دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال هفتم، شماره بیست و دوم، ۱۳۹۴

شناسایی و سنجش برخی از متابولیت‌های ثانویه اندام‌های برگ، ساقه و ریشه سیاه گینه(*Dendrostellera lessertii*) و اثر دگرآسیبی آنها بر گیاهان جو و ماش

بابک دلنواز هاشملویان[۱]، عذرا عطائی عظیمی[۲]، سیده مینا مژدهی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۵

چکیده

سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) گیاهی چند ساله و دارویی از تیره تیملاسه (Thymelaeaceae) با ویژگی ضد سرطان است. در این پژوهش، شناسایی و سنجش برخی از مواد مؤثره سیاه گینه مثل فنل ها، تانن ها و گروه های آلکالوئیدی اندام های ریشه، ساقه و برگ و سپس اثر دگرآسیبی عصاره الکلی در مقادیرمختلف روی گیاهان جو و ماش بررسی شد. تیمارها شامل نوع اندام(برگ، ریشه و ساقه)، غلظت عصاره(۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و نوع بذر(جو و ماش) بود. آزمایش ها در آزمایشگاه های تحقیقاتی ساوه و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در عصاره الکلی این گیاه با روش کروماتوگرافی لایه نازک و پاشیدن کلرید آهن، حضور تانن های متراکم و هیدرولیزی شناسایی شد. نتایج سنجش فنل ها، تانن ها و آلکالوئیدها نشان داد که همه اندام های این گیاه به ویژه ریشه و برگ سرشار از این مواد هستند. محتوای فنلی این گیاه بسیار بالا و تانن های هیدرولیزی آن از تانن های متراکم بیشتر بود. محتوای آلکالوئید این گیاه نیزدر مقایسه با گیاهان دیگر بالا ولی نسبت به فنل ها و تانن هیدرولیزی پایین‌تر بود. نتایج نشان داد عصاره الکلی سیاه گینه به ترتیب با کاهش ٦٦درصدی و ۳۳ درصدی جوانه زنی جو و ماش و کاهش رشد دانه رست آن ها، اثر دگرآسیبی داشته و اثر دگرآسیبی آن روی جو بیشتر از ماش است.

واژه های کلیدی: آلکالوئید، فنل، تانن هیدرولیزی ، تانن متراکم، کلرید آهن

دلنواز هاشملویان، ب.، ع. عطائی عظیمی و م. مژدهی. ۱۳۹٤. شناسایی و سنجش برخی از متابولیت های ثانویه اندام های برگ، ساقه و ریشه سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) و اثر دگرآسیبی آنها بر گیاهان جو و ماش. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۲۲: ۱۷۷-۱٦۲.

۱- گروه زیست شناسی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران- مسول مکاتبات، پست الکترونیکی delnavaz@iau-saveh.ac.ir

۲- گروه زیست شناسی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

مقدمه

بیش از پنجاه سال است که پژوهش ها روی شناسایی متابولیت های ثانویه در گیاهان متمرکز شده است. این ترکیبات نقش مهمی در سازش گیاهان به شرایط محیطی داشته و علاوه بر آن ارزش دارویی بالایی هم دارند (بورگاود و همکاران، ۲۰۰۱). ترکیبات فنلی، انواع آلکالوئید مثل اندول آلکالوئید، تروپان آلکالوئید و تاکسان ها از مهمترین ترکیبات ثانویه هستند که برای یافتن منابع گیاهی تولید کننده آن ها، تحقیقات زیادی انجام می شود(مورنو و همکاران، ۱۹۹۵). سنجش آلکالوئیدها، فنل ها و فلاونوئیدهای اندام های گیاهان، نشان داد که که در اکثر گیاهان، برگ ها بیشترین آلکالوئید و ریشه ها و ساقه ها بیشترین فنل و فلاونوئید را دارند. فنل ها، از ترکیبات شیمیایی دگرآسیب بر گیاهان و میکروارگانیسم ها هستند (کمال، ۲۰۱۱). ترکیبات شیمیایی دگرآسیب[1] مثل آلکالوئیدها و فنل ها، تأثیر مهمی بر بوم شناسی و فیزیولوژی موجوداتی دارند که آن ها را تولید می کنند(والر و درمر، ۱۹۸۱). برخی از ترکیبات دگرآسیب شیمیایی در مرحله خاصی از رشد در گیاه انباشته می شوند و نوع و میزان آن ها بستگی به مرحله رشد و فصل برداشت گیاه دارد. این ترکیبات در اندام های هوایی و زمینی گیاه تولید و باعث ارتباط دگرآسیبی گیاهان می شوند. در اغلب گیاهان، برگ ها منبع اصلی تولید ترکیبات شیمیایی دگرآسیب هستند (روسنزویگ و آبرانسکی، ۱۹۹۳).

فنل ها گروهی از ترکیبات ثانویه معطر گیاهی هستند که فعالیت های زیستی زیادی مثل اثرات درمانی، آنتی اکسیدانی(پرواستوس و همکاران، ۲۰۰۶) و ضد میکروبی(رایوها و همکاران، ۲۰۰۰) دارند. این ترکیبات در صنایع غذایی نیز اهمیت داشته و باعث بالا رفتن کیفیت و ارزش غذایی خوراکی ها می شوند(پر و بولول، ۲۰۰۰۰). گروه های اصلی فنل ها، مثل پلی فنل ها، فنل های اسیدی و فلاونوئیدهایی مثل فلاوان ها، فلاونول ها و ایزوفلاون ها، نقش مهمی در ایمنی گیاه، جانوران و انسان در برابر عوامل محیطی و بیماریزا دارند(تاپیرو و همکاران، ۲۰۰۲). اکثر فنل ها در حلال های قطبی و آب محلول هستند. استخراج فنل با حلال های مختلف، نشان داد که با کاهش قطبیت حلال، مقدار فنل جدا شده هم کاهش می یابد(پرواستوس و کوما ایتیس، ۲۰۰۷). در انگور قرمز، ۳۸ نوع ترکیب فنلی شامل انواع آنتوسیانین، هیدرواکسی سینامیک اسید، بنزوئیک اسید، کاتشین، پروسیانیدین و فلاونول شناسایی و مشخص گردید شدت قرمزی انگور به حضور این ترکیبات بستگی دارد(کارکوفالکون و همکاران، ۲۰۰۷). ترکیبات فنلی ضد جهش و ضد سرطان هستند(استاوریک، ۱۹۹٤). مرسوم ترین روش استخراج و جداسازی فنل ها از گیاهان، استفاده از حلال های آلی و جداسازی مایع- مایع می باشد که معمولاً طولانی بوده و باعث از بین رفتن برخی از ترکیبات، طی جدا سازی می شود (گارسیاسالاس و همکاران، ۲۰۱۰). اصطلاح پلی فنل به ترکیبات فنلی که حداقل یک حلقه آروماتیک با یک یا چند گروه هیدروکسیل دارند گفته می شود. بیش از هشت هزار نوع پلی فنل شناخته شده است که از نظر ساختمانی بسیار متنوع هستند. پلی فنل ها بر اساس اسکلت شیمیایی اصلی، به ده گروه مختلف تقسیم می شوند و در طبیعت با قندها، استرها، متیل استرها و پروتئین ها کمپلکس تشکیل می دهند(بالاسوندرام و همکاران، ۲۰۰٦). در گیاهان، فلانوئیدها اغلب به شکل گلیکوزیدهایی هستند که رنگ های آبی، قرمز و نارنجی را در اندام های گیاهان، به ویژه گل ها و میوه ها ایجاد می کنند(ناکزک و شهیدی، ۲۰۰٦). فلاونوئیدها به سیزده دسته شامل تانن های متراکم،

