فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال یازدهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۸ ص ۶۴-۵۳

مقاله پژوهشی

سنجش مقایسه‌ای محتوای پرولین در گیاهان مو، خرفه و رزماری در دو حالت خشک و تازه با حلال‌های مختلف

راضیه تقوی زاد[1*]، رویا احمدی[2]، ناصر رحیم[2]

[1] گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[2] گروه شیمی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] Email: ra_taghavizad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۱۵

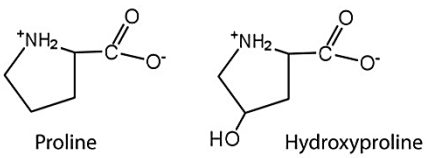
چکیده

نقش پرولین در بهبود کار مفاصل و تنظیم چرخه سلولی به اثبات رسیده است. از این رو دستیابی به گیاهانی که بیشترین محتوای پرولین را دارند اهمیت دارد. برگ های مو، خرفه و رزماری در پاییز جمع آوری شدند. جذب با استاندارد پرولین و محلول ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای سنجش محتوای آمینواسیدکل، جذب با استاندارد گلیسین و محلول ها در اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای مقایسه نتایج از آزمون‌های فریدمن و یومن ویتنی و نرم افزار SPSS استفاده شد. مقایسه محتوای پرولین توسط حلال های مختلف، آمینواسیدها و نسبت پرولین به آمینواسیدها در حالات خشک و تازه گیاهان نشان داد در همه بافت‌های تازه با اورتوزایلن، پرولین بیشتری استخراج شد و بیشترین ۱۴/۸۶۴±۰/۵۴۴µg/ml مربوط به رزماری تازه بود. در اغلب بافت های خشک، در سنجش با حلال تولوئن، پرولین بیشتری استخراج شد و بیشترین مربوط به خرفه با ۱۰/۲۹۱±۰/۲۰۲ µg/ml بود. بیشترین میانگین آمینواسیدهای آزاد کل ۸۲/۶۶۳±۰/۳۲۵µg/ml در رزماری تازه و ۶۸/۸۷۱±۰/۶۷۹ µg/ml در مو خشک بود. مقایسه عملکرد دو حلال معنی دار نبود یعنی می‌توان به جای تولوئن از اورتوزایلن استفاده کرد و از خطرات کاست. به نظر می‌رسد پروسه فیزیولوژیک پاسخ به تنش خشکی با سنتز پرولین پس از برداشت گیاه ادامه می‌یابد و از این طریق در تکوین فاز زایشی نقش دارد.

کلیدواژه‌ها: آمینواسید آزاد، پرولین، خرفه، رزماری، مو.

مقدمه

پرولین مولکولی خارق العاده در پیکر انسان و جانوران است.



پرولین با فرمول $C_5H_6NO_2$ یکی از بیست آمینواسید بدن انسان است. با وجودی که بدن ما قادر به ساخت این آمینواسید است ولی نیاز به پرولین برای سنتز پروتئین‌های بدن انسان بیشتر از هر آمینواسید دیگری است [۳٤]. پرولین در بدن به هیدروکسی پرولین تبدیل می‌شود و در ترکیب کلاژن که جزء فیبری اصلی پوست، استخوان، تاندون، غضروف و دندان است شرکت دارد. توالی گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین در کلاژن به دفعات تکرار می‌شود [۹]. سنتز غیر طبیعی کلاژن سبب آرتریت در مفاصل و شکنندگی استخوان می‌شود. پرولین در صنایع دارویی در ساخت داروی ضد فشار خون و به عنوان مکمل غذایی کاربرد دارد [۱٤]. امروزه قرص‌های پرولین برای تولید کلاژن، سلامت مفصل و ماهیچه اسکلتی تجویز می‌شود.

متابولیسم پرولین به‌عنوان پیش برنده سیگنال دهی سلول به سمت آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) یا بر عکس بقای سلولی شناخته شده است. به عبارتی پرولین در جانوران و گیاهان نقش‌های تنظیمی خاصی را به عهده دارد به‌خصوص در سرطان، به طوری که پرولین با نقش‌های آپوپتوزی، اتوفاژی و محروم نگهداشتن از اکسیژن، در ممانعت از سرطان نقش دارد [۳۱]. پرولین با نقش دوگانه در تنظیم چرخه سلولی شرکت می‌کند یعنی هم می‌تواند ROS ها یا گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (Oxygen pecies Reactive) را تشکیل دهد و هم برعکس با تغییر در میزان ROS ها آپوپتوز تومورها یا بقای سلولی را منجر شود و این کار را با فسفریلاسیون پروتئین‌ها انجام می‌دهد [۲۵]. در عین حال تراکم پرولین توسط یک پرولین اکسیداز در سلول کنترل می‌شود. در بیماری شیزوفرنی، وجود یک موتاسیون در توالی لوسین ٤٤۱- پرولین تشخیص داده شده است [۱۲].

در روش سنجش پرولین همیشه از حلال تولوئن استفاده می‌شود. این ماده با فرمول C7H8 دارای یک حلقه بنزنی با یک گروه متیل، سمی است و در معرض قرار گرفتن با این ماده منجر به اثرات موقت مانند سردرد، سرگیجه و ترک خوردگی پوست و استفاده مستمر باعث آسیب‌های حاد تولید مثلی، سیستم عصبی مرکزی و عوارض تنفسی می‌شود و حتی خطر مرگ به دنبال دارد [۳۰ و٦].

پرولین به عنوان یک آمینواسید ضد تنشی مطرح است. افزایش در تجمع پرولین منجر به مقاومت به خشکی در گیاه می‌شود تا در محدودیت آبی، رشد ادامه یابد [۱۰]. پرولین با شرکت در ترکیب هیدروکسی پرولین از اجزای مهم پروتئین اکستنسین به شمار می‌آید که در رشد و نمو و دفاع گیاهان نقش مهمی دارند [۲٦]. پرولین حتی در عسل گیاهانی که در مناطق سرد به عمل می‌آیند به مقدار زیاد وجود دارد [۵].

