Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 2, Page 314-330 (2024)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.362422.3326

Effect of tryptophan, phenylalanine and methionine amino acids on the morpho-physiological and phytochemical properties of Persian Gulnar (*Punica granatum* L. var. *pleniflora*)

Fatemeh Mohammadi Dolatabad[1], Mohsen Sanikhani[2*], Maliheh Yaghoobi[3] and Azizollah Kheiry[4]

1- M.Sc. graduated, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
E-mail: sani@znu.ac.ir
3- Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: June 2023 Revised: December 2023 Accepted: December 2023

Abstract

Background and objectives: *Punica granatum* L. var. *pleniflora* is an ornamental/medicinal shrub native to Iran. Gulnar extract, like morphine, reduces pain in patients. It is also used against various diseases such as prostate cancer and breast cancer due to triterpenoids. In traditional medicine, it has been applied to cure diarrhea, bleeding, mucous secretions, and vaginal secretions. In external use, it has been used as a gargle to cure tonsillitis. Atherosclerosis is one of the most dangerous factors in cardiovascular disease. Due to antioxidant compounds, Gulnar reduces artery-clogging by almost 70%. Therefore, it is critical to enhance Persian Gulnar growth and flowering, a natural source of antioxidants.

Methodology: To investigate the effect of the amino acids tryptophan, phenylalanine, and methionine on the morphophysiological and phytochemical characteristics of the Persian Gulanar, an experiment was conducted in the research greenhouse of Zanjan University in a completely randomized design including ten treatments in three replications and 3 pots for each experimental unit in the research greenhouse, Faculty of Agriculture of Zanjan University. Different levels of treatment included methionine 0.5, 1, 2 mM, phenylalanine 0.5, 1, 2 mM, tryptophan 0.5, 1, 2 mM. The extraction conditions were optimized for total phenol, total flavonoid, antioxidant activity, and antimicrobial activity tests. To extract and optimize the extraction using a dry flower sample, an ultrasonic device was used and an experiment was designed to determine the appropriate solvent, temperature, and duration of extraction, as well as to determine the optimal ratio of plant dry matter to solvent, and a comparison was made between two water solvents and alcohol at temperatures of 30-50-70 degrees Celsius and different amounts of plants 0.2, 0.35, and 0.5 grams per ten milliliters of solvent and durations of 5, 15, 25 minutes. Based on these cases, the initial tests by recommended software. To investigate the antimicrobial activity of the flower extract and Persian Gulnar's red color**,** a good penetration method was used. Plates containing a solid culture medium of Mueller Hinton agar were used in this method.

Results: The treatments significantly affected the dry weight of flowers and flavonoids at a 5% probability level. In addition, they affected the number of flowers, anthocyanin content, antioxidant activity (FRAP), and chlorophyll b at a 1% probability level. The flower dry weight increased by 97.09% in the presence of 2 mM tryptophan compared to the control. The most anthocyanin was observed with an increase of 56.05 and 50% in the concentration of 0.5 mM phenylalanine compared to the control. The highest amount of antioxidant activity (FRAP) was obtained with a 110% increase compared to the control at a concentration of 2 mM tryptophan. The highest flower number was at 1 mM phenylalanine and 2 mM methionine. The most positive correlation (*r=0.68) was between flower dry weight and branch growth, and the most negative correlation (*r=0.80) was between chlorophyll b and anthocyanin. There was a

Copyright: © 2024 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.

significant positive correlation between chlorophyll a and total flavonoids, chlorophyll b, and branch growth. Also, there was a significant positive relationship between the number of flowers with anthocyanin and total phenol. The best extraction point was related to the temperature of 70 ºC, 70% ethanol solvent, 15 minutes, and the ratio of plant dry matter to solvent was 0.2 grams of dry weight in 10 ml of solvent. The red flowers showed a higher inhibitory effect against *Escherichia coli*, and the variegated flowers had a higher inhibitory power against *Staphylococcus aureus*.

Conclusion: According to the results, in addition to confirming Gulnar's antibacterial activity and determining the optimal extraction point, it was found that the levels of 0.5 mM amino acids in most of the traits, including branch growth, flower dry weight, total phenol, and anthocyanin brought the best results from the treatment. It also justifies them in the field. Since amino acid fertilizers are applied in small amounts, they are economically justified.

Keywords: Anthocyanin, pomegranate, flower, phenolic content, foliar application.

اثر اسیدهای آمینه تریپتوفان، فنیل‌آلانین و متیونین بر خصوصیات مرفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گلنار فارسی (*Punica granatum* L. var. *pleniflora*)

فاطمه محمدی دولت‌آباد[۱]، محسن ثانی‌خانی[۲*]، ملیحه یعقوبی[۳] و عزیزاله خیری[۴]

۱- دانش آموخته کارشناس ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، پست الکترونیک: sani@znu.ac.ir

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

۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت:خرداد ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: گلنار فارسی یا انار پُرپَر (*Punica granatum* L. var. *pleniflora*) درختچه‌ای زینتی/دارویی و بومی ایران است. عصاره گلنار مانند مورفین باعث کاهش سطح درد در بیماران می‌شود و به‌دلیل حضور تری‌ترپنوئیدها علیه بیماری‌های مختلف مانند سرطان پروستات و سرطان سینه استفاده می‌شود. در طب سنتی برای رفع اسهال، خونروی‌های ساده، ترشحات مخاطی، ترشحات واژینال و در استعمال خارجی، به‌صورت غرغره برای رفع ورم لوزه استفاده می‌شده است. تصلب شریان یکی از فاکتورهای خطرناک در بیماری قلبی–عروقی شمرده می‌شود. گلنار به‌دلیل داشتن ترکیب‌های متعدد آنتی‌اکسیدانی، سبب کاهش تقریباً ۷۰٪ گرفتگی شریان‌ها می‌شود، ازاین‌رو افزایش رشد و گلدهی گلنار فارسی که منبع طبیعی از آنتی‌اکسیدان‌هاست حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثر اسیدهای آمینه تریپتوفان، فنیل‌آلانین و متیونین بر خصوصیات مرفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گلنار فارسی، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان به‌صورت طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۰ تیمار در ۳ تکرار و ۳ گلدان به ازای هر واحد آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان اجرا شد. سطوح مختلف تیمارها شامل متیونین ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مولار، فنیل‌آلانین ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مولار، تریپتوفان ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مولار طی سه مرتبه محلول‌پاشی برگی به فواصل دو هفته، به همراه شاهد (آب مقطر) اعمال شدند. شرایط استخراج برای آزمون‌های فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی بهینه شد. برای عصاره‌گیری و بهینه‌سازی استخراج با استفاده از نمونه خشک گل از دستگاه اولتراسونیک استفاده شد و برای تعیین حلال، دما و مدت‌زمان مناسب عصاره‌گیری و تعیین نسبت بهینه ماده خشک گیاهی به حلال، آزمایشی طراحی شد و مقایسه بین دو حلال آب و الکل در دماهای ۳۰–۵۰–۷۰ درجه سانتی‌گراد و مقادیر مختلف گیاهی ۰/۲، ۰/۳۵، ۰/۵ گرم در ده میلی‌لیتر حلال و مدت زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵ دقیقه بود که براساس این موارد آزمایش‌های اولیه توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. به‌منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گل ابلق و قرمز رنگ گلنار فارسی، از روش نفوذ چاهکی استفاده شد. در این روش از پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار که به‌طور جداگانه آغشته به سوسپانسیون باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس‌اورئوس با غلظت یک میلیون در میلی‌لیتر بود، استفاده گردید.