1- Allelochemicals

چالکون ها، دی هیدرو چالکون ها، آورونها، فلاون ها، فلاونول ها، دی هیدروفلاونول ها، فلاوانون ها، فلاوانول ها(کاتشین ها)، فلاواندیول ها، آنتوسیانیدین ها، ایزوفلاونونا ها و فلاونوئیدها تقسیم می شوند(اسکارپا و گونزالز، ۲۰۰۸). تانن ها از پلی فنل های با وزن مولکولی بالا می باشند که با پروتئین ها پیوند ایجاد می کنند(کلیفورد و اسکالبرت، ۲۰۰۰). دو نوع تانن در گیاهان شناسایی شده اند که شامل تانن های هیدرولیز شونده و متراکم هستند. تانن های هیدرولیز شونده، فراوانترین پلی فنل و ترکیب آنتی اکسیدان گیاهان می باشند که شامل گالوتانن ها، الاژیتانن ها و گالاژیل استرها هستند(تاناکا و همکاران، ۱۹۸٦). مغزهایی مثل گردو با وجود فنل ها و به ویژه پلی فنل هایی مثل الاژیتانن ها و الاژیک اسید، خاصیت آنتی اکسیدان، ضد جهش و ضد سرطان دارند(آبه و همکاران، ۲۰۱۰). تانن ها ترکیباتی محلول در آب، قلیاهای رقیق، الکل و استن بوده، ولی در حلال های آلی دیگر کمتر حل می شوند. گالی تانن ها و الاژی تانن ها(تانن های هیدرولیز شونده) با محلول خیلی رقیق فریک کلراید، به رنگ آبی تا سیاه در می آیند، ولی تانن های متراکم با این معرف قهوه ای تا سبز رنگ می شوند(بامنیری و همکاران، ۲۰۱۰).

آلکالوئیدها گروهی از ترکیبات ثانویه هستند که در گیاهان، انتشار وسیعی داشته و از نظر ساختمانی، انتشار در طبیعت و فعالیت های زیستی بسیار متنوعند(روبرت و وینک، ۱۹۹۸). گروه های چهارگانه آلکالوئیدهای پروتوبربرینی، گروه بزرگی از آلکالوئیدهای ایزوکواینولینی هستند که در گیاهان مختلف مثل زرشک انتشار دارند و روش های مختلفی برای استخراج آن ها استفاده می شود(گریکوا و همکاران، ۲۰۰۷). با به کارگیری حلال های مختلف و تغییر pH می توان چهار گروه اصلی پروتوبربرین ها را از هم جدا کرد(مارک و همکاران، ۲۰۰۳).

سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii* (Wikstr)Van.Tigeh)) گیاهی دارویی از تیره مازریون (Thymelaeaceae) و از جمله گیاهان بوته ای چندساله با ساقه چوبی است که به صورت طبیعی و خودرو در قسمت عمده ای از مراتع ایران از جمله آذربایجان، منجیل، خمسه، همدان، ملایر، اراک، فارس، اصفهان، دامنه جنوبی البرز، یزد، خراسان، سمنان و ساوه انتشار دارد(اخیانی، ۱۳۷٤، رشینگر، ۱۹۷۲). این گیاه از جمله گیاهان دارویی مرتعی است که می تواند نقش بسزایی در صنعت داروسازی داشته باشد(دلنواز هاشملویان و عطائی عظیمی، ۱۳۸۷). گیاه سیاه گینه، از گیاهان مراتع خشک است که در کاهش دی اکسید کربن هوا دخالت داشته و مؤثر است(فروزه و همکاران، ۱۳۸۷). دی ترپن های برگ سیاه گینه خاصیت ضد توموری دارند(صادقی و یزدانپرست، ۲۰۰۵). عصاره برگ سیاه گینه با اثر روی آنزیم آلکالین فسفاتاز غشای پلاسمایی از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری می کند(صادقی ریزی و یزدانپرست، ۲۰۰۷). عصاره آبی برگ روی مرگ برنامه ریزی شده سلول های سرطانی خون انسان اثر داشته و مانع تکثیر این سلول ها می شود(یزدان پرست و حیدری، ۲۰۰۹). عصاره الکلی سیاه گینه، روی تکثیر ٤ نوع سلول سرطانی انسانی، اثر بازدارنده دارد(صادقی و یزدانپرست، ۲۰۰۳). تجویز روزانه خوراکی عصاره آب – الکلی برگ های گیاه سیاه گینه، سبب حذف و یا کاهش اندازه تومورهای پستان و همچنین تحلیل تومورهای روده بزرگ در موش های آزمایشگاهی می شود(هدایتی و همکاران، ۱۳۸۷). عصاره برگ های سیاه گینه، باعث قطع

تقسیم و مرگ برنامه ریزی شده سلول های سرطانی تیروئید می شود(نوروزی و یزدانپرست، ۲۰۰۷).

اگر چه چندین گزارش درباره اثر ضد سرطانی این گیاه در دسترس است، ولی گزارشی از مطالعه اثر دگرآسیبی این گیاه، همچنین شناسایی و جدا سازی مواد مؤثره آن در دسترس نیست. در این پژوهش، علاوه بر مطالعه اثر دگرآسیبی، برخی از ترکیبات ثانویه این گیاه، مثل گروه های فنل ها، تانن ها و گروه های آلکالوئیدی، استخراج، شناسایی و سنجش شده است.

مواد و روش ها

این پـژوهش در سـال ۱۳۹۰ در آزمایشـگاه هـای تحقیقاتی دانشگاه آزاد ساوه انجام شد.

تهیه ماده گیاهی

گیاه سیاه گینه از اطراف ساوه جمع آوری و در هرباریوم مرکزی دانشگاه شناسایی شد. پس از شستشوی گیاه، اندام های برگ، ریشه و ساقه از یکدیگر جدا و در دمای اتاق و سایه خشک گردید. اندام های خشک شده به وسیله آسیاب پودر و برای استخراج آماده شدند.

