

اثر محلول پاشی اتانول و متانول بر شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis purpurea* L.)

افسون رضایی علولو^۱، محسن ثانی‌خانی*^۱، عزیزاله خیری^۱ و ملیحه یعقوبی^۲

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۸/۲۲)

چکیده

به منظور بررسی تأثیر محلول پاشی سطوح مختلف اتانول و متانول بر شاخص‌های بیوشیمیایی گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis purpurea* L.) آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان در سال ۱۳۹۹ اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل دو سطح اتانول (۵ و ۱۰ درصد) و متانول (۵ و ۱۰ درصد) به همراه تیمار شاهد (آب مقطر) بود. نتایج آزمایش نشان داد که حداکثر مقدار کلروفیل کل (۱/۷۸ میلی‌گرم بر گرم)، کاروتنوئید کل (۰/۰۶۵ میلی‌گرم بر گرم)، فنل کل (۱۵/۳۵ میلی‌گرم بر گرم)، فلاونوئید کل (۲/۵۸ میلی‌گرم بر گرم) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۴۳/۷۶ درصد) تحت تیمار متانول ۱۰ درصد به دست آمد. بیشترین میزان پرولین (۴/۴۷ میلی‌گرم) و فنل محلول (۷۶/۲۰ میلی‌گرم بر گرم)، محتوای آب نسبی (۷۶/۰۲ درصد) و نیتروژن برگ (۱/۶۱ درصد) تحت تیمار اتانول ۱۰ درصد مشاهده شد. شاخص نشت یونی (۱۵/۲۱ درصد) با کاربرد برگی اتانول ۱۰ درصد و فعالیت آنزیم کاتالاز (۱/۶۶ میلی‌گرم بر گرم پروتئین) و آنزیم پراکسیداز (۰/۳۴ میلی‌گرم بر گرم پروتئین) با محلول پاشی متانول ۱۰ درصد کاهش نشان دادند با توجه به نتایج به دست آمده، کاربرد سطوح مختلف هیدروالکل‌ها، جهت بهبود خصوصیات بیوشیمیایی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کاتالاز، گل انگشتانه، هیدروالکل، پرولین

مقدمه

تاکنون ۲۳ نوع مختلف آن در عصاره‌های حاصل از گونه *D. purpurea* شناخته شده است. در میان ترکیبات گلیکوزیدی حاصل از این گیاهان، دیگوکسین و دیجیتوکسین هنوز هم به عنوان داروهای مفید در درمان نارسایی‌های قلبی استفاده می‌شود (Newman et al., 2008).

با توجه به آسیب‌های جدی که در دهه‌های گذشته به واسطه استفاده بی‌رویه از نهاده‌های شیمیایی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای بالابردن تولید محصولات کشاورزی، به

گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis Purpurea* L.) متعلق به خانواده گل میمون (Scrophulariaceae) بوده که به علت شکل خاص گل‌هایش دستکش روباه (foxglove) نامیده می‌شود. جنس *Digitalis* از این تیره به ۲۰-۱۲ گونه تقسیم می‌شود و گونه‌های مختلف این جنس عموماً یک‌ساله و علفی و گاهی درختچه‌های چند ساله هستند. برگ‌های گونه‌های مختلف این جنس، حاوی ترکیبات گلیکوزیدی قلبی (کاردنولید) هستند که

محیطزیست و سلامت انسان‌ها وارد شده است، در سال‌های اخیر نوعی تجدیدنظر در مورد مصرف کودها و سم‌های شیمیایی که یکی از دستاوردهای کشاورزی رایج است در جریان است. در نتیجه تلاش برای بالابردن تولید زیست‌توده و ماده مؤثره آن‌ها بدون کاربرد نهاده‌های شیمیایی و استفاده از ترکیبات غیرشیمیایی با اثرات سوء کمتر به‌عنوان جایگزین مورد نیاز است (کوچکی و خواجه‌حسینی، ۱۳۹۶).

یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای رساندن مواد غذایی و عناصر مورد نیاز گیاه، محلول‌پاشی یا تغذیه از طریق برگ است که به‌دلیل سرعت جذب بالا از طریق اندام‌های هوایی در فاصله زمانی کوتاه‌تری می‌توان به نتیجه مطلوب دست یافت و نیاز غذایی گیاه را تأمین کرد (عسگری و معین‌فرد، ۱۳۹۳).

استفاده از ترکیبات الکلی برای تحریک رشد موجودات فتوسنتزکننده، برای اولین بار در سال ۱۹۵۱ توسط بنسون (Benson) گزارش شد. متانول (CH_3OH) و اتانول ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) ساده‌ترین نوع الکل‌ها هستند که از فعالیت بی‌هوازی گونه‌های زیادی از باکتری‌ها تولید می‌شوند و مقدار اندکی از آن‌ها وارد جو شده که پس از چند روز، توسط اکسیژن و نور خورشید اکسید شده و به آب و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌شود (Haakana et al., 2001; Yavarpanah et al., 2015). متانول، اتانول و سایر الکل‌ها به‌صورت غیرفعال و از طریق انتشار ساده از غشاء سلولی جذب سلول‌های گیاه می‌شوند و سرعت جذب آن‌ها به‌طور مستقیم به غلظت آن‌ها بستگی دارد. پس از محلول‌پاشی الکل‌ها روی گیاه بدون توجه به محل تیمارکردن یعنی محلول‌پاشی روی یک برگ یا محلول‌پاشی روی کل برگ‌های گیاه، عکس‌العملی سیستمیک نسبت به محلول‌پاشی الکل‌ها در کل گیاه مشاهده می‌شود (Zbiec and Padsiad, 2003).

بر طبق گزارشات، دو برابرشدن غلظت دی‌اکسید کربن سبب افزایش خطی کارایی مصرف نور تا ۳۰٪ می‌شود و همچنین افزایش غلظت متانول در بافت‌های گیاهی بر راندمان تبدیل کربن اثر مثبت می‌گذارد. افزایش سرعت رشد محصول پس از محلول‌پاشی متانول به‌علت افزایش غلظت در دی‌اکسید

