Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 41, No. 1, Page 1-19 (2025)

DOI:10.22092/ijmapr.2024.364367.3402

Effects of glutamic acid and benzyladenine foliar application on biochemical and growth characteristics of *Digitalis purpurea* L.

Afsoon Rezaie Allolo[1], Azizollah Kheiry [2*], Mohsen Sanikhani[2] and Maliheh Yaghoobi[3]

1-Ph.D. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture, Universit of Zanjan, Iran,
E-mail: kheiry@znu.ac.ir
3- Department of Engineering, Faculty of Chemical Engineering, University of Zanjan, Iran

Received: December 2023 Revised: May 2024 Accepted: September 2024

Abstract

Background and objectives: *Digitalis purpurea* L., the most well-known species of the *Digitalis* genus, is a biennial plant containing cardiac glycosides (0.3 to 0.4%) in its leaves. These glycosides are extracted and used as natural medicines for treating heart diseases, with no chemical substitutes available, making them widely utilized annually. In recent years, using amino acids and growth regulators as alternatives to chemical compounds has gained popularity for enhancing secondary metabolites, improving the quality and quantity of agricultural products, and promoting sustainable agriculture. This study investigates the biochemical and growth responses of *D. purpurea* to foliar applications of glutamic acid and benzyladenine under greenhouse conditions to evaluate their effects on morphophysiological characteristics, yield improvement, and their potential as environmentally friendly alternatives to chemical fertilizers.

Methodology: A completely randomized design with three replications was conducted in the research greenhouse of the University of Zanjan to evaluate the effects of foliar applications of benzyladenine (0.5 and 1 mM) and glutamic acid (1 and 2 mM), along with a control treatment (distilled water). Seeds were initially planted in a seedling tray containing cocopeat and peat moss. At the four-leaf stage, three seedlings were transplanted into plastic pots filled with a culture medium of field soil, cocopeat, and perlite (1:1:3 ratio). Greenhouse conditions were maintained at average day and night temperatures of 25°C and 18°C, respectively, with 80% relative humidity. Seedlings were irrigated weekly with 100 mL of complete Hoagland solution. Foliar spraying with the treatments began after seedling establishment in late June and was repeated four times at 10-day intervals. Leaf samples were collected 10 days after the final application for laboratory analysis. Data were analyzed using SAS software (version 9), and means were compared using Duncan's multiple range test at a 5% probability level.

Results: The application of 1 mM benzyladenine resulted in the highest total chlorophyll content (1.95 mg/g fresh weight), antioxidant activity (36.02%), and peroxidase enzyme activity (1.14 U/mg protein per minute). The maximum total carotenoid content (0.14 mg/g fresh weight), total phenol (12.52 mg gallic acid/g fresh weight), total flavonoid (2.86 mg quercetin/g fresh weight), and nitrogen content (1.46%) were achieved with one mM glutamic acid. Additionally, one mM glutamic acid application led to the highest catalase enzyme activity (4.09 U/mg protein per minute), fresh weight (123.51 g), and dry weight (47.38 g).

Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Conclusion: The findings suggest that applying glutamic acid and benzyladenine at varying levels can significantly enhance the biochemical and growth characteristics of *Digitalis purpurea* L.

Keywords: Antioxidant capacity, carotenoid, catalase, flavonoid, peroxidase.

تأثیر محلول‌پاشی اسید گلوتامیک و بنزیل‌آدنین بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و رشدی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis purpurea* L.)

افسون رضایی علولو[۱]، عزیزاله خیری[۲*]، محسن ثانی خانی[۲] و ملیحه یعقوبی[۳]

۱- دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، گروه باغبانی، دانشگاه زنجان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران، پست‌الکترونیک: kheiry@znu.ac.ir

۲- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه زنجان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: گل انگشتانه ارغوانی (*Digitalis purpurea* L.) شناخته‌شده‌ترین گونه از جنس *Digitalis* و گیاهی دوساله است که برگ‌های آن حاوی ماده مؤثره از نوع گلیکوزیدهای قلبی (۰/۳ تا ۰/۴ درصد) می‌باشد. گلیکوزیدهای استخراج شده از گل انگشتانه به عنوان داروهای طبیعی درمان بیماری‌های قلبی بوده که جایگزین شیمیایی نداشته و سالانه به فراوانی استفاده می‌شوند. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر برای افزایش متابولیت‌های ثانویه، کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی و کاربرد ترکیب‌هایی ازجمله اسیدهای آمینه و نیز تنظیم‌کننده‌های رشد به عنوان جایگزین ترکیب‌های شیمیایی طرفداران زیادی پیدا کرده است، این تحقیق برای بررسی نحوه پاسخ بیوشیمیایی و رشدی گیاه *D. purpurea* به کاربرد خارجی اسید گلوتامیک و بنزیل آدنین در شرایط گلخانه‌ای، بررسی عملکرد این ترکیب‌ها در بهبود خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و افزایش عملکرد *D. purpurea* و نیز کاربرد آنها به جای استفاده از کودهای شیمیایی به لحاظ حفاظت از محیط‌زیست و تقویت کشاورزی پایدار انجام شده است.

مواد و روش‌ها: به منظور ارزیابی اثر کاربرد برگی بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و رشدی گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا شد. دو سطح بنزیل‌آدنین (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و دو سطح اسید گلوتامیک (۱ و ۲ میلی‌مولار) به همراه شاهد (آب مقطر) به عنوان تیمارهای آزمایش به کار برده شدند. بذرها ابتدا در سینی نشا حاوی کوکوپیت و پیت‌ماس کشت گردیدند. سپس در مرحله چهار برگی ۳ عدد نشا به گلدان‌های از جنس پلاستیک منتقل شدند. بستر کشت شامل ترکیبی از خاک مزرعه، کوکوپیت و پرلیت (به نسبت ۱:۱:۳) 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 یکبار با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند کامل تغذیه شدند. بعد از انتقال نشاها به گلدان‌ها و استقرار کامل آنها در اواخر خردادماه، محلول‌پاشی با تیمارهای مذکور شروع شده و چهار مرتبه به صورت ۱۰ روز یکبار انجام شد و ۱۰ روز بعد از آخرین محلول‌پاشی، از برگ‌ها نمونه‌گیری و برای انجام آزمایش به آزمایشگاه منتقل شد. تجزیه داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

نتایج: نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل کل (۱/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، حداکثر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۳۶/۰۲٪) و بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ‌ها (۱/۱۴ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) با کاربرد تیمار یک میلی‌مولار بنزیل‌آدنین حاصل شد. حداکثر میزان کاروتنوئید کل (۰/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، فنل کل (۱۲/۵۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر)، فلاونوئید کل (معادل ۲/۸۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) و نیتروژن کل برگ‌ها (۱/۴۶٪) با کاربرد دو میلی‌مولار اسید گلوتامیک حاصل شد. تیمار یک میلی‌مولار اسید گلوتامیک بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۴/۰۹ یونیت بر

میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)، وزن تر (۱۲۳/۵۱ گرم) و وزن خشک (۴۷/۳۸ گرم) را موجب شد.
نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، کاربرد برگی سطوح مختلف اسید گلوتامیک و بنزیل‌آدنین برای بهبود خصوصیات بیوشیمیایی و رشدی گیاه *D. purpurea* پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کاروتنوئید، کاتالاز، فلاونوئید، پراکسیداز.

مقدمه

گل انگشتانه (*Digitalis* sp.) حدود ۲۰ گونه علفی دوساله، چندساله و درختچه‌ای دارد. این جنس در خانواده گل میمون (Scrophulariaceae) قرار دارد، اما تحقیقات فیلوژنتیک انجام شده، آن را در خانواده بارهنگ (Plantaginaceae) قرار داده است (Olmstead *et al*., 2001). شناخته‌شده‌ترین گونه از این جنس، *D. purpurea* L. گیاهی دوساله است که به دلیل گل‌های سرزنده و رنگ‌های متنوع از بنفش تا صورتی با نقاط رنگی و کاملاً سفید رنگ، اغلب به عنوان یک گیاه زینتی پرورش می‌یابد. گونه‌های ارزشمند دیگر شامل *D. ferruginea*، *D. grandiflora*، *D. lutea* و *D. parviflora* است (Omidbeigi, 2007). برگ‌ها حاوی ماده مؤثره از نوع گلیکوزیدهای قلبی (۰/۳ تا ۰/۴ درصد) است. مهمترین آنها شامل: گلیکوزید آ و ب (A & B Glycosides)، دیجی‌توکسین (Digitoxin)، جیتوکسین (Gitoxin) و جیتالوکسین (Gitaloxin) است. برگ‌ها حاوی مقادیر متفاوت ساپونین به نام‌های دیجیتونین (Digitonin)، جیتونین (Gitonin) و تیجونین (Tigonin) می‌باشند (Omidbeigi, 2007).