رُزمای یا اکلیل کوهی *Rosmarinus officinalis* L.، گیاهی پایا و معطر، به صورت بوته‌ای و دارای ساقه‌های چوبی بـه ارتفاع ۰/۵-۱ متـر متعلق به خانواده نعناییان Lamiaceae است. از رُزمای در طب سنتی برای درمان سردرد، **روماتیسم**، اختلالات گردش خون، بیماری‌های عروق محیطی، اختلالات مجاری ادراری، افزایش قدرت بینایی، ضعف و ناتوانی مزمن، اختلالات عصبی و ریزش مو استفاده می‌شـود [۲]. Llinares و همکاران (۲۰۱۵) پاسخ به تنش‌های محیطی را در چند گیاه از جمله رزماری که به زیستگاه‌های گچی مدیترانه سازگاری دارند بررسی کردند و اعلام نمودند: پرولین و گلیسین بتائین دو

آمینواسیدی هستند که در گیاهان اسمولیت و در پاسخ به استرس خشکی وقتی که سلول دهیدراته می‌شود سنتز می‌شوند [۲۷].

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. از گیاهان دارویی، چهار کربنه و یکساله از تیره Portulacaceae است[۱۳]، متحمل به خشکی بوده و به آسانی در خاک‌هایی که ممکن است اسیدی یا شور باشند رشد می‌کند [۲۲]. خرفه مواد موسیلاژی با اهمیت دارویی دارد[۳۳]. خرفه دارای اثرات ضد التهابی مانند **آرتریت** است [۲۳].

انگور *Vitis vinifera* L. گیاهی دائمی از تیرهٔ Vitaceae است. تحمل سرما در انگور یکی از عامل‌های مهم در گزینش رقم برای تولید محصول در یک منطقه خاص است. آسیب ناشی از سرمای زیر صفر، در بعضی از تاکستان‌های ایران وجود دارد اما توزیع جغرافیایی و پراکنش انگور از زمان‌های قدیم در ایران در نواحی سردسیر بوده است [۲۱]. در تنش خشکی، افزایش شدیدتر پرولین نسبت به کربوهیدرات در رقم رشه انگور دلالت بر آن دارد که در انگور احتمالا تجمع پرولین در مقایسه با کربوهیدرات نقش بیشتری در تنظیم اسمزی دارد و به حفظ تورژسانس کمک می‌کند [۱۶]. انگور دارای ویژگی های ضد التهابی معده است [۲۸]. انگور با کاهش بیان ژن‌های پاسخ دهنده به التهاب و کاهش ROSها **التهاب‌های مزمن** را کاهش می‌دهد [۱۷و۱۵].

در طب سنتی برای درمان التهاب مفاصل، استفاده از سه گیاه مو، خرفه و رزماری رایج بوده است. این تحقیق بر آن است تا به یکی از عوامل مشترک درمانی در سه گیاه فوق پی ببرد، در ثانی مزیت استفاده از گیاهان نامبرده در حالت‌های خشک و تازه را تعیین کند، ثالثا حلال جایگزینی با مخاطرات کمتر از تولوئن برای محققین سنجش پرولین بیابد.

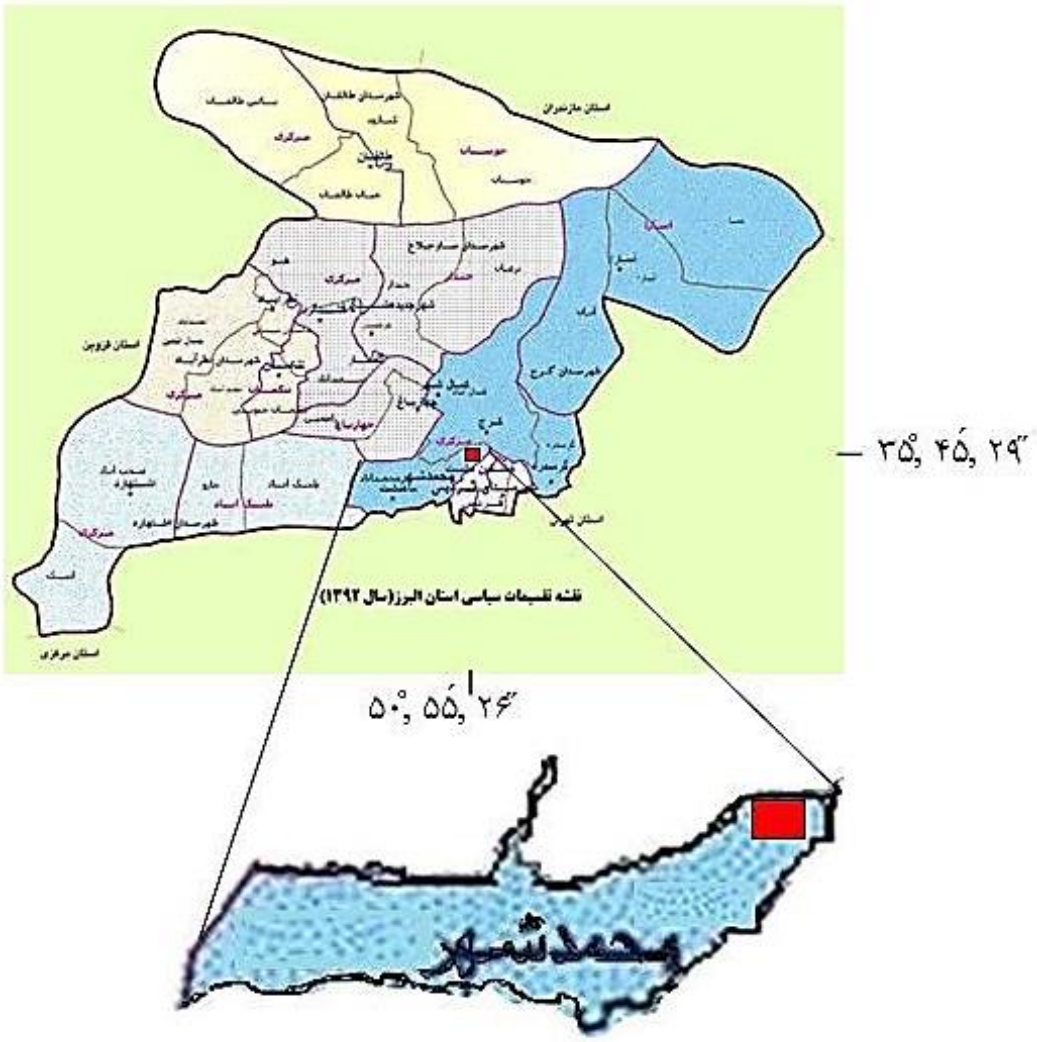
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاهان: سه گیاه در اوائل پاییز از محمدشهر کرج جمع آوری شدند تا شرایط اقلیمی یا احیانا تنش‌زای حاکم برای رشد گیاهان در حالت میانه و یکسان باشد. نیمی از گیاهان هر نمونه در سایه خشک شدند و نیمی دیگر بلافاصله بعد از چیده شدن مورد سنجش‌های پرولین و آمینواسیدهای کل قرار گرفتند. خشک شدن کامل خرفه حدود یک ماه به طول انجامید و در نهایت با بذردهی همراه شد.