اثر دگر آسیبی عصاره متانولی سیاه گینه بر جوانه‌زنی بذر و رشد دانه رست جو(*Hordeum vulgare* L.) و ماش(*Vigna radiata* L.)- ٤ گرم پودر اندام های هوایی سیاه گینه، با ۱۰۰ میلی لیتر متانول ۷۰٪ مخلوط و بعد از گذشت ۲٤ ساعت، صاف و در دمای اتاق خشک شد. برای مطالعه اثر عصاره بر جوانه‌زنی بذر و رشد دانه رست جو ، ۰/۵ گرم عصاره خشک گیاه، در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. بذرهای جو(رقم صحرا از اداره کشاورزی گنبد کاووس) و ماش(رقم 36-62-1 از اداره کشاورزی گنبد کاووس)، داخل پتری دیش های شیشه ای با کاغذ صافی، به اندازه کف پتری (برای پخش همگن عصاره)، و در حضور مقادیر۰، ۲/۵ و ۵ میلی لیتر عصاره گیاه (سه تکرار برای هر غلظت)، که حجم هر یک با آب مقطر به ۵ میلی لیتر رسانده شد. کشت شدند(دمای ۲۵-۲۷ درجه و تاریکی). مقادیر بر حسب وزن خشک عصاره، برابر۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج شامل درصد جوانه زنی، طول ساقه چه و ریشه چه دانه رست ها، بعد از ۵ روز، بررسی شد.

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) عصاره متانولی- ۲ گرم پودر اندام های هوایی سیاه گینه، با ۵۰ میلی لیتر متانول ۷۰٪ مخلوط و بعد از گذشت ۲٤ ساعت، صاف و در دمای اتاق تغلیظ شد. از محلول غلیظ شده روی صفحه سیلیکاژل آماده با ضخامت۰/۵ میلی متر، لکه گذاری و با متانول-آب با نسبت ۳۵ به٦۵ ، کروماتوگرافی انجام شد. بعد از پایان کروماتوگرافی، روی یکی از لکه ها برای تشخیص آلکالوئید، معرف درژاندورف ((محلول آ: ۰/۱۷ گرم بیسموت در مخلوط ۲ میلی لیتر استیک اسید و ۸ میلی لیترآب مقطر و محلول ب: ٤ گرم یدور پتاسیم در ۱۰ مخلوط میلی لیتر استیک اسید و ۲۰ میلی لیتر آب مقطر. محلول آ و ب مخلوط و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ رسانده شد))(ابراهیم زاده و همکاران ۱۳۷٤) و روی دیگری، محلول کلرید آهن ۰/۵٪ (معرف تانن) پاشیده شد**(بامنیری و همکاران۲۰۱۰)**.

استخراج و سنجش فنل ها (بامنیری و همکاران، ۲۰۱۰)

جداسازی فنل کل- ۲ گرم پودر هر اندام سیاه گینه، با ۵۰ میلی لیتر کلروفرم مخلوط، بعد از ۲ ساعت در بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد، صاف و تفاله سه بار با ۵۰ میلی لیتر کلروفرم شستشو شد. بخش صاف

شده کلروفرمی که محتوی رنگیزه های فتوسنتزی، لیپیدها و مواد محلول در چربی بود، دور ریخته شد و تفاله باقیمانده برای استخراج فنل، در دمای اتاق خشک گردید. تفاله خشک با ۵۰ میلی لیتر متانول ۷۰٪ مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه هم زدن، صاف و این فرآیند دو بار تکرار گردید تا فنل ها به طور کامل جدا شوند. عصاره متانولی محتوی فنل ها، در دمای اتاق خشک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر(در طول موج ۷٤۳ نانومتر)، در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد.

جداسازی تانن هیدرولیزی (گارو گالوز، ۱۹۹۷)- ۲ گرم پودر هر اندام سیاه گینه، با ۱۰۰ میلی لیتر متانول ۹٦٪ مخلوط، بعد از یک ساعت قرار دادن در بن ماری ۷۰ درجه، صاف و این فرآیند سه بار تکرار شد. عصاره الکلی در دمای اتاق خشک و ماده خشک در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر جوش حل گردید. به عصاره حاصل بعد از سرد شدن کامل، ۲۵ میلی لیتر اتر اتیلیک اضافه و با دکانتور، فاز اتری محتوی رنگیزه های فتوسنتزی و چربی ها از فاز آبی جدا شدند. فاز آبی به دو قسمت مساوی تقسیم شد. pH بخش اول با هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، به بیش از ۱۰ و pH بخش دوم با اسید کلریدریک ۱ نرمال به حدود ۳ رسانده شد برای هیدرولیز اسیدی و بازی تانن های هیدرولیزی، هر دو بخش ۲۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شدند. بعد از سرد شدن هر دو بخش مخلوط، pH آن روی ٦ تنظیم و تانن های هیدرولیز شده با اتر اتیلیک(حجم مساوی و سه بار تکرار) جدا، در دمای اتاق خشک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر(در طول موج ۷٤۳ نانومتر)، در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد.

سنجش فنل با معرف فولین سیوکالتو و روش اسپکتروفتومتری (گوت فینگر، ۱۹۸۱)- برای به دست آوردن منحنی استاندارد (کالیبره) از مقادیر۰ تا ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر اسید گالیک استفاده شد. ۱ میلی لیتر از هر یک از این مقادیر با ۱ میلی لیتر سدیم استات (۵ درصد با pH =۵)، ۰/۲۵ میلی لیتر معرف فولن- سیوکالتو (مولار) مخلوط و حجم با کربنات سدیم (۲۰ درصد) به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. جذب، با اسپکتروفتومتر(6800UV\VIS JENWY) در طول موج ۷٤۳ نانومتر اندازه گیری و منحنی استاندارد رسم شد.

سنجش فنل کل و تانن هیدرولیزی اندام های سیاه گینه، با مخلوط ۱میلی لیتر از هر نمونه با ۱ میلی لیتر سدیم استات، ۷/۷۵ میلی لیتر سدیم کربنات و ۰/۲۵ میلی لیتر فولن- سیوکالتو و خواندن جذب در طول موج ۷٤۳ نانومتر و با استفاده از منحنی استاندارد، انجام شد.

تعیین میزان فنل های دیگر (شناسایی نشده): برای به دست آوردن میزان فنل های دیگر، مجموع تانن هیدرولیز و متراکم، از فنل کل کم شد.

استخراج و اندازه گیری تانن های متراکم(بامنیری و همکاران، ۲۰۱۰) - ۲ گرم پودر گیاه در ۱۰۰ میلی لیتر استن ۷۰٪ حاوی ۱٪ اسید آسکوربیک مخلوط و ۲٤ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار گرفت و صاف شد. عصاره، در دمای اتاق خشک، وزن و در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل و سپس طی سه تکرار، هر با ۵۰ میلی لیتر اتر، تانن های متراکم آن، با دکانتور جدا گردید. عصاره اتری محتوی تانن های متراکم، خشک و برای سنجش در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر، حل شد.