نتایج: نتایج نشان داد تیمارها بر صفات مورد بررسی شامل وزن خشک گل‌ها و فلاونوئید در سطح احتمال ۵٪ و تعداد گل، میزان آنتوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP) و کلروفیل b در سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری داشتند. به‌طوری که میزان وزن خشک گل به مقدار ۹۷/۰۹٪ در غلظت ۲ میلی‌مولار تریپتوفان نسبت به شاهد افزایش داشت. بیشترین آنتوسیانین، با افزایش ۵۶/۰۵ و ۵۰ درصدی در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین نسبت به شاهد مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)، با افزایش ۱۱۰ درصدی نسبت به شاهد در غلظت ۲ میلی‌مولار تریپتوفان بدست آمد. بیشترین تعداد گل در غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین و ۲ میلی‌مولار متیونین بدست آمد. بیشترین همبستگی مثبت ($r=۰/۶۸^{*}$) بین وزن خشک گل و رشد

شاخه بود و بیشترن همبستگی منفی (r=۰/۸۰*) بین کلروفیل b و آنتوسیانین مشاهده شد. بین کلروفیل a با فلاونوئید کل، کلروفیل b و رشد شاخه همبستگی مثبت معنی‌داری وجود داشت. همچنین بین تعداد گل با آنتوسیانین و فنول کل رابطه مثبت معنی‌داری مشاهده شد. بهترین نقطه استخراج عصاره مربوط به دمای ۷۰°C، حلال اتانول ۷۰٪، زمان ۱۵ دقیقه و نسبت ماده خشک گیاه به حلال ۰/۲ گرم وزن خشک در ۱۰ میلی‌لیتر حلال بود. همچنین مشاهده شد که در برابر باکتری اشریشیاکلی، گل قرمز و در برابر استافیلوکوکوس اورئوس گل ابلق به‌ترتیب با ۱۷/۷۶ و ۱۷/۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین قدرت مهارگری را داشتند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج علاوه‌بر تأیید فعالیت ضد باکتریایی گلنار و تعیین نقطه بهینه استخراج، مشخص شد که سطوح ۰/۵ میلی‌مولار اسیدهای آمینه در بیشتر صفات شامل رشد شاخه، وزن خشک گل، فنل کل و آنتوسیانین بهترین نتایج را به همراه داشت که تیمار آنها در مزرعه را نیز توجیه می‌کند. با توجه به اینکه کشاورز برای محلول‌رسانی به محصول خود مقدار بسیار کمی از کودهای اسید آمینه را در مقایسه با دیگر کودها استفاده می‌کند، از این جهت توجیه اقتصادی مطلوبی نیز دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، انار پُرپَر، گل، محتوای فنولی، محلول‌پاشی.

مقدمه

گلنار فارسی یا گل انار غیرمثمر متعلق به خانواده Punicaceae است که شامل تنها یک جنس *Punica* و دو گونه *P. granatum* و *P. proptopunica* می‌باشد (Jaime *et al.*, 2013). گلنار فارسی یک واریته از گونه گراناتوم، در واقع همان درخت انار با نام علمی *Punica granatum* L. var. *pleniflora* است که به‌دلیل گل‌های درشت زینتی و غیرمثمر شناخته می‌شود. همین گونه دارای واریته بارور دیگری به نام *sativa* بوده که همان انار خوراکی است و واریته دیگر انار موسوم به nana به‌عنوان انار پاکوتاه یا انار زینتی شناخته می‌شود. سابقه کشت آن به ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بازمی‌گردد. موطن اصلی آن خاور نزدیک به‌ویژه ایران معرفی شده است. در حال حاضر مناطق کشت این درختچه محدود است. در آسیا، ایران، افغانستان و ازبکستان، در اروپا، اسپانیا و در آفریقا، در کناره‌های شمالی آن (سواحل جنوبی مدیترانه) کشت و کار می‌شود و در بقیه نقاط دنیا در صورت کشت، مساحت زیر کشت آن محدود و ناچیز است. این درختچه شاخه‌های بسیار خاردار با برگ‌های براق و نوک‌تیز و پوست درخت مایل به خاکستری دارد. گل‌های بزرگ، قرمز، سفید و یا رنگارنگ داشته، عمدتاً دارای گل‌های نر، نازا بوده و دارای غده ترشح‌کننده شهد هستند و توسط حشرات گرده‌افشانی می‌شوند (Ali *et al.*, 2017). تمام قسمت‌های انار دارای اثرهای درمانی و تغذیه‌ای است (Vučić *et al.*, 2019) که از گذشته‌های بسیار دور در طب یونانی و طب سنتی ایران برای درمان امراض مختلف به‌صورت دم‌کرده یا جوشانده استفاده می‌شده است. عصاره گلنار مانند داروهای مورفین باعث کاهش سطح درد در بیماران می‌شود (Chakraborthy, 2008). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلنار ۲ تا ۳ برابر بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی چای و انگور است (Hassani Moghadam *et al.*, 2019). همچنین این گل‌ها به‌دلیل حضور تری‌ترپنوئیدها علیه بیماری‌های مختلف مانند سرطان پروستات استفاده می‌شوند (Syed *et al.*, 2007). گل انار به‌دلیل حضور ترکیب‌های متعدد آنتی‌اکسیدانی، سبب می‌شود که تقریباً ۷۰٪ گرفتگی شریان‌ها کاهش یابد (Aviram *et al.*, 2008).

امروزه استفاده از روش‌های نوین نگهداری مانند استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی پیدا کرده‌اند. اضافه کردن آنتی‌اکسیدان به مواد غذایی یکی از

مؤثرترین شیوه‌های کاهش فساد مواد غذایی است و توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی کمک شایانی در این زمینه خواهد کرد. گیاهان دارویی می‌توانند اثرهای ضد میکروبی بسیار خوبی داشته باشند که تأثیر عصاره اتانولی گزنه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است (Kiaei *et al.*, 2011). محققان عصاره گزنه را بر روی رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استرپتوکوکوس پایوژنز بررسی و بیان کردند که عصاره گزنه قادر به ایجاد هاله عدم رشد بر روی محیط کشت باکتری‌های مذکور است (Tasdelen *et al.*, 2009). با توجه به اینکه گل انار حاوی انواع متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است، میزان رشد و گلدهی گلنار فارسی که منبع طبیعی از آنتی‌اکسیدان‌هاست حائز اهمیت است. آمینواسیدها برای جلوگیری از کاهش محصول به مرور زمان و بالا بردن کیفیت محصول، بسیار مؤثر هستند. به‌طورکلی، کاربرد آمینواسیدها به‌منظور استفاده در تغذیه پایه مورد نیاز گیاهان و یا حتی به‌منظور استفاده در مراحل بحرانی تغذیه گیاهی و پیش‌بینی رشد گیاهی بسیار مهم است. ازآنجایی‌که اسیدهای آمینه پیش‌ماده بسیاری از ترکیب‌های مهم دارویی هستند و از سوی دیگر خشت ساختمانی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها محسوب می‌شوند، ازاین‌رو افزایش و نیز فراهمی این ترکیب‌ها می‌تواند نقش اساسی در فرایندهای فیزیولوژیک و بیولوژیک داشته باشد. طی مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام شده، اثبات شده است که آمینواسیدها می‌توانند به‌طور مستقیم تأثیر بسیار زیاد و مهمی در فعالیت‌های حیاتی و ساختارهای گیاهی داشته باشند (Rezakhani & Hadi, 2017). مطالعات ثابت کرده است که اسیدهای آمینه می‌توانند به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم در فعالیت‌های فیزیولوژیکی رشد و نمو گیاه تأثیر بگذارند. بسیاری از مطالعات گزارش کردند که کاربرد برگی اسیدهای آمینه موجب افزایش رشد گیاه، عملکرد میوه و ترکیب‌های آن در سیر (El-Shabasi *et al.*, 2005) و سیب‌زمینی (Awad *et al.*, 2007) می‌شود. اثر اسیدهای آمینه روی اجزای بیوشیمیایی می‌تواند به‌دلیل حفاظت گیاه از مسمومیت آمونیاکی باشد، به این صورت که شکل آمیدی را حذف کرده و به‌عنوان منبع کربن و انرژی برای محافظت گیاه بکار می‌روند و عمل‌کننده به‌عنوان بافرها و بیوسنتز ترکیب‌های ارگانیکی مانند پروتئین‌ها، آمین‌ها، پورین‌ها، پیریمیدین‌ها، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها هستند (Karima *et al.*, 2005).

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و نحوه اعمال تیمارها

به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف اسیدهای آمینه بر خصوصیات مرفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گلنار فارسی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۰ تیمار در ۳ تکرار و ۳ گلدان به ازای هر واحد آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. سطوح مختلف تیمارها شامل متیونین ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مولار، فنیل‌آلانین ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مولار، تریپتوفان ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مولار طی سه مرتبه محلول‌پاشی برگی به فواصل دو هفته، به همراه شاهد (آب مقطر) اعمال شدند. وزن تر و خشک نمونه‌ها بعد از برداشت محاسبه شد و برای آزمایش‌های بعدی استفاده گردید.