استفاده از داروهای با منشأ شیمیایی دارای اثرهای جانبی خفیف تا شدید می‌باشد. گلیکوزیدهای استخراج شده از گل انگشتانه به عنوان داروهای طبیعی درمان بیماری‌های قلبی بوده که جایگزین شیمیایی نداشته و سالانه به فراوانی استفاده می‌شوند. داروهای تهیه شده از گل انگشتانه در درمان بیماری‌های قلبی ازجمله ریتم نامنظم ضربان قلب تجویز می‌شوند. به علاوه اثرهای ضد دیابتی، ترمیم زخم، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن به اثبات رسیده است (Nisar *et al*., 2018؛ Verma *et al*., 2018).

تنظیم‌کننده‌های رشد، دامنه وسیعی از فرایندهای رشد و نموی گیاهان را تنظیم می‌کنند. مقادیر کم برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد روی گیاه اثرهای زیادی در رشد و نمو و عملکرد گیاه دارد. همچنین این مواد در بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاه مانند گل‌دهی، ریشه‌زایی و سایر فرایندها دخالت دارند. سایتوکینین، هورمون گیاهی مهمی است که مراحل مختلف رشد و توسعه گیاهان مانند تمایز و تقسیم سلولی، افزایش سطح برگ و تحرک بخش مواد غذایی را بر عهده دارد (Abdel-Aziz *et al*., 2009). سایتوکینین‌ها همچنین از تخریب کلروفیل جلوگیری کرده، جذب اسیدهای آمینه و نگه‌داری پروتئین‌ها را در گیاه تقویت کرده و با تحریک تقسیم سلولی در گیاهان باعث جلوگیری از پیری می‌شوند، ماده بنزیل‌آدنین که نوعی سایتوکینین می‌باشد از طریق افزایش تقسیم سلولی و یا انتقال مواد غذایی به محل تیمار شده باعث رشد گیاه می‌گردد (Aremu *et al*., 2020). در پژوهشی که بر روی گیاه صبر زرد (*Aloe vera* L.) انجام شد، نتایج نشان داد که کاربرد بنزیل‌آدنین تأثیر به‌سزایی در بهبود صفات رشدی این گیاه دارد (Hazrati Yadekori & Tahmasebi Sarvestani, 2012). کاربرد بنزیل‌آدنین در گیاه کروتون (*Syngonium podophyllum* L.) به‌طور معنی‌داری موجب افزایش تعداد شاخه، تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ گردید (Abdel-Aziz *et al*., 2007). تأثیر بنزیل‌آدنین در افزایش رشد رویشی و بهبود خصوصیات بیوشیمیایی در گیاه شمعدانی (*Pelargonium hortorum* L.) و مریم‌گلی آتشین (*Salvia splendens* Sello) توسط پژوهشگران گزارش شده است (Lukaszewska *et al*., 2008).

در سال‌های اخیر برای افزایش متابولیت‌های ثانویه،

کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی، با کاربرد ترکیب‌های طبیعی یا ارگانیک ازجمله اسیدهای آمینه به عنوان جایگزین ترکیب‌های شیمیایی طرفداران زیادی پیدا کرده است (Jahani *et al*., 2016). اسیدهای آمینه یکی از شکل‌های آلی نیتروژن می‌باشد که به وسیله تولیدکنندگان، در دهه‌های اخیر در تغذیه گیاهان استفاده شده‌اند. مزایای استفاده از اسیدهای آمینه به محتوای نیتروژن آلی و تعامل مثبت آن با برخی از مواد مغذی قابل دسترس بستگی دارد (Garcia *et al*., 2011). اسید گلوتامیک می‌تواند به عنوان عامل اسموتیک سیتوپلاسم در سلول‌های محافظ روزنه بر باز و بسته شدن روزنه‌ها تأثیرگذار باشد. مطالعات نشان داده‌اند که اسیدهای آمینه به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر فعالیت‌های فیزیولوژیک و رشد و نمو گیاه مؤثر هستند (Faten *et al*., 2010). کاربرد برگی غلظت‌های مختلف اسید آمینه‌های اورنیتین، پرولین و فنیل‌آلانین در گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) تأثیر معنی‌داری بر افزایش ارتفاع گیاه، تعداد ساقه، وزن تر و خشک گیاه و تعداد گل در هر بوته داشته است (Karima *et al*., 2005). تیمار گیاه کروتون (*Codiaeum variegatum* L.) با اسید گلوتامیک (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) پارامترهای رشدی و محتوای کل کربوهیدرات‌ها، نیتروژن، فسفر و پتاسم را افزایش داده است (Azza *et al*., 2011). تیمار گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) با اسید آسپارتیک و فنیل‌آلانین در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش ارتفاع، وزن بذر، تعداد شاخه‌ها و گل‌ها شده و بیشترین درصد اسانس در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل گردید (Hendawy & Ezz- Din., 2010). تیمار گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) با اسید آمینه گلایسین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری وزن خشک اندام‌های رویشی، تعداد چترها، عملکرد بذر و درصد اسانس را افزایش داده است (Hassan & Ali., 2010).

هدف از این پژوهش، بررسی نحوه پاسخ بیوشیمیایی و رشدی گیاه *D. purpurea* به کاربرد خارجی اسید گلوتامیک و بنزیل آدنین در شرایط گلخانه‌ای، بررسی عملکرد این ترکیب‌ها در بهبود خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و افزایش عملکرد *D. purpurea* و نیز کاربرد آنها به جای استفاده از کودهای شیمیایی به لحاظ حفاظت از محیط‌زیست و تقویت کشاورزی پایدار است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در فصل‌های پاییز و زمستان سال ۱۳۹۹ به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در سه تکرار و برای هر واحد آزمایشی سه عدد گلدان با دو بوته در هر گلدان به همراه تیمار شاهد در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان، اجرا شد. برای ارزیابی خصوصیات مهم فیزیکی و شیمیایی خاک، نمونه‌برداری انجام شد و برای تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه منتقل که نتایج آزمایش خاک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Some physicochemical characteristics of experimental soil

pH	EC ($dS.m^{-1}$)	Nitrogen (%)	Calcium ($g.kg^{-1}$)	Sodium ($g.kg^{-1}$)	Potassium ($g.kg^{-1}$)	Organic matter (%)	Soil texture	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
7.4	1.49	0.07	0.12	0.13	0.20	0.94	Clay-loamy	25	38	37

تیمارهای آزمایش شامل دو سطح بنزیل‌آدنین (نیم و یک میلی‌مولار) و دو سطح اسید گلوتامیک (یک و دو میلی‌مولار) به همراه تیمار شاهد (آب مقطر) بودند. بذرهای گل انگشتانه ارغوانی (تهیه شده از شرکت پاکان بذر) قبل از

کشت با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و بعد چندین مرحله با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرها ابتدا در سینی نشا حاوی کوکوپیت و پیت‌ماس در اوایل آبان‌ماه سال ۹۹ کشت گردیدند. سپس در اوایل بهمن‌ماه و در مرحله چهار برگی نشاها، سه عدد نشا به گلدان‌هایی از جنس پلاستیک به قطر دهانه ۲۵ و ارتفاع ۳۲ سانتی‌متر منتقل شدند. بستر کشت شامل ترکیبی از خاک مزرعه، کوکوپیت 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 درصد تنظیم شد. در طول آزمایش، گیاهچه‌ها هفته‌ای یکبار با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند کامل تغذیه شدند (Hoagland & Arnon, 1950). به‌غیر از محلول‌دهی هر سه روز یکبار گیاهچه‌ها با آب لوله کشی 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 گردید. بعد از انتقال نشاها به گلدان‌ها و استقرار کامل آنها در اواخر خردادماه، محلول‌پاشی با تیمارهای مذکور شروع شده و چهار مرتبه به صورت ۱۰ روز یکبار انجام گردید و ۱۰ روز بعد از آخرین محلول‌پاشی، از برگ‌ها نمونه‌گیری و برای انجام آزمایش به آزمایشگاه منتقل شد.

صفات مورد اندازه‌گیری

برای اندازه‌گیری کلروفیل کل و کاروتنوئید از روش (Arnon, 1967) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاه وزن شد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده شد و پس از سانتریفوژ کردن با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵، ۵۱۰ و ۴۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل SAFAS MONACO (RS 232) خوانده شد، در نهایت میزان کلروفیل و کاروتنوئید کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه، به دست آمد.

استخراج عصاره فنلی

برای تعیین میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها از عصاره متانولی استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی در هاون چینی ساییده شده و عصاره حاصل با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس محلول رویی عصاره جدا شده و برای اندازه‌گیری فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید.