سنجش تانن متراکم به روش اسپکتروفتومتری- ۱ میلی لیتر از محلول آبی محتوی تانن متراکم را در یک لوله آزمایش، با ٤/۸ میلی لیتر محلول بوتانول – اسید

کلریدریک (۹۵ قسمت بوتانول و ۵ قسمت اسید کلریدریک ۳۷٪) مخلوط، به آن ۰/۲ میلی لیتر معرف فریک (سولفات آمونیوم فریک ۲٪ در اسید کلریدریک ۲ نرمال) اضافه و ۶۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن محلول حاصل، جذب با اسپکتروفتومتر، در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری و با فرمول زیر محتوای تانن متراکم محاسبه گردید:

$$Td\%=(A_{550}\times 78.26)/(Wd\times 1000)$$

درصد تانن متراکم(Td%)، جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر(A_{550}) و وزن خشک عصاره(Wd).

استخراج، شناسایی و سنجش گروه های آلکالوئیدی

(مارک و همکاران، ۲۰۰۳)- استخراج عصاره خام: ۵ گرم پودر نمونه گیاهی(ریشه، ساقه، برگ) در ۱۰۰ میلی لیتر متانول(خالص) مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری ۶۰ درجه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، صاف و تفاله سه بار با متانول شستشو شد. عصاره صاف شده در سایه و دمای اتاق تبخیر و عصاره خام خشک هر اندام به دست آمد.

جداسازی چهار گروه آلکالوئید از عصاره خام، با حلال های مختلف و روش اسید- باز به شکل مرحله به مرحله انجام گرفت:

مرحله ۱**(گروه ۱)**- جداسازی آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی: عصاره خام خشک، در۵۰ میلی لیتر آب حل و pH آن با سولفوریک اسید غلیظ به حدود ۳-۴ رسانده شد. سپس به آن ۲۰ میلی لیتر اتر اضافه و با دکانتور، فاز اتری از فاز آبی جدا گردید. سه بار این مرحله تکرار شد. فاز اتری دارای آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی بود که در هوای اتاق خشک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر، در یخچال(دمای ۱۰ درجه و تاریکی) نگهداری شد.

مرحله ۲ **(گروه۲)** - جداسازی آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین های چهار بخشی، آلکالوئیدهای پروتوپین و آلکالوئیدهای سه قسمتی بازی محلول در اتر: pH فاز آبی باقیمانده از مرحله ۱، با قطره قطره اضافه کردن کربنات سدیم به حدود ۸-۱۰ رسانده شد. سپس به آن ۲۰ میلی لیتر اتر اضافه و آن را درون دکانتور ریخته، فاز اتری جدا گردید. سه بار این مرحله تکرار شد. فاز اتری دارای آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین های چهار بخشی، آلکالوئیدهای پروتوپین و آلکالوئیدهای سه قسمتی بازی محلول در اتر بود که در هوای اتاق خشک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر، در یخچال(دمای ۱۰ درجه و تاریکی) نگهداری شد.

مرحله ۳ **(گروه۳)** - جداسازی آلکالوئیدهای چهار پروتوبربرین به شکل نمک های سیترات و ترکیبات غیر قطبی: pH فاز آبی باقیمانده از مرحله ۲ با اضافه کردن سود ۲ نرمال به بالاتر از ۱۳ و دوباره با اضافه کردن قطره قطره اسید سیتریک، pH به ۸-۱۰ رسانده شد. سپس به آن ۲۰ میلی لیتر اتر اضافه و آن را درون دکانتور ریخته، فاز اتری جدا گردید. این مرحله سه بار تکرار شد. فاز اتری دارای آلکالوئیدهای چهار پروتوبربرین به شکل نمک های سیترات و ترکیبات غیر قطبی محلول در اتر بود که در هوای اتاق خشک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر، در یخچال(دمای ۱۰ درجه و تاریکی) نگهداری شد.

مرحله ۴ **(گروه۴)** - جداسازی آلکالوئیدهای چهار بخشی با قطبیت بالا: pH فاز آبی باقیمانده از مرحله ۳ با اضافه کردن ۲ گرم یدور پتاسیم(KI) با اسید سولفوریک غلیظ، به ۵/۵ رسانده شد. سپس به آن ۲۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه و آن را درون دکانتور ریخته، فاز کلروفرمی جدا گردید. سه بار این مرحله

تکرار شد. فاز کلروفرمی دارای آلکالوئیـدهای بخـش چهارم با قطبیت بالا بود که در هوای اتـاق خشـک و برای سنجش با اسپکتروفتومتر، در یخچال(دمـای ۱۰ درجه و تاریکی) نگهداری شد.

سنجش آلکالوئید: سنجش آلکالوئید با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. آلکالوئید ارگوتامین به عنوان آلکالوئید استاندارد برای رسم منحنی کالیبره استفاده شد.

۱۰۰ میلی گرم ارگوتامین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و از آن مقادیر ۰ تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، تهیه شد. برای سنجش آلکالوئیدهای چهار گانه، عصاره خشک شده از هر گروه از هر اندام، در ۰/۵ میلی لیتر حلال خودش حل و حجم آن با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. جذب مقادیر مختلف آلکالوئید استاندارد و نمونه های گیاهی، در طول موج ۲۵٤ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری و بر اساس منحنی استاندارد حاصل، درصد آلکالوئید در هر گروه از هر اندام محاسبه شد.

آزمایش کیفی حضور آلکالوئید در هر گروه- حضور آلکالوئید در هر مرحله، با استفاده از معرف عمومی آلکالوئیدها (درژاندورف) مشخص شد. از محلول غلیظ شده هر مرحله، یک قطره روی صفحه سلیکاژل قرار داده شد و روی آن معرف درژاندورف پاشیده شد. ظهور رنگ نارنجی، نشان دهنده حضور آلکالوئیدها بود.

آزمایش ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و برای تجزیه آماری و مقایسه میانگین ها، از نرم افزار Minitab و آزمون توکی در سطح ۵ درصد، استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر عصاره سیاه گینه بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذور ماش و جو معنی دار است(جدول۱).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف عصاره الکلی سیاه گینه بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذور جو و ماش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین	مربعات	
		جوانه زنی	ساقه چه	ریشه چه
تکرار(جو)	۲	**۲۵۵/٦۷** ns	۲۰٦/۷۳ns	۲۳۲/۷۲ns
تیمار(جو)	۲	۲۱۹۸/٦۱**	۱۰۰۳/۳۵**	۲۱/۵۳**
خطا(**جو**)	۹	۲۹۳/۱۸	۵/۳۲	۰/۰۷
تکرار(ماش)	۲	۲۲۹/۵۲ ns	۱۹٦/۷۳ns	۱۹٦ ns
تیمار(ماش)	۲	۳۰۰۱/۷۰**	۳۸۵/۹۳**	۱٦/۵٤**
خطا(**ماش**)	۱۱	۵۰۱/۷	۵/۲٤	٦/۵۹

ns، بدون اثر معنی دار و **، اثر معنی دار در سطح احتمال یک درصد($p<0.05$)

عصاره خام اندام های هوایی سیاه گینه، اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی بذر و رشد دانه رست جو و ماش داشت (جدول۱). با افزایش غلظت عصاره به ۵ میلی‌لیتر، درصد جوانه‌زنی بذر جو، نسبت به شاهد (۹۸/۸۰٪) ۹/۸ برابر کاهش و به ۱۰٪ رسید، ولی اثر آن بر جوانه‌زنی بذر ماش کمتر بود و درصد

جوانه‌زنی ماش از ۱۰۰٪ در شاهد، به ٦٦/٦ ٪ در غلظت ۵ میلی لیتر عصاره رسید. این نتیجه نشان داد که اثر دگرآسیبی عصاره سیاه گینه بر جوانه‌زنی بذر ماش، کمتر از جو است. رشد ساقه‌چه و ریشه‌چه دانه رست جو نسبت به شاهد به ترتیب حدود ۲۷ و ٤٠ برابر و در ماش به ترتیب ٥/٤ و ۹ برابر کاهش داشت (جدول۲ و شکل۱).