عصاره‌گیری

شرایط استخراج برای آزمون‌های فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی بهینه شد. برای عصاره‌گیری و بهینه‌سازی استخراج از نمونه خشک گل، از دستگاه اولتراسونیک استفاده شد و برای تعیین حلال، دما و مدت زمان مناسب عصاره‌گیری و تعیین نسبت بهینه ماده خشک گیاهی

به حلال، آزمایشی طراحی شد و مقایسه بین دو حلال آب و الکل در دماهای ۳۰–۵۰–۷۰ درجه سانتی‌گراد و مقادیر مختلف گیاهی ۰/۲، ۰/۳۵ و ۰/۵ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال و مدت زمان‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ دقیقه بود که براساس این موارد آزمایش‌های اولیه توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. سپس عصاره استخراج شده با استفاده از کاغذ واتمن از مواد جامد گیاهی جدا گردید.

فعالیت ضد میکروبی

به‌منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گل ابلق و قرمز رنگ گلنار فارسی، از روش نفوذ چاهکی استفاده شد. در این روش از پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار که به‌طور جداگانه آغشته به سوسپانسیون باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس‌اورئوس با غلظت یک میلیون در میلی‌لیتر (به کمک قرائت در اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر) بودند، استفاده شد. توسط یک کاتر فلزی استریل یک چاهک با قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت جامد ایجاد شده و داخل هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره با نسبت گیاه خشک به حلال ۱ به ۵ به‌طور جداگانه اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس‌ازآن، قطر هاله‌های عدم رشد باکتری هر چاهک توسط خط‌کش اندازه‌گیری شده و برحسب میلی‌متر گزارش شد. از آنتی‌بیوتیک‌های سفکسیم و سیپروفلاکسین نیز به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد (Balouiri *et al.*, 2016).

اندازه‌گیری صفات مورفوفیزیولوژیکی

تعداد گل، طول رشد شاخه‌های جدید، وزن خشک گل‌ها و محتوای کلروفیل به‌عنوان صفات مورفوفیزیولوژیکی گلنار فارسی اندازه‌گیری شد.

محتوای کلروفیل

مقدار کلروفیل براساس روش آرنون با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد و به‌صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه گیاهی بیان گردید. ۰/۵ گرم از ماده گیاهی تازه در هاون چینی به همراه ۳۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ کاملاً خرد و همگن شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. مقدار جذب روشناور در طول‌موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b، با استفاده از اسپکتروفتومتر SAFAS Monaco قرائت شد (Arnon, 1967).

اندازه‌گیری شاخص‌های فیتوشیمیایی

ترکیب‌های فنولی

برای اندازه‌گیری ترکیب‌های فنولی از معرف فولین سیوکالچو استفاده شد. اساس این روش شامل احیاء معرف فولین توسط ترکیب‌های فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است. برای انجام آزمایش به ۵۰ میکرولیتر عصاره با نسبت ۰/۲ ماده گیاهی خشک بر ۱۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۷۰٪، ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین ۱۰٪ و ۱۹۵۰ میکرولیتر آب مقطر و بعد از ۵ دقیقه نگهداری در تاریکی، ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷٪ اضافه شد. نمونه‌ها در مرحله بعد به‌مدت ۲۵ دقیقه در تاریکی نگه داشته شدند و جذب آنها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. گالیک اسید به‌عنوان استاندارد فنل برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. محتوای فنل کل به‌صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک گزارش شد (Pandjaitan *et al.*, 2005).

فلاونوئید کل

مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی با استفاده از روش نورسنجی کلرید آلومینیوم تعیین شد (Chang *et al.*, 2002). به فالکون حاوی ۲۷۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر عصاره

گیاهی، ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ و ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط و تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد بعد از تهیه رقّت‌های مختلف کوئرستین رسم شده و نتایج به‌صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن گیاه خشک گزارش شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

از روش‌های مرسوم برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی استفاده (FRAP) شد. برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره مقدار ۴۰۰ میکرولیتر پتاسیم هگزاسیانوفرات و ۴۰۰ میکرولیتر فسفات بافر اضافه شده و پس از نگهداری در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، ۴۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید اضافه شده و با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس بر روی ۳۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شده و بعد از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آهن، بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد (Singh *et al.*, 2007). منحنی استاندارد بعد از تهیه رقّت‌های مختلف اسید اسکوربیک رسم شد.

آنتوسیانین کل

برای سنجش آنتوسیانین کل طبق روش واگنر (Wagner, 1979)، ۰/۰۲ گرم از گیاه پودر شده را با متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده و عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر قرائت و ثبت شد. برای محاسبه غلظت برحسب میکرومول، از ضریب خاموشی $\varepsilon = ۳۳۰۰۰ mMCm^{-1}$ استفاده گردید و با استفاده از فرمول زیر میزان غلظت آنتوسیانین محاسبه شد.

$$A= \varepsilon bc$$

A: جذب، b: عرض کوت و c: غلظت محلول مورد نظر می‌باشد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن به کمک نرم‌افزار SAS,Ver 9.3 انجام شد. همچنین نقاط بهینه استخراج با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert تعیین شد.

نتایج

نتایج مربوط به تعیین نقطه بهینه استخراج برای برخی شاخص‌ها

ملاک طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی فرایند استخراج ترکیب‌های گیاه گلنار فارسی توسط فناوری اولتراسونیک، بیشترین مقدار فنول و فلاونوئید کل استخراج شده بود و نتایج نشان داد که بهترین نقطه استخراج عصاره دمای ۷۰°C، حلال اتانول۷۰٪ زمان ۱۵ دقیقه و نسبت ماده خشک گیاه به حلال، ۰/۲ گرم در هر ۱۰ میلی‌لیتر بود. در ادامه، شرایط استخراج این نقطه به‌عنوان نقطه بهینه در استخراج عصاره اصلی برای اندازه‌گیری فنل کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های اصلی در نظر گرفته شد (جدول ۱ و شکل ۱).

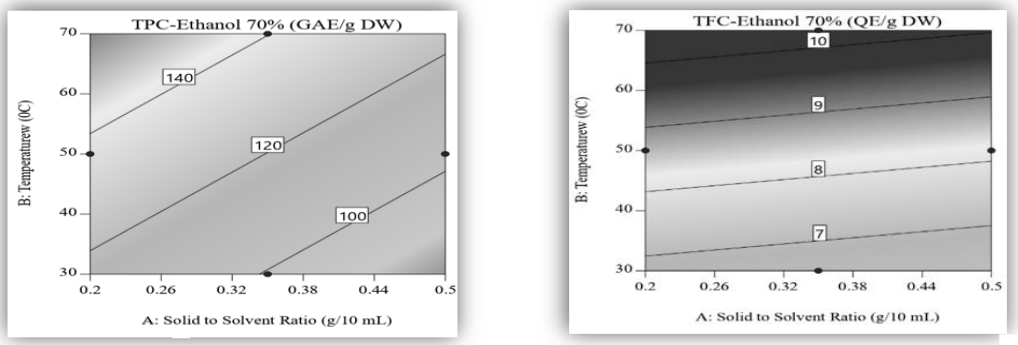
نتایج صفات مورد مطالعه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نمونه‌های گلنار فارسی مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر آنتوسیانین، کلروفیل b، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP) و تعداد گل داشته و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بر میزان فلاونوئید و وزن خشک گل دارد (جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۱- آزمایش‌ها برای عصاره‌گیری بهینه از گلنار فارسی

Table 1. Experiments for optimal extracting from *Punica granatum* var. *pleniflora*

Extraction variable			Response			
Concentration (g.10 mL^{1})	**Temperature (ºC)**	**Time (min)**	**Total flavonoids content (Solvent: water) (QE.g^{-1} DW)**	**Total flavonoids content (Solvent: ethanol 70%) (QE.g^{-1} DW)**	**Total phenols content (Solvent: water) (GAE.g^{-1} DW)**	**Total phenols content (Solvent: ethanol 70%) (GAE.g^{-1} DW)**
0.2	30	15	7.54	6.69	78.72	112.86
0.5	30	15	5.89	4.94	74.13	63.31
0.2	70	15	15.17	9.63	118.63	168.78
0.5	70	15	11.02	8.80	115.30	137.15
0.2	50	5	9.12	7.26	97.63	128.87
0.5	50	5	6.70	7.61	74.66	104.90
0.2	50	25	10.03	9.12	125.20	160.38
0.5	50	25	7.97	9.46	83.37	131.27
0.35	30	5	5.47	4.08	67.79	76.49
0.35	70	5	7.05	8.60	96.45	148.36
0.35	30	25	7.51	5.92	88.50	101.10
0.35	70	25	9.09	9.54	121.51	63.74
0.35	50	15	7.64	8.18	95.25	137.71
0.35	50	15	8.90	7.41	105.30	132.46
0.35	50	15	7.22	6.60	95.55	124.81