میزان فنل کل براساس روش فولین سیوکالتیو با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد به روش Meda و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره صاف شده ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو ۵۰ درصد، پس از پنج دقیقه دو میلی‌لیتر کربنات سدیم دو درصد و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شدند. میزان جذب در طول موج ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری SAFAS MONACO (RS 232) قرائت شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در رابطه مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید، مقدار فنل کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد. در نهایت، داده‌ها براساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر گیاه محاسبه شد.

میزان فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد به روش Chang و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره صاف شده ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در تاریکی نگه‌داری شد. میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر SAFAS MONACO (RS 232) قرائت شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در رابطه مربوط به منحنی استاندارد کوئرستین، مقدار فلاونوئید کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد و محتوای فلاونوئید برحسب میلی‌گرم

کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها با استفاده از روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) اندازه‌گیری شد. این آزمون براساس واکنش رادیکال‌های آزاد پایدار DPPH با ترکیب‌های دهنده هیدروژن مانند فنل‌ها استوار می‌باشد. ابتدا محلول ۰/۱ میلی‌مولار از DPPH تهیه شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر از DPPH به لوله آزمایش ریخته شده و جذب آن پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از رابطه $I(\%)=[(A_0-A_s)/A_0]\times100$ محاسبه گردید که A_0 جذب شاهد (حاوی همه اجزای واکنش‌گر بدون نمونه) و As جذب نمونه بود (Brand-Williams *et al*., 1995).

استخراج عصاره آنزیمی

ابتدا یک گرم از بافت تازه برگ‌ها با ازت مایع پودر شده و با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج سدیم پتاسیم فسفات (NaKPi) با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار و pH=7 (حاوی Na_2HPO_4=7.09gr، KH_2PO_4=4.35gr، $Na_2S_2O_5$= 0.475gr، Na_2EDTA=0.465gr و PVPP=0.25gr برای تهیه ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر استخراج) درون هاون ساییده شد. سپس عصاره حاصل به داخل میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری انتقال داده شده و میکروتیوب‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در دقیقه با دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل PIT320R) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و محلول رویی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) استفاده شد.

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز (POD)

سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با هفت میکرولیتر پراکسیداز هیدروژن و شش میکرولیتر گایاکول مخلوط و دستگاه اسپکتوفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. دستگاه اسپکتوفتومتر روی طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت سه دقیقه با فاصله زمانی ۲۰ ثانیه تنظیم گردید. سپس ۱۵ میکرولیتر عصاره به مخلوط اضافه و بلافاصله تغییرات جذب نور خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به صورت تغییرات جذب براساس یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد (Dhindsa *et al*., 1981).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با ۱۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن مخلوط و دستگاه اسپکتوفتومتری با این مخلوط صفر گردید. دستگاه اسپکتوفتومتری روی طول موج ۲۴۰ نانومتر و مدت زمان یک دقیقه و با فاصله زمانی پنج ثانیه تنظیم شد. سپس ۲۰ میکرولیتر عصاره به مخلوط اضافه شد و بلافاصله تغییرات جذب نور آن با فاصله زمانی ۵ ثانیه و به‌مدت یک دقیقه خوانده شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر و برحسب میکرومول پراکسید هیدروژن بر تغییرات جذب براساس یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (Dhindsa *et al*., 1981).

تعیین میزان نیتروژن با استفاده از دستگاه کجلدال

برای اندازه‌گیری نیتروژن از روش (Emami, 1996) استفاده شد. این آزمایش در چهار مرحله آماده کردن نمونه، هضم نمونه، تقطیر و مرحله تیتر کردن انجام شد. در مرحله اول مقدار ۰/۵ گرم از هر نمونه وزن و در داخل کاغذ مخصوص پیچیده و بعد به درون ارلن منتقل گردید. در مرحله هضم میزان هشت میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۶ درصد) و سه گرم کاتالیزور سلنیوم‌سولفات (۹۶۰ گرم سولفات پتاسیم، ۱۰ گرم دی‌اکسیدسلنیوم، ۴۰ گرم سولفات مس) به نمونه‌ها اضافه شد و زمان دستگاه روی ۱۵۰ دقیقه و درجه حرارت دستگاه روی ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. 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 تیتراسیون با اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال آرام و قطره قطره انجام شد.

اضافه کردن اسید کلریدریک به محلول تا جایی ادامه پیدا کرد که رنگ محلول ثابت شد و نمونه به رنگ بنفش درآمد. در نهایت میزان نیتروژن با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

درصد نیتروژن = ((۰/۰۰۱۴*V) /P) *۱۰۰

P= وزن نمونه برحسب گرم

V= حجم اسید کلریدریک مصرفی در مرحله تیتراسیون برحسب میلی‌لیتر

وزن تر و خشک

برای ثبت وزن خشک اندام هوایی، پس از اندازه‌گیری وزن تر، نمونه‌ها درون پاکت‌های کاغذی و در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد، سپس به کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم، وزن خشک اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن تجزیه‌وتحلیل گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر کاربرد برگی سطوح مختلف تیمارهای بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر خصوصیات بیوشیمیایی و رشدی *D. purpurea* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر برخی صفات گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Table 2. ANOVA of benzyladenine and glutamic acid effects on some *Digitalis purpurea* characteristics

S.O.V.	d.f.	M.S.									
		Nitrogen	Leaf dry weight	Leaf fresh weight	DPPH	Peroxidase	Catalase	Flavonoids	Phenols	Carotenoids	Total chlorophyll
Treatment	4	0.0497**	167.2281**	162.0205**	46.2884**	0.0660**	1.9824**	0.5984**	12.8995**	0.0036**	0.1313**
Experimental error	10	0.0001	0.0932	0.1336	0.1845	0.0003	0.0173	0.0004	0.0243	0.0002	0.0017
C.V. (%)		0.99	0.73	0. 30	1.40	1.73	4.41	0.83	1.53	4.74	2.46

n.s. and **: non-significant and significant at 1% probability level, respectively.

کلروفیل کل

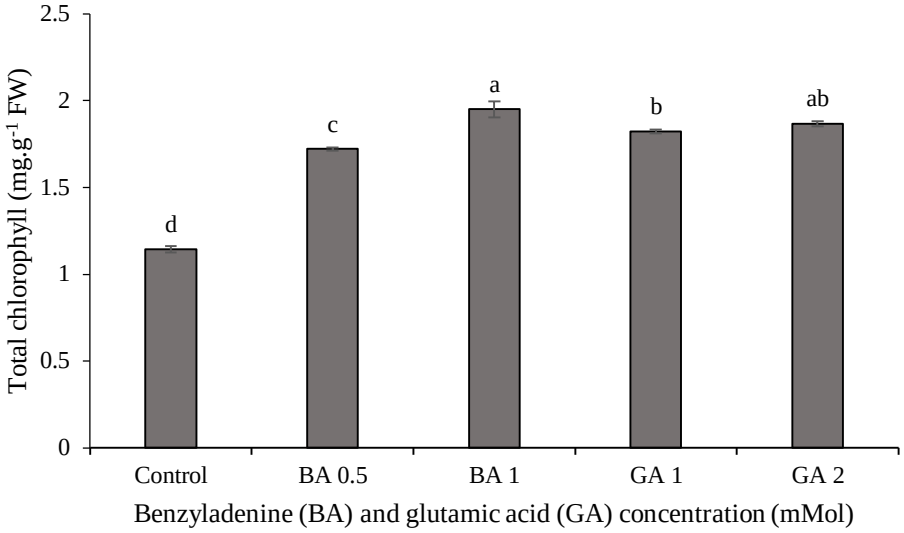
کاربرد برگی سطوح مختلف تیمارها موجب افزایش میزان کلروفیل کل نسبت به تیمار شاهد شد، به‌طوری‌که بیشترین میزان کلروفیل کل (۱/۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) با مصرف یک میلی‌مولار بنزیل‌آدنین مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد (۱/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۱).

کاروتنوئید کل

طبق نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، با کاربرد برگی بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک میزان کاروتنوئید کل نسبت به تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) افزایش معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد. به‌طوری‌که حداکثر میزان رنگیزه‌های کاروتنوئید کل (۰/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار دو میلی‌مولار اسید گلوتامیک مشاهده شد (شکل ۲).

