DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2012.2943

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۴۲۲-۴۱۱ (۱۳۹۱)

تغییرات وزن خشک و تعیین میزان کلشی‌سین طی مراحل مختلف نموی در دو گونه سورنجان بومی ایران (*Colchicum kotschyi* Boiss. و *Colchicum robustum* Stefanov)

مرتضی علیرضایی نغندر[1*]، حسین آروئی[2]، شمسعلی رضازاده[3]، محمود شور[2] و رحیم تقی‌زاد فرید[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیک: mortezaalirezaie@yahoo.com
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج
٤- کارشناس ارشد، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۰

چکیده

جنس کلشیکوم (*Colchicum* L.) به علت تولید کلشی‌سین شناخته شده است و چندین گونه از آن در نقاط مختلف ایران به صورت خودرو رشد می‌کنند. سطوح کلشی‌سین در طی رشد و نمو و در گونه‌های مختلف، متغیر است. به منظور تعیین میزان کلشی‌سین و درصد وزن خشک، طی مراحل مختلف نموی در دو گونه سورنجان بومی ایران (*Colchicum kotschyi* Boiss. و *C. robustum* Stefanov)، کورم‌ها و بذرهای هر دو گونه طی فصول مختلف (بهار، تابستان، پاییز و زمستان) در سالهای ۱۳۸۹-۱۳۸۸ از عرصه جمع‌آوری شدند و میزان کلشی‌سین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان کلشی‌سین کورم در هر دو گونه در برداشت پاییزه (در زمانی نزدیک به آغاز فعالیت ریشه) با میزان ۰/۰۷۷ w/w٪ و ۰/۰٤۹ w/w٪ به‌ترتیب در *C. kotschyi* و *C. robustum* مشاهده شد. کمترین میزان کلشی‌سین کورم در *C. kotschyi* در برداشت تابستان (قبل از شروع گلدهی) و در *C. robustum* در برداشت زمستان (همزمان با گلدهی و شروع رشد رویشی) به‌ترتیب با میزان ۰/۰۰۵۸ w/w٪ و ۰/۰۰۷۵ w/w٪ وزن خشک بدست آمد. میزان کلشی‌سین بذر در *C. robustum* و *C. kotschyi*، به‌ترتیب ۰/۱۲۸ w/w٪ و ۰/۰٤٦۲ w/w٪ وزن خشک بدست آمد. بیشترین و کمترین درصد وزن خشک کورم در هر دو گونه به‌ترتیب در برداشت تابستان و زمستان حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: کلشی‌سین، *Colchicum* L.، مراحل نموی، تغییرات فصلی.

مقدمه

جنس کلشیکوم (*Colchicum*) متعلق به خانواده Colchicaceae است و بالغ بر ۱۰۰ گونه از این جنس در جهان وجود دارد (Santavy *et al*., 1982). این گیاه در ایران به سورنجان یا گل حسرت شهرت یافته است و رشد بیش از ۱۵ گونه آن در ایران گزارش شده است (Persson,

1992). کلشیکوم بیش از سه هزار سال است که به‌عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Komjatayova *et al*., 2000). طی قرنهای اخیر کورمها و بذرهای سورنجان در درمان آسم، رماتیسم، اسهال خونی و نقرس حاد بکار می‌رفتند. ماده مؤثره اصلی این جنس از نوع آلکالوئید می‌باشد که آلکالوئید اصلی آن کلشی‌سین است و در تمام قسمتهای گیاه مانند کورم، بذر، برگ و گل وجود دارد، اما بذرها و کورمها حاوی مقادیر بیشتری کلشی‌سین می‌باشند. علاوه بر جنس کلشیکوم، کلشی‌سین از دیگر جنس‌های خانواده Colchicaceae مانند *Merendera* و *Glorisa* نیز گزارش شده است (Nordenstam, 1998). کلشی‌سین که اولین بار در سال ۱۸۲۰ جداسازی و شناسایی شد (Pelletier & Caventou, 1820) عمدتاً از منابع گیاهی بدست می‌آید، زیرا تولید آن به روش سنتز شیمیایی اقتصادی نمی‌باشد (Poutareaud & Champay, 1995). در پزشکی مدرن خواص شناخته شده کلشی‌سین شامل اثرهای متوقف‌کننده سرطان، ضد رماتیسم، ضد التهاب، مسهل، قی‌آور، درمان اختصاصی نقرس حاد (Boye & Katzung, 2004؛ Kaplan *et al*., 1999؛ Brossi, 1992) و بیماری تب مدیترانه‌ای خانوادگی (Cerquaglia *et al*., 2005) می‌باشد. همچنین در به‌نژادی گیاهان به منظور القاء پلی‌پلوئیدی کاربرد گسترده‌ای دارد. گونه‌های مختلف جنس کلشیکوم از لحاظ زمان گلدهی، شروع رشد رویشی و میزان کلشی‌سین تفاوتهای بسیاری دارند. در برخی گونه‌ها مانند *C. asteranthum* (Vassiliades & Persson, 2002) و *C. chimonanthum* (Persson, 1999b) رشد رویشی همزمان با ظهور گل و در اوایل زمستان اتفاق می افتد و در گونه‌ی *C. boissieri* برگها همزمان با گلها و در پاییز ظاهر می‌شوند (Vassiliades & Persson, 2002).