شکل ۱- نمودار استخراج فنل و فلاونوئید با حلال اتانول ۷۰٪

Figure 1. Phenols and flavonoids extraction diagram with ethanol 70% solvent

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر محلول‌پاشی اسیدهای آمینه بر برخی صفات گلنار فارسی

Table 2. ANOVA of amino acids foliar application effects on some *Punica granatum* var. *pleniflora* traits

S.O.V.	d.f.	M.S.		
		Number of flowers	**Flower dry weight**	**Shoot length growth**
Treatment	9	44.78**	0.07*	41.93^{ns}
Experimental error	70	9.97	0.02	25.63
C.V. (%)		16.06	15.35	12.41

S.O.V.	d.f.	M.S.					
		Flavonoids	**Anthocyanins**	**FRAP**	**Phenols**	**Chlorophyll *a***	**Chlorophyll *b***
Treatment	9	0.43**	0.02**	1417.78**	657.70^{ns}	0.078^{ns}	0.07**
Experimental error	20	0.15	0.00	101.30	365.30	0.05	0.01
C.V. (%)		11.68	6.44	18.04	12.99	14.36	17.01

n.s., *, and **: non-significant, significant at 1, and 5% probability levels, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر محلول‌پاشی اسیدها آمینه بر برخی صفات گلنار فارسی

Table 3. Means comparison of amino acids foliar application effects on some *Punica granatum* var. *pleniflora* traits

Amino acid treatment (mM)	Flower dry weight (g)	Number of flowers	Chlorophyll *b* (mg.g^{-1} FW)	Total flavonoids content (QE.g^{-1} DW)	Anthocyanins (mg.g^{-1} DW)
0	0.48^{c}	3.62^{e}	1.00^{a}	3.81^{ab}	0.46^{c}
Methionine 0.5	0.89^{a}	3.62^{e}	0.96^{a}	3.76^{ab}	0.51^{c}
Methionine 1	0.71^{abc}	5.75^{cd}	0.96^{a}	3.39^{abc}	0.60^{b}
Methionine 2	0.74^{abc}	8.62^{b}	0.91^{ab}	3.60^{abc}	0.66^{ab}
Tryptophan 0.5	0.72^{abc}	4.5^{de}	0.70^{bc}	2.93^{c}	0.66^{ab}
Tryptophan 1	0.58^{bc}	4.50^{de}	0.62^{c}	2.99^{c}	0.69^{a}
Tryptophan 2	0.95^{a}	6.12^{cd}	0.78^{abc}	4.02^{a}	0.60^{b}
Phenylalanine 0.5	0.89^{a}	3.62^{e}	0.58^{c}	3.10^{bc}	0.72^{a}
Phenylalanine 1	0.52^{bc}	10.62^{a}	0.69^{bc}	3.08^{bc}	0.61^{b}
Phenylalanine 2	0.79^{ab}	7.00^{bc}	0.70^{bc}	3.27^{abc}	0.66^{ab}

In each column, means with common letter are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

رشد شاخه‌ها

مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که بیشترین میزان رشد شاخه مربوط به تیمار متیونین ۰/۵ میلی‌مولار با میانگین ۱۲/۸ سانتی‌متر و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۶/۴۴ سانتی‌متر بود. بنابراین بیشترین میزان رشد شاخه‌ها تحت تأثیر محلول‌پاشی نسبت به تیمار شاهد افزایش ۹۸ درصدی داشته است. همچنین بعد از تیمار ۰/۵ میلی‌مولار متیونین بیشترین رشد شاخه‌ها مربوط به تیمار ۲ میلی‌مولار تریپتوفان با میانگین ۱۲/۴۶ سانتی‌متر و تیمار ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین با میانگین ۹/۰۵ سانتی‌متر بود. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که محلول‌پاشی هر سه اسید آمینه مورد بررسی در این پژوهش در تمامی سطوح موجب افزایش میانگین رشد شاخه‌ها شده است.

تعداد گل

با توجه به جدول مقایسه میانگین، بین تمامی سطوح تیمارهای متیونین و بین تمام سطوح تیمار فنیل‌آلانین اختلاف معنی‌داری در تعداد گل مشاهده شد. بیشترین تعداد گل‌ها مربوط به تیمار ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین با میانگین ۱۰/۶۲ عدد، تیمار ۲ میلی‌مولار متیونین با میانگین ۸/۶۲ عدد و تیمار ۲ میلی‌مولار تریپتوفان با میانگین ۶/۱۲ عدد بود (جدول ۳).

وزن خشک گل‌ها

با توجه به نتایج میانگین داده‌ها (جدول ۴)، تیمارهای ۰/۵ میلی‌مولار متیونین و ۲ میلی‌مولار تریپتوفان و ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین با تیمار شاهد در میزان وزن خشک اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین محلول‌پاشی سطوح مختلف تیمارها بیشترین وزن خشک گل‌ها در تیمار ۲ میلی‌مولار تریپتوفان با میانگین ۰/۹۵ گرم، ۰/۵ میلی‌مولار متیونین با میانگین ۰/۸۹ گرم و تیمار ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین با میانگین ۰/۸۹ گرم بدست آمد که همگی نسبت به شاهد میزان بیشتری را نشان دادند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تمام تیمارها تأثیر مثبت در افزایش وزن خشک گل‌ها داشتند.

محتوای کلروفیل

با توجه به نتایج مقایسه میانگین، بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به تیمار محلول‌پاشی متیونین ۲ میلی‌مولار با میانگین ۱/۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن نمونه تر بود. همچنین

مشاهده گردید که محلول‌پاشی فنیل‌آلانین در هر سطحی روند کاهشی نسبت به تیمار شاهد در میزان کلروفیل a داشته و اثر مثبتی بر محتوای این پارامتر نداشته است. در تیمار تریپتوفان نیز محلول‌پاشی ۱ میلی‌مولار این اسید آمینه نسبت به تیمار شاهد در محتوای کلروفیل a تأثیر مثبت داشته و سایر سطوح محلول‌پاشی تریپتوفان روند کاهشی نسبت به تیمار شاهد داشته است. همچنین محلول‌پاشی متیونین در سطوح بالاتر به‌ویژه ۲ میلی‌مولار باعث افزایش محتوای کلروفیل a نسبت به تیمار شاهد گردید (جدول ۳).

با توجه به جدول مقایسه میانگین، میزان کلروفیل b با کاهش ۰/۵۸ و ۰/۳۸ درصدی به‌ترتیب در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین و ۱ میلی‌مولار تریپتوفان نسبت به شاهد مشاهده شد. بیشترین میزان کلروفیل b مربوط به تیمار محلول‌پاشی متیونین ۱ میلی‌مولار با میانگین ۰/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن نمونه تر بود. بنابراین با توجه به نتایج بدست‌آمده با محلول‌پاشی اسیدهای آمینه، تأثیر مثبتی بر روی افزایش میزان کلروفیل b مشاهده نشد اما در سطح ۲ میلی‌مولار در اسید آمینه فنیل‌آلانین و تریپتوفان محتوای کلروفیل b افزایش یافت، ولی در هر صورت نسبت به تیمار شاهد این افزایش چشمگیر نیست (جدول ۳).

میزان ترکیب‌های فنولی

نتایج میانگین داده‌ها نشان داد که در بین تیمارهای محلول‌پاشی شده توسط اسیدهای آمینه فقط سطوح ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین و تریپتوفان و ۲ میلی‌مولار متیونین، فنول بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین بیشترین میزان این شاخص را نسبت به تمام تیمارها و شاهد، با میانگین ۱۷۱/۲۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گیاه خشک، دارا بود (جدول ۳).

فلاونوئید کل

با توجه به نتایج (جدول ۳) در اندازه‌گیری فلاونوئید کل با وجود معنی‌دار بودن نسبت به شاهد، مشاهده شد که محلول‌پاشی اسید آمینه متیونین و فنیل‌آلانین روی مقدار فلاونوئید گیاه نسبت به تیمار شاهد اثری نداشته است. طبق جدول ۳، بیشترین میزان فلاونوئید در بین تیمارها و شاهد مربوط به تیمار ۲ میلی‌مولار تریپتوفان با میانگین ۴/۰۲ میلی‌گرم معادل کوئرسیتین بر گرم گیاه خشک بود و کمترین میزان این شاخص در تیمار ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار تریپتوفان به‌ترتیب با میانگین ۲/۹۳ و ۲/۹۹ میلی‌گرم گرم معادل کوئرسیتین بر گرم گیاه خشک مشاهده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

با توجه به نتایج، مشاهده شد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه در تیمار ۲ میلی‌مولار تریپتوفان بالاترین میزان این شاخص را با میانگین ۱۰۷/۶ میلی‌گرم اسید اسکوربیک بر گرم خشک گیاه نسبت به شاهد و بقیه تیمارها نشان داد که اختلاف معنی‌داری نسبت به غلظت‌های کمتر تریپتوفان، سایر اسیدهای آمینه و نیز شاهد داشت. همچنین با توجه به نتایج، در سطوح کم محلول‌پاشی فنیل‌آلانین ۰/۵ میلی‌مولار و سطوح بیشتر محلول‌پاشی متیونین ۲ میلی‌مولار و تریپتوفان ۱ و ۲ میلی‌مولار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته است (شکل ۲).