کربن در برگ‌ها و استفاده از متانول به‌عنوان یک منبع مستقیم برای سنتز اسیدآمینو سرین و یا کاهش هدررفت کربن از طریق تنفس نوری است (Richter, 2006). در اثر محلول‌پاشی متانول، دی‌اکسید کربن از اکسیداسیون سریع متانول بر روی گیاه به‌دست می‌آید و می‌تواند با موفقیت در جذب توسط رایبیسکو با اکسیژن رقابت کند (Ramirez et al., 2006). بررسی‌های دیگر نشان دادند محلول‌پاشی متانول سبب افزایش ۱۶ تا ۲۲ درصد عملکرد در سویا می‌شود که علت این افزایش عملکرد، افزایش ظرفیت فتوسنتزی گیاه در مرحله رشد است. همچنین متانول باعث بیشترشدن فتوسنتز گیاه و افزایش رشد گیاه می‌شود (Xiao-Tang et al., 2008). نتایج متفاوتی در مورد کاربرد برگی هیدروالکل‌ها در گیاهان مختلف توسط پژوهشگران گزارش شده است، طبق تحقیقی محلول‌پاشی گیاه توت‌فرنگی (*Fragaria × ananasa* cv. Gaviota) به‌صورت ترکیبی با اتانول و متانول ۱۵ درصد موجب افزایش رشد و عملکرد میوه شد (Yavarpanah, 2015). در مقابل در بررسی که بر روی گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) انجام شد، نتایج نشان داد که محلول‌پاشی با کمترین و بیشترین غلظت هیدروالکل‌ها (۱۰ و ۴۰ درصد حجمی اتانول و متانول) باعث تأثیر منفی روی تعداد شاخه‌های جانبی شد (نورافکن و همکاران، ۱۳۹۷). استفاده از تیمارهای متانول و اتانول موجب بهبود خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی در گیاه دارویی ریحان گردید (مقدم و همکاران، ۱۳۹۷). همچنین براساس گزارش Yazdi Far و همکاران (۲۰۱۵) محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف متانول منجر به افزایش معنی‌دار میزان فنل، فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه همیشه‌بهار شد.

با توجه به وجود گزارشات مختلف در مورد اثرات مثبت و منفی کاربرد برگی متانول و اتانول در تولید گیاهان سالم (بدون کاربرد نهاده‌های شیمیایی)، مطالعه حاضر جهت بررسی و مقایسه اثر نوع و غلظت هیدروالکل‌های مذکور بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها

بافت خاک	رس	سیلت	شن	ماده آلی	پتاسیم	سدیم	کلسیم	نیترژن	EC	pH
					(گرم بر کیلوگرم)	(گرم بر کیلوگرم)	(گرم بر کیلوگرم)	(درصد)	(دسی‌زیمنس بر متر)	
لوم رسی	۳۷	۳۸	۲۵	۰/۹۴	۰/۲۰	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۰۷	۱/۴۹	۷/۴

این پژوهش در فصل‌های پاییز و زمستان سال ۱۳۹۹ به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان انجام شد. هر تکرار شامل سه گلدان حاوی دو بوته برای هر تیمار به همراه تیمار شاهد و مجموع ۴۵ گلدان در نظر گرفته شد. نتایج ارزیابی خصوصیات مهم فیزیکی و شیمیایی خاک بستر در جدول ۱ ارائه شده است.

تیمارهای آزمایش شامل دو سطح اتانول (۵ و ۱۰ درصد) و دو سطح متانول (۵ و ۱۰ درصد) به همراه تیمار شاهد (آب مقطر) بودند. بذره‌های گل انگشتانه ارغوانی (شرکت پاکان بذر) قبل از کشت با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی و سپس چندین مرحله با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرها ابتدا در سینی نشا حاوی کوکویت و پیت‌ماس در اوایل آبان ماه سال ۹۹ کشت شدند. سپس در اوایل بهمن ماه و در مرحله چهار برگی سه عدد نشا به گلدان‌های از جنس پلاستیک به قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۲ سانتی‌متر منتقل شدند. بستر کشت شامل ترکیبی از خاک مزرعه، کوکویت و پرلیت (به نسبت ۳:۱:۱) بود. میانگین دمای روز و شب گلخانه در طول دوره آزمایش به ترتیب ۲۵ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰٪ تنظیم شد. در طول آزمایش گیاهچه‌ها هفته‌ای یک بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند کامل تغذیه شدند (Hoagland and Arnon, 1950). به غیر از محلول‌دهی هر سه روز یک‌بار گیاهچه‌ها با آب شیر و به مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر توسط بشر مدرج آبیاری شدند. pH محلول توسط اسید سولفوریک غلیظ در حد ۵/۶ با کمک pH متر مدل ۷۴۴ (Metrohm) تنظیم شد. بعد از انتقال نشاها به گلدان‌ها و استقرار کامل آن‌ها در اواخر خردادماه محلول پاشی با تیمارهای مذکور شروع شده و چهار مرتبه به صورت ۱۰ روز یک‌بار انجام گرفت و ۱۰ روز بعد از آخرین محلول پاشی، از برگ‌ها

نمونه‌گیری و جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل شد. **صفات مورد اندازه‌گیری، اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید:** برای اندازه‌گیری کلروفیل کل و کاروتنوئید از روش Arnon (۱۹۶۷) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ وزن شد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده شد و پس از سانتریفیوژکردن با دور ۵۰۰۰ به مدت ده دقیقه مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵، ۵۱۰ و ۴۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (RS 232) SAFAS MONACO خوانده شد و در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آورده شد. در این رابطه (V) حجم نهایی عصاره، (A) جذب نور در طول موج‌های مشخص، (W) وزن تر نمونه برحسب گرم است.

$$\text{Total Chlorophyll} = [20.2 (A645) + 8.02 (A663)] \times V / (W \times 1000)$$

$$\text{Carotenoid} = [7.6 (A480) - 1.49 (A510)] \times V / (W \times 1000)$$

سنجش میزان فنل کل: میزان فنل کل براساس روش فولین سیوکالتو با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد به روش Meda و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف شده ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو ۵۰ درصد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فنل کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد در نهایت، داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر گیاه محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل به

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: مقدار ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با ۷ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن و ۶ میکرو لیتر گایاکول مخلوط شده و دستگاه اسپکتوفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر شد. دستگاه اسپکتوفتومتری روی طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با فاصله زمانی ۲۰ ثانیه تنظیم گردید. سپس ۱۵ میکرو لیتر عصاره به مخلوط اضافه و بلافاصله تغییرات جذب نور خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در دقیقه بیان شد (Dhindsa et al., 1981).

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی برگ‌ها: فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش DPPH اندازه گیری شد. این آزمایش بر اساس واکنش رادیکال‌های آزاد پایدار DPPH با ترکیبات دهنده هیدروژن مانند فنل‌ها استوار است. ابتدا محلول ۰/۱ میلی مولار از DPPH تهیه و سپس ۱/۵ میلی لیتر عصاره به همراه ۱/۵ میلی لیتر از DPPH به لوله آزمایش ریخته و جذب آن بعد از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در اتاق تاریک، در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Brand-Williams et al., 1995).

$$DPPH = (Ac-As) / Ac \times 100$$
 درصد مهار رادیکال
Ac: میزان جذب برای نمونه شاهد مثبت، As: میزان جذب نمونه گیاهی

سنجش پرولین: برای اندازه گیری پرولین ابتدا ۰/۵ گرم از برگ توزین شده در هاون چینی در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ به خوبی ساییده شده و مخلوط هموژنیزه شده در دستگاه سانتریفوژ به مدت پنج دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول شناور را به فالکون منتقل نموده و سپس ۲ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و بلافاصله پس از خارج کردن از حمام آب به مدت چند دقیقه در حمام یخ قرار گرفتند. سپس به هر لوله آزمایش ۴ میلی لیتر تولون اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه تکان داده شدند تا کاملاً یکنواخت شوند. سپس لوله‌ها برای مدتی در محیط

روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد به روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) اندازه گیری شد. مقدار ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ با ۱۰ سی سی متانول اسیدی در هاون چینی ساییده شد. به ۰/۵ میلی لیتر عصاره صاف شده ۱/۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرو لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرو لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه داری شد. میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فلاونوئید کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد و محتوای فلاونوئید بر حسب معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر گیاه محاسبه شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان: مقدار ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه با ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) یک درصد و EDTA یک میلی مولار ساییده شد. تمام مراحل استخراج بر روی یخ انجام گرفت. سپس عصاره‌ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با ۱۵ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن مخلوط و دستگاه اسپکتوفتومتر با این مخلوط صفر گردید. طول موج اسپکتوفتومتر بر روی طول موج ۲۴۰ نانومتر و مدت زمان یک دقیقه و با فاصله زمانی ۵ ثانیه تنظیم شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر عصاره به مخلوط اضافه شده و بلافاصله تغییرات جذب نور آن با فاصله زمانی ۵ ثانیه و به مدت یک دقیقه خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر و بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن بر تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (Dhindsa et al., 1981).

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا: به منظور اندازه‌گیری شاخص پایداری غشای سلول، ۱ گرم برگ با آب مقطر شسته شده و در لوله‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و هدایت الکتریکی آن‌ها پس از سرد شدن با دستگاه هدایت‌سنج خوانده شد (EC_1) سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و هدایت الکتریکی آن‌ها پس از سرد شدن خوانده شد (EC_2). شاخص پایداری غشای سلولی با استفاده از رابطه زیر به صورت درصد محاسبه شد (Sairam et al., 2002).

$$EL = (EC_1 / EC_2) \times 100$$

EC_1 = هدایت الکتریکی پس از قرار گرفتن در معرض دمای

۴۰ درجه سانتی‌گراد

EC_2 = هدایت الکتریکی پس از قرار گرفتن در معرض دمای

۱۰۰ درجه سانتی‌گراد

تعیین میزان نیتروژن با استفاده از دستگاه کج‌دال: برای اندازه‌گیری نیتروژن از روش امامی (۱۳۷۵) استفاده شد. این آزمایش در چهار مرحله آماده‌کردن نمونه، هضم نمونه، تقطیر و مرحله تیتراژ انجام شد. در مرحله اول مقدار ۰/۵ گرم از هر نمونه وزن و در داخل کاغذ مخصوص پیچیده و سپس به درون ارلن منتقل شدند. در مرحله هضم میزان ۸ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۶ درصد) و ۳ گرم کاتالیزور سلنیوم سولفات (۹۶۰ گرم سولفات پتاسم، ۱۰ گرم دی‌اکسید سلنیوم، ۴۰ گرم سولفات مس) به نمونه‌ها اضافه و زمان دستگاه روی ۱۵۰ دقیقه و درجه حرارت دستگاه روی ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در مرحله سرد شدن نمونه‌ها و رسیدن درجه حرارت آن‌ها به درجه حرارت محیط آزمایشگاه، ارلن داخل دستگاه تقطیر قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه محلول تقطیر شده داخل ارلن جمع شده و آماده تیتراسیون شد و با اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال آرام و قطره قطره تیتراسیون انجام گرفت. اضافه‌کردن اسید کلریدریک به محلول تا جایی ادامه پیدا کرد که رنگ محلول ثابت و نمونه به رنگ بنفش در آمد. در نهایت میزان نیتروژن با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$100 = (V \times 0.014) / P = \text{درصد نیتروژن}$$

آزمایشگاه قرار داده شدند. در این مدت در داخل لوله آزمایش دو فاز روئی و زیرین کاملاً از هم قابل تشخیص شده و فاز روئی را که به رنگ صورتی و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود برداشته و جذب آن در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت پرولین برحسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Bates et al., 1973).

میلی‌گرم پرولین بر گرم وزن تر = [(میلی‌گرم پرولین بر میلی‌لیتر) × (۵/۰ گرم نمونه) + (۱۱۵/۱۳ میلی‌لیتر تولوئن)]

سنجش قند محلول: سنجش قند محلول برگ به روش

Kochert (۱۹۸۷) انجام شد. بدین صورت که ۰/۱ گرم از نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد به مدت یک هفته قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول روئی برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و پس از نیم‌ساعت جذب آن‌ها در طول‌موج ۴۸۵ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. رسم منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز و تعیین میزان قند برحسب میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک نمونه‌ها محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوای آب نسبی: برای اندازه‌گیری محتوای

آب نسبی برگ، برگ کاملاً توسعه‌یافته به چند قسمت تقسیم شد و پس از توزین تکه‌های برگ به کمک ترازوی دیجیتالی وزن تر آن‌ها محاسبه شد. سپس آن‌ها به پتری‌دیش‌های درب دار حاوی آب مقطر منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شدند. پس از خارج کردن برگ‌ها از آب مقطر رطوبت اضافی سطح آن‌ها توسط دستمال کاغذی خشک شده و سپس برای به‌دست آوردن وزن آماس آن‌ها دوباره وزن شدند. پس از تعیین وزن آماس، قطعات برگی به آون (۷۰ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند و پس از ۴۸ ساعت وزن خشک آن‌ها تعیین شد. در نهایت محتوای نسبی آب برگ با استفاده از رابطه زیر به صورت درصد محاسبه شد (Galmes et al., 2007).

$$RWC = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})} \times 100$$

تورژسانس) × ۱۰۰

فعالیت آنزیم کاتالاز شد. حداقل میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار متانول ۱۰ درصد به دست آمد که نسبت به بقیه تیمارها تفاوت معنی داری نداشت ولی نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (شکل ۵).

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها کاربرد برگی سطوح مختلف اتانول و متانول در گیاهان تیمار شده موجب کاهش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید. حداقل مقدار آن در تیمار ۱۰ درصد متانول و حداکثر مقدار آن در تیمار شاهد بدون محلول پاشی هیدروالکل مشاهده شد (شکل ۶).

طبق نتایج مقایسه میانگین داده‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها تحت تیمار با هیدروالکل‌ها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (شکل ۷).

میزان پرولین در گیاهان محلول پاشی شده با سطوح مختلف اتانول و متانول نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی داری را نشان داد به طوری که حداکثر مقدار پرولین (۴/۴۷ میلی گرم بر گرم) در تیمار اتانول ۱۰ درصد و کمترین مقدار آن (۲/۳۳ میلی گرم بر گرم) در تیمار شاهد (بدون محلول پاشی) مشاهده شد (شکل ۸).

طبق نتایج به دست آمده محلول پاشی گیاهان با هیدروالکل‌ها باعث افزایش معنی دار درصد قند محلول برگ‌ها شد (شکل ۹).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که محتوای آب نسبی برگ گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف اتانول و متانول افزایش معنی داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ۱۰).

بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که نشت یونی برگ‌های گیاهان تحت تیمار هیدروالکل‌ها نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی داری را نشان داد (شکل ۱۲).

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها استفاده از سطوح مختلف الکل‌ها به صورت محلول پاشی موجب افزایش میزان نیتروژن برگ‌ها شد و حداکثر مقدار نیتروژن با محلول پاشی متانول ۱۰ درصد حاصل شد (شکل ۱۲).

$P =$ وزن نمونه برحسب گرم، $V =$ حجم اسید کلریدریک مصرفی در مرحله تیتراسیون برحسب میلی لیتر
آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS V9 و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کاربرد برگی سطوح مختلف اتانول و متانول بر خصوصیات بیوشیمیایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۲).

کلروفیل کل: براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها کاربرد برگی سطوح مختلف هیدروالکل‌ها بر میزان کلروفیل کل تأثیر مثبت نشان داد، به طوری که حداکثر مقدار کلروفیل کل (۱/۷۸ میلی گرم بر گرم) با کاربرد متانول ۱۰ درصد به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد (۱/۰۱ میلی گرم بر گرم) در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (شکل ۱).

کاروتنوئید کل: بررسی داده‌های حاصل نشان داد که میزان کاروتنوئید کل (۰/۰۶ میلی گرم بر گرم) با محلول پاشی متانول ۱۰ درصد افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد (۰/۰۲ میلی گرم بر گرم) نشان داد (شکل ۲).

فنل کل: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که استفاده از هیدروالکل‌ها افزایش معنی داری را در میزان فنل کل سبب شد به طوری که حداکثر مقدار فنل کل (۱۵/۳۵ میلی گرم بر گرم) در تیمار متانول ۱۰ درصد و کمترین میزان آن (۹/۵۱ میلی گرم بر گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۳).

فلاونوئید کل: نتایج نشان داد که کاربرد برگی اتانول و متانول موجب افزایش میزان فلاونوئیدکل برگ‌های گل انگشته‌انه ارغوانی شد. حداکثر مقدار فلاونوئیدکل (۲/۵۸ میلی گرم بر گرم) در تیمار اتانول ۱۰ درصد و کمترین مقدار آن (۰/۶۱ میلی گرم بر گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۴).

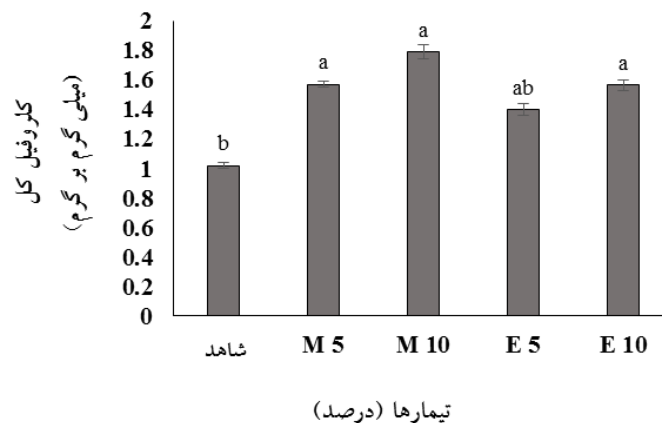
براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها، محلول پاشی گیاهان با هیدروالکل‌ها موجب کاهش میزان

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف محلول پاشی متانول و اتانول بر خصوصیات بیوشیمیایی گل انگشتانه ارغوانی

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کلروفیل	کارتونوئید	فنل	فلاونوئید	پرولین
تیمار	۴	۰/۲۴۶۰*	۰/۰۰۲۶*	۱۲/۹۶۱۸*	۱/۶۰۴۹*	۱/۷۶۰۱*
خطا	۱۰	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۰۸	۰/۰۵۹۰	۰/۰۰۱۴	۰/۰۳۸۱
ضریب تغییرات (%)		۴/۰۷۱۸	۵/۶۹۰۵	۱/۹۳۹۸	۲/۳۱۳۶	۵/۵۳۱۲

ادامه جدول ۲-

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کاتالاز	پراکسیداز	ظرفیت	نیترژن	محتوای نسبی آب
تیمار	۴	۱/۲۱۷۶*	۱/۰۸۲۷*	۲۵۸/۴۴۰۶*	۰/۰۳۰۰*	۲۸/۹۲۵۴*
خطا	۱۰	۰/۱۰۳۴	۰/۰۰۹۱	۵/۴۹۵۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۹۵۹*
ضریب تغییرات (%)		۱۵/۴۸۰۵	۹/۷۸۹۶	۲/۳۰۴۷	۰/۶۷۲۹	۰/۴۳۰۴



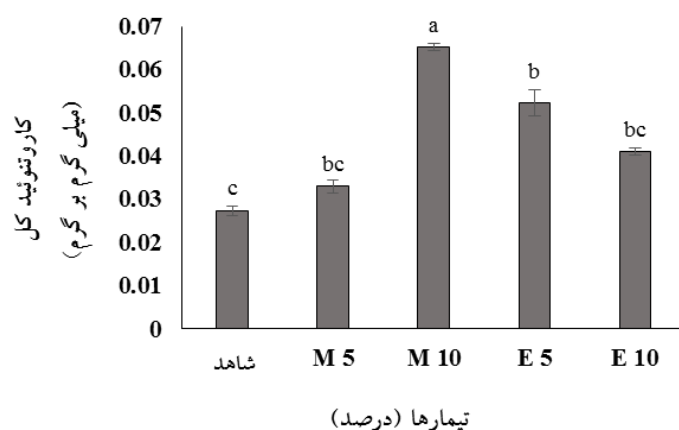
شکل ۱- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان کلروفیل کل. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

بحث

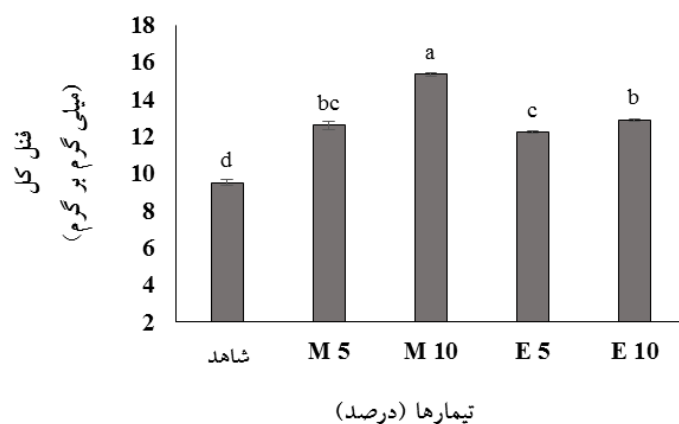
دی‌اکسید کربن را افزایش می‌دهند. همچنین با افزایش فشار آماس، درصد قند و تورم سلول به توسعه برگ‌ها، افزایش کلروفیل و محتوای کاروتنوئید کل کمک می‌کنند (Zbiec and Podsiad, 2003).