جدول۲- اثر مقادیر مختلف عصاره الکلی سیاه گینه بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذور جو و ماش

نمونه	عصاره (ml)	درصد جوانه زنی	طول ساقه‌چه (cm)	طول ریشه‌چه (cm)
جو	۰	۹۸/۸±۱/۹۰۰a	۳/۵±۱/۰۲a	۲/۸٤±۰/۹a
	۲/۵	۳۰±۱/۸۹b	۱/۲±۰/۹b	۰/۹±۰/۳٦b
	۵	۱۰±۱/۰۲c	۰/۱۳±۰/۰۷۵c	۰/۰۷±۰/۰۰۹c
ماش	۰	۹۹/۱±۰/۱a	٤/۸۵±۱/۱۷a	٤/۵±۰/۹a
	۲/۵	۸٦/٦±۱/۰۷a	۱/٤۲±۰/۹b	۰/٦۳±۰/۱۷b
	۵	٦٦/٦±۱/۸۱b	۰/۹±۰/۱۷c	۰/۵±۰/۰۵۵b

± خطای استاندارد از میانگین

شکل۱- اثر دگرآسیبی عصاره خام سیاه گینه بر جوانه‌زنی و رشد دانه رست جو و ماش.

ترکیبات فنلی، آلکالوئیدها، ترپن‌ها، کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها، می توانند از مواد دگرآسیب باشند که بر عوامل زیستی موجودات دیگر مثل تنفس و فتوسنتز اثر گذاشته و سبب کاهش رشد و یا نابودی آن موجود می شوند (کومینگ و همکاران ۲۰۱۲، و کمال، ۲۰۱۱). ترکیبات شیمیایی دگرآسیب مثل آلکالوئید و فنل ها، اثر مهمی بر بوم شناسی و فیزیولوژی موجوداتی دارند که آن ها را تولید می کنند (والر و درمر، ۱۹۸۱). گروه های اصلی فنل ها، مثل پلی فنل ها، فنل های اسیدی و فلاونوئیدهایی مثل فلاوان ها، فلاونول ها و ایزوفلاون ها، نقش مهمی در ایمنی گیاهان، جانوران و انسان ها در برابر عوامل

محیطی وعوامل بیماریزا دارند (تاپیرو و همکاران، ۲۰۰۲).

عصاره الکلی سیاه گینه اثر بازدارنده بر جوانه زنی دانه و رشد دانه رست جو و ماش داشت. تاکنون گزارشی از اثر دگر آسیبی عصاره سیاه گینه بر گیاهان در دست نبوده است ولی در این مطالعه اثر بازدارندگی آن، بر رویش و جوانه زنی بذر، در برخی گیاهان نظیر ماش و جو اثبات شد. اثر بازدارنده عصاره آبی گیاه رنگینک(*Chrozophora rottleri*) ، بر جوانه زدن بذر و رشد دانه رست سه رقم برنج (مهاراج و پرابهاکاران، ۲۰۱۳) و اثر بازدارنده عصاره دانه و دانه رست تاج خروس بر جوانه زنی بذر و رشد دانه رست ذرت (فرج زاده و یارنیا، ۲۰۱۱) مثال هایی از اثرات بازدارنده عصاره های گیاهی است. با وجود این، در مواردی برخلاف اثر بازدارندگی، اثر محرک عصاره مشاهده شده است. برای مثال، می توان به اثر محرک عصاره غده سیب زمینی بر رویش دانه و رشد دانه رست نوعی ارکیده(*Vanda roxburgii*) اشاره کرد (ایسلام و همکاران، ۲۰۱۱).

از عصاره های گیاهی، می توان به عنوان یک محرک رشد موجودات دیگر و یا یک عامل بازدارنده رشد ارگانیک، مثل علف کش ها استفاده کرد که به راحتی در محیط تجزیه شده و سبب آلودگی محیط نمی شوند (کومینگ و همکاران، ۲۰۱۲، روسنزویگ و آبرانسکی، ۱۹۹۳ ، والر و درمر، ۱۹۸۱ و کمال، ۲۰۱۱). اگر چه عصاره الکلی سیاه گینه اثر بازدارنده بر جوانه زنی و رشد دانه رست جو و ماش داشت، ولی اثر آن بر جو خیلی بیشتر از ماش بود. جو یک گیاه تک لپه و ماش یک گیاه دو لپه است. با توجه به این اثر، شاید بتوان، از عصاره الکلی این گیاه، به عنوان یک علف کش ارگانیک و انتخابی، برای از بین بردن علف های هرز تک لپه، در مزارع گیاهان دولپه مثل چغندر و کلزا، استفاده کرد.

شناسایی و سنجش فنل ها و آلکالوئیدهای سیاه گینه

شناسایی فنل و آلکالوئید: با انجام کروماتوگرافی لایه نازک عصاره خام اندام های هوایی سیاه گینه، مشخص شد که این گیاه دارای تانن هیدرولیزی و متراکم و آلکالوئید است. پاشیدن معرف تانن (محلول آهن کلراید) روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک، نشان داد که اندام های هوایی سیاه گینه، دارای هر دو نوع تانن متراکم و هیدرولیزی هستند (شکل۲ چپ). در این کروماتوگرافی تانن متراکم روی صفحه کروماتوگرافی حرکت، ولی تانن هیدرولیزی روی لکه باقی ماند. رنگ قهوه ای و سبز حضور تانن های متراکم و رنگ آبی و سیاه روی لکه و کمی بالاتر نشان دهنده حضور تانن های هیدرولیزی بود.

ظهور رنگ نارنجی با پاشیدن معرف درژاندورف، وجود آلکالوئیدها را در این گیاه نشان داد اگر چه در این کروماتوگرافی، انواع آن از هم جدا نشدند (شکل۲ راست).

فنل ها: درصد فنل کل در وزن خشک ریشه (٦/٢١٪) و برگ (٦/٢٢٪) مشابه بود، ولی فنل ساقه (٤/٢٪) خیلی کمتر و تفاوت آن با دو اندام دیگر معنی دار بود (جدول۳). میزان تانن های متراکم و هیدرولیزی در اندام های سیاه گینه، شناسایی و میزان آن ها اندازه گیری شد. میزان فنل های شناسایی نشده (فنل های دیگر) از اختلاف مجموع تانن ها از فنل کل حاصل شد.

