فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۹-۲۳
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser.68, Summer 2021, p. 9-23
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۹

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

تأثیر کودهای ازت و نانو ازت بر ترکیبات فنلی و کلشی‌سین در بنه‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum speciosum* L.) سه منطقه‌ی استان مازندران

مسعود بابائی نائیج[۱]، مریم پیوندی*[۲]، حسین عباسپور[۳]، زهرا نورمحمدی[۳]، صدیقه اربابیان[۳]

چکیده

گل‌حسرت (Colchicum speciosum L.) گیاهی دارویی غنی از کلشی‌سین و ترکیبات فنلی است. در این مطالعه تاثیر غلظت های مختلف کودهای ازت و نانو ازت بر محتوای ترکیبات فنلی وآلکالوئید کلشی‌سین در بنه گیاهان گل‌حسرت از سه منطقه در استان مازندران (فیل‌بند، کلرد و سنگ‌درکا) بررسی شد. آزمایش با طرح بلوک های تصادفی برای پنج تیمار شامل تیمار شاهد، دو سطح کود ازت (۱/۱mg/l و۲/۲)، دو سطح کود نانو ازت (۱/۵mg/l و ۳) برای گیاهان سه رویشگاه اجرا شد. سه ماه پس از شروع تیمار، ترکیبات فنلی و آلکالوئید کلشی‌سین بنه استخراج شد. محتوای ترکیبات فنلی با روش اسپکتروفتومتری و کلشی‌سین با HPLC سنجش شدند. در گیاهان رویشگاه فیل‌بند همه تیمارهای ازت و نانو ازت موجب افزایش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای ترکیبات فنلی کل بنه شد. استفاده از کودهای ازت و نانو ازت موجب کاهش معنی‌دار محتوای فلاونوئید کل در بنه گیاهان رویشگاه‌های مورد مطالعه شد. کود ازت در همه‌ی جمعیت‌ها موجب افزایش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین کل بنه شد، در حالی‌که تیمار با کود نانو ازت تاثیر معنی‌دار بر میانگین محتوای آنتوسیانین کل بنه نداشت. مقایسه‌ی نتایج میانگین محتوای کلشی‌سین بنه در تیمارهای مختلف نشان داد که کودهای ازت موجب کاهش و کودهای نانو ازت سبب افزایش محتوای کلشی‌سین بنه می‌شوند. نتایج حاضر نشان داد محتوای متابولیت‌های مورد مطالعه در بنه رویشگاه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت دارند و تاثیر کودهای ازت و نانو ازت برتغییر محتوای این متابولیت‌ها یکسان نیست.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین کل، بنه، فلاونوئید کل، کلشی‌سین، گل‌حسرت، نانو ازت

۱- دانشجوی دکترا، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲- دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
*(نویسنده مسئول: naji_t@iaups.ac.ir/ tnaji2002@gmail.com)
۳- دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

مقدمه

گل‌حسرت (*Colchicum speciosum* L.) *متعلق به جنس* کلشی‌کوم (*Colchicum*) و خانواده کلشی‌کاسه (*Colchicacae*) است و اعضای آن علفی، پایا همراه با بنه‌های زیرزمینی یا ریزوم و گل‌های هیپوژینوس با ۶ گلبرگ هستند (Nordenstam, 1998). از این خانواده در ایران فقط جنس کلشی‌کوم وجود دارد که ۱۴ گونه دارد. در شمال کشور ۹ گونه وجود دارد که یکی از این گونه‌ها *Colchicum speciosum* در ارتفاعات مازندران دیده می‌شود و علاوه بر شمال ایران در آذربایجان و شاهرود و تهران نیز مشاهده می‌شود. این گونه علاوه بر ایران در ترکیه و قفقاز نیز گزارش شده است (معروفی، ۱۳۹۶).

تنوع متابولیت‌های ثانوی در گیاهان بیش از ۲۰۰۰۰۰ ماده مختلف است که می‌توان به گروه‌های آمین، آمینواسیدهای غیر پروتئینی، اسیدهای آلی، کوئینون‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فنل‌ها اشاره نمود. ترکیبات فنلی خود شامل پلی فنل‌ها، اولیگوفنل‌ها و مونوفنل‌ها یا ترکیبات ساده فنلی چون بنزوئیک اسید و سینامیک اسید و مشتقات هیدروکسیله شده‌ی آن‌ها است (Marchiosi *et al.*, 2020). از ترکیبات فنلی موجود در جنس کلشی‌کوم می‌توان به وانیلین، وانیلیک اسید، کوماریک اسید، کافئیک اسید و لوتئین اشاره کرد (Mansoor, 2004).

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی ریشه و ساقه گیاه .C. turcicum L نشان داد که بالاترین محتوای فنل کل و فلاونوئید کل در این گونه مربوط به عصاره‌های حل شده در استون هستند که بالاترین محتوای فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان دادند (Kilic, 2013). در مطالعه‌ی دیگر (Senizza *et al.*, 2020) ۲۸۵ نوع ماده شیمیایی از گونه C.triphyllum شناسایی شد *که* فراوانترین این ترکیبات شامل آلکالوئیدها (مثل *کلشی‌سین* و دمکولسین)، آنتوسیانین‌ها (مثل پتونیدین ۳- O-روتینوزید و سیانیدین۳-O- سوفروزید) فلاون‌ها (مثل آپیژنین و لوتئولین گلوکوزیدها)، فلاونول‌ها (مثل اشکال ایزومری کامفرول و کوئرستین) بودند. از جمله مهمترین متابولیت‌های ثانوی در گل حسرت می‌توان به *کلشی‌سین* اشاره نمود. این آلکالوئیدها در خانواده Colchicaceae در جنس کلشی‌کوم و گونه *Gloriosa superba* وجود دارد (Renu Sarin, 2010). *کلشی‌سین* جزء گروه آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین می‌باشد و در اندام‌های مختلف گیاه مشاهده می‌شود. این گروه از آلکالوئیدها علاوه بر کلشی‌سین شامل اعضای فعال فیزیولوژیکی چون امتین (emetine نوعی ضد آمیب) (pettit *et al.*, 2020)، مورفین و کودئین (Mehabadi & Karimiyan, 2018) هستند.