فنل کل

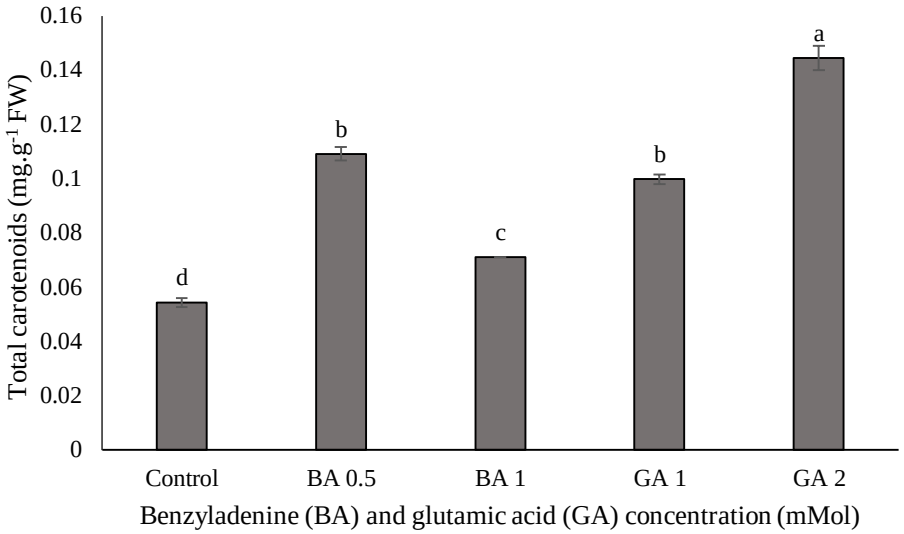
براساس نتایج به دست آمده میزان فنل کل برگ‌ها با کاربرد برگی بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. بیشترین مقدار فنل کل (۱۲/۵۲ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم وزن تر) در تیمار دو میلی‌مولار اسید گلوتامیک مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد (۸/۰۶ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم وزن تر) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۳).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان کلروفیل کل گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 1. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* total chlorophyll *content*

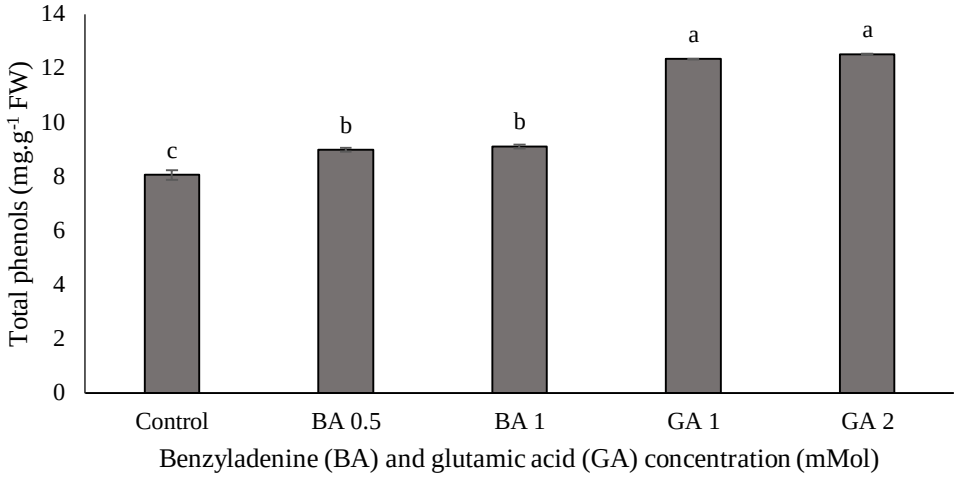
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان کاروتنوئید کل گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 2. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* total carotenoids *content*

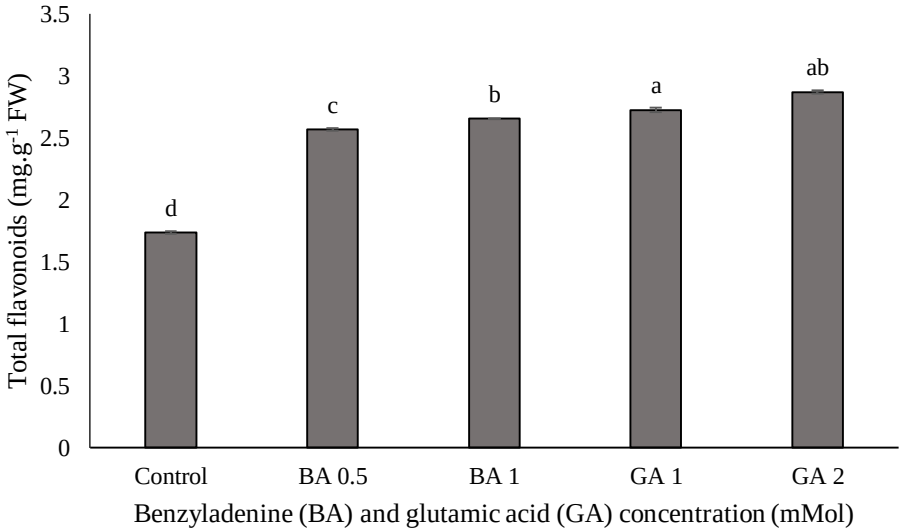
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان فنول کل گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 3. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* total phenols *content*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان فلاونوئید کل گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 4. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* total flavonoids *content*

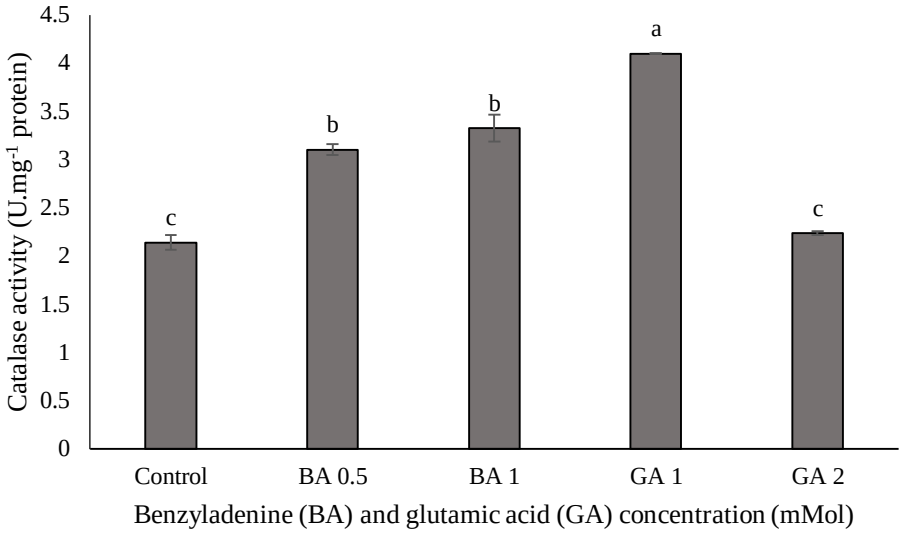
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

فلاونوئید کل

براساس نتایج به دست آمده میزان فلاونوئید کل برگ‌ها با کاربرد برگی بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد و بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۲/۸۶ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن تر) در تیمار دو میلی‌مولار اسید گلوتامیک مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد (۱/۷۳۶ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن تر) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۴).

آنزیم کاتالاز

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها با کاربرد برگی تیمارها میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) افزایش یافت. به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن (۴/۰۹ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در تیمار یک میلی‌مولار اسید گلوتامیک مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد (۲/۱۴ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) افزایش معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 5. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea catalase activity*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

آنزیم پراکسیداز

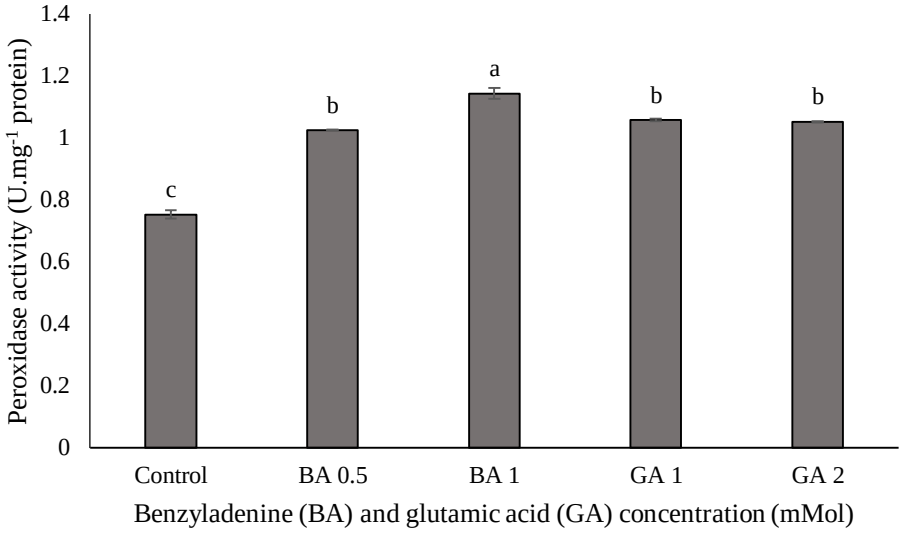
نتایج نشان داد که کاربرد برگی تیمارها میزان فعالیت آنزیم (POD) را نسبت به گیاهان تیمار نشده (شاهد) افزایش داد. حداقل مقدار (۰/۷۵ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) فعالیت آنزیم POD در تیمار شاهد و حداکثر مقدار آن (۱/۱۴ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) در تیمار یک میلی‌مولار بنزیل‌آدنین به دست آمد (شکل ۶).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های *D. purpurea* در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد و حداکثر مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها (۳۶/۰۲ درصد) در تیمار یک میلی‌مولار بنزیل‌آدنین مشاهده شد (شکل ۷).