تعیین زمان شروع هر کدام از مراحل نموی در جنس کلشیکوم، بدلیل اینکه میزان کلشی‌سین در قسمتهای مختلف گیاه در طول مراحل رشدی مختلف به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای متفاوت است (Vicar *et al*., 1993؛ Alali *et al*., 2006)، اهمیت زیادی می‌یابد. با مروری در منابع می‌توان دریافت که میزان کلشی‌سین در این گیاه به گونه، نوع اندام مورد استفاده، زمان برداشت ، شرایط محیطی و ترکیب عناصر غذایی خاک (Poutaraud & Girardin, 2003) بستگی دارد. به‌عنوان مثال نشان داده شده که گونه‌های مختلف از لحاظ میزان کلشی‌سین متفاوتند، برخی از گونه‌ها همچون *C. autumnale* (Samuelsson, 1992)، *C. hierosolymitanum* و *C. steveni* (Alali *et al*., 2004) به‌عنوان منابعی غنی از کلشی‌سین شناخته شده‌اند و در برخی مقادیر کلشی‌سین ناچیز می‌باشد. در میان گونه‌های مختلف کلشیکوم، *C. autumnale* بهترین منبع کلشی‌سین است، به‌طوری که بذرها و کورم‌ها به‌ترتیب حاوی ۱/۲–۰/٦٪ و ۰/٦٪ کلشی‌سین هستند (Trease & Evas, 1989). کورمهای ۷ گونه کلشیکوم به نامهای *C. macrophyllum*، *C. turcicum*، *C. cilicicum*، *C. kotschyi*، *C. bornmuelleri*، *C. speciosum* و *C. triphyllum* که در ترکیه رشد می‌کنند، به منظور تعیین میزان آلکالوئیدهای کلشی‌سینوئیدشان مورد بررسی قرار گرفتند و میزان کلشی‌سین در کورم این چند گونه، به‌ترتیب ۰/۰۵، ۰/۰٤، ۰/۰۲، ۰/۰٤، ۰/۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۱ درصد در واحد وزن خشک بدست آمد (Ondra *et al*., 1995). میزان کلشی‌سین در اندامهای مختلف گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در C. *stevenii* کورمها، گلها و برگها به‌ترتیب حاوی ۰/۱۷، ۰/۱۲ و ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین بودند، در حالی‌که در *C. hierosolymitanum* کورمها و گلها به‌ترتیب

حاوی ۰/۱۳ و ۰/۰۹ ٪ کلشی‌سین بودند (Alali *et al*., 2004) و در *C. cilicicum* میزان کلشی‌سین در کورم، ساقه، برگ و گل به‌ترتیب ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۲ درصد وزن خشک بدست آمد (Sütlüpinar *et al*., 1988). همچنین نشان داده شده که میزان کلشی‌سین در فصول مختلف و در اندامهای مختلف گیاه، متفاوت است. در بررسی روند تغییرات فصلی میزان کلشی‌سین در دو گونه *C. brachyphyllum* و *C. tunicatum* نشان داده شد که در گونه‌ی *C. tunicatum*، ساقه‌ها، ریشه‌ها و بذرهای نارس، به‌ترتیب در مراحل گلدهی، رشد رویشی و تشکیل بذر منابع اصلی کلشی‌سین به‌ترتیب با میزان ۰/۱۶، ۰/۱۶ و ۰/۱۶ درصد وزن خشک بودند، در حالی‌که در گونه *C. brachyphyllum*، کورمها منابع عمده کلشی‌سین با میزان ۰/۱۷ و ۰/۱۹ درصد وزن خشک، به‌ترتیب در مراحل گلدهی و تشکیل دانه بودند (Alali *et al*., 2006). مرور کلی نتایج ذکر شده رابطه یکسان و دقیقی را بین میزان کلشی‌سین با مراحل نموی در گونه‌های مختلف جنس کلشیکوم نشان نمی‌دهد. هدف از انجام این آزمایش، بررسی رابطه بین تغییرات میزان کلشی‌سین و درصد وزن خشک کورم با مراحل مختلف نموی در دو گونه سورنجان بومی ایران بود.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و ثبت مراحل نموی

کورمهای دو گونه سورنجان بومی ایران (*Colchicum kotschyi* Boiss. و *C. robustum* Stefanov) از دو ناحیه رویشگاهی مختلف (کورمهای *C. kotschyi* از منطقه‌ی نغندر در حوالی شهر مشهد واقع در استان خراسان رضوی و کورمهای *C. robustum* از ناحیه بابا امان در نزدیکی شهر بجنورد واقع در استان خراسان شمالی) در چند نوبت و همزمان با شروع هر کدام از مراحل نموی، طی سالهای ۸۸-۸۹ جمع‌آوری شده و توسط کارشناس گیاه‌شناسی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شدند (نمونه‌های هرباریومی *C. robustum* و *Colchicum kotschyi* به‌ترتیب تحت شماره هرباریومی ۳۹۵۱۹ و ۳۹۵۱۶ در هرباریوم FUMH نگهداری می‌شوند). مختصات جغرافیایی و ویژگی‌های اقلیمی هر دو ناحیه رویشگاهی نغندر و بابا امان به‌ترتیب، از سایت جهاد کشاورزی استان خراسان رضوی و سایت هواشناسی استان خراسان شمالی استخراج شد که در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- اطلاعات اقلیمی مربوط به نواحی رویشگاهی دو گونه سورنجان (*Colchicum kotschyi* و *C. robustum*) مورد مطالعه در این آزمایش

مناطق	میانگین درجه حرارت (°C)	میانگین بارندگی سالانه (mm)	درصد رطوبت نسبی	ارتفاع از سطح دریا (m)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
نغندر (رویشگاه)	۱۱/۵	-	۶۱	۱۴۰۰	۳۶′ ۲۲°	۵۹′ ۱۷°
بابا امان (رویشگاه)	۱۲/۷	۲۶۹/۱	۵۸	۱۰۹۱	۳۷′ ۲۹°	۵۷′ ۲۶°

همچنین به منظور مطالعه‌ی چرخه‌ی نموی گیاه و ثبت زمان شروع هر کدام از مراحل نموی هر دو گونه در شرایط عرصه، تعداد ٦ مرتبه بازدید در زمانهای مختلف طی دوره‌ای یکساله از هر دو ناحیه‌ی رویشگاهی بعمل آمد. به‌طور کلی هر مرحله‌ی رشدی زمانی ثبت می‌شد که حداقل ۵۰٪ بوته‌ها وارد آن مرحله شده باشند (جدول ۲).

توزین و عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی بلافاصله پس از برداشت، تمیز و خرد شده و بعد در دمای اتاق خشک شدند. وزن تر و خشک و درصد وزن خشک کورمها در ٦ زمان برداشت مختلف (اردیبهشت، خرداد، تیر، مرداد، مهر و بهمن) در هر دو گونه با سه تکرار بدست آمد. عصاره‌گیری از نمونه‌ها و تعیین میزان کلشی‌سین در عصاره‌ها، در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی انجام شد. به منظور عصاره‌گیری و تعیین میزان کلشی‌سین، از هر گونه چهار نمونه کورم (کورمهای برداشت شده در ماههای اردیبهشت، مرداد، مهر و بهمن) و یک نمونه بذر (جمع‌آوری شده در هنگام تشکیل بذر در اوایل اردیبهشت) انتخاب شدند. عملیات عصاره‌گیری و استخراج مطابق با روش توضیح داده شده در منابع انجام شد (Alali *et al*., 2006). روش کار به این صورت بود که ابتدا نمونه‌های خشک شده، آسیاب شدند و از هر نمونه پودر شده ۲ گرم وزن کرده و داخل ارلن ml ۲۵۰ ریخته شد. به هر ارلن ml ۱۰۰ متانول اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد، سپس مخلوط مورد نظر صاف شده و پودر روی صافی ۲ بار هر بار با ۵ میلی‌لیتر متانول شسته شد. پودر روی صافی دوباره به ارلن مایر منتقل گشت و این بار ۵۰ml متانول به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مجدداً سونیکات شد و دوباره مخلوط صاف شده و بعد ۲ مرتبه هر بار با ml ۵ متانول شسته شد و به محلول متانولی بدست آمده از مرحله قبل اضافه گردید. محلول حاصل از صاف کردن به قیف دکانتور منتقل شد و به منظور چربی‌زدایی سه مرحله هر بار با ml ۳۰ اتر دوپترول عمل چربی‌زدایی صورت گرفت. برای جداسازی بهتر و ایجاد دو فاز مجزا به محلول ml ۱۰ آب مقطر و ml ۱۰ محلول نمک اشباع اضافه شد. فاز متانولی حاصل به یک دکانتور خالی منتقل شد و ۳ مرتبه و هر بار با ml ۳۰ کلروفرم عمل استخراج صورت گرفت (در این مرحله نیز از محلول نمک اشباع و آب مقطر برای جداسازی و ایجاد فازهای جداگانه استفاده شد). به منظور آبگیری به محلول کلروفرمی، سدیم سولفات انیدر اضافه شد و سپس از کاغذ صافی عبور داده شد و با دستگاه روتاری، حلال (کلروفرم) کاملاً جدا شد و مواد باقیمانده با ml ۵ متانول HPLC جمع‌آوری شد.

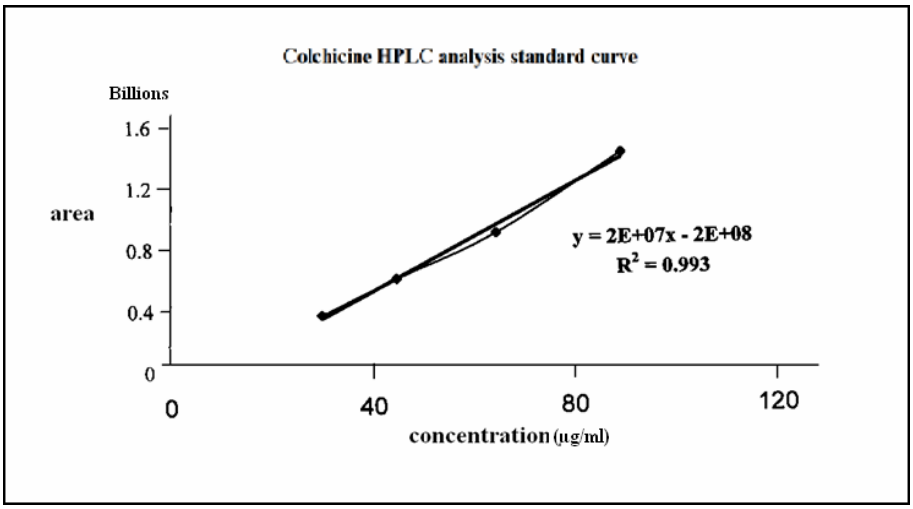
مراحل کار HPLC

به منظور تعیین میزان کلشی‌سین در عصاره آلکالوئیدی، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. مشخصات دستگاه HPLC بکار رفته به صورت زیر است: دستگاه HPLC مدل Knauer، دستگاه گاززدا degasser knauer، پمپ HPLC pump K-1001، دستگاه تزریق اتوماتیک Auto smaller knauer و دستگاه چمبر Dynamic mixing chamber. فاز متحرک بکار برده شده شامل بافر فسفات و استونیتریل با نسبت (۲۳:۷۷) بود. سرعت جریان حلال (Flow rate)