کلشی‌سین بدون شک یکی از مهم‌ترین آلکالوئیدهایی است که مورد توجه انسان‌ها است. *کلشی‌سین* داروی سنتی نقرس است و برای درمان دردهای روماتیسمی از سال ۱۸۱۰ تجویز می‌شود (Wendelbo & Stuart, 1985).

ازت عنصر مغذی حیاتی در چرخه زندگی گیاهان محسوب می‌شود و در طیف وسیعی از ترکیبات آلی چون آمینواسیدها، پروتئین‌ها، نوکلئیک‌اسیدها و کلروفیل دیده می‌شود (Pilbeam, 2015). مشخص شده است که کمبود ازت سبب نقص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود که در نهایت منجر به کاهش تقسیم سلولی و اختلال در فرآیند فتوسنتز می‌گردد

(Roggatz *et al.*, 1999). کودهای ازتی و همچنین زمان برداشت محصول بر محتوای انباشت متابولیت‌های ثانوی از جمله انواع فنل‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ی گیاهی موثر هستند (Cojocaru *et al.*, 2020).

در عصر تغییر اقلیم، سیستم‌های کشاورزی جهانی برای دستیابی به امنیت غذایی با چالش‌های بی شماری روبرو هستند. مهندسی نانو، ابزاری مفید برای تقویت محصولات است. کودهای نانو می‌توانند یک یا چند ماده غذایی را در اختیار گیاه قرار دهند و با این روش سبب افزایش محصول و عملکرد گیاه می‌شوند (Liu & Lal, 2015) . نانوکودها مواد غذایی گیاهان را به نانومواد تبدیل می‌کنند و این ترکیبات در اندازه‌ی نانو می‌توانند از منافذ روزنه‌ها و دیواره‌ی اسکلتی سلول‌های ریشه به‌راحتی عبور کنند. همچنین با عبور از پلاسمودسم‌ها می‌توانند به سادگی از سلولی به سلول دیگر منتقل شوند و خود را به تمامی سلول‌ها برسانند و سبب افزایش عملکرد محصولات زراعی گردند (Wan *et al.*, 2010). در مقایسه نانوکود و برتری آن نسبت به کود عادی می‌توان گفت که نانوکودها برخلاف کودهای شیمیایی عنصر غذایی را به آرامی آزاد می‌کنند و آب شویی ماده را نسبت به کود شیمیایی کاهش می‌دهند و نسبت به کودهای شیمیایی از کانال‌های یونی بیشتری در غشاء پلاسمایی برای جذب استفاده می‌کنند (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). این در حالی است که ۴۰ تا ۷۰ درصد کودهای شیمیایی به‌راحتی از دسترس گیاه خارج می‌شوند (Ombódi & Saigusa, 2000). مطالعات اندکی پیرامون اثرات کود بر گیاه گل حسرت انجام گرفته است (Al-Fayyad, 2003). از آنجایی که کلشی‌سین جزء ترکیباتی ازت دار می‌باشند به همین خاطر انتظار می‌رود که دسترسی ازت نقش مهمی در بیوسنتز و انباشت آلکالوئیدها در گیاهان داشته باشد. تأثیر ازت به عنوان عامل افزایش دهنده *کلشی‌سین* در کلشی‌کوم گزارش شده است در مطالعه‌ای دیگر علیرضایی و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیقی پیرامون تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی ازتی بر عملکرد بنه و میزان کلشی‌سین در گونه *C. kotschyi* تحت شرایط رویشگاه، نشان دادند که کودهای زیستی یا شیمیایی با غلظت متوسط می‌تواند بهترین عملکرد را روی بنه به‌جا گذاشته و بیشترین مقدار *کلشی‌سین* را از این گونه بدست آورد. با بررسی تاثیر خصوصیات شیمیایی خاک روی مواد معدنی و مقدار آلکالوئیدهای گیاه *C. autumnale* نشان دادند که مقدار کبالت و کلسیم خاک اثر مثبتی روی انباشت *کلشی‌سین* در دانه‌های این گیاه دارد (Girardin, 2004 & Poutaraud). پیرامون اثر کودها بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان نیز بررسی متفاوتی انجام شده است. از جمله می‌توان به تحقیق Zhang و همکاران (2016) اشاره نمود که با تحقیقی روی اثرات بلند مدت کود آلی و ازتی بر خاصیت آنتی اکسیدانی میوه‌های گوجه فرنگی نشان دادند که وقتی از کود شیمیایی ازتی به‌همراه کود آلی استفاده شود سبب افزایش مقدار فنل‌ها و فلاونوئیدها خواهد شد.

استفاده از نانوکودها سبب افزایش کارآیی مصرف عناصر غذایی و افزایش مقدار محصول می‌شود (Liu & Lal, 2015). نانوکودها به دلیل آن که در دسترس بودن عناصر غذایی برای برگ های گیاه را با کمک کلات کردن عنصر مورد نظر تسهیل

می کنند، کارآیی مصرف این نوع کودها را نسبت به کودهای معمولی بالا می‌برند (Suppan, 2013) . محمدقاسمی و همکاران (۲۰۲۰) نیز با بررسی تاثیر نانوکود بر اجزاء عملکرد و خصوصیات آنتی اکسیدانی در گیاه *Lallemantia iberica* نشان دادند که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی زمانی در این گیاه حاصل می‌شود که از تیمار نانوکود NPK (نیتروژن، فسفر، پتاسیم) به‌همراه نانوکودآهن استفاده گردد.

از آنجایی که شرایط محیطی و تغذیه ای روی تولید و عملکرد گیاهان اثرات متفاوتی دارند هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات کود و نانوکود ازت بر محتوای کلشی‌سین و ترکیبات فنلی در شرایط گلدانی در گیاه *C. speciosum* بود. همچنین برای اولین بار به اهلی‌سازی این گونه‌ی وحشی اقدام شد.