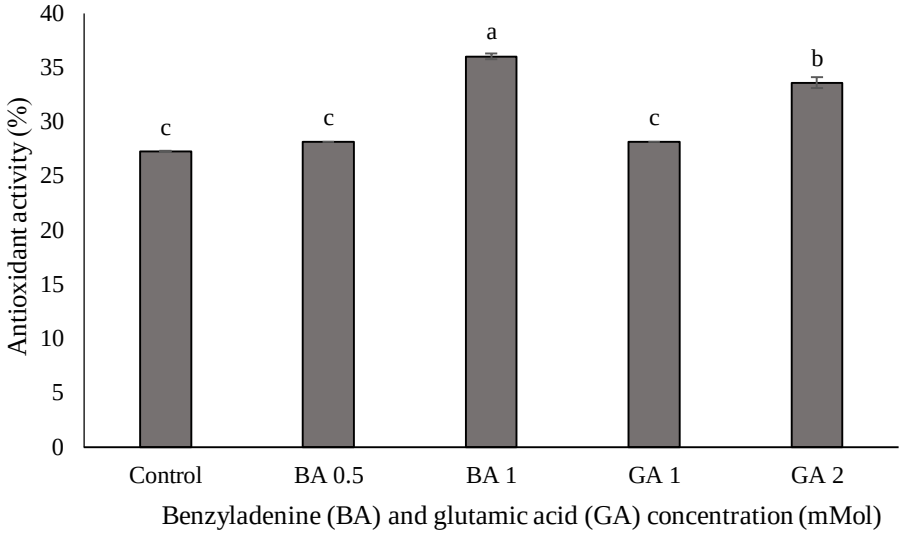
وزن تر

در این پژوهش کاربرد برگی تیمارهای مذکور باعث افزایش معنی‌داری در میزان وزن تر برگ‌ها شد. بیشترین مقدار وزن تر برگ (۱۲۳/۵۱ گرم) در تیمار یک میلی‌مولار اسید گلوتامیک به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد (۱۰۵/۶۰ گرم) در سطح احتمال ۱ درصد افزایش نشان داد (شکل ۸).



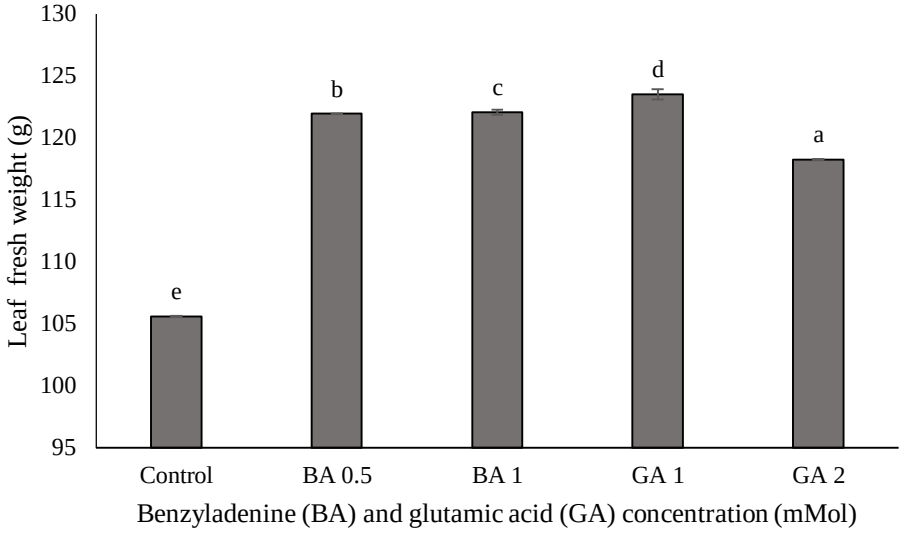
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 6. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea peroxidase activity*
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (**DPPH**) گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 7. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* antioxidant activity *(DPPH)*
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



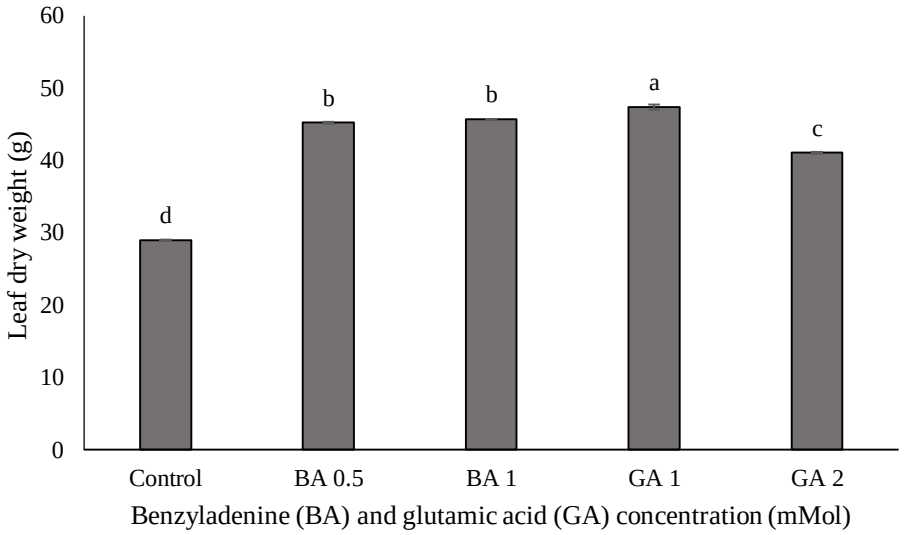
شکل ۸- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر وزن تر برگ گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 8. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* leaf fresh weight

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

وزن خشک

نتایج حاصل از کاربرد برگی تیمارها نشان داد که محلول‌پاشی گیاهی موجب افزایش وزن خشک برگ‌های *D. purpurea* شد. حداکثر مقدار وزن خشک برگ‌ها (۴۷/۳۶ گرم) در تیمار یک میلی‌مولار اسید گلوتامیک و کمترین مقدار آن (۲۸/۹۸ گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۹).



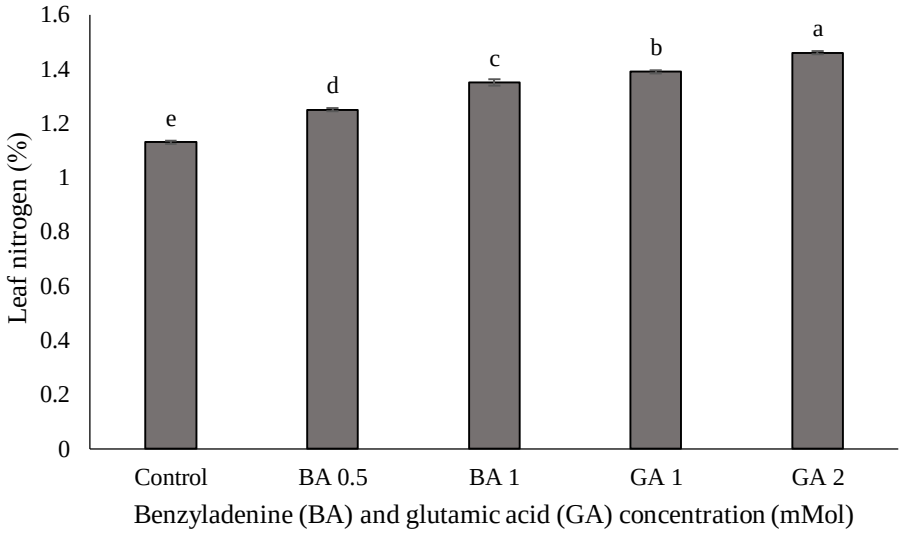
شکل ۹- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر وزن خشک برگ گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 9. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* leaf dry weight