آنتوسیانین کل

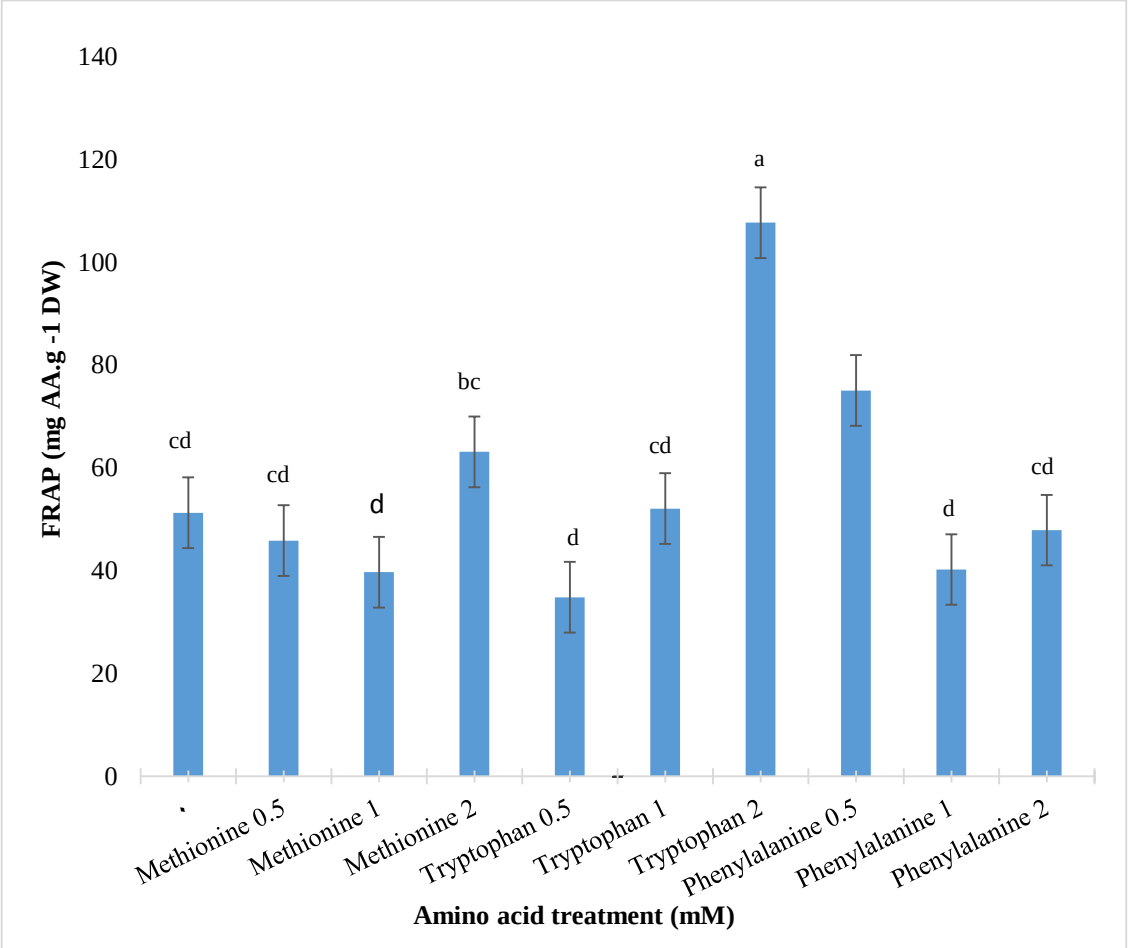
با توجه به مقایسه میانگین (جدول ۳) در اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین گیاه اختلاف معنی‌دار بین تمامی سطوح متیونین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان به‌غیر از ۰/۵ میلی‌مولار متیونین با تیمار شاهد مشاهده شد. به‌طورکلی با افزایش سطوح مصرفی متیونین مقدار آنتوسیانین افزایش یافت،

درحالی‌که این مقدار با افزایش سطوح مصرفی اسید آمینه‌های تریپتوفان و فنیل‌آلانین کاهش پیدا کرد. ولی به‌طور کلی در تیمار تمامی اسیدهای آمینه میزان آنتوسیانین گیاه نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته بود.

نتایج مربوط به بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌ها توسط گیاه مورد مطالعه

با توجه به نتایج بدست آمده (جدول ۴) عصاره الکلی گل‌های گلنار فارسی خاصیت آنتی‌باکتریالی قابل توجه و معنی‌داری در مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس‌اورئوس و اشریشیاکلی نسبت به شاهد از خود نشان دادند، به‌طوری که هاله عدم رشد باکتری به‌خوبی قابل تشخیص است (شکل ۳). بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره الکلی این گیاه می‌تواند به‌طور مؤثری از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند.

نتایج مطالعه بر روی خاصیت ضدمیکروبی عصاره گلنار همچنین نشان داد که بیشترین اثر روی استافیلوکوکوس اورئوس با هاله عدم رشد ۱۷/۴ میلی‌متری مربوط به عصاره گلنار ابلق و بیشترین اثر روی اشریشیاکلی با بیشترین هاله عدم رشد ۱۷/۷۶ میلی‌متری مربوط به گلنار قرمز بود که نشان‌دهنده قدرت مهارگری بیشتر گلنار قرمز در برابر باکتری اشریشیاکلی و گلنار ابلق در برابر استافیلوکوکوس اورئوس بود (جدول ۴ و شکل ۳).



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر محلول‌پاشی اسیدهای آمینه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (**FRAP**) گلنار فارسی

Figure 2. Means comparison of amino acids foliar application effects on antioxidant activity (FRAP) of *Punica granatum* var. *pleniflora*

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

همبستگی بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده

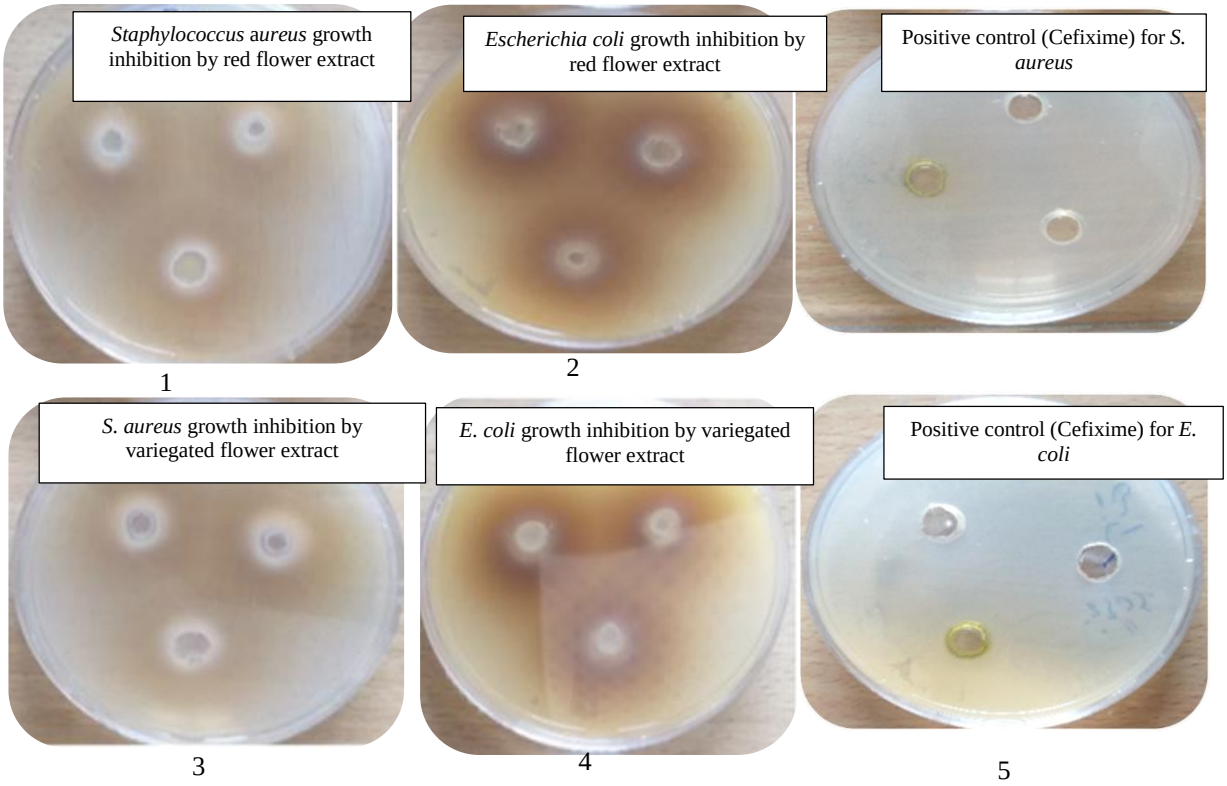
ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در جدول ۵ نشان داده شده است. براساس نتایج موجود، بیشترین همبستگی مثبت (r= ۰/۶۸*) بین وزن خشک گل و رشد شاخه بود و بیشترن همبستگی منفی (r= ۰/۸۰*) بین کلروفیل b و آنتوسیانین مشاهده شد (جدول ۵). بین کلروفیل a با فلاونوئید کل، کلروفیل b و رشد شاخه همبستگی مثبت معنی‌داری وجود داشت اما با فرپ، وزن خشک گل، تعداد گل، آنتوسیانین و فنول کل همبستگی منفی داشت. فرپ با وزن خشک گل، رشد شاخه و فنول کل همبستگی مثبت و با تعداد گل همبستگی منفی معنی‌دار داشت. همچنین بین تعداد گل با آنتوسیانین و فنول کل رابطه مثبت معنی‌داری مشاهده شد.