مشخصات جغرافیایی محل رویش گیاهان

منطقه جمع آوری نمونه در دامنه‌های جنوبی رشته کوه البزر مرکزی، در جنوب کرج و شمال شرقی محمدشهر قرار گرفته است (شکل ۱). طول جغرافیایی ″۵۵٬۲۶ ,°۵۰ شرقی و عرض جغرافیایی آن ″۲۹ ,′۴۵ ,°۳۵ شمالی و ارتفاع آن ۱۲۳۷ متر از سطح دریا است. میزان بارندگی متوسط محمدشهر سالانه ۲۳۰ میلی‌متر است. بر مبنای سیستم اقلیم نمایی آمبرژه آب و هوای نیمه‌خشک معتدل دارد. میانگین حداکثر درجه حرارت آن ۲۱°C است ولی در روزهای گرم سال به ۴۰°C هم می‌رسد و میانگین حداقل ۹°C است اما در روزهای سرد سال به ۱۰°C- هم می‌رسد و میانگین متوسط آن ۱۵°C است. میانگین رطوبت هوا ۵۱ درصد است که در فصل گرم و سرد متفاوت است. میانگین حداکثر رطوبت نسبی ۷۳/۱ درصد است که در دی ماه بیشترین میانگین را دارد. میانگین حداقل رطوبت نسبی ۳۱/۵ درصد در خرداد است، به طوری که در این ماه میزان رطوبت به ۱۷ درصد نیز می‌رسد.

دو نوع جریان باد در منطقه وجود دارد. یک نوع: جریان‌های عمومی است که به دو شکل در منطقه جاری است. شکل اول: جریان عمومی از اقیانوس اطلس به منجیل و منطقه مورد مطالعه می‌وزد و جهت آن شمال غرب یه جنوب شرق و از شرق به غرب است و با رطوبت همراه است و از ابتدای پاییز تا پایان بهار جریان دارد. اغلب بارندگی‌های پاییزی و زمستانه در منطقه مربوط به این بادها می‌شود. شکل دیگر جریان‌های عمومی: بادهای گرم جنوب غربی است. این بادها در تابستان عموما از دشت‌های عراق و سوریه به ارتفاعات زاگرس می‌وزند و شاخه‌هایی از آن‌ها پس از عبور از ارتفاعات زاگرس از سمت ساوه وارد منطقه مورد مطالعه می شوند. این بادها موجب گرم‌تر شدن هوای منطقه می‌شود. نوع دوم جریان بادها: بادهای محلی است که از سمت دامنه‌های جنوبی البرز به سوی منطقه مورد مطالعه می‌وزد. منطقه دارای خاک‌های آبرفتی است.



شکل ۱- استان البرز، منطقه محمدشهر در جنوب این استان قرار دارد؛ کرج، محمدشهر، محل جمع‌آوری نمونه‌ها

سنجش پرولین

سنجش پرولین در بافت خشک گیاهان مو، خرفه و رزماری به روش Bates *et al.* (1973) انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم از برگ هر یک به طور جداگانه همراه ۱۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ٪۳ در یک هاون چینی کوچک به مدت ۳ دقیقه ساییده شد. محلول هموژنیزه شده توسط کاغذ صافی واتمن ۲ صاف شد. سپس دو میلی لیتر از محلول صاف شده با ۲ میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک در یک لوله آزمایش ریخته شد و برای مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار داده شد، سپس به محلول واکنش در لوله آزمایش پس از سردشدن در حمام یخ، ٤ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و لوله آزمایش مربوطه برای مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه به شدت به هم زده شد. از پرولین خالص غلظت‌های ۰ ، ۵۰ ،۱۰۰ ، ۲۰۰ میکرومولار تهیه شد. نمودار جذب استاندارد پرولین و سپس جذب‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل T.80 خوانده بر حسب طول موج تعیین شد [۷].

در سنجش پرولین با بافت تازه؛ ۰/۵ گرم برگ تازه را به قطعات حدود ۵ میلی‌متر بریده و بقیه کار را عیناً مراحل بافت خشک انجام دادیم. هر نمونه سه بار سنجش شد و طیف مربوطه بعد از نمونه استاندارد، خوانده و درج شد. غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم محاسبه گردید.

مقایسه حلال‌ها

در سنجش پرولین به طور معمول از حلال تولوئن استفاده می‌شود. در این بررسی از حلال‌های جایگزین مانند استون، اتانل، متازایلن و اورتوزایلن به جای تولوئن مورد استفاده و نتایج مقایسه شد.