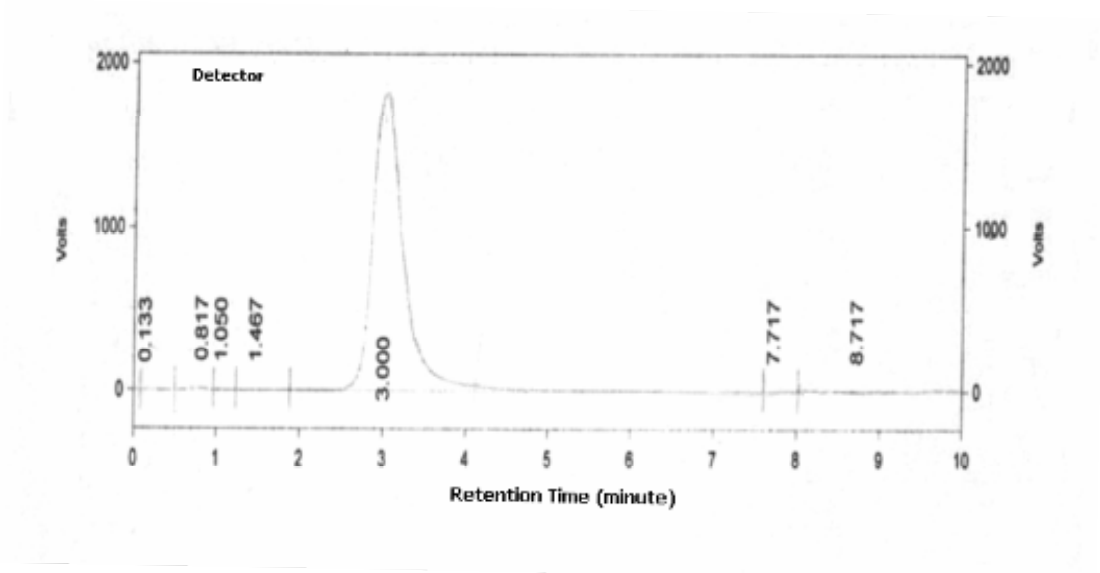
برابر با ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم هر بار تزریق برابر ۵۰ میکرولیتر بود. ستون Bondapck C18 (3.9×300) و آشکارساز ماوراءبنفش با طول موج ۲٤۳ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت.

رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد آلکالوئید کلشی‌سین

برای تهیه غلظت‌های استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون، ابتدا ۱۰ mg از استاندارد کلشی‌سین وزن کرده، سپس با متانول به حجم ۱۰ ml رسانده شد. از روی این محلول غلظتهای استاندارد ۳۰، ۵۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ µg/ml بدست آمد. با توجه به غلظت و سطح زیر منحنی پیک‌های حاصل از کروماتوگرام‌های بدست آمده از HPLC، منحنی کالیبراسیون برای کلشی‌سین رسم شد (شکل ۱). نمودار کروماتوگرام کلشی‌سین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۱- منحنی کالیبراسیون غلظت در برابر سطح زیر منحنی کلشی‌سین



شکل ۲- کروماتوگرام کلشی‌سین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز تجزیه واریانس و آزمون مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵٪ (برای داده‌های مربوط به درصد وزن خشک) با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام شد. ترسیم نمودارها و جدول‌ها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

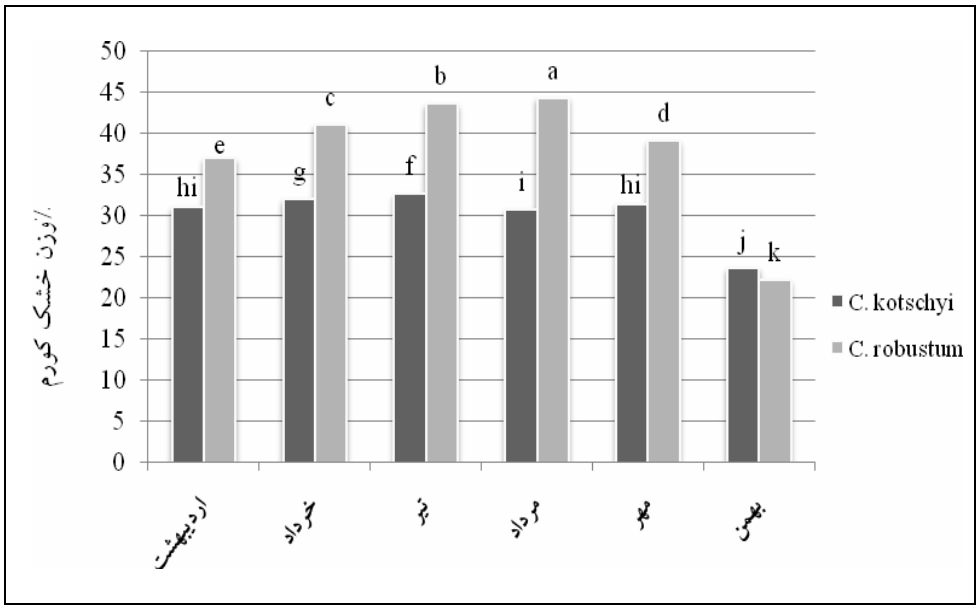
نتایج حاصل از مشاهدات و ثبت هر کدام از مراحل نموی در شرایط عرصه نشان داد که بین دو گونه در زمان گلدهی اختلاف زیادی وجود دارد، به نحوی که در گونه‌ی *C.kotschyi* گلدهی از اواخر تابستان شروع شد و تا اواسط مهر ادامه داشت و رشد رویشی در اواسط زمستان آغاز شد، اما گلدهی در گونه‌ی *C. robustum* تقریباً همزمان با رشد رویشی از اوایل زمستان آغاز شد و تا اواخر بهمن تداوم داشت (جدول ۲). تشکیل ریشه‌ها در هر دو گونه در فصل پاییز اتفاق افتاد و کپسول‌های حاوی بذر در *C.kotschyi* و *C. robustum* به‌ترتیب در اول و آخر فروردین‌ماه ظاهر گشتند و کورمهای دختری در هر دو گونه در اردیبهشت ماه تشکیل شدند (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌های مربوط به درصد وزن خشک کورم (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵٪) نشان از تفاوت معنی‌دار بین برداشت‌های مختلف و نیز بین دو گونه داشت (شکل ۳). بیشترین درصد وزن خشک کورم در هر دو گونه در برداشت مربوط به تیرماه با میزان ۴۳/۳۸ و ۳۲/۵۵ درصد و کمترین درصد وزن خشک کورم در برداشت مربوط به بهمن‌ماه با میزان ۲۲/۱٪ و ۲۳/۶٪ به‌ترتیب برای *C. robustum* و *C.kotschyi* بدست آمد. درصد وزن خشک کورم *C. robustum* در تمامی برداشت‌ها بجز برداشت بهمن ماه نسبت به *C.kotschyi* بیشتر بود (شکل ۳). دو گونه از نظر میزان کلشی‌سین تفاوت نشان دادند، ولی بیشترین میزان کلشی‌سین کورم در هر دو گونه در برداشت پاییزه حاصل شد که این میزان در *C. kotschyi* و *C. robustum* به‌ترتیب با میزان (w/w) ۰/۰۷۷٪ و (w/w) ۰/۰۴۹٪ وزن خشک بود (جدول ۳).