جدول ۴- مقایسه میانگین قطر ناحیه مهار عصاره دو رنگ مختلف گل گلنار فارسی بر برخی میکروارگانیسم‌ها به روش نفوذ چاهکی

Table 4. Means comparison of inhibition zone diameter of two different flower colors extracts of *Punica granatum* var. *pleniflora* on some microorganisms by well diffusion method

Microorganism	Inhibition zone diameter (mm) (Mean ± Standard deviation)				
	0	Ciprofloxacin (mg.mL^{-1})	Cefixime (mg.mL^{-1})	Red flower (mg.mL^{-1})	Variegated flower (mg.mL^{-1})
Escherichia coli	0^{e}	26.1± 0.43^{b}	27.56± 0.66^{a}	17.76± 0.35^{c}	.5± 0.55^{d}
Staphylococcus aureus	0^{e}	28.12± 0.24^{a}	19.46± 0.25^{b}	16.6± 0.72^{c}	17.4± 0.43^{c}

In each column, means with common letter are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۳- تأثیر عصاره گل گلنار فارسی بر رشد میکروارگانیسم‌ها به روش نفوذ چاهکی

Figure 3. Effects of *Punica granatum* var. *pleniflora* flower extracts on microorganisms growth by well diffusion method

جدول ۵- همبستگی صفات گلنار فارسی تحت تأثیر محلول‌پاشی اسیدهای آمینه

Table 5. Traits correlation in *Punica granatum* var. *pleniflora* affected by amino acids foliar application

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1-Chlorophyll ***a***	1								
2-Flavonoids content	0.13**	1							
3-Chlorophyll ***b***	0.5**	0.71**	1						
4-FRAP	-0.18*	0.46**	-0.22**	1					
5-Flower dry weight	-0.36*	0.31**	-0.10*	0.49*	1				
6-Shoot length growth	0.13*	0.51*	0.24**	0.44**	0.68*	1			
7-Number of flowers	-0.13**	-0.34*	-0.18**	-0.29*	-0.24**	0.02*	1		
8-Anthocyanins	-0.13**	-0.69**	-0.80*	0.17**	0.23**	0.02	0.28**	1	
9-Phenols content	-0.39**	-0.33	-0.46*	0.08	0.02**	-0.14**	0.14	0.44	1

* and **: significant at 1 and 5% probability levels, respectively.

بحث

نتایج نشان داد کاربرد اسیدهای آمینه رشد شاخه‌ها را به‌طور معنی‌داری بهبود می‌بخشد. تأثیر مثبت رشدی اسید آمینه‌ها بر عملکرد گیاهان احتمالاً به‌دلیل اثر تحریک‌کنندگی آنها بر رشد سلول‌های گیاه است و این اثر مثبت به دلیل فراهم شدن منبع کربن و انرژی برای تولید کربوهیدرات در داخل گیاه است. همچنین نقش غیرمستقیم تریپتوفان روی رشد می‌تواند به‌دلیل اثر بر سنتز اکسین باشد (Nahed *et al.*, 2010). به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که فراهم بودن اسیدهای آمینه در مراحل آغازین رشد، طویل شدن بخش‌های هوایی گیاه را افزایش می‌دهد. نتایج مشابهی نیز در افزایش چشمگیر ارتفاع گیاه کرفس وحشی در اثر محلول‌پاشی گیاه با اسیدهای آمینه مشاهده شده است (Shehata *et al.*, 2011). نتایج مطالعه روی گلنار فارسی نشان داد استفاده از اسیدهای آمینه می‌تواند تأثیر مثبتی بر روی وزن خشک گل‌ها داشته باشد. اسیدهای آمینه نقش مهمی در متابولیسم گیاهان و جذب پروتئین برای تشکیل سلول دارند و باعث افزایش ماده تر و خشک گیاه می‌شوند (Reham *et al.*, 2016). در مطالعات انجام شده توسط Karima و همکاران (۲۰۰۵) نیز اشاره شده است که وزن تر و خشک گیاه در بابونه آلمانی با استفاده از اسید آمینه فنیل‌آلانین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین کاربرد تریپتوفان به‌منظور بهبود رشد و افزایش عملکرد محصولات مختلف گزارش شده است (Mustafa *et al.*, 2018). در تحقیقی دیگر، استفاده از اسید آمینه تریپتوفان باعث افزایش وزن تر و خشک در نوعی گزنه شد (Wahba *et al.*, 2015). همچنین تحقیق بر روی تاتوره مشخص کرد که فنیل‌آلانین وزن خشک و تر گیاه را طی رشد رویشی و مرحله گلدهی افزایش می‌دهد (Youssef *et al.*, 2004). بنابراین با توجه به نتایج سایر محققان، کاربرد اسیدهای آمینه در بیشتر گیاهان زراعی و باغی باعث افزایش وزن خشک می‌شود که با نتایج تحقیقات ما همخوانی دارد. به‌طور کلی افزایش محلول‌پاشی با اسیدهای آمینه متیونین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین باعث افزایش رشد شاخه‌ها و تعداد گل‌ها شد. در تحقیقات محققان دیگر نیز نشان داده شده است که کاربرد اسیدهای آمینه به‌صورت محلول‌پاشی برگی موجب افزایش رشد گیاه، عملکرد میوه و شاخص‌های فیتوشیمیایی میوه می‌شود (Awad *et al.*, 2007). همچنین

در دیگر گزارش‌ها بیان شده است که محلول‌پاشی با اسید آمینه افزایش تعداد گل در بومادران (El-Din & El-Wahed, 2005)، گوجه‌فرنگی (Neeraja *et al.*, 2005) و گل میمون (Nahed *et al.*, 2009) را به‌همراه داشته است که با نتایج این پژوهش همسو می‌باشد. با توجه به نتایج این‌گونه می‌توان استدلال کرد که اسید آمینه متیونین نسبت به فنیل‌آلانین و تریپتوفان اثر مثبت و به‌سزایی را در میزان کلروفیل a داشته است. براساس تحقیقات Faten و همکاران (۲۰۱۰) اسیدهای آمینه به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم در فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه اثر گذاشته و به افزایش کلروفیل در گیاه کمک می‌کند. پژوهشگران بیان کردند که تیمارهای اسیدهای آمینه در دو فصل متوالی باعث افزایش میزان کلروفیل a در برگ گیاه توت‌فرنگی شد (Gharib *et al.*, 2011). کلروفیل، پیوسته در حضور نور سنتز می‌شود و از بین می‌رود و طبق نتایج محققان محتوای کلروفیل، به‌منظور بهبود حداکثر جذب فوتون در وضعیت‌های محیطی مختلف تغییر می‌کند. همچنین شدت‌های مختلف نور بر متابولیسم ترکیب‌های فنولی مانند آنتوسیانین‌ها مؤثرند (Hatamian *et al.*, 2014). همچنین محققان در گزارشی بیان کردند که توسعه رنگ‌دانه‌های سلول با بالا رفتن میزان کربوهیدرات‌ها نسبت مستقیم داشته و هر عاملی که بتواند روی افزایش، جذب یا ساخته‌شدن قندها مؤثر باشد، باعث تغییر رنگ دانه در گیاه می‌شود (Pinton *et al.*, 1999). در نتیجه با توجه به کاهش کلروفیل b و مشاهده افزایش معنی‌دار آنتوسیانین ممکن است کلروفیل b به رنگ‌دانه‌های غیر فتوسنتزی مانند آنتوسیانین‌ها تبدیل شده باشد (Edreva, 2005).