سنجش آمینواسید آزاد کل

برای این که میزان پرولین نسبت به کل آمینواسیدهای موجود در برگ این گیاهان مشخص شود، سنجش غلظت کل آمینواسیدهای آزاد را به روش Hwang & Ederer (1975) انجام دادیم. نمونه گیاه را خرد کرده و در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=6/8) مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور قرار دادیم. سپس بر روی نمونه‌های شناور معرف نین‌هیدرین اضافه کردیم و به مدت ٤ تا ۷ دقیقه در حمام آب گرم به دمای ۷۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای تهیه محلول استاندارد غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گلیسین تهیه و به آن معرف نین‌هیدرین را اضافه و بعد از دمادهی، جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ متر خوانده و منحنی استاندارد آن رسم شد [۱۹]. میزان آمینواسید آزاد نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید و برای تعیین مقدار در فرمول مربوطه گذاشته شد. همه سنجش‌ها سه بار تکرار شد و نتایج با آزمون فریدمن و یومن ویت‌نی و نرم افزار SPSS مقایسه شد.

نتایج

میانگین میزان پرولین و آمینواسید آزاد در گیاهان مو، خرفه و رزماری در دو حالت تازه و خشک با دو حلال تولوئن و اورتوزایلن به طور جداگانه اندازه‌گیری شد (جدول۱). گیاهان در میزان پرولین محتوایشان تفاوت‌هایی را نشان دادند. میانگین پرولین در بافت تازه رزماری (۱٤/۸۱٦ ±۰/٦٦۲µg/ml)

بیشتر از مو و مو (۷/۷٦٦ ±۰/۸ µg/ml) بیشتر از خرفه (۵/۳۰٤ ±۰/۱۱۸ µg/ml) بوده است (جدول ۱ و نمودار ۱). از حلال‌های استفاده شده تنها اورتوزایلن مانند تولوئن بعد از آمیختگی با عصاره‌ها فاز قرمز ایجاد می‌کرد و جذبی نزدیک به تولوئن و حتی بهتر از آن در اسپکتروفتومتر داشت، به طوری که در بافت‌های هر سه گیاه میزان پرولین با حلال اورتوزایلن بیش از میزان آن با استفاده از حلال تولوئن بود. (جدول ۱).

میانگین پرولین به دست آمده با حلال تولوئن در حالت خشک در خرفه (۱۰/۲۹۱±۰/٤٤۹ µg/ml) بیشتر از رزماری (۸/۷۵۳ ±۰/۰۵۵ µg/ml) و رزماری بیشتر از مو (۸/۳٦۳ ±۰/٤۵۱ µg/ml) بود (جدول ۱ و نمودار۲).

میانگین پرولین به دست آمده با حلال اورتوزایلن در رزماری تازه دو برابر مو و مو بیشتر از خرفه بود (نمودار ۳).

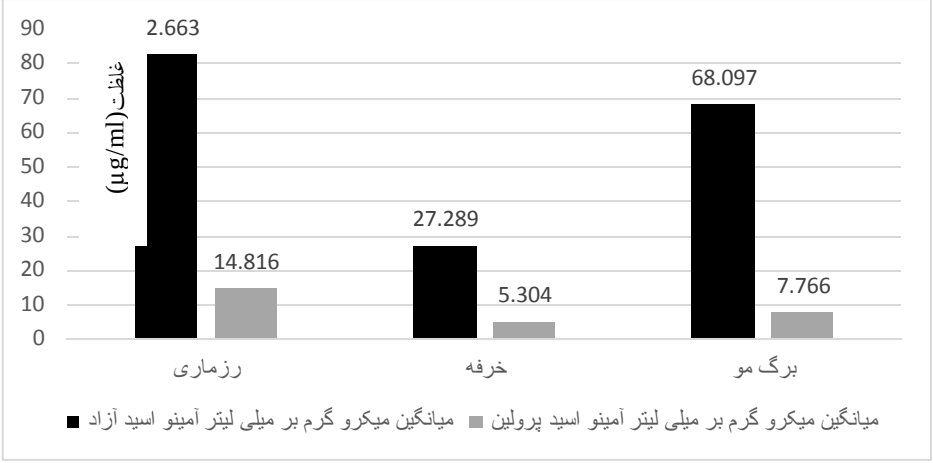
میانگین پرولین به دست آمده با حلال اورتوزایلن در خرفه خشک بیشتر از رزماری و رزماری بیشتر از برگ مو بود (نمودار ٤).

نسبت پرولین به آمینواسیدآزاد کل در هر یک از گیاهان رزماری، خرفه و برگ مو محاسبه شد. این نسبت در خرفه تازه بیشتر از زرماری و در زرماری بیشتر از مو بود. همین نسبت در رزماری خشک بیشتر از خرفه و خرفه بیشتر از رزماری بود (جدول ۳).

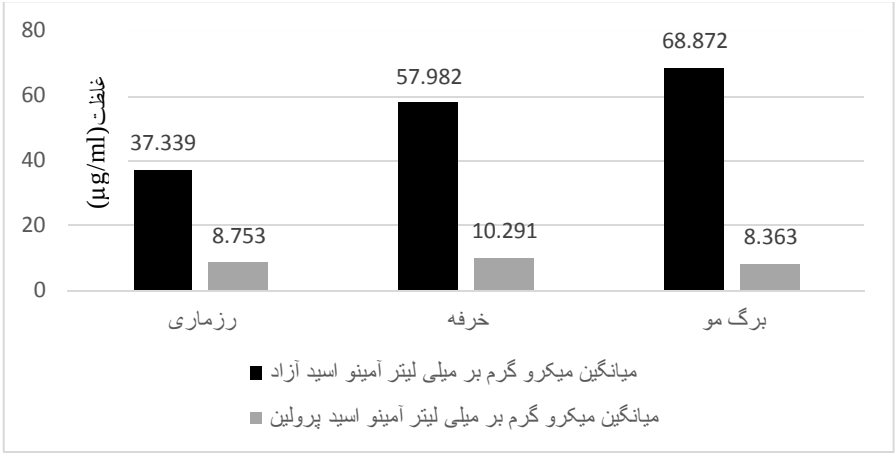
مقایسه دو حلال تولوئن و اورتوزایلن در تعیین محتوای پرولین و آمینواسیدهای آزاد در گیاهان مو، خرفه و رزماری تفاوت زیادی را آشکار نکرد و مقایسه این نسبت ها در دو حالت معنی‌دار نبود و $p>0/05$ را نشان می‌داد (جدول ۳).