میزان تانن متراکم در هر سه اندام ریشه، ساقه و برگ سیاه گینه بین ۰/۱٦-۰/۲۵ درصد بود. اگر چه به نظر می آید که ساقه بیشترین تانن متراکم را دارد

(جدول۳)، ولی مقایسه آنالیز واریانس و میانگین ها نشان داد بین سه اندام از نظر داشتن تانن متراکم تفاوت معنی داری وجود ندارد و میزان تانن متراکم هر سه اندام، مشابه است(جدول۳).

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها نشان داد که بین سه اندام از نظر داشتن تانن هیدرولیزی تفاوت معنی دار وجود دارد. درصد تانن هیدرولیز شونده در اندام های ریشه، ساقه و برگ سیاه گینه بین ۱/۱– ۱/۷ درصد بود. ریشه بیشترین و برگ کمترین تانن هیدرولیزی را داشت (جدول٤و۳).

شکل۲- کروماتوگرافی لایه نازک عصاره خام اندام های هوایی سیاه گینه:
چپ- نمایش وجود تانن های متراکم و هیدرولیزی بعد از پاشیدن آهن کلراید.
راست- نمایش وجود آلکالوئید بعد از پاشیدن درژاندورف.

جدول۳- نتایج تجزیه واریانس فنل کل، تانن هیدرولیزی و متراکم و فنل های دیگر در اندام های سیاه گینه

		میانگین	مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	فنل کل	تانن هیدرولیزی	تانن متراکم	فنل های دیگر
تکرار	۲	۲۲۱/۲۳ ns	۱۹/۳۲ ns	۷/۳۵ns	۱۰/۷۲ns
اندام	۲	۷۳۸/۷**	۱۳/٦۲**	٦/٥۲ns	۷/٥۳**
خطا	٦	۳/۱٤	٥۰۱/۷	٥/۲٤	٦/٥۹

ns، بدون اثر معنی دار و **، اثر معنی دار در سطح احتمال یک درصد($p<0.05$)

مقایسه میانگین تانن متراکم با تانن هیدرولیزی اندام ها نشان داد که تفاوت ها معنی دار بوده و به طور کلی اندام های سیاه گینه، تانن هیدرولیزی بیشتری دارند.

تانن ها از پلی فنل های با وزن مولکولی بالا می باشند که با پروتئین ها پیوند ایجاد می کنند (کلیفورد و اسکالبرت، ۲۰۰۰). تانن های هیدرولیز شونده و متراکم در بسیاری از گیاهان شناسایی شده اند. تانن های هیدرولیز شونده، فراوانترین پلی فنل و ترکیب آنتی اکسیدان گیاهان می باشند که شامل گالوتانن ها، الاژیتانن ها و گالاژیل استرها هستند (تاناکا و همکاران، ۱۹۸٦).

درصد فنل های شناسایی نشده در اندام های سیاه گینه بین ۲/۲٦- ٤/۹٦ درصد بود (جدول٤). تفاوت بین اندام ها، از جهت داشتن فنل های شناسایی نشده معنی دار بود. برگ بیشترین فنل شناسایی نشده را داشت.

مقایسه میزان فنل های شناسایی نشده با تانن ها، نشان داد که تفاوت فنل های شناسایی نشده با تانن های متراکم در همه اندام ها، معنی دار است ولی تفاوت تانن هیدرولیزی ساقه با فنل های شناسایی نشده معنی دار نیست. یعنی نسبت تانن ها و فنل های شناسایی نشده در ساقه یکسان است.

جدول٤- درصد تانن های متراکم و هیدرولیزی، فنل های شناسایی نشده و فنل کل در وزن خشک ریشه، ساقه و برگ سیاه گینه

نوع فنل	ریشه	ساقه	برگ
تانن متراکم (درصد)	۰/۲۵±۰/۰۲f	۰/۲٤±۰/۰۷۵f	۰/۱٦±۰/۰۰۹f
تانن هیدرولیزی (درصد)	۱/٤٦d±۰/۰۰۲	۱/۷۰±۰/۹c	۱/۱۰±/۰۷۰۳e
فنلهای دیگر (درصد)	٤/۵۰±۰/۸۹a	۲/۲٦±۰/۳٦b	٤/۹٦±۰/۰۰۵a
فنل کل (درصد)	٦/۲۱±۱/۰۲a	٤/۲±۰/۹۰۰b	٦/۲۲±۰/۷۷a

بررسی مواد مؤثره سیاه گینه نشان داد که اندام های مختلف این گیاه، سرشار از متابولیت های ثانویه، یعنی ترکیبات فنلی و پلی فنل های تاننی شامل تانن های هیدرولیزی و تانن های متراکم و انواع آلکالوئید هستند. برگ و ریشه بیشترین و ساقه کمترین مواد مؤثره را داشتند. به طور کلی در این گیاه، تانن های متراکم و آلکالوئیدها از باقی مواد کمتر بودند.

گردو با وجود فنل ها و به ویژه پلی فنل هایی مثل الاژیتانن ها و الاژیک اسید، خاصیت دگرآسیب و آنتی اکسیدان دارند (آبه و همکاران، ۲۰۱۰).

گروه های آلکالوئیدی:

سنجش آلکالوئید کل سیاه گینه نشان داد که محتوای آلکالوئید اندام های این گیاه کم بوده و در محدوده ۰/۰۱۸- ۰/۵٤۲ درصد متغیر است (جدول٦). آلکالوئید کل ریشه و برگ یکسان، ولی اختلاف بین این دو اندام با ساقه معنی دار بود(جدول۵).

جدول۵- نتایج تجزیه واریانس آلکالوئید کل و گروه های آلکالوئید در اندام های سیاه گینه

منابع تغییرات	درجه آزادی	آلکالوئید کل	میانگین مربعات			
			گروه۱	گروه۲	گروه۳	گروه٤

اندام	۲	۰/۰۰٤**	۰/۰۰۷**	۰/۰۰٦^{ns}	۰/۰۰٦**	۰/۰۰۸**
گروه	۳	۰/۰۱٤**	۰/۰۰۸**	۰/۰۰۵**	۰/۰۰٦^{ns}	۰/۰۰۹**
اندام*گروه	٦	۰/۰۰۱۵**	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۰۱۱**
خطا	۲٤	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۲٤	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱

ns، بدون اثر معنی دار و **، اثر معنی دار در سطح احتمال یک درصد($p<0.05$)

آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی (گروه ۱) و آلکالوئیدهای چهار بخشی با قطبیت بالا (گروه ٤) در هر سه اندام بیشتر از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین های چهار بخشی، آلکالوئیدهای پروتوپین و آلکالوئیدهای سه قسمتی بازی محلول در اتر (گروه ۲) و آلکالوئیدهای چهار پروتوبربرین به شکل نمک های سیترات و ترکیبات غیر قطبی(گروه ۳) بودند (جدول٦).

