارد. اما در گیاه تاج خروس سه رنگ با افزایش سن گیاه غلظت کلروفیل کاهش یافته که نتایج این تحقیق با گزارش آنها مغایرت دارد (۱۷).

در این پژوهش بیشترین مقدار فنل کل، فلاونوئید کل، ظرفیت آنتی اکسیدانی و تانن کل در مرحله گلدهی مشاهده

بحث

در این تحقیق بالاترین میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و نیز کارتونوئید در مرحله بذردهی گیاه مشاهده شد (جدول ۲). متناسب با سن و موقعیت برگ روی شاخه، سطح برگ به تدریج افزایش یافته و همراه با آن تغییرات بیوشیمیایی برای تولید کلروپلاست‌های کاملاً نمو یافته انجام می‌شود. گزارش شده است که رنگدانه‌های گیاهی مانند کلروفیل‌ها و کارتوئین‌ها از نشانگرهای فیزیولوژیکی افزایش سن برگ‌ها بوده و همراه با نمو برگ و کلروپلاست‌ها، تولید آنها نیز به منظور تأمین انرژی مورد

مراحل بلوغ، شرایط آب و هوایی، بخش‌های مورد استفاده از گیاه، شرایط برداشت و ذخیره‌سازی تغییر می‌کند (۲۱). رسیدگی گیاهان دارویی با تغییرات مهم بیوشیمیابی اتفاق می‌افتد. اغلب میزان فنل کل با نمو و رسیدن کامل گیاه به طور پیوسته کاهش می‌یابد که این موضوع با نتایج این بررسی مطابقت داشت و میزان فنل کل بعد از مرحله گلدهی روند نزولی نشان داد.

بیشترین مقدار روتین و کوئرستین در مرحله گلدهی و بیشترین میزان اسیدکلروژنیک و اسیدکافثیک در مرحله ۸ برگی یافت شد. با توجه به نتایج این پژوهش گونه تاج خروس گسترده را نمی‌توان به عنوان یک منع غنی از کوئرستین به حساب آورد. منابع غنی کوئرستین در تعدادی از میوه‌ها، سبزی‌ها و گیاهان داروئی مشخص شده است (۳۰). در تحقیقی مقدار روتین و کوئرستین ۴ گونه تاج خروس را مورد سنجش قرار گرفته و گزارش شده که بیشترین مقدار روتین و کوئرستین در مرحله گلدهی تولید می‌گردد (۱۶) که نتایج آزمایش ما نیز با این گزارش مطابقت دارد. در گیاه بادیان رومی (*Pimpinella anisum* L.) بیشترین مقدار روتین و کوئرستین در مرحله گلدهی مشاهده شده است (۲۵). در پژوهشی ترکیبات فنولیک گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana* L.) در مراحل مختلف فنولوژیکی بررسی شده و گزارش شده که بیشترین مقدار کوئرستین در مرحله گلدهی و بیشترین مقدار روتین، اسید کلروژنیک و اسید کافثیک در مرحله رویشی پدیدار می‌گردد (۲۵).

در تحقیقی مقدار روتین گیاه تاج خروس (حدود ۰/۳٪) مانند مقدار روتین در برگ‌های گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*) گزارش شده است و لذا می‌توان از این گیاه به عنوان سبزی در تغذیه انسان استفاده کرد. این گیاه منع غنی از اسیدکافثیک و اسیدکلروژنیک در مراحل ابتدای رویشی می‌باشد و با افزایش سن گیاه بیوستز این دو ترکیب به شدت کاهش می‌یابد.

گردید (جدول ۴). علت افزایش تجمع ترکیبات فنولیک در مرحله گلدهی را می‌توان مرتبط به سلول‌ها و بافت‌هایی مثل مزوپلی، اپیدرم و ضخامت کوتیکول، کلروپلاست، کرک و یا تغییرات مهم فیزیولوژیکی و یا ساختاری طی مراحل نموی دانست. همچنین این افزایش را می‌توان به همزمانی این مرحله با دمای معتدل هوا در اواسط بهار مرتبط دانست و با نزدیکی به تابستان و افزایش دمای هوا و رسیدن گیاه به بلوغ کامل میزان این ترکیبات مجددًا کاهش می‌یابد. اثر مراحل فنولوژیکی بر مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه گل راعی بررسی و گزارش شده است که در مرحله گلدهی مقدار این ترکیبات به حداقل می‌رسد و پس از گلدهی سیر نزولی دارد (۳۲). در برگ‌های گیاه رزماری نیز بیشترین مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئید کل و تانن در مرحله بذردهی و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله گلدهی مشاهده شد (۳۳).

در تحقیقی در گیاه بومادران (*Achillea gypsicola*) دریافتند که ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مراحل مختلف رشد متفاوت است و بیشترین مقدار فنل کل در مرحله گلدهی و بیشترین مقدار فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله بذردهی اتفاق می‌افتد (۷). مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ترشک (*Rumex crispus* L.) در مرحله گلدهی بیشتر از مرحله بذردهی گزارش شده (۱۲) و در گیاه سیاهدانه هم مقدار فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل در مرحله بذردهی گیاه بیشترین مقدار را داشته است (۳۴). در گزارشی نیز آمده است که بیشترین مقدار فنل کل و فلاونوئید کل در مرحله گلدهی گیاه لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent.) تولید می‌گردد (۳۴).

در تمام مراحل رشد گیاهان، یک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی فعال می‌باشد که عمل این آنتی‌اکسیدان‌ها متفاوت است و به طور گسترده با چندین فاکتور مثل

کرد. در مجموع می‌توان گفت که بیشترین میزان ترکیبات زیست فعال از جمله فنل کل، تانن کل، فلاونوئید کل و اسیدهای فنولیک کوئرستین و روتین این گیاه در مرحله گلدهی و بیشترین میزان رنگیزه‌های گیاهی از جمله کلروفیل و کارتوئین در مرحله بذردهی بیوستز می‌گردد.

سپاسگزاری

اعتبار مالی لازم این تحقیق توسط حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا تأمین شده است. لذا نویسنده‌گان مقاله مراتب قدردانی خود را از مساعدت‌های مذکور اعلام می‌دارند.

نتیجه‌گیری کلی

مراحل فنولوژیکی بر میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه تاج خروس موثر می‌باشد و بیشترین مقدار فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله گلدهی تولید می‌گردد. این گیاه دارای اسیدهای فنولیک از جمله کوئرستین، روتین، اسیدکلروفیل و اسیدکافئیک می‌باشد. بیشترین مقدار روتین و کوئرستین در مرحله گلدهی یافت شد و در مرحله بذردهی مقدار آن‌ها کاهش یافت اما بیشترین مقدار اسیدکلروفیل و اسیدکافئیک در مرحله ۸ برگی مشاهده شد و سپس در مراحل بعدی کاهش پیدا

منابع

۳. نیازی پور، غ.، اهتمام، م. ح.، کریم مجتبی، ح. ۱۳۹۷. مقایسه اثرات دگرآسیبی عصاره دوغونه بومادران (*Achillea pachycephala* Rech. and *Achillea nobilis* L.) بر علف هرز تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲(۳۱)، ۴۵۲-۴۶۲.
۴. بیزدانشنس، ح.، طویلی، ع. و نصیری، م. ۱۳۹۴. اثر تیمارهای فیزیکوشیمیایی بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی گیاهی زیستی تاج خروس (*Amaranthus cruentus* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۵(۲۸)، ۱۱۲۹-۱۱۳۶.
5. Adegbola P.I., Adetutu A., Olaniyi T.D., 2020. Antioxidant activity of Amaranthus species from the Amaranthaceae family—A review. South African Journal of Botany 133, 111-117.
6. 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, 875-877.
7. Akif Açıkgöz M., 2019. Evaluation of Phytochemical Compositions and Biological Properties of *Achillea gypsicola* at Different Phenological Stages. Chemistry & biodiversity 16 (12), e1900373.
8. 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, 9859.
9. Bussmann R.W., Paniagua-Zambrana N.Y., Njoroge G.N., 2021. *Amaranthus hybridus* L. Amaranthus spinosus L. A maranthaceae. Ethnobotany of the Mountain Regions of Africa, 153-160.
10. Cevahir G., Yentur S., Yazgan M., Unal M., Yilmazer N., 2004. Peroxidase activity in relation to anthocyanin and chlorophyll content in juvenile and adult leaves of "mini-star" *Gazania splendens*. Pakistan Journal of Botany 36, 603-610.
11. Ebrahimi S.N., Hadian J., Mirjalili M., Sonboli A., Yousefzadi M., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food chemistry 110, 927-931.
12. 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, 237.

13. Harnischfeger G., 2000. Proposed guidelines for commercial collection of medicinal plant material. *Journal of herbs, spices & medicinal plants* 7, 43-50.
14. Hilou A., Nacoulma O., Guiguemde T., 2006. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of ethnopharmacology* 103, 236-240.
15. Jolkili M., Shaari A., Razak N., 2019. The influence of leaf age and drying temperature on antioxidant capacity of *Cassia alata*, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, p. 012052.
16. Kalinova J., Dadakova E., 2009. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus spp.*). *Plant foods for human nutrition* 64, 68.
17. Khandaker L., Ali M.B., Oba S., 2009. Influence of cultivar and growth stage on pigments and processing factors on betacyanins in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). *Food Science and Technology International* 15, 259-265.
18. Kulkarni A.P., Aradhya S.M., 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food chemistry* 93, 319-324.
19. 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 J. Exp. Sci* 23, 51-54.
20. 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, 254-260.
21. Mejia L., Hudson E., de Majia E.G., Vazquez F., 1988. Carotenoid content by vitamin A activity of some common cultivars of Mexican peppers (*Capsicum annuum*) as determined by HPLC.
22. Mlakar S.G., Turinek M., Jakop M., Bavec M., Bavec F., 2010. Grain amaranth as an alternative and perspective crop in temperate climate. *Journal for Geography* 5, 135-145.
23. Pelden D., Meesawat U., 2019. Foliar idioblasts in different-aged leaves of a medicinal plant (*Annona muricata* L.). *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 41.
24. Rastogi A., Shukla S., 2013. Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical reviews in food science and nutrition* 53, 109-125.
25. Rebey I.B., Wannes W.A., Kaab S.B., Bourgou S., Tounsi M.S., Ksouri R., Fauconnier M.L., 2019. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Pimpinella anisum* L. accessions at different ripening stages. *Scientia horticulturae* 246, 453-461.
26. Sairam R., Singh D., Srivastava G., 2003. Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biologia Plantarum* 47, 61-66.
27. Santiago-Saenz Y.O., Hernández-Fuentes A.D., Monroy-Torres R., Cariño-Cortés R., Jiménez-Alvarado R., 2018. Physicochemical, nutritional and antioxidant characterization of three vegetables (*Amaranthus hybridus* L., *Chenopodium berlandieri* L., *Portulaca oleracea* L.) as potential sources of phytochemicals and bioactive compounds. *Journal of Food Measurement and Characterization* 12, 2855-2864.
28. Soosaraei M., Fakhar M., Teshnizi S.H., Hezarjaribi H.Z., Banimostafavi E.S., 2017. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery* 21, 63-80.
29. 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, 77-83.
30. Sultana B., Anwar F., 2008. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry* 108, 879-884.
31. Taira S., Ono M., 1996. Reduction of astringency in persimmon caused by adhesion of tannins to cell wall fragments, I International Persimmon Symposium 436, pp. 235-242.
32. Toker Z., 2009. Variation of total hypericin, phenolic and flavonoid compounds in *Hypericum triquetrifolium* during its phenological cycle. *Pharmaceutical Biology* 47, 285-288.
33. Yosr Z., Hmia C., Rim T., Mohamed B., 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. typicus Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 43, 412-419.

34. 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, 205-212.

Evaluation of some bioactive compounds and phenolic acids of *Amaranthus blitoides* at different phenological stage

Sayyari M.* , Hamidi M., Azizi A. and Ahmadvand G.

Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

To determine some bioactive compounds of *Amaranthus blitoides* in different phenological stages, an experiment was conducted in a randomized complete block design with three treatments and three replications. Three phenological stages, including eight-leaf, flowering and seed production stages, were considered three treatment of experiment, some phytochemical traits and phenolic acids, including quercetin, rutin, chlorogenic acid and caffeic acid, were measured. The highest total chlorophyll content (2.05 mg g^{-1}) was observed at the seed production stage, while the lowest total chlorophyll content (0.94 mg g^{-1}) was observed at the eight-leaf stage. The highest content of chlorophyll a and b was observed in the seed production stage, whereas the lowest amount of chlorophyll a and b was observed in the eight-leaf stage. The highest content of carotenoids was observed at the seed production stage. At different phenological stages, the evaluated traits had significant differences. The highest amount of total phenolic compounds, total flavonoids, total tannins, and antioxidant capacity were observed in the flowering stage. HPLC analysis of extracts showed that quercetin and rutin production increased during growth until the flowering stage and then decreased. Also, the biosynthesis of two phenolic acids, including chlorogenic acid and caffeic acid, was high at the eight-leaf stage and reduced after this phenological stage. In general, the highest amount of bioactive compounds and phenolic acids quercetin and rutin of this plant was observed in the flowering stage and the highest amount of plant pigments was observed in the seed production stage.

Key words: Antioxidant activity, Phenolic compounds, Total flavonoids, Total tannins