جدول ۱- میانگین میزان پرولین در گیاهان مو، خرفه و رزماری در دو حالت تازه و خشک بعد از آنالیز واریانس.

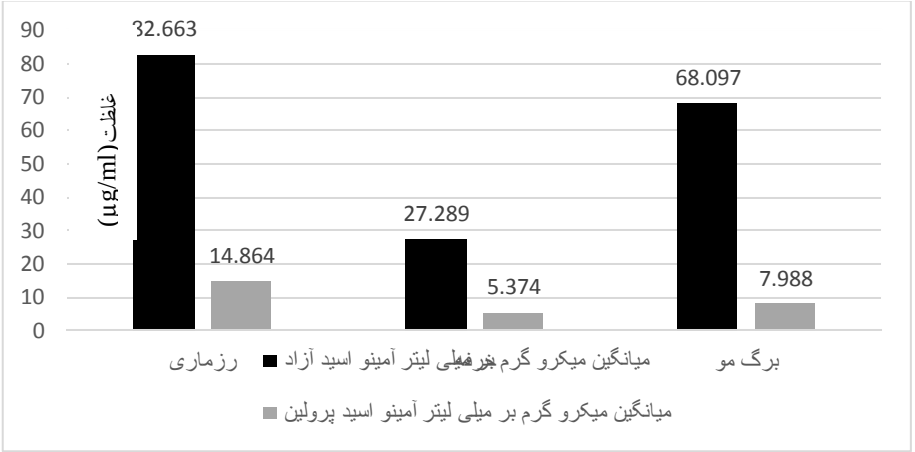
نوع حلال	نوع گیاه و بافت		میانگین میزان پرولین (µg/ml)
تولوئن	بافت تازه	مو	۷/۷٦٦±۰/۸
		خرفه	۵/۳۰٤±۰/۱۱۸
		رزماری	۱٤/۸۱٦±۰/٦٦۲
	بافت خشک	مو	۸/۳٦۳±۰/٤۵۱
		خرفه	۱۰/۲۹۱±۰/٤٤۹
		رزماری	۸/۷۵۳ ±۰/۰۵۵
اورتوزایلن	بافت تازه	مو	۰/۸۸۷±۷/۹۸۷
		خرفه	۰/۱۰۲±۵/۳۷٤
		رزماری	۰/۵٤٤±۱٤/۸٦٤
	بافت خشک	مو	۰/۲۰۷±۸/۸۰۹
		خرفه	۰/۳۲٦±۹/۹۸۷
		رزماری	۰/۳۲٦±۸/۸٤۳



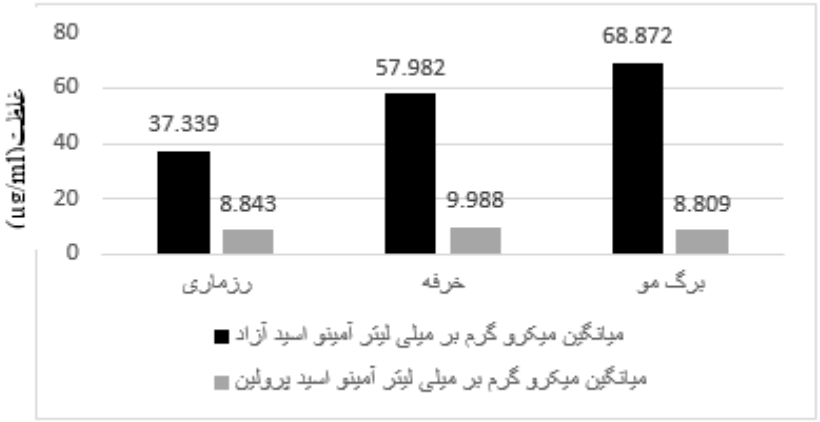
نمودار ۱–مقایسه میانگین محتوای آمینو اسیدهای آزاد با میانگین محتوای پرولین در هر یک از بافت‌های تر رزماری، خرفه و برگ مو (با حلال تولوئن)



نمودار۲– مقایسه میانگین محتوای آمینواسیدهای آزاد با میانگین محتوای پرولین در هر یک از بافت‌های خشک رزماری، خرفه و برگ مو (با حلال تولوئن)



نمودار ۳–مقایسه میانگین محتوای آمینواسیدهای آزاد با میانگین پرولین در بافت تر رزماری، خرفه، برگ مو (با حلال اورتو زایلن)



نمودار ٤-مقایسه میانگین محتوای آمینواسیدهای آزاد با میانگین محتوای پرولین در بافت خشک رزماری، خرفه، برگ مو (با حلال اورتو زایلن)

جدول۲ – مقایسه نسبت پرولین به آمینواسید آزاد کل در گیاهان رزماری، خرفه، مو در دو حالت تازه و خشک

گیاهان	میانگین میزان آمینو اسید آزاد µg/ml در بافت تازه	میانگین میزان آمینو اسید آزاد در بافت خشک µg/ml	نسبت پرولین به آمینو اسید آزاد در بافت تازه (درصد)	نسبت پرولین به آمینواسید آزاد در بافت خشک (درصد)
مو	٦٨/٠٩٧±٠/٥١٤	٦٨/٨٧١±٠/٦٧٩	١١/٤	١٢/١
خرفه	٢٧/٢٨٩±٠/١٧٨	٥٧/٩٨١±٠/٨٠٣	١٩/٤	١٧/٧
رزماری	٨٢/٦٦٣±٠/٣٢٥	٣٧/٣٣٩±٠/٥٠٧	١٧/٩	٢٣/٤