جدول٦- درصد آلکالوئید کل و گروه های آلکالوئیدی در اندام های ریشه، ساقه و برگ سیاه گینه

گروه	نوع آلکالوئید	ریشه	ساقه	برگ
۱	٪ لیپوفیل و غیر بازی	۰/۲۰۰±۰/۰۰۸	۰/۱۲٦±۰/۰۰۳	۰/۲۱٤±۰/۰۰۷
۲	٪ بنزوفنانتریدین، پروتوپین و بازی	۰/۱۰۱±۰/۰۰٤	۰/۰۹۱±۰/۰۰۳	۰/۱۰۸±۰/۰۰۵
۳	٪ چهار پروتوبربرین و غیر قطبی	۰/۰۹٤۱±۰/٦۰	۰/۰۸۹±۰/۰۰۷	۰/۰۹۳±۰/۰۰۳
٤	٪ چهار بخشی با قطبیت بالا	۰/۱٤۸±۰/۰۰۹	۰/۱۱٤±۰/۰۱۱	۰/۱۱۸±۰/۰۰۸
-	٪ کل	۰/۵٤۲±۰/۰٦۵	۰/٤۲±۰/۰۱۸	۰/۵۳±۰/۰۲۷

در ریشه و برگ، اختلاف آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی (گروه ۱) با دیگر گروه های آلکالوئیدهای خودشان و با همه گروه های آلکالوئید ساقه معنی دار بود. آلکالوئیدهای چهار بخشی با قطبیت بالا (گروه ٤) در ریشه از ساقه و برگ بالاتر و تفاوت آن معنی دار بود(جدول۵). این نتایج نشان داد که آلکالوئیدهای برگ بیشتر از نوع آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی (گروه ۱)، ولی در ریشه، علاوه بر گروه اخیر، آلکالوئیدهای چهار بخشی با قطبیت بالا (گروه ٤) نیز از باقی گروه ها بیشتر بودند (جدول٦).

آلکالوئیدها گروهی از ترکیبات ثانویه و دارویی هستند که از نظر ساختمانی، انتشار در طبیعت و فعالیت های زیستی بسیار متنوعند و گروه های مختلفی از آن ها، در گیاهان وجود دارد(روبرت و وینک، ۱۹۹۸). گروه های چهارگانه آلکالوئیدهای پروتوبربرینی، گروه بزرگی از آلکالوئیدهای ایزوکواینولینی هستند که در گیاهان مختلف مثل زرشک انتشار دارند و روش های مختلفی برای استخراج آن ها استفاده می شود(گریکوا و همکاران، ۲۰۰۷). در این روش ها با به کارگیری حلال های مختلف و تغییر pH می توان چهار گروه اصلی پروتوبربرین ها را از هم جدا کرد(مارک و همکاران، ۲۰۰۳). وجود پروتوبربرین ها در برخی از تیره های گیاهی مثل تیره خشخاش، زرشک، شاتره، آلاله، آناناسه و مرکبان گزارش شده اند ولی پروتوبربرین های چهارگانه در تعداد بسیار محدودی از گونه های گیاهی شامل زرشک، شاتره و انواع خشخاش یافت شده اند(بنتلی ۲۰۰٦). گیاه سیاگینه از نظر میزان هر یک از این این چهار گروه اصلی پروتوبربرین ها، به زرشک(گریکوا و همکاران، ۲۰۰۷) شباهت دارد ولی

وجود این آلکالوئیدها در این گیاه برای اولین بار گزارش می شود.

نتیجه گیری

نتایج کلی این پژوهش نشان داد که اندام های برگ، ساقه و ریشه سیاه گینه، غنی از مواد مؤثره شامل انواع فنل مثل تانن های هیدرولیزی و متراکم و انواع آلکالوئید ها است. آلکالوئیدها شامل آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی (گروه ۱) و آلکالوئیدهای چهار بخشی با قطبیت بالا (گروه ٤)، آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین های چهار بخشی، آلکالوئیدهای پروتوپین و آلکالوئیدهای سه قسمتی بازی محلول در اتر (گروه ۲) و نمک های سیترات و ترکیبات غیر قطبی آلکالوئیدهای چهار پروتوبربرینی(گروه ۳) بودند. در بین گروه های آلکالوئیدی، آلکالوئیدهای محلول در لیپید (لیپوفیل) و آلکالوئیدهای غیر بازی (گروه ۱) و آلکالوئیدهای چهار بخشی با قطبیت بالا (گروه ٤) بیشتر از دیگر آلکالوئیدها بودند. عصاره الکلی اندام های برگ، ساقه و ریشه سیاه گینه، فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و اثر دگرآسیبی بر رویش بذور جو و ماش داشتند که احتمالا" ناشی از وجود مقادیر بالای فنل ها و آلکالوئیدها، در این گیاه است.

منابع

ابراهیم زاده، ح.، ع. عطائی عظیمی و م.ر. نوری دلویی. ۱۳۷٤. مقایسه اندول آلکالوئیدهای نواری ها(*Vinca*). مجله دانشکده داروسازی. ۵ (۱و۲): صفحات ۱۷– ۲۸.

اخیانی، خ.۱۳۷٤. فلور ایران تیره مازریون، شماره۱۵، موسسه تحقیقات جنگلهاو مراتع، تهران، ایران.

دلنواز هاشملویان ب. و ع. عطایی عظیمی. ۱۳۸٦. خواص دارویی و خوراکی گیاهان. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه. ۲۰۷–۲۰۹.

فروزه، م. ر.، غ. حشمتی، غ. قنبریان و س.ح. مصباح. ۱۳۸۷. مقایسه توان ترسیب کربن سه گونه بوته ای گل آفتابی، سیاه گینه و درمنه دشتی در مراتع خشک ایران. محیط شناسی. ٤٦: ٦۵–۷۲.

هدایتی م.، ر. یزدانپرست، ب. جعفری بروجردی و ف. عزیزی.۱۳۸۷. اثر عصاره سیاه گینه (*Dendrostellera lessertii*) بر ترشح TNF-α و تنظیم کاهشی گیرنده های آن بر سطح منوسیتهای انسانی در محیط کشت. پژوهش در پزشکی. ۲۹ (٤): ۳۳۷–۳٤۲.

Abe, T.L., F. M. Lajlo and M. I. Genovese. 2010. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. Sci. Tecnol. Aliment. 30(Supl.1): 254-259.

Balasundram, N., K. Sundram and S. Samman. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99: 191-203.

Bamoniri, A., M. Behpour and M. Khayat Kashani. 2010. Quantification of total phenolics and tannins of pomegranate extraction. J. Optoelec. Biomed. Mat. 2(1): 25 – 31.

Bentley, K.W., 2006. b-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. Nat. Prod. Rep. 23: 444–463.

Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161: 839–851.

Clifford, M. N. and A. Scalbert. 2000. Ellagitannins: nature, occurrence and dietary burden. J.Sci. Food. Agric. 80(7):1118-1125.