مواد و روش‌ها

نحوه انتقال نمونه‌ها به گلدان و تیماردهی

گیاهان در اواخرآبان، زمانی‌که این گیاه در مرحله گل‌دهی قرار داشت از سه منطقه در استان مازندران جمع‌آوری شدند (جدول ۱). بنه گیاهان در تاریکی و در مکان خشک و خنک نگهداری شد. برای بررسی اثرات کود و نانوکود ازت بنه‌ها در اواخر خرداد درگلدان‌هایی به ابعاد ۳۰×۵۰ سانتی متر کاشته شدند. برای سازگاری بهتر نمونه‌ها در محیط از خاک همان مناطق در کاشت نمونه‌ها استفاده شد. کود ازت آریو از شرکت گرین و نانوکود ازت از شرکت خضراء خریداری شد.

گیاهان با کود ازت (۱/۱ mg/l و ۲/۲) و نانو ازت (۱/۵ mg/l و ۳) تیمار شدند. تیمار با محلول‌های ازت یا نانو ازت دوبار(در اول مرداد ماه و دوم در ۱۰شهریورماه ۹۶) انجام شد. نمونه گیری از بنه‌ها در زمان گل دهی در آبان ماه انجام شد.

جدول۱: مشخصات جغرافیایی سه منطقه

شماره جمعیت	نام منطقه	ارتفاع رویشگاه (m)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	عرصه رویشی
۱	سنگ‌درکا	۸۵۰	۶۱،۲۶،۲۸	۴۰،۲۳،۲	جنگلی
۲	کلرد	۴۸۳	۶۲،۲۶،۳۳	۴۰،۱۴،۷۵	جنگلی
۳	فیل‌بند	۲۱۴۱	۶۳،۶۶،۷۳	۴۰،۰۱،۸۹	ییلاقی

براساس UTM Coordinance System WGS84 Zoom 39N

استخراج کلشی‌سین از بنه

برای استخراج کلشی‌سین از روش Kumar و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد. نیم گرم پودر بنه دوبار با ۲۵ میلی لیتر اتر نفت به مدت یک ساعت تکان داده و صاف شد. ماده جامد باقیمانده را در محیط خشک کردیم و سپس با ۱۰ میلی لیتر دی کلرومتان در دمای اتاق برای ۳۰ دقیقه تکان داده شد. سپس ۱۰ درصد محلول آمونیم (0.5 ml) به آن اضافه و به مدت ۱۰

دقیقه با شدت تکان داده شد. ۳۰ دقیقه محلول دست نخورده گذاشته و سپس صاف شد. باقیمانده دوبار با 10ml دی کلرومتان شسته و سپس با محلول مرحله قبل مخلوط شد.. فاز آلی بخار و خشک و سپس در 1ml اتانول ۷۰ درصد حل شد.

سنجش کلشی‌سین با HPLC

سنجش کلشی‌سین با دستگاه HPLC برند Waters مدل ۱۵۲۵(Sciencix company USA) با آشکارگر جذب UV انجام شد، شناسایی و جداسازی کلشی‌سین توسط کروماتوگرافی مایع انجام گرفت که به‌صورت ایزوکراتیک در ستون فاز معکوس C18) قطر ذرات µm ۵ و۴/۶X ۱۵۰)، فاز متحرک شامل استونیتریل (۳۲٪)، متانول (۴۸٪)، آب (۲۰٪) / بود و با اسید فسفریک pH ۵/۲ تنظیم شد. حجم تزریق µl ۳۰ و شدت جریان حلال ml/min ۰/۵ بود. مناسبترین طول موج شناسایی دتکتور UV، برای کلشی‌سین nm ۲۵۴ می‌باشد (Gowda, 2014).

برای رسم منحنی استاندارد کلشی‌سین از استاندارد کلشی‌سین تولیدی شرکت BIOFARM کشور رومانی استفاده شد. منحنی استاندارد کلشی‌سین براساس غلظت‌های (µg/ml)۱، ۱۰، ۲۰ رسم شد(شکل ۱).

استخراج و سنجش ترکیبات فنلی کل

برای استخراج فنل‌ها از روش Slinkard & Singleton, 1977 استفاده شد. یک گرم وزن تر بنه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰درصد قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در الکل جوشانده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۳۰۰۰rpm) شد. سپس محلول فوقانی جدا و با الکل ۸۰ درصد به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد. در پایان ۰/۲ میلی لیتر عصاره با ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر محلول فولین سیوکالتو ۱۵ بار رقیق و مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه ۳ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷درصد به مخلوط اضافه گردید و پس از ۹۰ دقیقه جذب در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار فنل بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد. منحنی استاندارد گالیک اسید براساس غلظت‌های (mg/ml) ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰۶۶/.، ۱ رسم شد (شکل۱).