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

نیتروژن برگ

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، نیتروژن برگ‌ها با کاربرد تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. به‌طوری‌که میزان نیتروژن برگ‌ها از ۱/۱۳ درصد تیمار شاهد به ۱/۴۶ درصد با تیمار دو میلی‌مولار اسید گلوتامیک رسید (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر بنزیل‌آدنین و اسید گلوتامیک بر میزان نیتروژن برگ گل انگشتانه ارغوانی (***Digitalis purpurea***)

Figure 10. Means comparison of benzyladenine and glutamic acid effects on *Digitalis purpurea* leaf nitrogen content

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بحث

طبق نتایج حاصل، کاربرد برگی سطوح مختلف بنزیل آدنین (BA) و اسید گلوتامیک باعث افزایش محتوای رنگیزه کلروفیل کل گردید. به نظر می‌رسد افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی توسط BA به دلیل تأثیر مستقیم آن بر واکنش‌های فتوسنتزی یا افزایش اندازه و تعداد کلروپلاست در برگ‌ها در نتیجه تقسیم سلولی باشد (Abou Rayya *et al*., 2015). سیتوکینین‌ها تقسیم سلولی، طویل شدن سلولی، رشد بافت‌های سلولی، شروع و رشد اندام‌های هوایی را تحریک کرده و فرایندهای پیری را در بسیاری از بافت‌های گیاهی به تأخیر می‌اندازند. همچنین سنتز کلروفیل را افزایش می‌دهند و جذب مواد مغذی را تقویت می‌کنند (Taiz & Zeiger, 2006). محلول‌پاشی BA ممکن است تشکیل زودتر سیتوکینین را تحریک کند، بنابراین از پیری زودرس برگ جلوگیری می‌کند و منجر به افزایش سطح برگ با رنگدانه‌های فتوسنتزی بالاتر می‌شود (Hanaa *et al*., 2008). در یک مطالعه‌ای Abshahi و همکاران (۲۰۱۴) به این نتیجه رسیدند که اسپری BA در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث بهبود محتوای کلروفیل در گل استرلیتزیا (*Strelitzia* spp.) می‌شود (Abshahi *et al*., 2014) که با نتایج به دست آمده در این تحقیق همسو می‌باشد. افزایش مشاهده شده در میزان کلروفیل کل با کاربرد برگی اسید گلوتامیک را می‌توان به نقش اسیدآمینه‌ها به عنوان منبع تأمین نیتروژن که یکی از اجزای مهم برای ساخت کلروفیل می‌باشد و نیز سنتز اکسین، انتقال و ذخیره نیتروژن نسبت داد (Farouk *et al*., 2012).

البته افزایش میزان کلروفیل کل تحت محلول‌پاشی اسید گلوتامیک در گیاه شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita* L.) توسط (Ashrafi, 2013) گزارش شده است.

محلول‌پاشی برگی BA و اسید گلوتامیک در این بررسی موجب افزایش میزان رنگدانه‌های کاروتنوئیدی نسبت به تیمار شاهد (بدون محلول‌پاشی) شد. در گیاهان عواملی مانند تولید اتیلن، منجر به افزایش فعالیت آنزیم LOX و پراکسیداسیون لیپید، موجب تخریب کاروتنوئیدها می‌شود، همچنین رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در طی واکنش آنزیم LOX با اسیدهای چرب نیز منجر به اکسیداسیون کاروتنوئیدها می‌شود، در حالی که سیتوکینین‌ها، سنتز کاروتنوئیدها را افزایش می‌دهند و در برابر نور و اکسیژن آنها را محافظت می‌کنند (Faten *et al*., 2010). کاربرد سیتوکینین‌ها در تحقیقی که بر روی شاه اسپرم انجام گردید موجب افزایش میزان کاروتنوئید نسبت به تیمار شاهد شد (Ashrafi, 2013) که با نتایج این بررسی همسو بود. نیتروژن عنصر مهم ساختار اصلی تمامی آمینواسیدها در پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌باشد که به عنوان ترکیب‌های ساختاری کلروپلاست فعالیت می‌کنند که در نهایت باعث افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه می‌گردد (Faten *et al*., 2010). طبق گزارشی کاربرد اسیدهای آمینه، سنتز کاروتنوئیدها را فعال می‌کند تا از اکسیداسیون کلروفیل جلوگیری کرده و محتوای کلروفیل را افزایش دهد (Farouk *et al*., 2012). کاربرد اسیدآمینه‌ها در گیاه گلایول (*Gladiolus grandiflorus*) به‌طور معنی‌داری میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی را افزایش داد (Khattab *et al*., 2016).

ترکیب‌های فنلی یکی از بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه هستند که به وسیله گیاهان تولید می‌شوند، این ترکیب‌ها عمدتاً از سینامیک اسید سنتز می‌شوند که به وسیله آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) از فنیل پروپانوئید به دست می‌آید. مطالعات نشان می‌دهد که PAL آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانوئیدها بوده و کاربرد برگی اسیدهای آمینه سبب القای فعالیت PAL می‌شود. مسیر فنیل پروپانوئیدی به وسیله آنزیم PAL کاتالیز شده و سبب تولید ترکیب‌های فنلی زیادی می‌شود که این ترکیب‌ها نقش دفاعی در گیاهان را برعهده دارند (Michalak., 2006).

ترکیب‌های فنلی از اجزاء سیستم دفاعی غیرآنزیمی و آنتی‌اکسیدانی سلول‌های گیاهی هستند که مهار اکسیداسیون لیپیدها، تجزیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیدها را به عهده دارند. از آنجایی که هیدرات‌های کربن اسکلت مورد نیاز برای ساخت ترکیب‌های فنلی می‌باشند، ازاین‌رو افزایش در مقدار آنها به عنوان افزایش سوبسترا برای ساخت ترکیب‌های فنلی عمل کرده و موجب افزایش این ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Nguyen *et al*., 2010). ترکیب‌های فعالی ازجمله اسیدآمینه‌ها، اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها از طریق افزایش هیدرات‌های کربن گیاه موجب افزایش ساخت ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌شوند (Natesan *et al*., 2007). در این مطالعه ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی برگ‌های *D. purpurea* تحت تیمارهای BA و اسید گلوتامیک به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان دادند که با نتایج گزارش شده توسط García-Ramirez و همکاران (۲۰۱۴) بر روی گیاه خیزران (*Bambusa vulgaris*)، مطابقت داشت که تأثیر BA، به‌ویژه در غلظت‌های پایین‌تر، بر تولید ترکیب‌های فنلی مثبت بود (García-Ramirez *et al*., 2014). همچنین گزارش شده است که فنل‌ها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در برگ زیتون با افزایش غلظت BA از ۴۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Abou Rayya *et al*., 2015).

آنتی‌اکسیدان‌ها از ترکیب‌های ثانویه در گیاهان محسوب می‌شوند که می‌توانند شامل ترکیب‌های فنلی (فلاونوئیدها، فنولیک اسید، توکوفرول و ...)، ترکیب‌های نیتروژن‌دار (اسیدآمینه‌ها، آلکالوئیدها، آمین‌ها و ...)، کاروتنوئیدها و اسیدآسکوربیک باشند. ترکیب‌های نیتروژن‌دار به عنوان یک عنصر کلیدی در ساخت بسیاری از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی مانند رنگیزه‌ها، آلکالوئیدها، آمین‌ها و غیره شرکت دارند (Gorni & Pacheco., 2016) و از آنجایی که اسیدآمینه‌ها فرم ارگانیک نیتروژن هستند کاربرد برگی آنها در گیاهان موجب بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد

(Amini Fard *et al*., 2017). در بررسی که روی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) انجام شد نتایج نشان داد که محلول‌پاشی اسیدآمینه‌ها بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه اثرهای مثبتی را نشان داد (Fallahi *et al*., 2018). همچنین کاربرد غلظت‌های مختلف اسیدآمینه روی گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera* L.) موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها گردید (Oraghi Ardebili *et al*., 2012) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. طبق پژوهشی که روی گیاه بومادران (*Achillea millefolium* L.) انجام شده است، کاربرد BA موجب افزایش تولید گروه‌های مختلف متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌اکسیدان‌ها شده است (Gorni & Pacheco., 2016) که با نتایج این پژوهش همسو است. همچنین نتایج پژوهش Ramtin و همکاران (۲۰۱۶) بر روی گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) نشان داد که کاربرد BA در غلظت‌های مختلف باعث افزایش برخی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی گردید.

اسیدهای آمینه نقش مهمی در سنتز ترکیب‌های آلی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، پورین‌ها، آمین‌ها، آلکالوئیدها و ویتامین‌ها دارند (Tajik & Danaee, 2016). کاربرد برگی اسیدهای آمینه در گیاه آلوئه‌ورا موجب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم PAL شد (Oraghi Ardebili *et al*., 2012)، به‌طوری‌که در این تحقیق نیز کاربرد اسید گلوتامیک موجب افزایش فعالیت آنزیمی در برگ‌های *D. purpurea* گردید.

طبق گزارشی محلول‌پاشی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر BA می‌تواند به‌طور مؤثر فرایند پیری برگ را از طریق ترویج فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی بهبود ببخشد (Wang *et al*., 2015).

کاربرد برگی BA در این بررسی باعث افزایش وزن تر و خشک برگ‌ها گردید. اثرهای تقویتی سیتوکینین‌ها مانند BA بر رشد گیاه ممکن است به دلیل اثرهای تحریکی آنها بر تقسیم سلولی، طویل شدن سلول، شروع و رشد ساقه، تجمع مواد مغذی، تأخیر در فرایند پیری و غلبه بر چیرگی راسی در گیاهان باشد (Taiz & Zeiger, 2006 ؛Duck *et al*., 2004). از سوی دیگر، BA یکی از سیتوکینین‌هایی است که عملکرد بسیاری از گیاهان را از نظر کمی و کیفی بهبود می‌بخشد (Reda *et al*., 2007). نتایج تحقیقی نشان داد که کاربرد خارجی BA بر روی گیاهان لوپن (*Lupinus termis* L.) به‌طور قابل توجهی بر رشد رویشی و ترکیب‌های بیوشیمیایی (درصد روغن، فنل کل، نیتروژن کل) تأثیر مثبت داشت (Hasnaa *et al*., 2011). به‌طور مشابه، Hussein (۲۰۰۵) در مورد گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) اعلام کرد که محلول‌پاشی با BA به‌طور قابل توجهی باعث افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و خشک گیاهان شد. به‌طورکلی افزایش رشد توسط BA با افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و بازده فتوسنتزی خالص تحریک می‌شود. از آنجا که رشد گیاهانی که به‌صورت توده خشک بیان می‌شوند تا حد زیادی به سنتز اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و قندها بستگی دارد، بنابراین بهبود توانایی فتوسنتز متعاقباً می‌تواند سنتز کربوهیدرات را افزایش دهد (Hussein, 2005).

در این تحقیق نتایج نشان داد که کاربرد برگی اسید گلوتامیک باعث افزایش وزن تر و خشک برگ‌ها نسبت به تیمار شاهد شد. این اثر افزایشی را می‌توان به اثر تحریک‌کنندگی آن بر رشد سلول‌های گیاه و فراهم شدن منبع کربن و انرژی لازم برای تولید کربوهیدرات در گیاه نسبت داد. اسید گلوتامیک می‌تواند به اسیدآمینه‌ها که پیش‌ساز یا فعال‌کننده فیتوهورمون‌ها و مواد رشدی هستند تبدیل شود. تمامی اسیدآمینه‌ها ممکن است نقش مهمی در متابولیسم گیاهی و تجمع پروتئین داشته باشند و باعث افزایش وزن تر و خشک گیاه شوند (Shehata *et al*., 2011). افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه کروتون (*Codiaeum variegatum* L.) با محلول‌پاشی اسید گلوتامیک گزارش شده است (Azza *et al*., 2011). همچنین محلول‌پاشی اسید گلوتامیک در گیاه شاه‌اسپرم باعث افزایش صفات رشدی ازجمله وزن تر و خشک بوته‌ها گردید (Ashrafi, 2013). ولی با افزایش غلظت اسیدگلوتامیک به دو میلی‌مولار میزان وزن تر و خشک برگ‌ها روند کاهشی نشان داد، چنین تأثیری در مورد کاربرد اسیدآمینه تریپتوفان نیز گزارش شده

است، به‌طوری‌که کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اسیدآمینه تریپتوفان موجب ایجاد تنش‌هایی در گیاه شده که احتمالاً مربوط به زیادی اکسین و تأثیرات بازدارندگی آن در مرحله رویشی است؛ نتیجه این اختلال می‌تواند افزایش جذب عناصر و هدررفت کربن به شکل دی‌اکسیدکربن و کاهش ماده خشک باشد (Paciorek *et al*., 2005).

در مورد افزایش نیتروژن برگ‌ها با محلول‌پاشی BA این احتمال وجود دارد که سیتوکینین‌ها و اکسین در تنظیم پروتئین‌های غشایی که در جذب عناصر نقش دارند تغییراتی را ایجاد نمایند (Lopez *et al*., 2005). سیتوکینین‌ها با تحریک فعالیت آمینوژنی گلوتامات دهیدروژناز وابسته به NADH (NADH-GDH)، جذب نیتروژن را افزایش می‌دهند که در نهایت منجر به افزایش نیتروژن، سطح پروتئین و ترشح آن و تجمع پلی‌پپتیدها می‌شود (Piotrowska & Czerpak, 2009).

اسیدهای آمینه موادی هستند که باعث تحریک سوخت‌وساز (متابولیسم) و فرایندهای متابولیکی در جهت افزایش کارایی گیاهان می‌شوند (Faten *et al*., 2010). از آنجایی که اسیدهای آمینه به عنوان منبع تأمین نیتروژن در گیاه عمل می‌کنند، در نتیجه افزایش میزان نیتروژن برگ‌ها و نیز افزایش رشد و عملکرد گیاه با محلول‌پاشی اسیدهای آمینه قابل انتظار است (Ghazi Manas *et al*., 2013). کاربرد اسیدهای آمینه در کلم چینی (*Brassica rapa* sp.) و کاهو (*Lactuca sativa*) باعث افزایش نیتروژن کل گیاه شد (Chen & Gao, 2002) که کاربرد اسید گلوتامیک در گیاه *D. purpurea* نیز تأثیر مثبت بر میزان نیتروژن کل برگ‌ها داشت که با تحقیقات انجام شده پیشین، همسو می‌باشد.

به‌طورکلی با توجه به بهبود خصوصیات بیوشیمیایی و رشدی گیاه دارویی *D. purpurea* با کاربرد برگی سطوح مختلف اسیدگلوتامیک و BA، به نظر می‌رسد استفاده از اسید آمینه‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند از نظر افزایش عملکرد شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه مفید واقع شود و کاربرد این ترکیب‌ها به جای استفاده از کودهای شیمیایی به لحاظ حفاظت از محیط‌زیست و تقویت کشاورزی پایدار، سودمند باشد.

References

- Abdel-Aziz, N.G., Taha Lobna, S. and Ibrahim Soad, M.M., 2009. Some studies on the effect of putrescine, ascorbic acid and thiamine on growth, flowering and some chemical constituents of Gladiolus plants at Nubaria. Ozean Journal of Applied Sciences, 2(2): 169-179.
- Abdel-Aziz, N., El-Quesni F.E.M. and Farahat, M.M., 2007. Response of vegetative growth and some chemical constituents of *Syngonium podophyllum* L. to foliar application of thiamine, ascorbic acid and kinetin at Nubaria. World Journal of Agricultural Science, 3(3): 301-305.
- Abou Rayya, S.M., Thanaa, SH.M. and Nabila, E.K., 2015. Photosynthetic pigments and fruit quality of Manzanillo olive as affected by 6-benzyl adenine and studying the chemical constituents in leaves using Fourier transform infrared spectroscopy technique. International Journal of ChemTech Research, 8(6): 514-522.
- Abshahi, M., Zarei, H., Ghasemnezhad, A. and Aghdasi, M., 2014. Changes in chlorophyll contents, external quality characters, dry weight, and vase life of strelitzia (*Strelitzia* spp.) leaves affected by different preservative solutions. Journal of Plant Physiology and Breeding, 4(2): 1-8.
- Amini Fard, M., Gholami, M., Bayat, H. and Moradi Nejad., 2017. Investigating the effect of fulvic acid and amino acid fertilizers on phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity and photosynthetic pigments of the medicinal plant (*Coriandrum sativum* L.). Ecophytochemistry Quarterly of Medicinal Plants, 25(7): 25-39.
- Aremu, A.O., Fawole, O.A., Makunga, N.P., Masondo, N.A., Moyo, M., Buthelezi, N.M.D., Amoo, S.O., Spichal, L. and Dolezal, k., 2020. Applications of cytokinins in horticultural fruit crops. Trends and future prospects. Biomolecules, 10(9): 1222.
- Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal, 23:112-121.
- Ashrafi, S., 2013. The effect of foliar spraying of urea and some amino acids on the morphological, physiological and metabolic characteristics of *Tanacetum balsamita* L. Master's thesis in the field