Cummings, J. A., I. M. Parker and G.S. Gilbert, 2012. Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration.Plant Ecol. 213:1975–1989.

Escarpa, A. and M.C. Gonzalez. 2008. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. Crit. Rev. Anal. Chem. 75: 57-139.

Farajzadeh, E. and Yarnia M. 2011. Allelopathy extracts various parts of pigweed germination and seedling growth corn. Ann. Biol. Res. 2 (5): 83-86

Garca-Falcon, M.S., C. Perez-Lamela, E. Martnez-Carballo, J. Simal Gandara. 2007. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. Food Chem. 105, 248–259.

Garcia-Salas, P., A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez. 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. Molecules. 15: 8813-8826.

Garro Galvez, J.M., B. Riedl and A. H. Conner, 1997. Analytical Studies on Tara Tannins. Holzforschung. 51: 235-243.

Grycova, L., J. Dostal and R. Marek. 2007. Quaternary protoberberine alkaloids. Physiol. Chem. 68: 150–175.

Gutfinger, T. 1981. Phenols in olive oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 966–968.

Islam, M. O., Akter M. and Prodhan A. 2011. Effect of potato extract on *in vitro* seed germination and seedling growth of local *Vanda roxburgii* orchid, J. Bangladesh Agril. Univ. 9(2): 211–215.

Kamal, J. 2011. Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Afri.J. Biotechnol. 10(16): 3149-3151

Maharaj, S. and J. Prabhakaran. 2013. Allelopathic Potential of *Chrozophora rottleri* (geis.). On germination and growth of some rice (*oryza sativa* L.) Cultivars. IJAPBC. 2(1): 44-53.

Marek, R., P.Seckarova, D. Hulova, J. Marek, J. Dostal, and V. Sklenar. 2003. Palmatine and berberine isolation artifacts. J. Nat. Prod. 66: 481–486.

Moreno, P.R.H., R. Van der Heijden and R. Verpoorte. 1995. Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 42: 1–25.

Naczk, M. and F. Shahidi. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 41: 1523-1542.

Nowrouzi, A. and R. Yazdanparast. 2007. G1 Phase Arrest and Apoptosis Induction in Human Thyroid Cancer Cell Line(Thr.C1.PI33) by 3-Hydrogenkwadaphnin Isolated from *Dendrostellera lessertii.* Iranian Biomed. J. 11 (4): 215-221.

Parr, A. J., and G. P. Bolwell. 2000. Phenols in plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. J. Sci. Food Agric. 80: 985–1012.

Proestos, C.and M. Komaitis. 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT. 41: 652–659

Proestos, C., D.Sereli and M.Komaitis. 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC–MS. Food Chem. 95: 44–52.

Rauha, J.P., S. Remes, M.Heinonen, A. Hopia, M.Kahko nen and T. Kujala. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food Microbiol. 56: 3–12.

Rechinger, K.H. 1972. Flora Iranica. Akademische, Druck-U. verlagsanstalt, Graz, Austria, No. 95/1.12.

Roberts, M.F. and M. Wink.1998. Biochemistry, ecology, and medicinal applications. In: Roberts, M.F., Wink, M. (Eds.), Alkaloids. Plenum Press, New York, London, pp. 1–7.

Roesenzweig, M.L. and Z. Abransky. 1993. How is diversity and productivity related? In: Ricklefs RE, Schluter D (eds). Species diversity in ecological communities. University of Chicago Press. pp. 52–65.

Sadeghi, H. and R. Yazdanparast . 2003. Effect of *Dendrostellera lessertii* on the intracellula r alkaline phosphatase activity of four human cancer cell lines. J. Ethnopharm. 86(1):11-4.

Sadeghi, H.and R. Yazdanparast. 2005. Isolation and Structure Elucidation of a New Potent Anti-neoplastic Diterpene from *Dendrostellera lessertii*. Am. J. Chin. Med. 3(5): 831- 837.

Sadeghirizi, A. and R. Yazdanparast. 2007. Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin an antiproliferative agent from Dendrostellera lessertii. Acta Biochimica Polonica. 54(2): 323-329.

Stavric, B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods. Food Chem. Toxicol. 32: 79–90.

Tanaka, T., G. I. Nonaka and I. Nishioka. 1986. Tannins and related compounds. XL. Chem. Pharma. Bul. 34: 650–655.

Tapiero, H., K. D. Tew, G. Nguyen Ba and G. Mathe. 2002. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomed.Pharmacoth. 56: 200–207.

Yazdanparast, R. and M. Haidari. 2009. Apoptosis of U937 Leukemia Cells by an Active Compound from *Dendrostellera lessertii*. Iran Biomed. J. 13(1): 35-42

Waller, G.R. and E.K. Nowacki. 1987. The role of alkaloids in plants. In Alkaloids Biology and metabolism in plants (Eds, G.R, Waller and E.K. Nowak). Plenum press, New York. pp. 143-181.

Wink, M. 1999. Plant secondary metabolites: biochemistry, function and biotechnology. In Biochemistry of Plant Secondary Metabolism 2 (Wink, M.). Sheffield Academic Press. pp. 1–16.

Wink, M. & Roberts, M. F. 1998. Compartmentation of alkaloid biosynthesis, transport and storage. In Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications (Roberts, M.F. and Wink, M., eds). Plenum Press. pp. 239–262.

Identification and measurement of some secondary metabolites of leaves, stems and roots of *Dendrostellera lessertii* and their allelopathy effects on barley and mungbean plants

B. Dlnoaz Hashimloyan[1], A. Ataiazimin[1], M. Mozhdehi[1]

Received: 2014-9-3 Accepted: 2015-1-5

Abstract

Dendrostellera lessertii (Thymelaeaceae family) is one of the herb and medicinal plants with anti-cancer agents. In this study, active substance of roots, stems and leaves of *D. lessertii* was determined and assayed. Allelopathic effects of some concentration of alcoholic extract of *D. lessertii* were evaluated on barley (*Hordeum vulgare* L.) and mungbean (*Vigna radiata* L.). Treatments were including organs: leaves, root and stem, concentrations: 0, 50 anf 100 $mgml^{-1}$ and barley and mungbean. All experiments occurred in laboratories of Saveh University and in completely randomized blocks design. The effective compounds include dense tannins; hydrolyzed tannins and alkaloids identified using TLC analysis and the color reaction with Dragendorff and Ferro chloride reagents. The results showed that all organs of *D. lessertii* were rich of phenols, tannins and alkaloids but in roots and leaves had the highest contents. Phenolic compounds of *D. lessertii* were very high and hydrolyzed tannins were more than dense tannins. Alkaloids of *D. lessertii* organs were high but phenols and hydrolyzed tannins were low. *D. lessertii* alcoholic extract reduced seedlings growth and 66% and 33% seeds germination of barely and mungbean, respectively. Alcoholic extract have allelopathic effects on seeds germination and seedlings growth of barley and mungbean but on barley was more inhibited.

Key words: Alkaloid, phenols, hydrolyzed tannins, dense tannins, ferro chloride

1- Plant Biology Department, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran