



تاثیر زمان برداشت بر میزان روتین و فعالیت آنزیم PAL در سیاه گندم (*Fagopyrum esculentum*)

زینب علیزاده^۱، محمدفتاحی^{۲*}

^{۱،۲} گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

* نویسنده مسئول: mohamadfattahi@yahoo.com

چکیده

گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی بنام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که به عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. باید توجه داشت میزان متابولیت‌های ثانویه به هیچ‌وجه در گیاهان ثابت نبوده و متناسب با میزان رشد گیاه تغییر می‌نماید. سیاه‌گندم (*Fagopyrum esculentum*) از تیره علف هفت‌بند می‌باشد. این پژوهش برای تعیین مناسب‌ترین زمان برداشت گیاه سیاه‌گندم برای مصارف دارویی طراحی و اجرا شد. بذر گیاه در مزرعه گیاهان دارویی گروه باغبانی کشت و در پنج مرحله برداشت و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) و نیز میزان روتین به عنوان ترکیب فلاونوئیدی غالب در تمام مراحل به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. نتایج نشان داد در مرحله سوم یا آغاز گلدهی بالاترین میزان فعالیت آنزیم PAL و نیز با توجه به نتایج چشمی و کمی TLC بالاترین میزان فلاونوئید روتین مشاهده شد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده، مناسب‌ترین زمان برداشت گیاه سیاه‌گندم برای مصارف دارویی، مرحله آغاز گلدهی می‌باشد.

کلمات کلیدی: فنیل آلانین آمونیلیاز، روتین، کروماتوگرافی لایه نازک

مقدمه

اصطلاح گیاه دارویی به انواع گیاهانی اطلاق می‌شود که دارای خواص دارویی هستند. این گیاهان یک منبع غنی از ترکیبات هستند که می‌تواند برای تولید و سنتز دارو استفاده شود (Rasool Hassan, 2012). باید توجه داشت میزان موادموثره به هیچ‌وجه در گیاهان ثابت نبوده و متناسب با میزان رشد گیاه تغییر می‌نماید. تغییراتی که در میزان موادموثره گیاه در طول سال و حتی ساعات یک روز به وجود می‌آید اهمیت جمع‌آوری گیاهان دارویی را در زمانی که گیاه دارای حداکثر میزان موادموثره است را نمایان می‌سازد. برداشت گیاهان دارویی در زمان نامناسب نه تنها میزان محصول بدست آمده را کاهش می‌دهد، بلکه محصول برداشت شده نیز از کیفیت مطلوبی برخوردار نخواهد بود. زیرا عملکرد اندام موردنظر و همچنین میزان متابولیت‌های ثانویه یک گیاه دارویی در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه متفاوت است (قمری و همکاران، ۱۳۹۵).

سیاه گندم یا گندم ممرز (*Fagopyrum esculentum*) با نام انگلیسی Buckwheat از تیره علف هفت‌بند (Polygonaceae)، گیاهی (شبه غلات) علفی و یکساله و دولپه ای با گل‌های متراکم و کوچک که شهد فراوانی دارد، می‌باشد (قائمیان و همکاران، ۱۳۹۲). شاخ و برگ در فارماکوپه اروپا به عنوان یک ماده اولیه دارو برای درمان اختلالات وریدی ثبت شده است. الزامات زیست محیطی کم و حفاظت نیاز ندارد (Zvikas et al., 2016). پیکر رویشی آن حاوی مواد موثره متعلق به فلاونوئیدها بوده که اهمیت بسیار زیادی در صنایع مدرن داروسازی دارد (بهرامی، ۱۳۸۱). ترکیبات ارزشمند پیکر رویشی شامل انواع فلاونوئیدها (ویتکسین، ایزوویتکسین، اورینتین، ایزواورینتین و روتین)، یک



فلاونول (کوئرستین) ، فلاون-۳- ال و دیگر ترکیبات فنلی (اسید کلروژنیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید گالیک) می‌باشد. سیاه گندم‌ها منبع خوبی از روتین هستند که در سایر غلات، شبه غلات و حبوبات، گزارش مستندی وجود ندارد. به طور اختصاصی، روتین (کوئرستین-3-O- روتینوساید) یک فلاونول گلیکوزید است که جزء اصلی فلاونوئیدها در سیاه گندم بشمار می‌رود سرکوب تجمع چربی بدن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدفشارخون بالا، ضدالتهاب، کاهش احتمال بروز سرطان روده اثرات دارویی هستند که به این گیاه نسبت داده شده است. همچنین به علت اینکه فاقد گلوتن است برای افراد مبتلا به عدم تحمل گلوتن یا بیماری سلیاک جایگزین مناسبی است (Park et al., 2017). در این پژوهش به میزان ترکیب فلاونوئیدی روتین در مراحل مختلف رشد پرداخته شد تا زمان مناسب برداشت بوته برای مصارف دارویی شناسایی شود.