استخراج و سنجش فلاونوئید کل

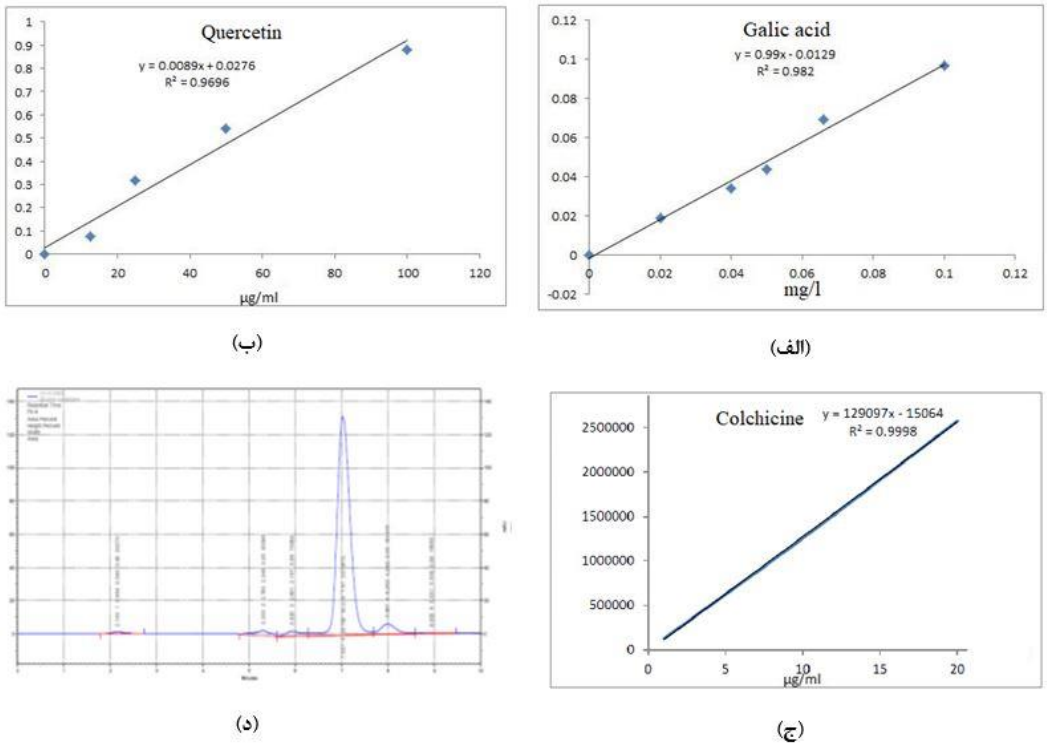
برای استخراج فلاونوئیدها از روش Chang *et al*., 2002 استفاده شد. یک گرم بنه با ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰درصد مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰rpm) شد. حجم روشناور با متانول ۸۰ درصد به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. ۰/۵ میلی لیتر عصاره با ۱/۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط شد و به آن ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. پس از

گذشت نیم ساعت جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید براساس منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد. منحنی استاندارد کوئرستین براساس غلظت‌های (۱۲/۵ µg/ml، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) رسم شد(شکل ۱).

استخراج و سنجش آنتوسیانین کل

استخراج آنتوسیانین‌ها براساس روش (Baker & Nouges, 2000) انجام شد. یک گرم از بنه در ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (۹۹:۱) (اسید کلریدریک : متانول) (**v/v**) استخراج شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰ rpm) شد. روشناور به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و جذب محلول در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از ضریب خاموشی با فرمول زیر محاسبه شد.

$\varepsilon = 33000 mM^{-1}\ cm^{-1}$



شکل ۱: (الف) منحنی استاندارد گالیک اسید، (ب) منحنی استاندارد کوئرستین، (ج) منحنی استاندارد کلشی‌سین، (د) کروماتوگرام HPLC استاندارد کلشی‌سین

آنالیز آماری

آزمایش با طرح بلوک‌های کاملا تصادفی انجام شد. هر تیمار با نه گلدان و در هر گلدان ۱۵ نمونه کاشته شدند. آنالیز آماری با نرم افزار SPSSver.22 انجام شد. آنالیز واریانس چند عاملی با برنامه General Linear Model و گروه بندی میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P\leq0.05$) انجام شد.

نتایج

آنالیز واریانس چند عاملی نشان داد تفاوت در میانگین ترکیبات فنلی کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل و کلشی‌سین بنه وابسته به رویشگاه و نوع تیمار گیاه با کودهای ازت ونانو ازت می‌باشند (جدول ۲).

فنل کل

مقایسه میانگین محتوای ترکیبات فنلی کل بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای ترکیبات فنلی مربوط به بنه رویشگاه کلرد (۸/۶۲mg/gFW) و کمترین میانگین در بنه رویشگاه فیل‌بند (۴/۵۵mg/gFW) می‌باشد. محتوای ترکیبات فنلی در جمعیت کلرد در تیمار ازت (۱/۱ mg/l) افزایش معنی‌داری ($P\leq0.05$) را نشان داد، در حالی‌که تیمارهای نانو ازت در هر دو غلظت موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) آن در این جمعیت شد.

در جمعیت فیل‌بند همه تیمارهای ازت و نانو ازت موجب اقزایش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای ترکیبات فنلی کل بنه شد. بنابراین می‌توان گفت استفاده از کودهای ازت و نانو ازت موجب افزایش معنی‌دار ($P\leq0.05$) ترکیبات فنلی کل در گیاهان منطقه فیل‌بند و کلرد شده است. برخلاف گیاهان این دو رویشگاه، در گیاهان منطقه سنگ‌درکا تیمار با نانو ازت موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای ترکیبات فنلی کل بنه شد (شکل۱).

فلاونوئیدکل

مقایسه میانگین محتوای فلاونوئید کل بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای فلاونوئید کل مربوط به بنه رویشگاه سنگ‌درکا (۰/۱۵mg/gFW) و کمترین میانگین در بنه رویشگاه فیل‌بند (۰/۳۷mg/gFW) می‌باشد. همچنین این نتایج نشان داد استفاده از کودهای ازت و نانو ازت موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای فلاونوئید کل در بنه گیاهان مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه شده است (شکل۱).

آنتوسیانین کل

مقایسه میانگین محتوای آنتوسیانین کل بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای آنتوسیانین کل مربوط به بنه رویشگاه فیل‌بند (۰/۴۰mg/gFW) و کمترین میانگین در بنه رویشگاه سنگ‌درکا (۰/۶۲mg/gFW) می‌باشد. نتایج نشان داد کود ازت(۱/۱mg/l) در همه جمعیت‌ها موجب افزایش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین کل بنه شد. کود ازت با غلظت (۲/۲mg/l) نیز تاحدی موجب افزایش آنتوسیانین شد، در حالی‌که نانو ازت با غلظت‌های مختلف (۱/۵mg/l، ۳) تاثیر معنی‌دار ($P\leq0.05$) بر محتوای آنتوسیانین کل بنه نداشت(شکل۱).