جدول ۲- زمان شروع هر کدام از مراحل نموی در شرایط رویشگاهی دو گونه سورنجان (*Colchicum kotschyi* و *C. robustum*)

گونه	مراحل مختلف نموی					
	تشکیل کورم دختری	میوه‌دهی و تشکیل کپسول	آغاز رشد رویشی	تشکیل ریشه	اوج گلدهی	شروع گلدهی
C. kotschyi	اواسط اردیبهشت	۳ فروردین	۱۵ بهمن	۱۰ آبان	۱۳ مهر	۲۳ شهریور
C. robustum	اواخر اردیبهشت	۳۰ فروردین	۲۰ بهمن	۲۰ آذر	۳۰ بهمن	۷ بهمن

کمترین میزان کلشی‌سین در *C. kotschyi* در برداشت تابستان (قبل از شروع گلدهی) و در *C. robustum* در برداشت زمستان (همزمان با گلدهی و شروع رشد رویشی) به‌ترتیب با میزان (w/w) ۰/۰۰۵۸٪ و (w/w) ۰/۰۰۷۵٪ وزن خشک بدست آمد (جدول ۳). میزان کلشی‌سین بذرها در برداشت بهار، ۰/۰٤٦۲ و ۰/۱۲۸٪ وزن خشک به‌ترتیب برای *C. kotschyi* و *C. robustum* بدست آمد، در حالی‌که در همین زمان میزان کلشی‌سین در کورمهای *C. kotschyi* و *C. robustum* به‌ترتیب ۰/۰٥٤۰ و ۰/۰۲۱٪ وزن خشک بود (جدول ۳).



شکل ۳- میانگین درصد وزن خشک کورم در دو گونه سورنجان (*C. kotschyi* و *C. robustum*) طی مراحل مختلف نموی

(مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ٥٪)

جدول ۳- درصد کلشی‌سین در واحد وزن خشک کورم و بذر در دو گونه سورنجان (*C. kotschyi* و *C. robustum*) طی مراحل مختلف نموی (درصد وزنی/ وزنی)

زمان برداشت	*C. kotschyi*		*C. robustum*	
	درصد کلشی‌سین (w/w) وزن خشک[1]		درصد کلشی‌سین (w/w) وزن خشک[1]	
	کورم	بذر	کورم	بذر
تابستان	۰/۰۰٥۸±۰/۰۰۰۳	–	۰/۰۱۳± ۰/۰۰۰۲	–
پاییز	۰/۰۷۷±۰/۰۰۳	–	۰/۰٤۹± ۰/۰۰۰٦	–
زمستان	۰/۰٦۰۳±۰/۰۰۳	–	۰/۰۰۸± ۰/۰۰۰۲	–
بهار	۰/۰٥٤۰±۰/۰۰۳	۰/۰٤٦۲±۰/۰۰٤	۰/۰۲۱± ۰/۰۰۰۳	۰/۱۲۸±۰/۰۰۲

۱- میانگین میزان کلشی‌سین بر حسب درصد وزنی/ وزنی ± انحراف معیار

بحث

مشاهدات انجام شده در شرایط رویشگاه، حکایت از آن دارند که *C. kotschyi* گیاهی پاییز گل و هیسترانتوس (ظهور برگها پس از گلها) می‌باشد، در حالی‌که *C. robustum* گونه‌ای زمستان گل و سینانتوس (ظهور برگها همزمان یا کمی پس از ظهور گل) است. دلیل این امر می‌تواند با خصوصیات ژنتیکی و شرایط آب و هوایی ارتباط داشته باشد. عموماً جنس کلشیکوم (مخصوصاً *C. autumnale* که معروفترین گونه‌ی این جنس است) را با این مشخصه می‌شناسند که ابتدا گلها در پاییز ظاهر می‌شوند و رشد رویشی در اوایل بهار با گرم شدن هوا آغاز می‌شود (Komjatayova *et al*., 2000)، اما گونه‌های زمستان گل یا گونه‌هایی که گلدهی در آنها همزمان با رشد رویشی است، نیز گزارش شده‌اند (Persson, 1999b؛ Vassiliades & Persson, 2002). در جنس کلشیکوم گلدهی به شدت تحت کنترل وراثت است، در حالی که به نظر می‌رسد شروع رشد رویشی تا حد زیادی تحت کنترل شرایط محیطی باشد (Burtt, 1970؛ Gutterman & Boeken, 1988؛ Persson, 1999a). با این‌حال تغییرات حرارتی در طی فصول مختلف نیز می‌تواند به‌عنوان عامل مهم دیگری در کنترل گلدهی کلشیکوم و اغلب گیاهان سوخوار دیگر مطرح باشد (Gutterman, 1989؛ Halevy, 1990).