با توجه به این‌که کلروفیل a هسته مرکزی واکنش در فتوسیستم II را تشکیل می‌دهد، افزایش آن می‌تواند بیانگر تقویت سیستم فتوستنتزی گیاه باشد (Ramirez et al., 2006). بنابراین می‌توان استنباط کرد که کاربرد اتانول و متانول با تقویت مرکز واکنش فتوسیستم II سبب بهبود سیستم

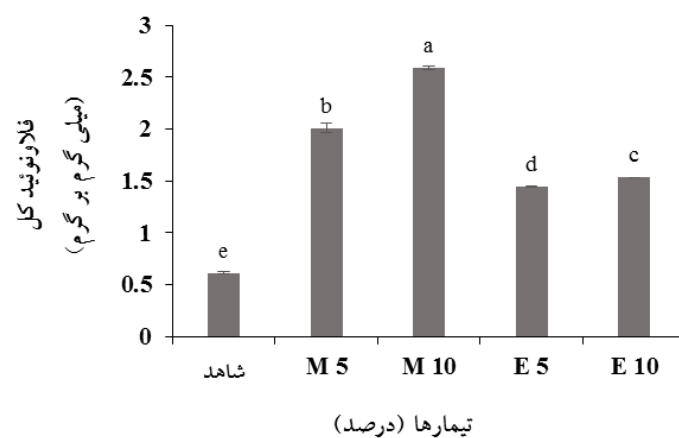
یکی از عوامل مهم در تعیین ظرفیت فتوستنتزی برگ، محتوای کلروفیل برگ می‌باشد که در پژوهش‌های مختلف همبستگی مثبتی بین میزان فتوستنتز برگ و محتوای کلروفیل آن گزارش شده است. از سوی دیگر تشکیل کلروفیل در حضور نور نیازمند هورمون سیتوکینین است که الکل‌ها با افزایش محتوای سیتوکینین گیاه موجب افزایش تشکیل کلروفیل و کاروتنوئید می‌شوند (Ramirez et al., 2006). متانول و اتانول با اکسیداسیون سریع به دی‌اکسید کربن در برگ‌ها نقطه جبران



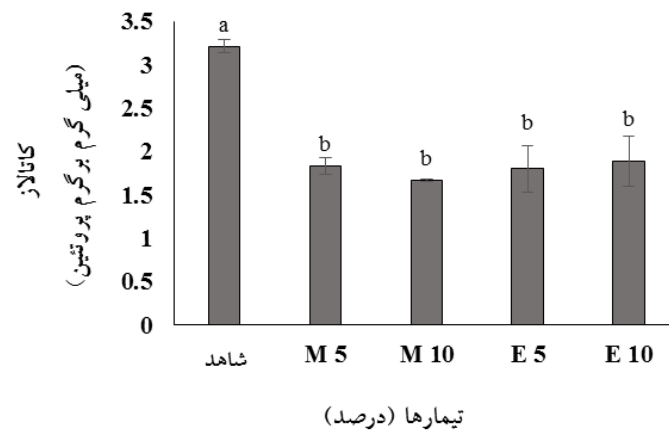
شکل ۲- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان کاروتنوئید کل. بارها نشان دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها است.



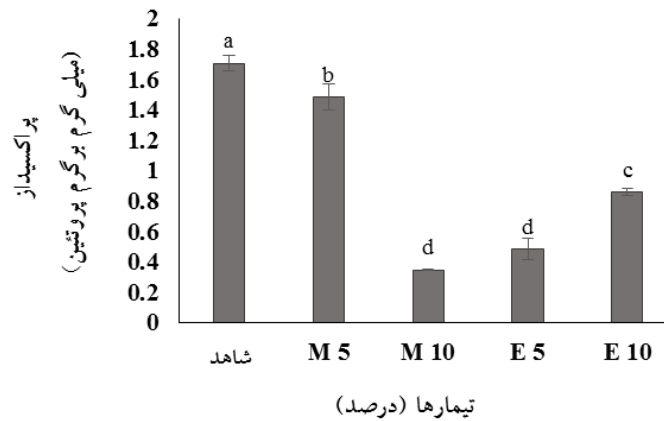
شکل ۳- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان فنل کل. بارها نشان دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها است.



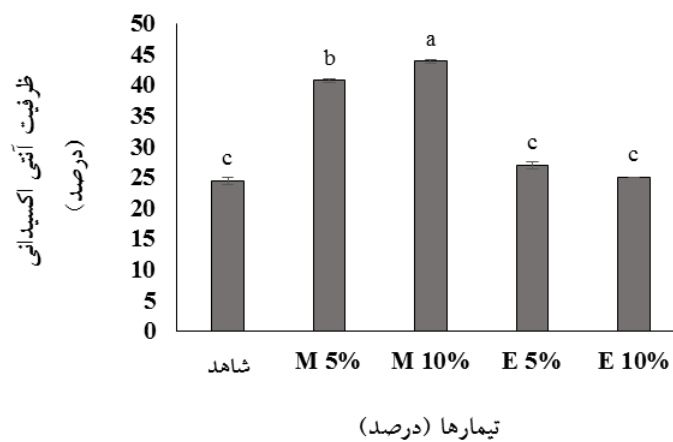
شکل ۴- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان فلاونوئید کل. بارها نشان دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها است.



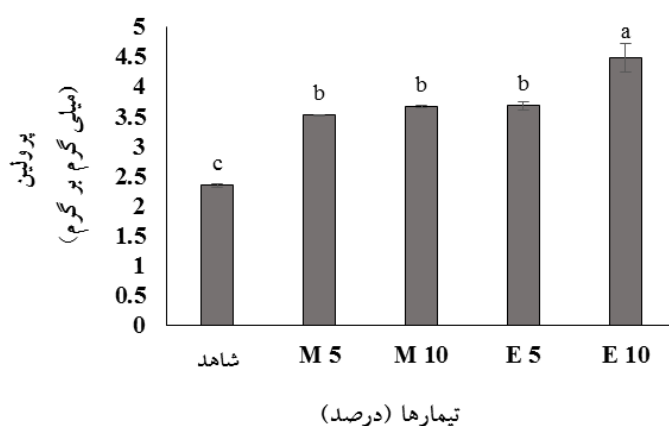
شکل ۵- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



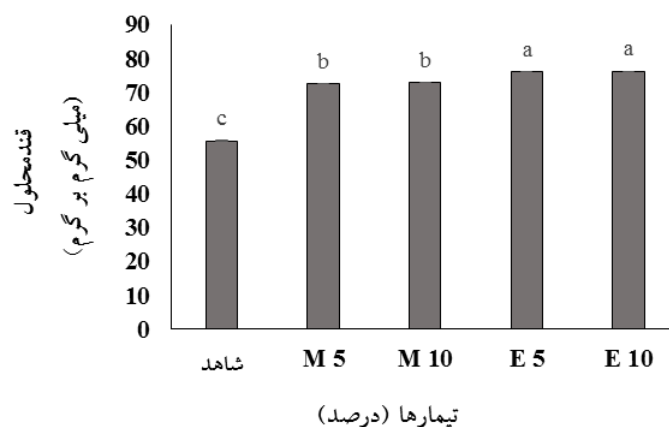
شکل ۶- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



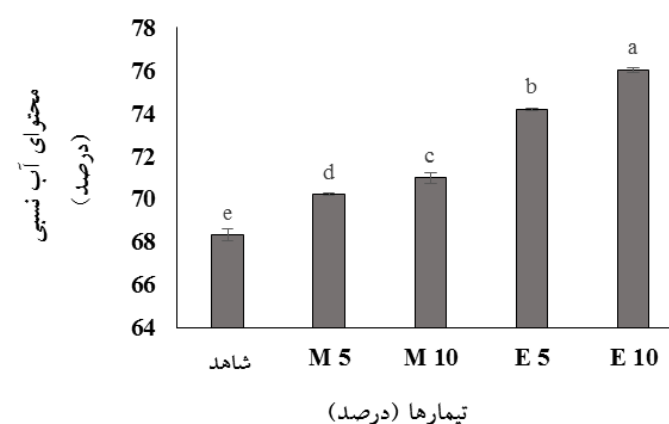
شکل ۷- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



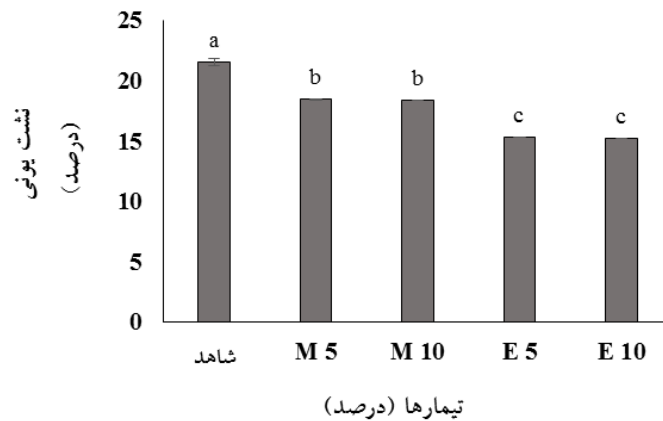
شکل ۸- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان پروتئین. بارها نشان دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها است.



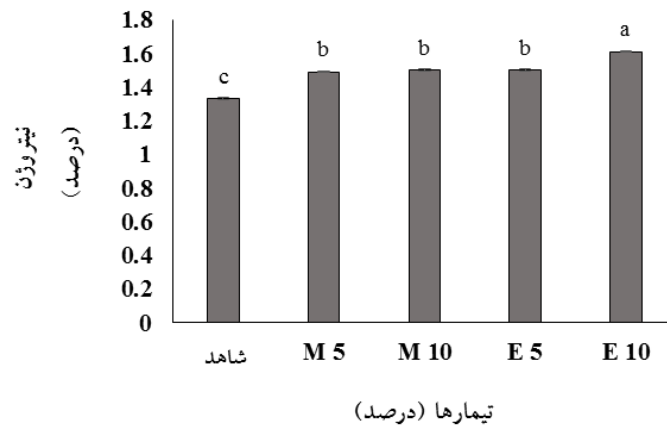
شکل ۹- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان قند محلول. بارها نشان دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها است.



شکل ۱۰- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان محتوای آب نسبی. بارها نشان دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها است.



شکل ۱۱- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان نشت یونی. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



شکل ۱۲- اثر سطوح مختلف محلول پاشی، متانول (M) و اتانول (E)، بر میزان نیترژن برگ. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (ES) است. ستون‌های دارای حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

تخریب کلروفیل و صدمه به سیستم فتوسنتزی گیاه در مقابل تنش‌های مختلف و مولکول‌های پر انرژی عمل می‌کند. به‌طور مثال کمبود آب موجب آسیب به رنگدانه‌ها و پلاستیدها می‌شود و کاهش کلروفیل، کاروتنوئید و کاهش ضخامت غشاء در تیلاکوئیدها را در پی خواهد داشت (Ramirez et al., 2006). افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های کاروتنوئید در گیاه سیاهدانه تحت تیمار سطوح مختلف متانول گزارش شده است (برادران فیروزآبادی و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین در گیاه دارویی ریحان استفاده از تیمارهای اتانول و متانول موجب افزایش میزان کاروتنوئید شده است (مقدم و همکاران، ۱۳۹۷)

فتوسنتزی گیاه می‌گردد. در گیاه دارویی ریحان محلول پاشی سطوح مختلف اتانول و متانول اثر قابل توجهی در افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی داشت، به‌طوری‌که رقت‌های ۲۰ درصد اتانول و ۲۵ درصد متانول موجب افزایش ولی کاربرد غلظت‌های بالاتر باعث کاهش صفت مورد نظر شد (مقدم و همکاران، ۱۳۹۷) که در پژوهش حاضر کاربرد برگی سطوح مختلف (۵ و ۱۰ درصد) اتانول و متانول موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل کل نسبت به تیمار شاهد شد.

رنگیزه کاروتنوئید عمل به‌دام انداختن نور در فتوسیستم‌ها را برعهده دارد و به‌عنوان یک عامل حفاظتی برای جلوگیری از

که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

بسیاری از ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و می‌توانند به‌طور مؤثری رادیکال‌های گروه هیدروکسیل و پروکسیل را حذف کرده و از اکسیدشدن چربی‌ها ممانعت کنند (Boscaiu et al., 2010). در تحقیق حاضر تیمار گیاهان با هیدروالکل‌ها موجب افزایش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شد که با تحقیقات مقدم و همکاران (۱۳۹۷) در گیاه دارویی ریحان، و امرایی و همکاران (۱۳۹۶) در گیاه سویا همسو بود. افزایش میزان ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه همیشه‌بهار با محلول‌پاشی متانول گزارش شده است (Yazdi Far et al., 2015).

کاهش مشاهده‌شده در میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تیمار هیدروالکل‌ها را می‌توان به کاهش تنش‌های القاشده در طی فرآیند تنفس نوری از قبیل کاهش میزان پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن در برگ‌ها نسبت داد (Gout et al., 2000). متانول با تبدیل به CO_2 سبب افزایش غلظت CO_2 درون سلول‌های برگ‌ها و انجام عمل فتوسنتز و ماده‌سازی می‌شود. بدین ترتیب از تشکیل سوپراکسید در کلروپلاست سلول‌های برگ‌ها جلوگیری می‌شود (Yordanov et al., 2003). متانول با کاهش میزان پراکسید هیدروژن در کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نقش دارد (Simova-Stoilova et al., 2008).

در تحقیق حاضر محلول‌پاشی گیاهان با سطوح مختلف اتانول و متانول موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های گل انگشتانه ارغوانی شد که می‌توان علت این امر را این‌گونه توجیه کرد که کاربرد تیمارهای الکلی سبب افزایش میزان فنل کل و کاروتنوئید می‌شود و با توجه به این‌که قدرت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد ارتباط مستقیمی با میزان فنل کل و محتوای کاروتنوئید دارد. می‌توان این‌گونه استنباط کرد که کاربرد متانول و اتانول موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه خواهد شد (Qasim et al., 2010). همچنین افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه همیشه‌بهار تحت تیمار سطوح مختلف متانول توسط Yazdi Far و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شده است.

پرولین علاوه بر شرکت در تنظیم اسمزی، نقش‌های مهمی مانند حفاظت از سیستم‌های غشایی سلول، سمیت‌زدایی و تنظیم اسیدیته سیتوزول را نیز بر عهده دارد (Yordanov et al., 2003). در این تحقیق تیمار گیاهان با هیدروالکل‌های اتانول و متانول باعث افزایش تجمع پرولین در برگ‌ها شد از آن جایی که متانول محلول‌پاشی‌شده بر روی برگ توسط آنزیم متانول اکسیداز و با از دست‌دادن H^+ به فرمات (متانوئیک اسید) تبدیل می‌شود. فرمات در مرحله بعد و توسط آنزیم فرمات دهیدروژناز تبدیل به CO_2 و H^+ می‌شود، از طرف دیگر گزارش شده آنزیم پرولین-۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد به‌نظر می‌رسد متانول با کاهش PH در گیاه منجر به افزایش فعالیت آنزیم پرولین-۵ کربوکسیلات سنتتاز شده و در نهایت تجمع پرولین در برگ را خواهیم داشت (Yordanov et al., 2003).

در بررسی حاضر کاربرد برگی هیدروالکل‌ها موجب افزایش میزان قند کل در برگ‌های گل انگشتانه ارغوانی شد که افزایش مشاهده شده در تیمار متانول و اتانول را این‌گونه می‌توان توضیح داد که متانول بعد از محلول‌پاشی متابولیزه شده و با افزایش میزان دی‌اکسید کربن درون برگ‌ها منجر به افزایش میزان آماس و قندسازی در برگ‌ها می‌شود. طبق گزارش مقدم و همکاران (۱۳۹۷) بیشترین میزان قند کل در گیاه ریحان با کاربرد برگی متانول ۱۰ درصد مشاهده شد که با نتایج تحقیق حاضر همسو بود. همچنین آن‌ها گزارش کردند که افزایش غلظت متانول باعث کاهش صفت مورد نظر گردید (مقدم و همکاران، ۱۳۹۷).

همچنین تأثیر تیمارهای اتانولی نیز در افزایش نسبت قند به اسید به اثبات رسیده است. در واقع استالدئید حاصل از اتانول، با افزایش تنفس سلولی موجب کاهش اسیدیته و افزایش درصد قند محلول می‌گردد (Pesis, 2005). همچنین کاربرد برگی متانول موجب تولید دو مولکول سرین در گیاهان تیمار شده می‌شود که این امر باعث افزایش گلوکز، فروکتوز و دو برابرشدن مقدار ساکارز می‌شود که در نتیجه آن عملکرد کل و نیز میزان قند کل افزایش پیدا می‌کند (Ramirez et al., 2006).

محتوای آب نسبی برگ‌های گل انگشتانه ارغوانی با تیمار هیدروالکل‌ها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. به نظر می‌رسد محلول پاشی متانول نقش مؤثری در افزایش رطوبت و محتوای آب نسبی برگ‌ها دارد که دلیل آن دو برابر شدن کربوهیدرات تولید شده در برگ‌ها با کاربرد متانول است (آرمند و همکاران، ۱۳۹۴). افزایش محتوای آب نسبی برگ در گیاه لوبیا تحت تیمار سطوح مختلف متانول گزارش شده است (آرمند و همکاران، ۱۳۹۴) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

استفاده از هیدروالکل‌ها در این تحقیق موجب افزایش میزان نیتروژن برگ‌ها شد که می‌توان آن را به افزایش محتوای سیتوکینین و اکسین برگ‌ها با محلول پاشی الکل‌ها نسبت داد (Ramirez et al., 2006). طبق گزارشی سیتوکینین و اکسین در تنظیم پروتئین‌های غشایی که در جذب عناصر نقش دارند تغییراتی را ایجاد می‌نماید و از این طریق باعث افزایش میزان عناصر غذایی در گیاه می‌گردد (Argueso et al., 2009). مطالعاتی که بر روی گوجه‌فرنگی و چغندر قند صورت گرفت نشان داد که محلول پاشی متانول باعث افزایش فعالیت نترات ردوکتاز به میزان ۵۰ درصد شده است (Ivanova et al., 2001). بنابراین افزایش میزان نیتروژن برگ پس از محلول پاشی با متانول را می‌توان به افزایش فعالیت نترات ردوکتاز و آسیمیلاسیون نیتروژن نسبت داد (Abanda et al., 2006; Ivanova et al., 2001). افزایش میزان نیتروژن برگ‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی و چغندر تحت محلول پاشی متانول گزارش شده است (Ivanova et al., 2001) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

به‌طور کلی با توجه به بهبود خصوصیات بیوشیمیایی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی با کاربرد برگی سطوح مختلف هیدروالکل‌ها، به نظر می‌رسد استفاده از اتانول و متانول از نظر افزایش عملکرد گیاه و نیز از لحاظ حفاظت از محیط زیست می‌تواند مفید واقع شود. از طرف دیگر با توجه به نتایج به دست آمده کاربرد متانول نسبت به اتانول افزایش قابل ملاحظه‌ای در بهبود خصوصیات بیوشیمیایی گیاه گل انگشتانه ارغوانی را باعث شد.

منابع

- آرمند، نظام، امیری، حمزه، و اسماعیلی، احمد (۱۳۹۴). تأثیر متانول بر عملکرد و اجزای عملکرد لوبیا تحت تنش کمبود آب. نشریه اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، (۲(۳۴)، ۲۴۲-۲۳۱.
- امامی، عاکفه (۱۳۷۵). روش‌های تجزیه گیاه. جلد ۱، نشریه سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران.
- امرای، بهزاد، پاک‌نژاد، فرزاد، ابراهیمی، محمد علی، و سبحانیان، حمید (۱۳۹۶). اثر محلول پاشی متانول و تنش خشکی بر عملکرد دانه و شاخص‌های رشد سویا (*Glycine max L.*). نشریه فیزیولوژی گیاهان زراعی، (۹(۳۴)، ۱۲۹-۱۱۱.
- برادران فیروزآبادی، مجتبی، پارسائیان، مهدیه و برادران فیروزآبادی، مهدی (۱۳۹۶). پاسخ زراعی و فیزیولوژیک سیاهدانه (*Nigella sativa L.*) به محلول پاشی آسکوربات و متانول در شرایط تنش کم آبیاری. مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی، (۹(۳۰)، ۲۷-۱۳. <https://sid.ir/paper/188582/fa>
- عسگری، علی‌اکبر، و معین‌فرد، عاطفه (۱۳۹۳). بررسی تأثیر محلول پاشی الکل‌ها بر گیاهان به‌عنوان روشی نوین در کشاورزی. اولین کنگره ملی زیست‌شناسی و علوم طبیعی ایران، دانشگاه تهران، ایران. <https://civilica.com/doc/333038>
- کوچکی، علیرضا، و خواجه‌حسینی، محمد (۱۳۹۶). زراعت نوین. جهاد دانشگاهی واحد مشهد.