جدول ۳- مقایسه بین میزان پرولین استخراج شده از گیاهان نسبت به میران آمینو اسید آزاد با دو حلال تولوئن و اورتو زایلن با استفاده از آزمون یومن ویت نی

	حلال	میانگین	معناداری
نسبت میزان پرولین به آمینو اسید آزاد	تولوئن	٤٧/٣٣	٠/١٨٥
	اورتو زایلن	٣٨/١٩	

بحث

بحث اکولوژیک

وزش سه دسته از بادهای مخصوص این منطقه خصوصا بادهای گرم جنوب غربی که در تابستان عموما از دشت‌های عراق و سوریه به ارتفاعات زاگرس می‌وزند و شاخه‌هایی از آن‌ها پس از عبور از ارتفاعات زاگرس از سمت ساوه وارد منطقه مورد مطالعه می شوند موجب گرم‌تر شدن هوای منطقه در تابستان می‌شود و می‌تواند در میزان افزایش پرولین برخی گیاهان از جمله خرفه تأثیرگذار باشد.

رزماری یا اکلیل کوهی گیاهی همیشه سبز و مقاوم به سرما و یخ زدگی است به طوری که در زیر برف و یخ سالم باقی می‌ماند و تنش سرما را به خوبی تحمل می‌کند. خرفه که نوعی علف هرز مزارع است در خاک‌های مرطوب می‌روید و در عین حال تا حدودی به تنش‌های گرما و سرما مقاوم است. مو هم در کشور ما از گیاهان سردسیری است. بنابراین هر سه این گیاهان شرایط محیطی لازم برای سنتز پرولین را دارند.

نتایج نشان داد بافت تازه رزماری که در فصل پاییز برداشت شده ۱٤/۸۱٦ ±۰/٦٦۲µg/ml پرولین داشت، در حالی که Boscaiu *et al.* (2009) در بررسی خود میزان پرولین در رزماری تازه در زمستان را که تنش‌زایی بیشتر دارد ۵/٤۲±۱/۰۵ µg/ml گزارش کردند [۱۱]. گیاه مورد بررسی در پژوهش کنونی حدود ۳ برابر بیشتر پرولین داشت و می‌توان نتیجه گرفت حتی فصل‌های یکسان نمی‌توانند شرایط تنشی یکسان ایجاد کنند و اقلیم‌ها مهم‌ترند. در رزماری، فرآیند ضدتنشی که تحریک کننده مرحله گلدهی نیز هست از طریق تشکیل موادی همچون پرولین ممکن می‌شود. مجد و همکاران (۱۳۹۰) نیز تشکیل مواد ضد سرطانی در رزماری را وابسته به مراحل مختلف نموی آن دانستند [٤].

بحث تکوینی

نتایج نشان داد در خرفه، تنش خشکی سبب افزایش بیشتر پرولین نسبت به دو گیاه دیگر شده است. این می‌تواند به میزان آب و ژلاتین بیشتر در بافت آن و مدت زمان خشک شدن گیاه بستگی داشته باشد، به طوری که خشک شدن خرفه در سایه یکماه به طول انجامید و در مراحل پایانی با رسیدگی بذرها و خروج آن‌ها از کپسول همراه شد.

تبدیل پرولین به هیدروکسی پرولین لازمه ساخته شدن ژلاتین در گیاهان است [۳۲]. با افزایش تنش خشکی از یک سو تبدیل پرولین به هیدروکسی پرولین متوقف شده و از سوی دیگر بیوسنتز پرولین بیشتر شده و در مجموع موجب افزایش زیاد محتوای پرولین در خرفه شده است. در این راستا Lutts و همکاران (۲۰۰٦) نیز گزارش کرده‌اند: ذخیره پرولین در بافت‌های گیاهی در تنش خشکی به دلیل کاهش تجزیه پرولین و افزایش بیوسنتز آن، افزایش می‌یابد [۲۹].

علت تکوینی: افزایش مستمر پرولین طی خشک شدن طولانی مدت خرفه به منظور پیشبرد سریعتر تکوین در خرفه صورت می‌گیرد تا فاز زایشی را تکمیل کند. در این راستا محققینی مانند مجد و همکاران (۱۳۸۵) اشاره داشته‌اند: تنش خشکی و اسید آبسیزیک بیرونی سبب تکوین در تخمک‌ها و رویان‌های گیاه کلزا می‌شود [۳]. در گزارش دیگری Lehmann و همکاران (۲۰۱۰)، کاربرد پرولین در گیاه «آرابیدوپسیس» را در رشد و تکوین گل‌ها و دانه‌های آن دانستند [۲٤]. به این ترتیب می‌توان افزایش سنتز پرولین در تنش خشکی را یکی از ابزارهای لازم برای تکوین خرفه دانست. پژوهش حاضر در عین حال نشان می‌دهد پروسه فیزیولوژیک پاسخ به تنش خشکی حتی بعد از چیده شدن گیاه و تا زمانی که گیاه آب دارد همچنان ادامه می‌یابد

این تحقیق نشان داد یکی از دلایل استفاده یکسان گیاهان مو، خرفه و رزماری در طب سنتی برای درمان بیماری‌های التهاب مفاصل می‌تواند به سنتز پرولین زیاد این گیاهان مربوط باشد همان طور که Devlin

(2006), Berg (2002) در گزارش خود نقش پرولین در ساخت غضروف و درمان آرتریت مفاصل را عنوان کرده‌اند و [۱۸]. در گزارش خود عامل خودالتهابی را بستگی به موتاسیون در توالی فسفاتاز پرولین-سرین-ترئونین و پاتوژنزز آن دکر کرده‌اند.