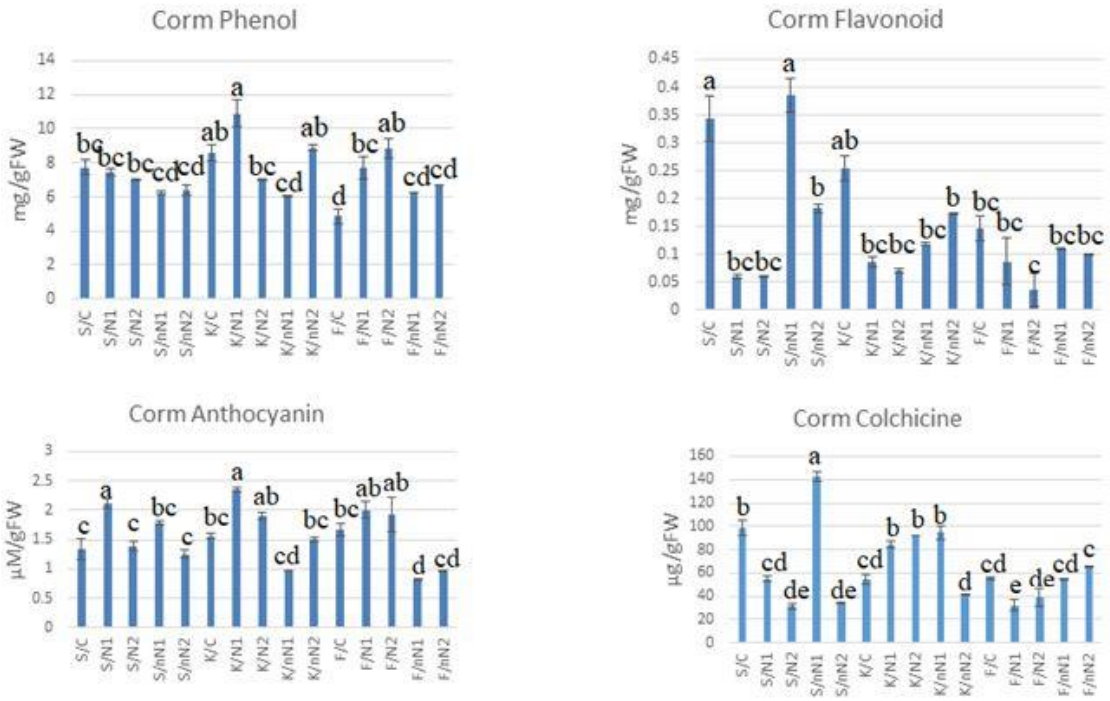
کلشی‌سین

مقایسه میانگین محتوای کلشی‌سین بنه‌های سه رویشگاه در تیمار شاهد نشان داد بیشترین محتوای کلشی‌سین مربوط به بنه رویشگاه سنگ‌درکا و کمترین میانگین در بنه رویشگاه فیل‌بند می‌باشد.

در بنه گیاهان رویشگاه کلرد، کود ازت با هر دو غلظت و نانو ازت با غلظت کم موجب افزایش معنی‌دار محتوای کلشی‌سین شد. در بنه گیاهان رویشگاه سنگ‌درکا کود نانوازت (۱/۵mg/l) موجب افزایش و کود ازت (۲/۲mg/l) و نانو ازت با غلظت بالا (۳mg/l) موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای کلشی‌سین بنه شد. هم‌چنین در بنه گیاهان رویشگاه فیل‌بند کود ازت در هر دو غلظت و نانو ازت در غلظت بالا موجب کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای کلشی‌سین شد (شکل۲).

جدول ۲: آنالیز واریانس دوعاملی(رویشگاه، نوع کود) بر شاخص‌های مختلف در بنه گل‌حسرت

منبع	متغیر وابسته	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
کود	فنل کل	۱۰۴/۱۸	۴	۲۴/۰۴	۴۱/۶۴	۰/۰۰
	فلاونوئید کل	۰/۴۷	۴	۰/۱۱	۳۷/۹۵	۰/۰۰
	آنتوسیانین کل	۱۴/۷۷	۴	۳/۶۹	۱۲۵/۳۹	۰/۰۰
	کلشی‌سین	۱۰۳۷۸۶/۸۷	۴	۲۵۹۴۶/۷۱	۱۴۵/۵۷	۰/۰۰
رویشگاه	فنل کل	۶۸/۰۶	۲	۳۴/۰۳	۵۴/۴۱	۰/۰۰
	فلاونوئید کل	۰/۱۹	۲	۰/۰۹	۳۰/۸۹	۰/۰۰
	آنتوسیانین کل	۰/۳۱	۲	۰/۱۵	۵/۳۲	۰/۰۰۵
	کلشی‌سین	۸۳۶۴/۰۸	۲	۴۱۸۲/۰۴	۲۳/۴۶	۰/۰۰
کود * رویشگاه	فنل کل	۱۶۰/۲۶	۸	۲۳/۰۳	۳۲/۰۲	۰/۰۰
	فلاونوئید کل	۰/۵۵	۸	۰/۰۶	۲۲/۰۰	۰/۰۰
	آنتوسیانین کل	۱۳/۴۷	۸	۱/۶۸	۵۷/۱۶	۰/۰۰
	کلشی‌سین	۱۴۴۸۶۴/۴۴	۸	۱۸۱۰۸/۰۵	۱۰۱/۵۹	۰/۰۰



شکل۲: میانگین ترکیبات فنلی کل، فلاونوئید، آنتوسیانین و کلشی‌سین بنه گیاهان سه رویشگاه سنگ‌درکا(S)، کلرد (K)، فیل‌بند (F) در تیمارهای شاهد(C)،کود ازت(N1)۱/۱ mg/l، کود ازت(N2)۲/۲ mg/l، کود نانو ازت(nN1)۱/۵ mg/l، کود نانو ازت ۳(nN2) mg/l. نتایج میانگین سه تکرار (Maen±SE) را نشان می‌دهد. گروه بندی بر اساس آزمون دانکن ($P\leq0.05$).

بحث

کشت و کار و اهلی سازی گیاهان دارویی در رویشگاه طبیعی به حفظ تنوع ژنتیکی و برداشت پایدار کمک می‌کند (علیرضایی وهمکاران، ۱۳۹۱). شرایط جغرافیایی، بافت خاک و عناصر مغذی در رشد و نمو و بقا این گیاهان تاثیر بسزایی دارد (Gholami *et al*., 2020). مطالعه حاضر نشان داد تیمار گیاهان با کود ازت و نانو ازت موجب افزایش محتوای فنل کل گیاهان رویشگاه کلرد و فیل‌بند شد. برخلاف این دو رویشگاه، محتوای فنل کل در بنه گیاهان رویشگاه سنگ‌درکا در تیمارهای نانو ازت کاهش معنی‌دار ($P\leq0.05$) نشان داد. در این ارتباط Benzon و همکاران (2015) در گیاه برنج نشان دادند که نانو کود سبب افزایش محتوای فنل کل در گیاه برنج می‌شود. تاثیر دو نوع کود بر محتوای فلاونوئید منفی بود. در پژوهشی بر روی گندم نشان دادند کاربرد کود ازت اگرچه عملکرد گیاه را افزایش می‌دهد، اما موجب کاهش محتوای برخی از فلاونوئیدها می‌گردد (Stumpf *et al*., 2018). در پژوهشی بر تاثیر کود ازت بر محتوای فلاونوئید کنگر فرنگی نشان دادند که با افزایش غلظت کود، محتوای فلاونوئید در عصاره گیاه کاهش می‌یابد و دلیل این کاهش را به نقش اسید آمینه فنیل آلانین به عنوان پیش ماده تولید فلاونوئیدها دانستند (Allahdadi & Farzane,2018). در این ارتباط Aires و همکاران (2006) متذکر شدند که ازت بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی از جمله فلاونوئیدها را تعدیل می‌کند. Awad و همکاران (2002) نشان دادند که همبستگی منفی بین

افزایش غلظت کود ازتی با غلظت فلاونوئید، مربوط به افزایش دسترسی به فنیل آلانین است که سبب محدود کردن سنتز فلاونوئیدها تحت شرایط کمبود ازت می‌شود. Ibrahim و همکاران (2011) در بررسی رابطه بین محتوای تولید فنل و فلاونوئید با محتوای ترکیبات کربوهیدراتی غیر ساختاری و فتوسنتزی در گیاه *Labisia pumila* Benth تحت اثر کود نیتراتی و CO_2 بالا دریافتند که تولید فنل و فلاونوئید در ارتباط با افزایش کربوهیدرات‌های غیر ساختاری است چرا که افزایش در مقدار نشاسته نسبت به غلظت قند بیشتر بود. این محققان نشان دادند که غلظت قندهای محلول اثر بالاتری نسبت به نشاسته بر مقدار بیوسنتز فنل و فلاونوئید دارد. همچنین اظهار داشتندکه فتوسنتز رابطه‌ای منفی با تولید فنل و فلاونوئید دارد به‌نحوی که کاهش محتوای فتوسنتز سبب خواهد شد تا متابولیت‌های ثانوی زیاد گردند این امر به‌واسطه‌ی افزایش مسیر شیکمیک اسید می‌باشد که منجر به افزایش تولید فنل و فلاونوئید می‌شود.

Chun-Sen Wu و همکاران (2013) در بررسی مقایسه‌ای اثر کودهای آلی و سنتی بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه دارویی *Ziziphus jujube* Mill. دریافتند که کودهای آلی ازتی تاثیر بیشتری بر روی انباشت آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها در این گیاه دارد و پیشنهاد کردند که دلیل این تفاوت مربوط به تعادل در نسبت کربن به ازت می‌باشد و گیاه به این تعادل برای تولید فنل‌ها نیاز دارد. بر اساس نظریه‌ی اثر متقابل رشد و دفاع گیاه و رقابت برای منابع محدود می‌توان گفت بین عملکردهای مختلف گیاه معاملاتی وجود دارد، متابولیسم فنل‌ها نه تنها روی نمو عادی گیاه تاثیر می گذارد بلکه می‌تواند تحت تاثیر تنش‌های محیطی نیز در گیاه القا گردد (Endara & Coley, 2011).

Al-Fayyad و همکاران (2002) با بررسی تعیین محتوای کلشی‌سین در دو گونه از گل حسرت تحت کشت مزرعه‌ای نشان دادند که اثر کود NPK (پتاسیم، فسفر، نیتروژن) در مراحل متعدد رویشی گل حسرت، سبب بهبود معنی‌دار ($P\leq0.05$) محتوای کلشی‌سین می‌شود و بالاترین محتوای این آلکالوئید نیز در بنه‌های آن دیده می‌شود. همچنین علیرضایی نغندر و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که سطوح متوسط کود ازتی و نیتروکسین سبب افزایش مقدار کلشی‌سین در گل حسرت می‌شود و دلیل افزایش محتوای کلشی‌سین را مربوط به افزایش تولید مواد فتوسنتزی و ارسال آن‌ها به بخش زمینی از جمله بنه دانستند که سبب افزایش محتوای رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی در آن‌ها شده است. درمورد اثر منفی افزایش ازت بر محتوای کلشی‌سین بنه طی کشت شیشه‌ای گیاه Gloriosa نشان دادند که تولید کلشی‌سین در غلظت متوسط کود ترکیبی نیترات آمونیوم، پتاسیم هیدروژن فسفات و کلرید کلسیم افزوده می‌شود و غلظت زیاده از حد ازت سبب کاهش مقدار کلشی‌سین خواهد شد (Bharathi& Philomina, 2010). این نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضر در جمعیت سنگ‌درکا و کلرد است که نانوکود با غلظت پایین سبب افزایش محتوای کلشی‌سین در بنه گیاهان این رویشگاه شده است. کود ازت، محتوای کلشی‌سین در جمعیت فیل‌بند را کاهش داد. این مورد نشان می‌دهد کشت گیاهان رویشگاه فیل‌بند به منظور افزایش تولید کلشی‌سین نتیجه بخش