گیاهان مقادیر متنوعی از مشتقات فنولی دارند. این مواد شامل فنول‌های ساده و فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنان و لیگنین هستند، تمام این مواد از فنیل‌آلانین و در بعضی از گونه‌ها از تیروزین مشتق می‌گردند. اسید آمینه فنیل‌آلانین در مسیرهای بیوسنتز متابولیسم ثانویه دخیل بوده و پیش‌ماده سنتز ترکیب‌های فنولی با استفاده از آنزیم است که فنیل‌آلانین را کاتالیز کرده و سینامیک اسید تولید می‌کند و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنولی می‌شود (Teixeira *et al.*, 2017). با توجه به نتایج بیشترین میزان فلاونوئید در ۲ میلی‌مولار تریپتوفان بدست آمد که افزایش ۵/۵ درصدی نسبت به شاهد از خود نشان داد. تریپتوفان در گیاهان نه تنها از اجزای ضروری برای سنتز پروتئین است، بلکه به‌عنوان پیش‌ساز بیوسنتزی برای تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهان مهم‌اند (Tzin & Galili, 2010). تریپتوفان به‌عنوان پیش‌سازی برای ساختار فلاونوئید به حساب می‌آید (Ahmed *et al.*, 2011). بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)، با مقدار ۱۰۷/۶۹ میلی‌گرم بر گرم خشک گیاه در غلظت ۲ میلی‌مولار تریپتوفان بدست آمد که حکایت از افزایش ۱۱۰ درصدی نسبت به شاهد بود. نتایج بدست آمده به‌دلیل استفاده از اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین و تریپتوفان می‌باشد که به‌عنوان پیش‌ماده برای سنتز آنتوسیانیدین (ساختار فلاونوئید) می‌باشد و باعث افزایش آنتوسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (Ahmed *et al.*, 2011). در گیاهان رابطه‌ای مثبت و قوی بین محتوای فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است که به‌نظر می‌رسد در بسیاری از گونه‌های گیاهی این رابطه برقرار باشد (Ghasemzadeh *et al.*, 2012). به‌طوری که عصاره نعنا ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی بالایی دارد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را نیز نشان می‌دهد (Swetie *et al.*, 2007). گیاهان سیستم‌های سلولی خود را از تأثیرات گونه‌های اکسیژن فعال به‌وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دفاعی مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند ترکیب‌های فنیل پروپانوییدی

محافظت می‌کنند (Ahmad *et al.*, 2018). همچنین تأثیر مثبت تریپتوفان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) مطابق با این پژوهش توسط Mervat و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شده است. بیشترین میزان آنتوسیانین، با افزایش ۵۶/۰۵ و ۵۰ درصدی به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین و ۱ میلی‌مولار تریپتوفان نسبت به شاهد مشاهده شد. طبق تحقیقات Zamani و همکاران (۲۰۱۱)، مصرف اسیدهای آمینه تأثیر زیادی در جلوگیری از تخریب بیولوژیکی آنتوسیانین و سایر رنگ‌دانه‌های گیاهی دارد. اسید آمینه فنیل‌آلانین یک مولکول نیتروژن‌دار است که از اسیدهای آمینه ضروری در گیاهان محسوب می‌شود و به‌عنوان پیش‌ساز فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در تولید ترکیب‌های فنولی ازجمله انواع آنتوسیانین نقش مهمی بر عهده دارد (Garde-Cerdán *et al.*, 2014). طبق یافته‌های محققان محلول‌پاشی برگی فنیل‌آلانین سبب افزایش بیوسنتز بیشتر آمینواسیدها و ترکیب‌های آنتوسیانین در انگور شده است (Portu *et al.*, 2015). همچنین نتایج محققان دیگر روی توت‌فرنگی (Gharib *et al.*, 2011) و کدو حلوایی (Abd El-Ahl *et al.*, 2010) در مورد افزایش آنتوسیانین با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. با توجه به نتایج بدست آمده و اثبات خواص ضد باکتریایی عصاره الکلی گلنار فارسی، احتمال می‌رود که این گیاه فعالیت ضد باکتریایی خود را از طریق آسیب به غشاء سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌ها اعمال می‌کند. عصاره از غشاء سیتوپلاسمی عبور کرده و سبب ایجاد اختلال در ساختار لیپیدی غشاء و تغییر در نفوذپذیری آن و فرایندهای غشائی می‌گردد (Stanković *et al.*, 2016). نفوذپذیر کردن غشاء سبب افزایش نشت پروتون از سلول، اختلال در ظرفیت الکتریکی غشاء و نیروی حرکتی پروتون می‌شود و درنهایت سنتز آدنوزین تری‌فسفات (ATP) را کاهش می‌دهد (Baser *et al.*, 2008). شاید بتوان بروز اثرهای ضد باکتریایی در عصاره گیاه مورد مطالعه در این تحقیق را به ترکیب‌های پلی‌فنولی آن نسبت داد. وجود این ترکیب‌ها نفوذپذیری غشای سلولی را با مهار آنزیم‌های خاص تغییر می‌دهد و از طریق این سازوکارها می‌تواند تأثیر ضد میکروبی خود را اعمال کند (Asdagh & Pirsa, 2020؛ Hassoun *et al.*, 2020). در مطالعات مختلف و مشابه نیز اثر ضد باکتریایی گیاهان مختلف، ازجمله گزنه بر باکتری استافیلوکوکوس به‌خوبی نشان داده شده است (Proestos *et al.*, 2006).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که براساس نتایج این تحقیق، بهترین نقطه استخراج برای گلنار، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۵ دقیقه و نسبت ماده خشک گیاه به اتانول ۰/۲ گرم در هر ۱۰ میلی‌لیتر بدست آمد. علاوه بر تأیید فعالیت ضد باکتریایی گلنار فارسی مشخص شد که بیشترین قدرت مهارگری در برابر باکتری اشریشیاکلی مربوط به گل قرمز و بیشترین قدرت مهارگری، در برابر استافیلوکوکوس‌اورئوس مربوط به گل ابلق بود. سطوح ۰/۵ میلی‌مولار اسیدهای آمینه در بیشتر صفات شامل رشد شاخه، وزن خشک گل، فنل کل و آنتوسیانین بهترین نتایج را به‌همراه داشت که تیمار آنها در مزرعه را نیز توجیه می‌کند. با توجه به اینکه کشاورز برای محلول‌رسانی به محصول خود از حدود ۵ تا ۷ لیتر در هر هکتار از کودهای اسید آمینه استفاده می‌کند، این مقدار در مقایسه با دیگر کودها که به میزان‌های بسیار زیادی مصرف می‌شود مقدار کمتری است و از این جهت نیز توجیه اقتصادی مطلوبی دارد.

References

- Abd El-Aal, F.S., Shaheen, A.M., Ahmed, A.A. and Mahmoud, A.R., 2010. Effect of foliar application of urea and amino acids mixtures as antioxidants on growth, yield and characteristics of squash. Journal of Agriculture and Biological Scienc, 6(5): 583-588.
- Ahmad, P., Alyemeni, M.N., Ahanger, M.A., Egamberdieva, D., Wijaya, L. and Alam, P., 2018.