مواد و روش

بذرهای سیاه گندم که از یک شرکت فروش بذر در چین تهیه شده بود، بعد از خیسانده شدن در بهار سال ۹۷ در مزرعه گیاهان دارویی کشت شدند. دو روز پس از کاشت ظهور گیاهچه‌ها در سطح خاک صورت گرفت و با رشد بسیار سریع ۱۵ روز بعد از کاشت گلدهی آغاز شد. در نهایت ۵۲ روز پس از کاشت بذرهای رسیده و بوته‌ها به‌طور کامل برداشت شد. در پنج مرحله فیزیولوژیکی (دو برگ، چهار برگ، آغاز گلدهی، گلدهی کامل و بذردهی) برداشت انجام شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم PAL^۱ از روش (Guiwen et al., 1991) استفاده شد. از دو بافر استخراج و سنجش که دارای ترکیب یکسان ولی pH متفاوت بودند برای استخراج و سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. محاسبه فعالیت آنزیم PAL با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی ۹۶۳۰ و برحسب n mol FW min انجام گردید.

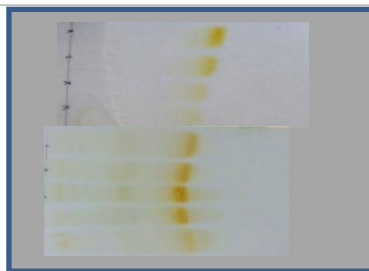
برای انجام کروماتوگرافی لایه نازک TLC^۲ نمونه‌های گیاهی خشک شده بوسیله متانول ۸۰ درصد و التراسونیک عصاره‌گیری شده و سپس مطابق روش ذکر شده توسط رحیمی (۱۳۹۴) تهیه تانکر و حلال و در نهایت لکه‌گذاری انجام شد.

کمی کردن نتایج TLC به کمک نرم‌افزارهای اکسل ۲۰۱۳ انجام شد. به این صورت که عکس‌های گرفته شده (شکل ۱)، پیکسل‌های مربوط به هر پنج غلظت استاندارد و پنج مرحله عصاره به صورت جداگانه وارد اکسل شد. برای هر غلظت استاندارد و عصاره نمودار مربوطه رسم شده و به کمک نمودار مقدار کمی روتین در هر عصاره هر پنج مرحله بدست آمد.

آنالیز آماری داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SAS ورژن/ ۱۹ در قالب طرح کامل تصادفی و در سه تکرار انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از روش دانکن استفاده شد.

¹ phenylalanine ammonia lyase

² Thin layer Chromatography



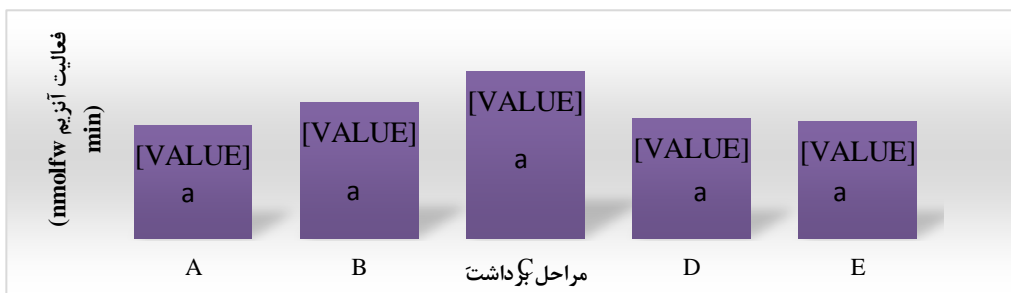
شکل «۱» عکس‌های مربوط به استاندارد (۱) و عصاره‌ها (۲)