بررسی‌های این پژوهش نشان داد تفاوت معناداری بین میزان پرولین استخراج شده از گیاهان رزماری و خرفه نسبت به میزان آمینواسید آزاد با دو حلال تولوئن و اورتوزایلن وجود ندارد چون $p>0/05$ است بنابراین می‌توان نتیجه گرفت؛ در آزمایشات سنجش پرولین می‌توان به جای تولوئن که تاکنون منحصرا از آن استفاده می‌شد از حلال اورتوزایلن استفاده کرد و از خطرات تماس با این ماده کاست، چون اورتوزایلن دارای دو عامل متیل است و متیلاسیون از سمیت می‌کاهد. از طرفی این ماده با بدن انسان همخوانی بیشتری دارد به طوری که جلالی و همکاران (۱۳۹۲) در تحقیق خود آورده اند: اورتوزایلن در مایعات زیستی مانند بزاق، خون و مدفوع یافت می‌شود و در غشای سلول‌های یوکاریوت‌ها از مخمر گرفته تا انسان وجود دارد و قابلیت بیومارکر شدن در مواد غذایی را دارد.

نسبت محتوای پرولین به آمینواسیدها در گیاهان گویای ترفندهایی است که برای رفع تنش به کار می-برند. به طور مثال برخلاف دو گیاه دیگر در خرفه افزایش کل آمینواسیدها بیشتر از افزایش پرولین در تنش خشکی است این و سبب می‌شود تا نسبت دکر شده در خشکی کم‌تر (۱۷/۷ درصد) از زمان آبدار بودن گیاه(۱۹/٤ درصد) باشد (جدول۳)، این نتیجه همسو با گزارش Jin و همکاران (۲۰۱٦) است که اعلام نموده‌اند: تنش خشکی به خصوص اگر با تنش دیگری در گیاه خرفه همراه باشد باعث افزایش سنتز انواع زیادی از آمینواسیدها مانند آلانین، گلیسین، ترئونین، ایزولوسین و فنیل‌آلانین می‌شود [۲۰].

برای تأمین پرولین از گیاهان تازه، رزماری سودمندتر است و در حالت خشک، مصرف خرفه بیشتر از مو و مو بیشتر از رزماری سودمند است. برای تأمین آمینواسیدهای آزاد، استفاده از رزماری تازه و مو خشک مناسب‌تر است.

پیشنهاد می‌شود آزمایش‌های بیشتری روی سایر گیاهان صورت گیرد و با نتایج این پژوهش مقایسه شود. در این صورت می‌توان از نتایج این پژوهش در برنامه‌ریزی‌های تغذیه‌ای و سلامت استفاده نمود.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری و آقای مهندس حنفی کارشناس آزمایشگاه شیمی به خاطر فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش تشکر می‌کنیم. همچنین از آقای دکتر نظریان، عضو هیأت علمی مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره) برای تعیین ویژگی‌های منطقه جغرافیایی نمونه‌ها تشکر می‌کنیم.

منابع

[۱] جلالی مهدی، جلالی سمیه، شفیعی مطلق مسعود، مردی حسین، نگهبان سید امیر رضا، فرجی طومار کندی وحدت، جهانگیری محمد. ۱۳۹۲. ارزیابی ریسک بهداشتی مواجهه شغلی با ترکیبات BTEX جایگاه‌های توزیع سوخت بنزین شهر مشهد، مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور، شماره ۱، ص ۲۷-۱۹.

[۲] زرگری علی، ۱۳۷٤، گیاهان دارویی، جلد پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، شماره مسلسل ۳۵٤۳، ۱۰۱۰ص.

[۳] مجد احمد، جعفریه یزدی المیرا، فلاحیان فتح الله، خاوری نژاد رمضانعلی، برنارد فرانسوا، جاویدفر فرزاد، ۱۳۸۵، اثر تنش خشکی و آبسیزیک اسید بیرونی بر تکوین گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)، جلد ٦۲، شماره۱، مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۱-۱.

[٤] مجد احمد، صدیقیه مهرابیان، پریسا جنوبی، آزاده مدرسی، ۱۳۹۰، بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد جهشی و ضد سرطانی گیاهان رزماری (Rosmarinus officinalis L.) و اسطوخودوس (Lavandula angustifolia Mill.) در مراحل مختلف نموی، جلد۵، شماره ۳، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ٦۷-٦۱.

[۵] نعمتی فاطمه، راضیه تقوی زاد، سعیده سیف هاشمی، ۱۳۹۰، مقایسه میزان پرولین عسل در شش استان شمالی و شمال غربی ایران، فصلنامه دانش زیستی ایران، جلد٦، شماره۱، ۲۰-۱۱.

[6] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2000, Toxicological Profile for Toluene. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

[7] Bates L S., Waldern R P., Tear I D. 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39:205-207.

[8] Bazer G., Datta FW., Johnson GA., Li P., Satterfield MC., Spencer T.E. 2008, Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development. 35(4): 702-691.

[9] Berg J M., Tymoczko J L., Stryer L. 2010, Biochemistry. 7th ed.

[10] Bhaskara G B., Yang T-H., Verslues P.E. 2015. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. Front Plant Sci. 6: 484.

[11] Boscaiu M., Mora E., Fola O., Scridon S., Llinares J., Vicente O. 2009, Osmolyte Accumulation in Xerophytes as a Response to Environmental Stress. Bulletin UASVM Horticulture. 66 (1): 102-96.

[12] Cappelletti P., Tallarita E, Rabattoni V., Campomenosi P., Sacchi S., Pollegioni L. 2018, Proline oxidase controls proline, glutamate, and glutamine cellular concentrations in a U87 glioblastoma cell line. PLoS ONE 13(4): e0196283. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196283.

[13] Chauhan B S., Johnson D E. 2009, Seed germination ecology of Portulaca oleracea L. an important weed of rice and upland crops. J. An. Appl. Biol. 155: 61-69.

[14] Devlin T. 2006, Texbook of biochemistry with clinical correlations.6th. edc. 2006.

[15] Garcia-Jares C., Vazquez A., Lamas J P., Pajaro M., Alvarez-Casas M. 2015, Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. Antioxidants (Basel) 4: 737-749.

[16] Ghaderi N., Siosemarde A., Shahooee S S. 2013, Effect of water stress on some physiological characteristics in three *Vitis vinifera* cultivars. Iranian journal of horticultural science. 37 (1): 45-55.