Salicylic acid (SA) induced alterations in growth, biochemical attributes and antioxidant enzyme activity in faba bean (*Vicia faba* L.) seedlings under NaCl toxicity. Russian Journal of Plant Physiology, 65: 104-114.
- Ahmed, Y.M., Shalaby, E.A. and Shanan, N.T., 2011. The use of organic and inorganic cultures in improving vegetative growth, yield characters and antioxidant activity of roselle plants (*Hibiscus sabdariffa* L.). African Journal of Biotechnology, 10(11): 1988-1996.
- Ali, K., Khan, S., Khan, N., Khan, W., Rahman, I.U., Ullah, F. and Nisar, M., 2017. Ethnobotanical and ecological study of Punica granatum in Dir district, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 4(8): 656-661.
- Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy journal, 23(1): 112-121.
- Asdagh, A. and Pirsa, S., 2020. Bacterial and oxidative control of local butter with smart/active film based on pectin/nanoclay/Carum copticum essential oils/ β-carotene. International Journal of Biological Macromolecules, 165: 156-168.
- Aviram, M., Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Kesava, M., Ferreira, D. and Rosenblat, M., 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein edeficient (E o) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. Journal of Agriculture and Food chemistry, 56(3): 1148-1157.
- Awad, E.M., Abd El-Hameed, A.M. and Shall, Z.S., 2007. Effect of glycine, lysine and nitrogen fertilizer rates on growth, yield and chemical composition of potato. Mansoura University Journal of Agriculture Sciences, 32(10): 8541-8551.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. Journal of pharmaceutical analysis, 6(2): 71-79.
- Baser, K.H.C., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Journal of Current Pharmaceutical Design, 14: 3106-3119.
- Chakraborthy, G.S., 2008. Analgesic activity of various extracts of *Punica granatum* L. flowers. International Journal of Green Pharmacy (IJGP), 2(3): 145-146.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis, 10(3): 3.
- Edreva, A., 2005. The importance of nonphotosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. Agriculture. Journal of Ecosystems and Environment, 106(1-2): 135-146.
- El-Shabasi, M.S., Mohamed, S.M. and Mahfouz, S.A., 2005. Effect of foliar spray with amino acids on growth, yield and chemical composition of garlic plants. The 6th Arabian Conference for Horticulture, March 20-22, Faculty of Agriculture, Suez Canal University, Ismailia, Egypt.
- El-Din, K.M.G. and El-Wahed, M.S.A.A., 2005. Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. International Journal of Agriculture and Biological Scienc, 7: 376-380.
- Faten, S.A., Shaheen, A.M., Ahmad, A.A. and Mahmoud, A.R., 2010. Effect of foliar application of amino acids as antioxidants on growth, yield and characteristics of squash. Journal of Agriculture and Biological Scienc, 6(5): 583-588.
- Garde-Cerdán,T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I. and Santamaría, P., 2014. Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. Journal of Food chemistry, 163: 136-141.
- Gharib, S.A., El-Mogy, M.M., Gawad, A. and Shalaby, E.A., 2011. Influence of compost, amino and humic acids on the growth, yield and chemical parameters of strawberries. Journal of Medicinal Plants Research, 5(11): 2304-2308.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z. and Karimi, E., 2012. Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger (*Zingiber officinale* R.) varieties. International journal of molecular sciences, 13(11): 14828-14844.
- Hassani Moghadam, E., Shaaban, M. and Sepahvand, A., 2019. Medicinal properties of Pomegranate. Herbal Medicines Journal, 4(3): 127-139.
- Hassoun, A., Carpena, M., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J., Özogul, F., Özogul, Y., Çoban, Ö.E., Gudjónsdóttir, M., Barba, F.J., Marti-Quijal, F.J., Jambrak, A.R., Maltar-Strmečki, N., Kljusurić, J.G. and Regenstein, J.M., 2020. Use of Spectroscopic Techniques to Monitor Changes in Food Quality during Application of Natural Preservatives: A Review. Antioxidants, 9(9): 882.
- Hatamian, M., Arab, M. and Roozban, M.R., 2014. Photosynthetic and nonphotosynthetic pigments of two rose cultivars under different light intensities. Journal of Agricultural crop management, 4(16): 259-270.
- Jaime, A., Silva, T.D., Rana, T.S., Narzary, D., Verma, N., Meshram, D.T. and Ranade, S.A., 2013. Pomegranate biology and biotechnology: a review. Scientia Horticulturae, 160: 85-107.
- Karima, M., Gamal EL-din, 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 Biological Scienc, 3: 376-380.
- Kiaei E, Mazandarani M, Ghaemi E. 2010. Antibacterial activity of 7 species of medicinal plants on bacteria isolated from UTI patients in Golestan province. Journal of medicinal plants. 2010; 9(34): 74-83.
- Mervat, Sh.S., Salva, A.O. and Bakry, A.B., 2015. Antioxidant properties, secondary metabolites and yield as affected by application of antioxidants and banana peel extract on Roselle plants. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 9(4): 93-104.

- Mustafa, A., Imran, M., Ashraf, M. and Mahmood, K., 2018. Perspectives of using l-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. Pedosphere, 28(1): 16-34.
- Nahed, G.A.A., Lobna, S.T. and Soad, M.I., 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 Science, 2(2): 169-179.
- Nahed, G., Abdel Aziz, A., Mazher, A.M. and Farahat, M.M. 2010. Response of vegetative growth and chemical constituents of *Thuja orientalis* L. plant to foliar application of different amino acids at Nubaria. Journal of American Science, 6(3): 295-301.
- Neeraja, G., Reddy, I. and Gautham, B., 2005. Effect of growth promoters on growth and yield of tomato cv. Marutham. Journal of Research ANGRAU, 33(3): 68-70.
- Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T. and Gil, M.I., 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(22): 8618-8623.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Agnolon, F. and Varanini, Z., 1999. Water extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fedeficient cucumber plants. Journal of Plant and Soil, 210: 145-157.
- Portu, J., Gonzalez-Arenzana, L., Hermosin-Gutierrez, I., Santamaria, P. and Garde-Cerdan, T., 2015. Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. Journal of Food Chemistry, 180: 55-63.
- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, J.E. and Komaitis, M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Journal of Food Chemistry, 95: 664-671.
- Reham, M.S., Khattab, M.E., Ahmed, S.S. and Kandil, M.A.M., 2016. Influence of foliar spray with phenylalanine and nickel on growth, yield quality and chemical composition of genoveser basil plant. African Journal of Agricultural Research, 11(16): 1398-1410.
- Rezakhani, A. and Hadi, M.R.H.S., 2017. Effect of manure and foliar application of amino acids on growth characteristics, seed yield and essential oil of coriander (*Coriandrum sativum* L.). Iranian Journal of Field Crop Science, 48(3): 777-786.
- Shehata, S.M., Abdel-Azem, H.S., El-Yazied, A.A. and El-Gizawy, A.M., 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.
- Singh, R., Singh, S., Kumar, S. and Arora, S., 2007. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Journal of Food and chemical toxicology, 45(7): 1216-1223.
- Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J. and Bernstein, N., 2016. Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula. NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences, 78: 21-28.
- Swetie, R., Raesh, Ch. and Arun, S., 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha Spicata* L.) in radiationprocessed lamb meat. Journal of Food Chemistry, 100(2): 451-458.
- Syed, D.N., Afaq, F and Mukhtar, H., 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. Phytonutrients, 17: 377-385.
- Tasdelen, F.N., Tanriverdi, C.Y., Coban, A.Y., Ozatli, D., Tanyel, E., Durupinar, B. and Tulek, N., 2009. Antimicrobial activity of plant extracts Ankaferd Blood Stopper. Fitoterapia, 80(1): 48-50.
- Teixeira, W.F., Fagan, E.B., Soares, L.H., Soares, J.N., Reichardt, K. and Neto, D.D., 2018. Seed and foliar application of amino acids improve variables of nitrogen metabolism and productivity in soybean crop. Frontiers in Plant Science, 9: 396.
- Tzin, V. and Galili, G., 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists, 8p.
- Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A. and Arsić, A., 2019. Composition and potential health benefits of pomegranate: a review. Current pharmaceutical design, 25(16): 1817-1827.
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acid, and anthocyanins in protoplast. Journal of Plant physiology, 64: 88-93.
- Wahba, H.E., Motawe, H.M. and Ibrahim, A.Y., 2015. Growth and chemical composition of *Urtica pilulifera* L. plant as influenced by foliar application of some amino acids. Journal of Materials Environmental Science, 6(2): 499-506.
- Youssef, A.A., Khattab, M.E. and Omer, E.A., 2004. Effect of spraying of molybdenum and tyrosine on growth, yield and chemical composition of lemon basil plant. Egyptian Pharmaceutical Journal, 3(2): 87-106.
- Zamani, S., Kazemi, M. and Aran M., 2011. Postharvest life of vut rose flowers as effected by salicylic acid and glutamin. World Applied Science Journal, 12(9): 1621-1624.