نتیجه و بحث

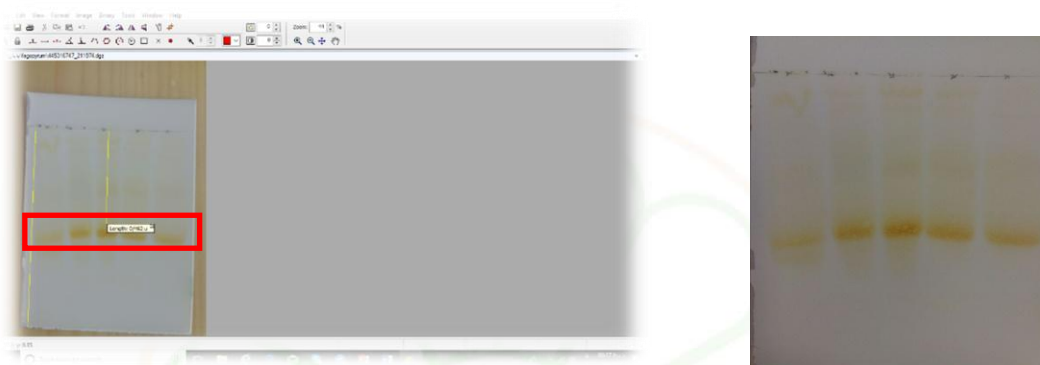
آنالیز آماری داده‌ها نشان داد تمامی آن‌ها در سطح احتمالی یک درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۲) نشان می‌دهد که مرحله آغاز گلدهی با میانگین $384/13$ نانومول وزن تر در دقیقه (nmol FW min) بالاترین میزان فعالیت این آنزیم را داشت. باتوجه به اینکه آنزیم PAL مهمترین آنزیم مسیر سنتز فلاونوئیدها می‌باشد با توجه به نتیجه به دست آمده انتظار می‌رود میزان فلاونوئید روتین نیز در این مرحله بیشترین میزان نسبت به مراحل دیگر باشد.

باتوجه به اینکه در اکثر گزارشات روتین به عنوان ترکیب غالب فلاونوئیدی پیکره رویشی سیاه‌گندم مطرح شده است، پررنگ‌ترین قسمت نوار TLC در هر پنج عصاره به ترکیب روتین نسبت داده شد. برای شناسایی دقیق‌تر فلاونوئیدها در روش TLC معمولاً به کمک رنگ آنها زیر نور UV و نیز فاکتور بازدارندگی آنها می‌باشد. رحیمی (۱۳۹۴) در پژوهش خود، رنگ و RF ترکیب روتین را به شرحی که در جدول ۱ آمده است گزارش کرده است. میزان RF گزارش شده برای روتین $0/46$ است و این با عدد بدست آمده برای روتین در TLC مربوط به عصاره‌ها (شکل ۴) که $0/462$ می‌باشد کاملاً مطابقت دارد. به این ترتیب با قاطعیت می‌توان گفت قسمت پررنگ علامت‌گذاری شده در شکل ۳ مربوط به ترکیب روتین است. تفسیر نتایج TLC معمولاً به صورت چشمی و با غلظت ترکیب مورد نظر انجام می‌شود. باتوجه به شکل یک مشاهده می‌شود که لکه مربوط به روتین در مرحله سوم یا مرحله آغاز گلدهی پررنگ‌تر از مراحل دیگر است که باتوجه به نتایج بدست آمده از فعالیت آنزیم PAL این نتیجه پیش‌بینی شده بود. به این ترتیب میزان فلاونوئید روتین در مرحله آغاز گلدهی بیشتر از مراحل دیگر است و جهت مصرف دارویی گیاه برداشت در این مرحله توصیه می‌شود. اما در این پژوهش ما علاوه بر گزارش چشمی با روشی نوین با کمی کردن نتیجه TLC استدلال محکم‌تری رسیدیم. باتوجه به مقادیر به دست آمده برای میزان روتین پس از کمی کردن نتایج TLC نیز، مرحله سوم یا آغاز گلدهی بیشترین میزان فلاونوئید روتین ($33/2647 \mu\text{g/ml}$) را داراست.

باتوجه به نتایج بدست آمده سیاه‌گندم در مرحله سوم (آغاز گلدهی) بالاترین میزان فعالیت آنزیم PAL و بدنبال آن بالاترین میزان روتین را دارد. به دلیل اهمیت موضوع صرفه جویی در مصرف نهاده‌های باارزش کشاورزی مثل آب در سالهای اخیر از طرفی، و از طرف دیگر باتوجه به اهمیت و تاثیر مرحله فیزیولوژیکی گیاه در تولید متابولیت‌های ثانویه این نتیجه می‌تواند قابل توجه تولیدکنندگان گیاه دارویی سیاه‌گندم برای مصارف دارویی (که در سال‌های اخیر در ایران اقدام به کشت کرده‌اند) مورد توجه قرار گیرد.