مقدم، محمد، نریمانی، رسول، رستمی، قادر، و مجرب، سپیده (۱۳۹۷). بررسی اثر محلول پاشی اتانول و متانول بر شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* c.v. Keshkeni luvellou). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، ۲(۱۶)، ۳۴۵-۳۵۴. DOI: 10.22067/gsc.v16i2.57520

نورافکن، حسن، کلانتری، زهرا، و سفیدکن، فاطمه (۱۳۹۷). اثر محلول پاشی متانول و اتانول بر ترکیبات اسانس نعناع فلفلی. فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی، ۱۴(۲)، ۱۸-۹. DOI: 10.22034/AEJ.2018.543125

Abanda, D., Musch, M., Tschiersch, J., & Schawb, M. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedling: Growth promotion, methanol consumption and localization of the methanol emission site. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4025-4032. DOI: 10.1093/jxb/erl173

Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment*, 32(9), 1147-1160. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01940.x

Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121.

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00018060>

Benson, A. A. (1951). Identification of ribulose in C¹⁴O₂ photosynthetic products. *American Chemical Society*, 73, 2971-2972.

Boscaiu, M., Sanchez, M., Bautista, I., Donat, P., Lidon, A., Llinares, J., Llul, C., Mayoral, O., & Vicente, O. (2010). Phenolic compounds and stress markers in plants from gypsum habitats. *Bulletin University Journal Agriculture Science*, 67(1), 44-49. <https://www.researchgate.net/publication/228346456>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>

Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, T. A., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(126), 93-101. <https://www.jstor.org/stable/23689973>

Galmes, J., Flexas, J., Save, R., & Medrano, H. (2007). Water relations and stomatal characteristics of mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: Responses to water stress and recovery. *Plant and Soil*, 290(1), 139-155. DOI:10.1007/s11104-006-9148-6

Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., & Nonomura, A. R. (2000). Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiology*, 123(1), 287-296. doi: 10.1104/pp.123.1.287

Haakana, K., Saerckae, L., & Somersalo, S. (2001). Gaseous ethanol penetration of plant tissues positively effects the growth and commercial quality of miniature roses and dill. *Scientia Horticulturae*, 88(2001), 71-84. PII: S0304-4238(00)00188-6

Hoagland, D. R. & Arnon, D. J. (1950). *The Water Culture Method for Growing Plants without Soil*. 2nd Ed. California Agricultural Experimental Station, Berkeley.

Ivanova, E.G., Dornina, N. V., & Trotsenko, Y. A. (2001). Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiologiya*, 70(4), 452-458. PMID: 11558269

Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. *Handbook of phycolgical methods. Phycological and Biochemical Methods*, 95-97.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.10.006

Newman, R., Yang, P., & Pawlus, A. (2008). Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular Interventions*, 8(1), 36-49. DOI: 10.1124/mi.8.1.8

Pesis, E. (2005). The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 1-19. DOI:10.1016/j.postharvbio.2005.03.001

Qasim, A., Ashraff, M., & Anwar, F. (2010). Seed composition and seed oil antioxidant activity of maize under water stress. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(10), 1179-1187. DOI:10.1007/s11746-010-1599-5

Ramirez, I., Doreta, F., Espinoza, V., Jimenez, E., Mercado, A., & Pen a-Cortes, H. (2006). Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of arabidopsis, tobacco, and tomato plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(1), 30-44. DOI:10.1007/s00344-005-0027-9

- Richter, E. (2006). The effect of CO₂ and temperature on sugar beet. *Defra Final Project Report*, 6, 143-159.
- Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163(5), 1037-1046. DOI:10.1016/S0168-9452(02)00278-9
- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N., & Feller, U. (2008). Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant, Soil and Environment*, 54(12), 529-536. DOI:10.17221/427-PSE
- Xiao-Tang, J., Feng-Chun, C., Chun-Gian, L., Rong-Feng, J., Christie, P., & Fu-Suo, Z. (2008). Yield and nicotine content of flue cured tobacco as affected by soil nitrogen mineralization Pedosphere. *Field Crops Research*, 18(2), 227-235. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(08\)60011-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60011-9)
- Yavarpanah, Z., Alizadeh, M., & Seifi, E. (2015). Effects of foliar and root applications of hydro-alcoholic solutions on physiological and biochemical attributes and fruit yield and weight of strawberry. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 5(1), 47-54. ISSN: 2008-5168
- Yazdi Far, S., Moradi, P., & Yousefi Rad, M. (2015). Effect of foliar application of methanol and chelated zinc on the quantities and qualities yield of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4(12), 170-176. ISSN: 2090-4274
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgharestan. *Journal of Plant Physiology*, 2(21), 187-206. DOI: 10.1023/A:1007201411474
- Zbiec, I., Karczmarczyk, S., & Podsiad, C. (2003). Response of some cultivated plants to methanol as compared to supplemental irrigation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 6, 1-7. <http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/agronomy/art-01.html>

Effect of ethanol and methanol foliar application on biochemical indices of *Digitalis purpurea* L.

Afsoon Rezaie Allolo¹, Mohsen Sanikhani^{1*}, Azizollah Kheiry¹, Maliheh Yaghoobi²

¹ Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Department of Engineering, Faculty of Chemical Engineering, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received: 2023/06/23, Accepted: 2023/11/13)

Abstract

In order to investigate the effect of foliar application of different levels of ethanol and methanol on the biochemical characteristics of *Digitalis purpurea* L., an experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications at the University of Zanjan research greenhouse. The treatments consisted of two levels of ethanol (5 and 10%) and methanol (5 and 10%), along with a control treatment (distilled water). The results showed that the maximum amount of total chlorophyll (1.78 mg/g), total carotenoid (0.10 mg/g), total phenol (15.35 mg/g), total flavonoid (58.2 mg/g) and antioxidant activity (43.76%) were obtained under a 10% methanol treatment. The highest amounts of proline (4.47 mg), soluble sugar (76.20 mg/g), relative water content (76.02%) and leaf nitrogen (1.61%) were observed under a 10% ethanol treatment. The ion leakage index (15.21%) with foliar application of 10% ethanol and catalase enzyme (1.66 mg/g protein) and peroxidase enzyme (0.34 mg/g protein) activity showed a decrease with foliar application of 10% methanol. According to the results, the application of different levels of hydroalcohols improved the biochemical properties of *Digitalis purpurea* L.

Keywords: Antioxidant activity, Catalase, *Digitalis Purpurea* L., Hydroalcohol, Proline

Corresponding author, Email: sani@znu.ac.ir