نبوده است و برای افزایش تولید کلشی‌سین پیشنهاد می‌شود تا از گیاهان رویشگاه سنگ‌درکا و کلرد استفاده گردد. Poutaraud و Girardin (2004) در این مورد اظهار داشتند که اگر بیش از پنج گیاه در کنار هم کاشته شوند گیاه برای اجتناب از رقابت، ظریف و نازک‌تر می‌شود و وزن خشک دانه نیزکاهش می‌یابد. در بررسی حاضر، بیش از ۵ گیاه در کنار هم کاشته شده بودند که می‌توان این اثر را موجب کاهش محتوای کلشی‌سین در اعضای جمعیت فیل‌بند دانست ولی اجتناب از رقابت در بین اعضاء جمعیت کلرد و سنگ‌درکا دیده نشد. این محققین متذکر شدند که محتوای آلکالوئید در بین گیاهان هر جمعیت گل حسرت به‌واسطه آنکه در طبیعت از یکدیگر فاصله دارند با ثبات است. این دو محقق عنوان کردند که زمان نمونه برداری نیز در استحصال محتوای کلشی‌سین اثر دارد و بهترین زمان برای نمونه برداری زمان تکثیر رویشی آن‌ها است. در مطالعه حاضر نیز زمان نمونه برداری در اواخر پاییز و پایان دوره رشد رویشی گل حسرت بود که غده‌های آن‌ها بالاترین محتوای وزن تر را نشان می‌دهند و امکان بالاتر بودن محتوای کلشی‌سین در آن‌ها نیز زیادتر است.

نتیجه‌گیری

محتوای ترکیبات فنلی و کلشی سین بنه گل‌حسرت رویشگاه‌های مختلف، الگوی متفاوتی از یکدیگر نشان دادند. اگرچه تفاوت در میانگین این شاخص‌ها وابسته به رویشگاه و نوع تیمار گیاه با کودهای ازت ونانو ازت بود اما تاثیر کودهای ازت و نانو ازت بر انباشت این ترکیبات در بنه گیاهان رویشگاه‌های مختلف، یکسان نبود.

منابع

علیرضایی نغندر، مرتضی ، رضازاده شمسعلی، آروئی، حسین و محمود شور (۱۳۹۱). تأثیر سطوح مختلف کودهای زیستی و شیمیایی ازت بر عملکرد کورم و میزان کلشی‌سین در گیاه دارویی *Colchicum kotschyi* Bioss. تحت شرایط رویشگاه. فصلنامه گیاهان دارویی، سال یازدهم، دوره دوم، ویژه نامه شماره نه، بهار

معروفی،حسین (۱۳۹۶). فلور ایران. شماره ۱۴۲:تیره گل حسرت (Colchiceae) موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.

Aires, A. Rosa, E. and Carvalho, R. (2006). Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. italica). Journal of the Science of Food and Agriculture.; 86:1512-1516.

Allahdadi, M., & Farzaneh, P. (2018). Influence of different levels of nitrogen fertilizer on some phytochemical characteristics of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. Journal of Medicinal Plants Studies; 6(1): 109-115.

Al-Fayyad, M. Alali, F. and Al-Tell, A. (2003). Effect of NPK fertilizer levels on morphological characteristics and productivity of *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum*, Journal of herbs, spices & medicinal plants, 4: 11-17.

Poutaraud, A. and Girardin, Ph. (2005). Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*. Environmental and Experimental Botany; 54: 101–108.

Arabshahi-Delouee, S. Devi, D.V. and Urooj. (2007). A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. Food Chem; 100: 1100-5.

Awad, M.A. And De Jager, A. (2002). Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. Scientia Horticulturae.; 92:265-276.

Benzon, H.R.L. Rubenecia, M.R.U. Ultra Jr, V.U. and Lee, S.C. (2015). Nano-fertilizer affects the growth, development, and chemical properties of rice. International Journal of Agricultural Research, 7(1), 105-117.

Bharathi P and Philomina D. (2010). Effect of nutritional factors and precursors on formation of colchicine in *Gloriosa superba* in vitro. Res. In Biotechnol.; 1: 29 - 37.

Chang, C. Yang, M. Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. Food and Drug Analysis; 10: 178-82.

Cojocaru, A., Vlase, L., Munteanu, N., Stan, T., Teliban, G.-C., Marian, B., & Stoleru, V. (2020). Dynamic of Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Yield of Rhubarb under Chemical, Organic and Biological Fertilization. Plants, 9, 355. https://doi.org/10.3390/plants9030355

David Pilbeam J. (2015). Handbook of Plant Nutrition, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, NY, USA.

Desgagné-Penix, I. and Facchini, PJ. (2011). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. In: Ashihara H, Crozier A, Komamine A, editors. Plant Metabolism and Biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons. 241-261.

Dewick, P.M. (2001). The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids In Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach, 2nd ed., pp. 137–186 Dewick PM, editor. Chichester: John Wiley.

Endara, M. J. Coley, P.D. (2011). The resource availability hypothesis revisited: A meta-analysis. Funct. Ecol. 25, 389–398.

Gholami, T. Peyvandi, M. Abbaspour, H. Noormohammadi, Z.and Sharifnia, F. (2020) Chemical Analysis of Population Variability in *Peganum Harmala* (var. *Harmala*). Acta Botanica Hungarica; 62:205-215

Gowda, B. G. (2014). High-performance liquid chromatographic determination of colchicine in pharmaceutical formulations and biological fluids. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6(6):335-337.

Mirza, H. Fujita, M. Carvalho, M. and Thiago, A.(2020). Sustainable Crop Production. eBook (PDF) ISBN: 978-1-83880-899-0.

Ibrahim, M. H. Jaafar, H. Z. Rahmat, A. and Rahman, Z. A. (2010). The relationship between phenolics and flavonoids production with total non-structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO_2 and nitrogen fertilization. Molecules (Basel, Switzerland), 16(1), 162–174.

Kiliç., I. Yesiloglu., Y. and Bayrak., Y. (2014). Investigation on the Antioxidant Activity of Roots and Stem *of Colchicum turcicum* L. Asian Journal of Chemistry; Vol. 26, No. 1, 5-9.

Kumar, A, Sharma, P.R. Mondhe, D.M. (2017). Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. Anticancer Drugs. Mar;28(3):250-262.

Liu, C., Liu, Y. M., Sun, Q. L., Jiang, C. Y., & Liu, S. J. (2015). Unraveling the kinetic diversity of microbial 3-dehydroquinate dehydratases of shikimate pathway. AMB Express, 5, 7. https://doi.org/10.1186/s13568-014-0087-y

Mansoor, A. (2004). Standardization of plant base medicines. Int. Chem.Pharm. Med. J. 1(2): 87-101.

Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. The Science of the total environment, 514C, 131-139. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.104

Marchiosi, R. dos Santos, W.D. Constantin, R.P.and *et al*. (2020) Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. Phytochem Rev 19, 865–906. https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2.

Mehabadi., Sh and Karimiyan, S. M. (2018). Morphine Tolerance Effects on Neurotransmitters and Related Receptors: Definition, Overview and Update. Journal of Pharmaceutical Research International. 23(6): 1-11; Article no. JPRI.41936.

Ghasemi, V., Moghaddam, S., Rahimi, A., Pourakbar, L., & Popović-Djordjević, J. (2020). Winter Cultivation and Nano Fertilizers Improve Yield Components and Antioxidant Traits of Dragon's Head (Lallemantia iberica (M.B.) Fischer & Meyer). Plants (Basel, Switzerland), 9. https://doi.org/10.3390/plants9020252

Nogues, S. and Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plant growth under enhanced UV- B radiation. Journal of Experimental Botany 51(8): 1309- 1317.

Nordenstam, B. (1998). Colchicaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.), The Families and Genera of Vascular Plants. Part III Flowering Plants, Monocotyledons, Lilianae (except Orchidaceae). SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 175–185.

Pettit, G. R., Melody, N., & Chapuis, J. C. (2020). Antineoplastic Agents. 607. Emetine Auristatins. J Nat Prod, 83(5), 1571-1576. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00031

Sarin. R., Rishi, A., & Kumar, A. (2010). In vivo and In vitro Estimation of Colchicine in Gloriosa ۲۲olchi L. by High Pressure Liquid Chromatography. J. Exp. Sci. 1(4):1-2.

Roggatz, U., McDonald, A. J. Stadenberg, S. I., and Schurr, U. (1999). "Effects of nitrogen deprivation on cell division and expansion in leaves of *Ricinus communis* L," *Plant, Cell and Environment*, vol. 22, no. 1, pp. 81–89.

Senizza, B. Rocchetti, G., Okur, M. A., Zengin, G., Yıldıztugay, E. A. k. G. Montesano, D. and Lucini, L. (2020). Phytochemical Profile and Biological Properties of *Colchicum triphyllum* (Meadow Saffron). Foods, 9, 457.

Slinkard, K., and Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods.A.m J. Enol Viticult; 28: 49-55.

Stumpf, B., Yan, F., Honermeier, B. (2018) Influence of nitrogen fertilization on yield and phenolic compounds in wheat grains (*Triticum aestivum* L. ssp. aestivum). Journal of Plant Nutrition and Soil Science; 111-118

Suppan, S. (2013). Nanomaterials in soil: Our future food chain? The institute of agriculture and trade policy, Minneapolis, MN.

Wan, A., Gao, Q. and Li, H. (2010). Effects of molecular weight and degree of acetylation on the release of nitric oxide from chitosan–nitric oxide adducts. Journal of Applied Polymer Science; 117:2183-2188.

Wendelbo, P., and Stuart, D. (1985). *Colchicum* L. In: Townsend CC, Guest (eds). Agriculture and Agrarian Reform. Baghdad. Republic of Iraq.

Wu, C., Gao, Q. Kjelgren, R.K. Guo, X. and Wang, M. (2013) Yields, phenolic profiles and antioxidant activities of *Ziziphus jujuba* Mill. in response to different fertilization treatments Molecules 18: 12029 -12040.

Zhang, E. Duan, Y., Tan, F. and Zhang, S. (2016) Effects of Long-term Nitrogen and Organic Fertilization on Antioxidants Content of Tomato Fruits. J Hortic 3: 172. doi:10.4172/2376-0354.1000172.

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology, Volume 34, Issue 2, Ser. 68,
۲۳ Summer 2021

Effect of nitrogen and nano nitrogen fertilizers on corm colchicine and phenolic compounds of *Colchicum speciosum* L. from three regions of Mazandaran

M. Babaei Naiej[1], M. Peyvandi[2*], H. Abbaspour[3], Z. Noormohammadi[3], S. Arbabian[3]

Received:2020.12.14
Accepted:2020.12.19

Abstract

Colchicum speciosum L. is a medicinal plant rich in colchicine and phenolic compounds. In this study, the effects of different concentrations of nitrogen and nano-nitrogen fertilizers on the accumulation of phenolic compounds and colchicine alkaloids were investigated in collected plants corms from three regions in Mazandaran province (Philband, Kellerd and Sangdarka). Experiments were performed with a randomized block design for five treatments including control, two levels of nitrogen fertilizer (1.1 and 2.2 mg / l), and two levels of nano-nitrogen fertilizer (1.5 and 3 mg / l) for plants of three habitats. Three months after treatments, phenolic compounds and the colchicine were extracted. The contents of phenolic compounds were measured by spectrophotometer and colchicine by HPLC. The results indicated in the plants of Filband habitat, all nitrogen and nano-nitrogen treatments caused a significant increase ($P \leq 0.05$) of total phenol content of corm. The use of nitrogen and nano-nitrogen fertilizers significantly reduced corm total flavonoid contents of all studied habitats. Nitrogen fertilizers in all populations caused a significant increase in corm total anthocyanin content, while nano-nitrogen fertilizers had no significant effect on corm total anthocyanin content. Comparison of colchicine content of control plants with treated plants showed that treatment with nitrogen fertilizers decreased and with nano-nitrogen fertilizers increased corm colchicine content. The present results showed that the contents of corm metabolites in different habitats are different from each other and the effects of nitrogen and nano nitrogen fertilizers on changing the contents of these metabolites are not the same.

Keywords: *Anthocyanin, Coriander, Colchicine, Colchicum speciosum ,Total Flavonoid, , Nano-Nitrogen*

1- PhD Student, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch, Islamic Azad University
2- Associate Professor, Tehran North Branch, Islamic Azad University
*(Corresponding author: maryapeyvandi@gmail.com)
3- Associate Professor, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch, Islamic Azad University