تغییرات وزن خشک طی مراحل مختلف نموی و نیز بین دو گونه دارای تفاوت معنی‌داری بود. در هر دو گونه حداکثر وزن خشک کورم در برداشت تیرماه، یعنی زمانی که کورمهای دختری جدید حاصل از کورمهای مادری به بلوغ کامل رسیده بودند و در دوره‌ی رکود تابستانه بسر می‌بردند بدست آمد. کورمهای دختری در پایان دوره‌ی رکود تابستانه، خود تبدیل به یک کورم مادری جدید شده و چرخه‌ی زندگی بعدی گیاه را آغاز می‌کنند. کمترین درصد وزن خشک کورم در هر دو گونه در برداشت بهمن ماه، هنگامی که رشد رویشی در هر دو گونه شروع شده بود، مشاهده شد (جدول ۲). درصد وزن خشک کورم در *C. robustum* در تمام دوره‌ها بجز برداشت بهمن ماه نسبت به گونه‌ی *C. kotschyi* بیشتر بود. تحقیقات بر روی گونه‌ی *C. autumnale* نشان داده است که کاهش شدید وزن خشک کورم در این زمان به این دلیل است که تمام مواد غذایی ضروری برای نمو کورم جدید، گل، سیستم ریشه‌ای و تکمیل بخش هوایی آینده، تنها توسط کورم مادری مهیا می‌شود (Frankova *et al*., 2005)، بنابراین کاهش بیشتر وزن خشک کورم در *C. robustum* در برداشت بهمن ماه، احتمالاً به این دلیل است که در این گونه رشد رویشی همزمان با تشکیل گل می‌باشد و مدت کمی پس از آن کپسول‌های حاوی بذر ظاهر می‌شوند که این امر باعث تخلیه‌ی بیشتر مواد غذایی از کورم و به تبع آن کاهش بیشتر درصد وزن خشک کورم نسبت به *C. kotschyi* می‌شود. بتدریج با بلوغ کورم دختری درصد وزن خشک افزایش می‌یابد و مقدار نهایی وزن خشک یک کورم رسیده برابر با آن چیزی است که در شروع چرخه‌ی زندگی سالانه در کورم مادری دیده می‌شود (Frankova *et al*., 2005).

بیشترین میزان کلشی‌سین کورم در هر دو گونه در برداشت پاییزه مشاهده شد که همزمان با اواخر دوره‌ی گلدهی و آغاز تشکیل ریشه‌ها در *C. kotschyi* بود، در حالی‌که در *C. robustum* بجز اینکه کمی پس از این زمان (حدوداً یک ماه بعد در آذرماه) ریشه‌ها ظاهر شدند مرحله‌ی نموی دیگری مشاهده نشد. با این حال موضوع

قابل تأمل این است که حداکثر میزان کلشی‌سین کورم در هر دو گونه در زمانی نزدیک به ظهور ریشه‌ها مشاهده شد. زمان اوج گلدهی (اواخر بهمن) با کمترین میزان کلشی‌سین کورم در *C. robustum* همراه بود، در حالی‌که در *C. kotschyi* حداقل میزان کلشی‌سین در تابستان یعنی زمانی که کورم‌ها در دوره‌ی رکود بسر می‌بردند حاصل شد. اندازه‌گیری کلشی‌سین بذر در فصل بهار نشان داد که میزان کلشی‌سین بذر در *C. robustum*، ٦ برابر غلظت آن در کورم در همان زمان است، در حالی‌که در *C. kotschyi* غلظت کلشی‌سین بذر تقریباً برابر با غلظت آن در کورم بود. میزان کلشی‌سین به مرحله‌ی نموی گیاه بستگی دارد و سطوح حداکثر کلشی‌سین در ماههای اردیبهشت و خردادماه یافت می‌شوند (Vicar *et al*., 1993). اندازه‌گیری کلشی‌سین در اندامهای هوایی *C. autumnale* نشان داده که میزان کلشی‌سینوئیدها طی دوره‌ی فعال فتوسنتزی فصل بهار در این گونه حداکثر است (Frankova *et al*., 2004) که با نتایج ما مطابقت دارد. از طرفی سنجش غلظت آنزیم پلی فنل اکسیداز (که فرض می‌رود آنزیمی دخیل در بیوسنتز کلشی‌سین باشد) در کورم و برگ *C. autumnale* در اواخر بهار نشان داد که غلظت این آنزیم همانند کلشی‌سینوئیدها در بالاترین میزان خود قرار دارد (Balazova *et al*., 2007). با توجه به غلظت بالای آنزیم‌های سنتزکننده‌ی کلشی‌سین در بخش هوایی گیاه، نمی‌توان گفت که بالا رفتن غلظت کلشی‌سین در بذرهای تازه به علت انتقال آن از کورم به بذر است. گزارشها حکایت از آن دارد که میزان کلشی‌سین در بذر نارس بسیار بالاست و با رسیدن بذر میزان آن به شدت کاهش می‌یابد (Godet, 1987؛ Alali *et al*., 2006). از آنجایی که کپسول‌های حاوی بذر در *C. robustum* نسبت به *C. kotschyi* دیرتر ظاهر شدند، بنابراین غلظت بالاتر کلشی‌سین بذر در *C. robustum* می‌تواند به این دلیل باشد که بذرهای این گونه در زمان برداشت نسبت به گونه‌ی دیگر نارس‌تر بوده‌اند. اندازه‌گیری میزان کلشی‌سین طی مراحل رشدی مختلف در دو گونه‌ی *C. brachyphyllum* و *C. tunicatum* که در اردن می‌رویند نشان داد که بخشهای زیرزمینی (کورم و ریشه) در هر دو گونه در طی مراحل مختلف رشدی، همیشه میزان کلشی‌سین بیشتری در مقایسه با بخشهای هوایی نشان دادند (Alali *et al*., 2006). به‌طور کلی آنچه که از نتایج فوق برمی‌آید این است که نمی‌توان رابطه‌ی یکسانی بین مراحل نموی و میزان کلشی‌سین در هر کدام از گونه‌های مختلف جنس کلشیکوم تعریف نمود. تجمع و یا عدم تجمع آلکالوئید کلشی‌سین در اندامهای مختلف گیاه را می‌توان تا حد زیادی با مکانیزمهای دفاعی یا همزیستی که گیاه برای ادامه نسلش بکار می‌بندد مرتبط دانست. عموماً سوخوارها مقدار قابل توجهی از مواد غذایی را در کورمها ذخیره می‌کنند که آنها را به‌عنوان منبع غذایی برای بسیاری از جانوران، به‌ویژه پستانداران زیرزمینی مطلوب می سازد (Bennet & Jarvis, 1995). از طرفی در یک مکانیزم دفاعی میزان بالای آلکالوئید کلشی‌سین در کورمها و بذرهای *C. autumnale*، باعث صرف نظر کردن گیاه‌خواران از خوردن این اندامها می‌شود (Ellington, 1998) و از طرفی دیگر در رابطه‌ای همزیستی، میزان کلشی‌سین در کورمهای *Merendera montana* آنقدر پایین می‌آید تا غذای فراوان و مقوی با سمّیت کم برای موشهای صحرایی تأمین شود و در مقابل رفتار لانه‌سازی در زیرزمین که توسط موشهای صحرایی انجام می‌شود به موفقیت گیاه در گسترش و تکثیر بیشتر

کمک می‌کند (Go´mez-Garcı´a *et al.*, 2004) و در همان زمان میزان آلکالوئید و سمّیت در برگهای سبز که در حال فتوسنتزند آنچنان بالاست که گیاه‌خواران دیگر از خوردنشان صرف نظر میکنند (García-González & Montserrat, 1986). بنابراین به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی (از این تحقیق) می‌توان گفت که حداکثر میزان کلشی‌سین کورم در دو گونه‌ی مورد آزمایش ما در زمانی نزدیک به آغاز فعالیت ریشه (قبل از آغاز رشد رویشی) و در بذرهای نارس همزمان با ظهور کپسول مشاهده شد. همچنین بالاترین درصد وزن خشک کورم در دوره‌ی رکود کورمها و کمترین میزان آن قبل از ظهور قسمتهای هوایی دیده می‌شود. با این‌حال، بررسی گونه‌های بیشتر به منظور تعیین رابطه‌ای دقیقتر ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت ریاست و پرسنل پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج، سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- Alali, F., El-Alali, A., Tawaha, Kh. and Al Elimat, T., 2006. Seasonal variation of colchicine content in *Colchicum brachyphyllum* and *Colchicum tunicatum* (Colchicaeace). Natural Product Research, 20: 1121-1128.
- Alali, F., Tawaha, Kh. and Qasaymeh, R.M., 2004. Determination of Colchicine in *Colchicum steveni* and *C. hierosolymitanum* (Colchicaceae): Comparison between two analytical methods. Phytochemical Analysis, 15: 27-29.
- Balazova, A., Bilka, F. and Bilkova, A., 2007. Characterisation of polyphenol oxidase from corms and root of *Colchicum autumnale* L. Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, 54: 40-47.
- Bennett, N.C. and Jarvis, J.U.M., 1995. Coefficients of digestibility and nutritional values of geophytes and tubers eaten by southern Africa mole-rats (Rodentia: Bathyergidae). Journal of Zoology, 236: 189-198.
- Boye, O. and Brossi, A., 1992. Tropolonic *Colchicum* alkaloids and allo congeners. The Alkaloids. Academic Press Inc, New York, 567p.
- Burtt B.L., 1970. The evolution and taxonomic significance of a subterranean ovary in certain monocotyledons. Journal of Botany, 19: 77-90.
- Cerquaglia, C., Diaco, M., Nucera, G., La Regina, M., Montalto, M. and Manna, R., 2005. Pharmacological and clinical basis of treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with colchicine or analogues. Current Drug Targets - Inflammation & Allergy, 4: 117-124.
- Ellington, E., 1998. Introdumlión de *Colchicum autumnale* L. al cultivo_*in vitro*_ y estudio comparativo del contenido alcaloidico en especies silvestres de la familia Colchicaceae. Doctoral thesis, University of Barcelona, 237p.
- Franková, L., Cibírová, K., Bilka, F., Bilková, A., Balážová, A. and Pšenák, M., 2005. Nitrate reductase from the roots of *Colchicum autumnale* L. Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, 52: 1-10.
- Franková, L., Cibirová, K., Bóka, K., Gašparíková, O. and Pšenák, M., 2004. The role of the roots in the life strategy of *Colchicum autumnale* L. Biologia, 59(13): 87-93.
- García-González, R. and Montserrat, P., 1986. Determinación de la dieta de ungulados estivantes en los pastos supraforestales del Pirineo Omlidental: 119-134. In: Actas XXVI Reunión Científica de la S.E.E. Vol. 1, Consejería de Agricultura y Pesca, Oviedo, España, 388p.
- Go´mez-Garcı´a, D., Azorı´n, J., Giannoni, S.M. and Borghi, C.E., 2004. How does *Merendera montana* (L.) Lange (Liliaceae) benefit from being consumed by mole-voles?. Plant Ecology, 172: 173-181.
- Godet, X., 1987. Biologie du colchique (*Colchicum autumnale* L.) Multiplicaton végétative par voie traditionnelle et *in vitro*. Thèse. Clermont-Ferrand, 172p.
- Gutterman, Y., 1989. *Colchicum tunicatum*: 234-242. In: Halevy. A.H., (Ed.). Handbook of Flowering. CRC Press, Boca Raton, 540p.
- Gutterman, Y. and Boeken, B., 1988. Flowering affected by daylength and temperature in the leafless flowering desert geophyte *Colchicum tunicatum*, its annual life cycle and vegetative propagation. Botanical Gazette, 149: 382-390.
- Halevy, A.H., 1990. Recent advances in control of flowering and growth habit of geophytes. Acta Horticulture, 266: 35-42.
- Kaplan, M.M., Schmid, C., Provenzale, D., Sharma, A., Dickstein, G. and Mckusik, A., 1999. A prospective trial of colchicine and methotrexate in