[17] Ghafoor K., Choi Y H., Jeon J Y., Jo I H. 2009, Optimization of ultrasound-Assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds. J Agric Food Chem 57: 4988-4994

[18] Holzinger D., Roth J. 2016, Alarming consequences - autoinflammatory disease spectrum due to mutations in proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1. Curr Opin Rheumatol. 28 (5): 550-559.

[19] 19-Hwang M., Ederer G M. 1975, Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. J Clin Microbiol. 1: 114-117.

[20] Jin R., Wang Y., Liu R., Gou J., Chan Z h. 2016, Physiological and Metabolic Changes of Purslane (Portulaca oleracea L.) in Response to Drought, Heat, and

Gypsum Habitats. Not Sci Biol, 2015, 7(1):37-44.

[28] Lorenzo C D., Sangiovanni E., Fumagalli M., Colombo E ., Frigerio G., Colombo F and et al. 2016, Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of Raisins (Vitis vinifera L.) in Human Gastric Epithelial Cells: A Comparative Study. Int. J. Mol. Sci. 17 (1156): 1-15.

[29] Lutts S., Kinet J M., Bouharmont J. 2006, Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (Oryza sativa L.) cultivars differing in salinity tolerance. Plant Growth Regulation. 19(3): 207-218.

[30] OSHA (Occupational Safety and Health Administration), OSHA Infosheet. 2013, Available online: http://www.osha.gov/Publications/OSHA3646.pdf. Accessed November 5, 2013.

[31] Phang J M., Liu W., Hancock C N., Fischer J W. 2015, Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 18 (1): 71–77.

[32] Sanael adrekani V., Mahmoodani F., SEE S F., Yusop S M., Babji A S. 2013, Processing Optimization and Characterization of Gelatin from Catfish (Clarias gariepinus) Skin. Sains Malaysiana 42 (12): 1697–1705.

[33] Uddin M K., Juraimi A S., Hossain M S., Un Nahar M A., Eaqub Ali M,. Rahman M M. 2014, Purslane Weed (Portulaca oleracea): A Prospective Plant Source of Nutrition, Omega-3 Fatty Acid, and Antioxidant Attributes. Scientific World Journal. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934766/

[34] Wu G., Bazer F W., Burghardt R.C., Johnson G.A., Kim S.W., Knabe D.A and et al. 2011, Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and Combined Stresses. Front Plant Sci. 6: 1123. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles

[21] Kavoosi, B. 2010, Biological and histological changes during growth and development of bud in grapevine (Vitis vinifera L.) in relation to bud necrosis. Ph.D. Thesis. College of Agriculture. Shiraz University, Iran. (in Farsi).

[22] Khan M., Zaheer Ahmed A M., Hameed A. 2006, Effect of sea salt and L- ascorbic acid on the seed germination of halophytes. J. Arid. Environ. 67: 535-540.

[23] Kim U-O., Lee S-W., Na S.W., Park H.R., Son ES. 2015, Anti-inflammatory effects of Portulaca oleracea L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells. Journal of medicinal plants research. 9 (21): 407-411.

[24] Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D. 2010, Proline metabolism and transport in plant development. Amino Acids, 39:949-962.

[25] Liang X., Zhang L., Natarajan S K., Becker D. F. 2013, Proline Mechanisms of Stress Survival. Antioxid Redox Signal. 19(9): 998–1011.

[26] Liu X,, Wolfe R., Welch LR., Domozych DS., Popper ZA., Showalter AM. 2016. Bioinformatic Identification and Analysis of Extensins in the Plant Kingdom. PLoS One. 11(2): e0150177.

[27] Llinares J V., Bautista I., Donat M d P., Lidon A., Lull C., Mayoral O and *et al*. 2015, Responses to Environmental Stress in Plants Adapted to Mediterranean human nutrition. Amino Acids. 40(4): 1053–1063.

[35] http://www.noojum.com

[36] www.mohammadshahrsalam.i

[37] http://mohammadshahr.org/Home/taghsimatjoghrafiaei

[38] https://www.bahesab.ir/map/geographic/

[39] https://behrah.com/map.php?id=1224

[40] http://www.irimo.ir/far/services/climate/789-

Journal of Developmental Biology
Vol. 11, No. 2, Spring 2019

Comparative measurement of proline content in dried and fresh forms of *Vitis vinifera* L., *Portulaca oleracea* L. and *Rosmarinus officinalis* L. by different solvents

Taghavizad R. [1*], Ahmadi R.[2], Rahim N.[2]

[1] Department of biology, Yadegar-e Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Department of chemistry, Yadegar-e Imam Khomeini (RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*] Email: ra_taghavizad@yahoo.com

Received: 28 November 2018 Accepted: 5 May 2019

Abstract

The role of proline has been proven in improving joints function and cell cycle regulation. Thus, achieving plants that have the highest proline content is important. The leaves of *Vitis vinifera*, *Portulaca oleracea* and *Rosmarinus officinalis* were collected in autumn. Absorption was determined at 520nm in spectrophotometer with proline standard and solutions. For measurement the total amino acids content, absorption was determined at 570nm in spectrophotometer with glycine standard. *Mann-Whitney U* and *Friedman tests* and SPSS were used. Comparisons of proline contents by different solvents, amino acids and ratio of proline to amino acids in dried and fresh forms of species showed that more proline was extracted in all fresh tissues with ortho xylene and among them the highest amount of proline belonged to fresh *R. officinalis* with 14.864±0.544 µg/ml. In most *samples* of *dried tissues*, more proline was extracted in measurement by toluene solution, and the highest belonged to dried *P. oleracea* with 10.291±0.202 µg/ml. The highest average of total free amino acids was 82.663±0.325 µg/ml in fresh *R. officinalis* and 68.871±0.679 µg/ml in dried *V. vinifera*. The comparison of the two solutions function was not significant, so it is possible to use ortho xylene instead of toluene and reduce the risks. It seems that the physiological process of response to drought stress continues with proline synthesis after harvesting and thus it plays a role in development of the reproductive phase.

Keywords: free amino acid, proline, *Portulaca oleracea*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera*.