of horticultural sciences, Urmia University, Iran. (In Persian)
- Azza, A.M., Zaghloul, S.M., Mahmoud, S.A. and Hanan, S., 2011. Stimulatory effect of kinetin, ascorbic acid and glutamic acid on growth and chemical onstituents of *Codiaeum variegatum* L. plants. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 10(3): 318-323.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT- Food Science and Technology, 28(1): 25-30.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2003. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analaysis, 10(3): 178-182.
- Chen, G. and Gao, X., 2002. Effect of partial replacement of nitrate by amino acid and urea on nitrate content of nonheading Chinese cabbage and lettuce in hydroponics (Chinese). Scientia Agricultura Sinica, 35(3): 187–191.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. and. 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.
- Duck, M.W., Gregg, B.M., Fernandez, R.T., Royal, D.H. and Cardoso, F.F., 2004. Height control of Picea spp. and Chamaecyparis lawsoniana with uniconazole and 6-benzyladenine. Journal of Environmental Horticulture, 22(3): 165–169.
- Emami, A., 1996. Methods of Plant Decomposition. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran, 126p. (In Persian)
- Fallahi, H.R., Amini Fard, M.H. and Jorkesh, A., 2018. Effects of thiamine spraying on bio-chemical and morphological traits of basil plants under greenhouse conditions. Journal of Horticulther and Postharvest Research, 1(1): 27-36.
- Farouk, S., Youssef, S.A. and Ali, A., 2012. Exploitation of bio stimulants and vitamins as an alternative strategy to control early blight of tomato plants. Asian Journal of Plant Science, 11(1): 36-43.
- Faten, S.A., Shaheen, A.M. Ahmed, A.A. and Mahmoud, A.R., 2010. Effect of foliar application of amino acids as antioxidants on growth, yield and characteristics of Squash. Agriculture and Biological Science, 5(6): 583- 588.
- Garcia, L.A., Madrid, R., Gimeno, V., Rodriguez-Ortega, W.M., Nicolas, N. and Garcia-Sanchez, F., 2011. The effects of amino acids fertilization incorporated to the nutrient solution on mineral composition and growth in tomato seedlings. Spanish Journal of Agricultural Research, 9(3): 852-861.
- García-Ramírez, M.G. Gonzáles, E.Q. Mendoza, M. . Seijo, M.L. Cárdenas, L.J. Moreno-Bermúdez, O. and. Ribalta, H., 2014. Effect of BA treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. American Journal of Plant Sciences, 5(2): 205-211.
- Ghazi Manas, M., Banj Shafiee, S., Haj Seyed Hadi, M.R. and Darzi, M.T., 2013. Effects of vermicompost and nitrogen on quantitative and qualitative yeild of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants research, 29(2): 269-280.
- Gorni, P.H. and Pacheco, A.C., 2016. Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L. African Journal of Biotechnology, 15(16): 657-665.
- Hanaa, H., Hussein, A., Game, M.M., and El-Baroty, S., 2008. Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. International Journal of Irrigation and Water Management, 7(11): 2812-2832.
- Hasnaa, S., Ayad, M. Karima, M. and EL-Din, G., 2011. Effect of atonik and benzyladenine on growth and some biochemical constituents of lupine plant (*Lupinus termis* L.). American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 10 (4): 519-524.
- Hassan, E.H. and Ali, E.F., 2010. Response of *Coriandrum sativum* L. plant to cutting as well as glycine and salisylic acid treatments. Minia Journal of Agricultural Research and Development, 30(1): 15-29.
- Hazrati Yadekori, S. and Tahmasebi Sarvestani, Z., 2012. Effects of different nitrogen fertilizer levels and hormone benzyl adenine (BA) on growth and ramet production of *Aloe vera* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants research, 28(2): 210-223.
- Hendawy, S.F. and Ezz-Din, A.A., 2010. Growth and yield of *Foeniculum vulgare* var. azoricum as influenced by some vitamins and amino acids. Journal of Applied Sciences, 3(1): 113-123.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.J., 1950. The water culture method for growing plants without soil. 2nd Ed. California Agricultural Experimental Station, Berkeley, 32p.
- Hussein, A.A., 2005. Biochemical and Physiological Studies on some Alkaloids Ph.D. Thesis, Faculty of

Agriculture Cairo University.
- Jahani., R., Hosni, A. and Samadi, A., 2016. The effect of spraying urea, aspartic acid and glutamic acid on the hypertensive, physiological and biochemical characteristics of *Agastache foeniculum*. Journal of soil use research. 5(2): 95-107.
- Karima, A., Gamal El-Din, K.M. and Abdel-Wahed, M.S.A., 2005. Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. International Journal of Agriculture and Biology, 7(3): 376-380.
- Khattab, M., Shehata, A., Abou El -Saadate, E. and Al-Hasni, Kh., 2016. Effect of glycine, methionine and tryptophan on the vegetative growth, flowering and corms production of gladiolus plant. Alexandria Science Exchange Journal, 37(4): 647-659.
- Lopez, M.L., Peralta-Videa, J.R., Benitez, T. and Gardea-Torresdey, J.L., 2005. Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. Chemosphere, 61(4): 595-598.
- Lukaszewska, A., Monika, P. and Karol, C.H., 2008. Effect of drought and benzyl adenine on scarlet salvia (*Salvia splendens* Sello) and geranium (*Pelargonium hortorum* L.). Annals of Warsaw University of Life Sciences–SGGW 29(6): 45–52.
- Meda, A., Lamien, CE. Romito, M. Millogo, J. and 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(1): 571-577.
- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies, 15(4): 523- 530.
- Natesan, R., Kandasamy, S. Thiyageshwari, S. and Boopathy, P.M., 2007. Influence of lignite humic acid on the micronutrient availability and yield of blackgram in an alfisol. Scientific World Journal, 7(11):1198-1206.
- Nguyen, P.H.M., Kwee, E.M. and Niemeyer, E.D., 2010. Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. Food Chemistry, 123(4): 1235-1241.
- Nisar, B., Sultan, A. and Rubab, S.L., 2018. Comparison of medicinally important natural products versus synthetic drugs-a short commentary. Natural Products Chemistry and Research, 6(2): 1-2.
- Olmstead, R.G.; Pamphilis, C.W., Wolfe, A.D., Young, N.D., Elisons, W.J., and Reeves, P.A., 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae. American Journal of Botany, 88 (2): 348–361.
- Omidbeigi, R., 2007. Production and Processing of Medicinal Plants. Vol. II, Behnashr, Mashhad, 442p. (In Persian)
- Oraghi Ardebili, Z., Ladan Moghadam, A.R. Oraghi Ardebili, N. and Pashaie, A.R., 2012. The induced physiological changes by foliar application of amino acids in *Aloe vera* L. plants. Plant Omics Journal, 5(3): 279-284.
- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J., Stierhof, Y.D., Kleine-Vehn, J., Morris, D.A., Emans, N., Jurgens, G. and Geldner, N., 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. Nature, 435: 1251–1256.
- Piotrowska, A.; and Czerpak, R., 2009. Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine and phenylurea-type cytokinins. Acta Physiologiae Plantarum, 31(3): 573–585.
- Ramtin, A., Kalatejari, S., Naderi, R. and Matinizadeh, M., 2016. Effect of benzyl adenine and salicylic acid on biochemical traits of two cultivars of carnation. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 4(4): 427-434.
- Reda, F., Baroty, G.S.A., Talaat, I.M., Abdel-Rahim, I.A. and Ayad, H.S., 2007. Effect of some growth regulators and vitamins on essential oil, phenolic content and activity of oxidoreductase enzymes of *Thymus vulgaris* L. World Journal of Agricultural Sciences, 3(5): 630-638.
- Shehata, S.M., Azem, S. and El-Yazied, A., 2011. Effect of Foliar Spraying with Amino Acids and Seaweed Extract on Growth Chemical Constitutes, Yield and its Quality of Celeriac Plant. European Journal of Scientific Research, 58(2): 257-265.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 2006. Plant Physiology. 4th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, US. 623p.
- Tajik, N. and Danaee, E., 2016. Study the effect of spraying pre-harvest glotamin, arginine and phenylalanine on some physicochemical and enzymatic traits and longevity *gerbera jamesonii* flower cv. Sorbet Cellular and Molecular Plant Biology Journal, 8(3): 4-12.
- Verma, S.K., Gantait, S. Jeong, B.R. and Hwang, S.J., 2018. Enhanced growth and cardenolides production in *Digitalis purpurea* under the influence of different LED exposures in the plant factory. Journal of Scientific Reports, 8(1): 1-12.
- Wang, S., Wang, H.B., Wang, X.D., Shi, X.B., Wang, B.L., Zheng, X.C. and Liu, F.Z., 2015. Effects of selenium and 6-BA on leaf senescence and active oxygen metabolism in grape. Journal of fruit science, 32(11): 206–214.