- Poutaraud, A. and Champay, N., 1995. Meadow saffron (*Colchicum autumnale* L.) a medical plant to domesticate. Revue Suisse- Agriculture, 27(2): 93-100.
- Poutaraud, A. and Girardin, P., 2003. Seed yield and components of alkaloid of meadow saffron (*Colchicum autumnale*) in natural grassland and under cultivation. Journal of Plant Science, 83: 23-29.
- Samuelsson, G., 1992. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy. Stockholm, 244p.
- Santavy, F., Dvorackova, S., Simanek, V. and Potesilova, H., 1982. Isolation and identification of alkaloids of the subfamily Wurmbaeiodeae. Medical Faculty, Palacky University, Olomoac, Czech Republic, 105-163.
- Sütlüpinar, N., Husek, A., Potesilová, H., Dvorácková, S., Hanus, V., Sedmera, P. and Simánek, V., 1988. Alkaloids and phenolics of *Colchicum cilicicum*. Planta Medica journal, 54(3): 243-245.
- Trease, G.E. and Evas, W.C., 1989. Trease and Evans' Pharmacognosy. Bailiere Tindall, London and Philadelphia, 832p.
- Vassiliades, D. and Persson, K., 2002. A new winter-flowering species of *Colchicum* from Greece. Preslia, Praha, 74: 57-65.
- Vicar, J., Klusakova, L. and Simanek, V., 1993. Changes in colchicine and demecolcine content during vegetation period of *Colchicum autumnale* L. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae, 136: 5-7.
the treatment of primary biliary cirrhosis. Gastroenterology, 117: 1173-1180.
- Katzung, G.B., 2004. Basic and Clinical Pharmacology. The McGraw- Hill companies Inc USA, 133: 627-631.
- Komjatayova, H., Frankova, L., Boka, K. and Psenak, M., 2000. Botanical and developmental aspects of *Colchicum autumnale* L. (autumn crocus) (in Slovak). Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, 40: 67-80.
- Nordenstam, B., 1998. Colchicaceae: 175-185. In: Kubitzki. K., (Ed.). The families and genera of vascular plants. Vol. 3, Springer-Verlag, Berlin, 602p.
- Ondra, P., Valka, I., Vicar, J., Sutlupinar, N. and Simanek, V., 1995. Chromatographic determination of constituents of the genus *Colchicum* (Liliaceae). Journal of Chromatography, 704: 351-356.
- Pelletier, P.J. and Caventou, J.B., 1820. Examen chimique de plusieurs vegetaux de la famille des colchicees, et du principe actif qu'ils renferment [Cevadille (*Veratrum sabadilla*)]; hellebor blanc (*Veratrum album*); colchique commun (*Colchicum autumnale*). Annual Review of Physical Chemistry, 14: 69-83.
- Persson, K., 1992. Liliaceae III. Subfam. I. *Wurmbaeoideae*: 1-40. In: Rechinger K.H., (Ed.). Flora Iranica. Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, Graz, 170p.
- Persson, K., 1999a. The genus *Colchicum* in Turkey. I. New species. Edinburgh Journal of Botany, 56: 85-102.
- Persson, K., 1999b. New and revised species of *Colchicum* L. from the Balkan Peninsula. Plant Systematics and Evolution, 217: 55-80.

Dry matter variation and determination of colchicine content during different phenological stages in two Iranian *Colchicum* species (*C. kotschyi* Boiss. and *C. robustum* Stefanov)

M. Alirezaie Noghondar[1*], H. Arouiee[2], Sh. Rezazadeh[3], M. Shoor[2] and R. Taghizad Farid[3]

1*- Corresponding author, Msc. Student, Horticultural Sciences Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, E-mail: mortezaalirezaie@yahoo.com
2- Horticultural Sciences Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Department of Pharmacognosy and pharmaceutics, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

Received: February 2011 Revised: June 2011 Accepted: June 2011

Abstract

The genus of *Colchicum* is known for the production of colchicine which some species such as *C. kotschyi* Boiss. and *C. robustum* Stefanov are grown in Iran. The level of colchicine varies in different species as well as stages of plant development stages. In the present study, colchicine content and dry matter of corm and seeds in *C. kotschyi* and *C. robustum*, growing wild in Iran, were determined during different phenological stages. The plant materials were collected in different seasons (spring, summer, autumn and winter), during 2009-2010 and the amounts of colchicine were determined by high liquid performance chromatography method. The highest amount of colchicine of corm in both species was observed during autumn, in the time close to the beginning of activation of the root, with amount of 0.077 and 0.049% (wt/wt) in *C. kotschyi* and *C. robustum*, respectively. The lowest amount of colchicine of corm in *C. kotschyi* was found to be 0.0058% (wt/wt) during summer, before flowering stage, while the lowest amount of Colchicine in *C. robustum* was found to be 0.0075% (wt/wt) during winter, synchronous to flowering and vegetative growth. Colchicine content in seeds was found to be 0.128 and 0.0462% (wt/wt) in *C. robustum* and *C. kotschyi*, respectively. The highest and the lowest of corm dry matter in both species were found in summer and winter, respectively.

Key words: Colchicine, *Colchicum* L., phenological stages, seasonal variation.