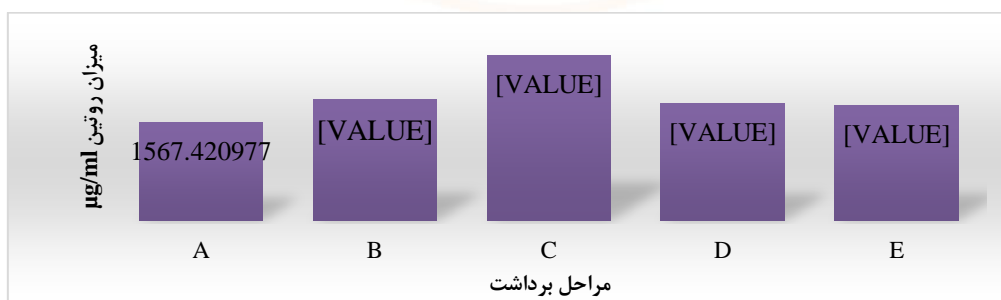
شکل «۲» فعالیت آنزیم PAL در ۵ مرحله فیزیولوژیکی: A (دو برگگی)، B (چهار برگگی)، C (آغاز گلدهی)، D (گلدهی کامل)، E (بذردهی).



شکل «۳» لکه گذاری انجام شده برای عصاره ۵ مرحله مورد نظر شکل «۴» تعیین میزان RF در نرم افزار Digimazer

جدول «۱» شناسایی روتین در گیاه سیاه گندم

Compound	λ_{max} Standard	λ_{max} Resolved spectra	Color in UV ۳۶۵nm	Color in ۲۴۵ nm	RF (BAW)
Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)	۲۶۵,۳۶۵	۲۱۸,۲۵۶,۳۵۶	Olive	Dark violate	۰/۴۶



شکل «۵» میزان روتین در ۵ مرحله فیزیولوژیکی: A (دو برگگی)، B (چهار برگگی)، C (آغاز گلدهی)، D (گلدهی کامل)، E (بذردهی).



منابع

- بهرامی، خ. ۱۳۸۱. تاثیر نیتروژن و فسفر بر باروری رشد، نمو، عملکرد پیکر رویشی بذر و ماده موثره گیاه دارویی فاگوپیروم اسکولنتوم. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس. ۹۸ص.
- رحیمی، ۱۳۹۳. بررسی مورفولوژی و فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف کاپاریس اسپینورا. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ارومیه. ۱۱۲ص.
- قمری، ح. صیدی، م. قاسم نژاد، ع. قنبری، ع. ۱۳۹۵. بررسی ترکیب فیتوشیمیایی اسانس مرزه سهندی (*satureja*) در مراحل مختلف فنولوژیکی. نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، ۱ (۸): ۱-۱۶.

Guiwen, W. J. and Breen, P. 1991. Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. Journal of Journal of the American Society for Horticultural Science. 116(5):865-869.

Park, CH., Yeo, H., Park, Y. and Morgan, A. 2017. Influence of Indole-3-Acetic Acid and Gibberellic Acid on Phenylpropanoid Accumulation in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Sprouts. Molecules, 22(3): 374-384.

Rasool Hassan, B. 2012. Medicinal plants (importance and uses). Pharmaceut Anal Acta 3: 139.

Žvikasa, V., Pukelevičienė, V., Ivanauskas, L., Romanovskajac, D. and Jakštas, V. 2016. Variety-based research on the phenolic content in the aerial parts of organically and conventionally grown buckwheat. Food Chemistry. 213:660-667.

The effect of the harvest time on the Rutin and the activity of PAL in the black wheat (*Fagopyrum esculentum*)

Mohammad Fattahi¹, Zeinab Alizadeh¹

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding Author: mohamadfattahi@yahoo.com

Abstract

Plants produce a large and diverse group of organic compounds known as secondary metabolites, which are consumed as drug compounds. There is a variety of organic compounds called secondary metabolites, which have to be noted that they have an important duty in growth of the plants. The Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) is one plants of Polygonaceae. This research was designed in order to determine the most suitable time of harvesting of the Buckwheat for medicinal purposes. Plant seeds were cultivated on the farm plants of medicinal plants and was carried out in five stages, and the phenylalanine ammonia lyase enzyme activity (PAL) was carried out in all stages in thin layer chromatography method (TLC). Results showed that at the third stage or beginning of flowering, the highest level of PAL activity and highest content of rutin. Therefore, with regard to the obtained results, flowering stage is the most appropriate time for harvesting the buckwheat plant for consumption in pharmaceutical industries.

Keywords: Phenylalanine ammonia lyase, Rutin, Thin layer chromatography