

اثرات ترکیب دگرآسیب کومارین بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کاهو

سید مهدی رضوی*، هادی حسین زاده شاهمناریگلو و صابر زهری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیل، اردبیل، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۷/۱۱)

چکیده:

ترکیبات کومارینی گروهی از متابولیتهای ثانویه گیاهان از گروه فنیل پروپانوئیدها بوده و عمدها در تیره چتریان یافت می‌شوند. کومارین ساده ترین ترکیب در این خانواده بشمار می‌رود. در این پژوهش اثر دگرآسیبی کومارین بر روی گیاه مدل کاهو (*Lactuca sativa*cv.siaahoo) بررسی گردید. ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف این ماده (یک میکروگرم تا یک میلی گرم بر میلی لیتر) بر برخی پارامترهای رشد از جمله جوانه زنی دانه، رشد ریشه چه و ساقه چه بررسی شد تا غلظت بهینه برای تداوم آزمایش‌ها تعیین گردد. در مرحله بعد بدزرهای کاهو در گلدان‌های حاوی پست کشت داده شده و با محلول غذایی هوگلنده واجد کومارین (غلظت‌های ۰۲ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) آبیاری شده و بعد از رشد گیاه تأثیر تیمارهای مذکور بر روی جنبه‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد جوانه زنی بذور کاهو تحت تأثیر کومارین کاهش کامل‌آ وابسته به غلظت می‌باشد. در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر، جوانه زنی کاملاً مهار گردید. همچنین رشد ریشه چه و ساقه چه تحت تأثیر کومارین کاهش داشته، وزن تروختشک اندام هوایی و ریشه گیاه و همچنین مقدار کلروفیل نسبی اندام هوایی نیز کاهش معنی‌داری در فلوروسانس کلروفیل صورت نگرفته است. فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز، پروتاز و پلی فنل اکسیداز افزایش ولی تغییر معنی‌داری در آنzsکوریات پراکسیداز کاهش یافته است. غلظت پروتئین کل در اثر تیمار کومارین کاهش یافته و تغییرات قابل توجهی در الگوی الکتروفورز پروتئین‌های اندام هوایی به صورت حذف بعضی از باندها و همچنین کم رنگ شدن بعضی از باندها دیگر دیده می‌شود. به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت، ترکیب دگرآسیب کومارین از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، گیاه کاهورا تحت تأثیر قرارداده و نحوه پاسخ گیاه به این نوع تنش که تنش دگرآسیبی است تا حدی شبیه به تنش‌های غیرزیستی مثل خشکی و شوری است.

کلمات کلیدی: کومارین، دگرآسیبی، الکتروفورز

مقدمه:

توسط یک گیاه می‌باشند که رشد و توسعه سایر گیاهان اطراف در زیستگاه‌های طبیعی یا سیستم‌های زراعی را تحت تأثیر قرار داده و مهار می‌نمایند (Sampietro *et al.* 2009). ترکیبات فنولی دسته مهم و گسترده‌ای از ترکیبات دگرآسیب در گیاهان می‌باشند. این ترکیبات در سه گروه، فنیل پروپانوئیدهای ساده،

امروزه توجه محققین به طور گستردۀ به سمت ترکیبات دگرآسیب خصوصاً سازوکارهای تأثیر این ترکیبات از دیدگاه فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی جلب شده است. هدف این مطالعات زمینه‌سازی در جهت ساخت علف کش‌هایی با منشأ طبیعی (Bio herbicides) می‌باشد. ترکیبات دگرآسیب

گرفتند. در داخل هر پتری ۲۰ بذر قرار داده و ۱۰ میلی لیتر از محلول‌های تهیه شده برای هر پتری ریخته شده و تمامی پتری‌ها به داخل انکوباتور که بر دمای ۲۵ درجه سیلیسیوس تنظیم شده بود، انتقال گردید. لازم به ذکر است که برای هر غلاظت از ماده کومارین ۵ پتری و برای گروه شاهد نیز ۵ پتری در نظر گرفته شد. شمارش بذرها جوانه زده روزانه و تا یک هفته انجام گرفت. در پایان این مدت، درصد کل جوانه‌زنی بذرها محاسبه و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه دانه رست‌ها نیز در هر ظرف پتری با استفاده از خط کش میلیمتری اندازه‌گیری شد.

کشت گلخانه‌ای و تیمار گیاه: دانه رست‌ها گروه شاهد و تیمار شده با غلاظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین، به درون گلدان‌های حاوی پیت که قبلًا استریل شده بودند، منتقل شده و در داخل اتافک رشد با دوره روشنایی ۶ ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت و دمای ۲۵ درجه سیلیسیوس و رطوبت ۸۰ درصد به مدت ۳۲ روز، رشد داده شدند. گیاهان گروه شاهد با محلول غذایی هوگلندر ۴۰ درصد و گیاهان گروه‌های تیمار با هوگلندر ۴۰ درصد حاوی ۱۰ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین، روزانه به مقدار ۱۰ میلی لیتر برای هر گلدان آبیاری گردیدند. گیاهان تا رسیدن به مرحله هفت برگی (۳۲ روز در این پژوهش) رشد داده شده و سپس برداشت شدند.

اندازه گیری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه: پس از برداشت گیاه، وزن تر اندام هوایی تعیین شد، سپس نمونه‌ها درون پاکت‌های جداگانه و در داخل آون در دمای ۷۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک و توزین شدند. ریشه‌های هر گلدان نیز با دقیقت خارج شد و پس از شستشو وزن تر ریشه تعیین شد و وزن خشک نیز بعد از خشک شدن در درون آون اندازه گیری گردید.

سنجهش محتوی و فلورسانس کلروفیل: مقدار کلروفیل دانه رست‌های گروه شاهد و گروه‌های تیمار بر اساس واحد نسبی (SPAD) با دستگاه کلروفیل متر از بخش ما بین رگبرگ اصلی و حاشیه برگ صورت گرفت. برای سنجهش فلورسانس

لاکتون‌های فنیل پروپانوئیدی و مشتقات اسید بنزوئیک تقسیم بندی می‌شوند، که کومارین با فرمول شیمیایی $C_9H_6O_2$ ساده ترین عضو از لاکتون‌های فنیل پروپانوئیدی می‌باشد (Taiz and Zeiger, 2002). این ترکیب در گیاهان تیره چتریان، سداب و حبوبات به فراوانی وجود دارد (Razavi, 2011). بررسی‌ها نشان داده که کومارین تأثیر معناداری بر روی رشد و عملکرد گیاهانی همچون ذرت، آرابیدوپسیس تالیانا، کلزا و... داشته است (Lupini et Reigosa et al., 1999; Lupini et al., 2013; al., 2010). امروزه پدیده دگر آسیبی برای تولید علف کش‌ها و سموم ارگانیک ضد قارچ، ضد باکتری و ضدحشرات علف خوار در کشاورزی ارگانیک بسیار مورد توجه قرار گرفته تا با حذف علف کش‌ها و سموم شیمیایی در کشاورزی، از آلودگی سیستم‌های زیستی جلوگیری کرد (Sampietro et al., 2009). در این پژوهش ساز و کار تأثیر کومارین بر گیاه کاهو که گیاه شاخص و مدل در پژوهش‌های دگر آسیبی محسوب می‌شود (Inderjit et al., 1999). بررسی شده و نحوه‌ی پاسخ این گیاه از دیدگاه فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به ترکیب مذکور مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها:

تعیین غلاظت بهینه کومارین با بررسی روی شاخص‌های رشد: در ابتدا تأثیر غلاظت‌های مختلف ماده کومارین بر جوانه‌زنی گیاه کاهو (رقم سیاهو) در پنج تکرار و در قالب طرح بلوكهای تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیب کومارین از شرکت سیگما-آلدریخ (اس تی لوئیس، میسوری، آمریکا) خریداری شد. محلول این ماده در غلاظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲ میکروگرم در میلی لیتر با حل کردن در آب مقطر و با افزودن چند قطره استون تهیه شد. بذر های شاهد با استفاده از آب مقطر حاوی چند قطره استون آبیاری شدند. ابتدا بذرها با هیپوکلرید سدیم یک درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر در پتری های مفروش با کاغذ صافی واتمن که قبلًا در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سیلیسیوس، به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده بودند، جهت جوانه زنی قرار

میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجدش فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز: دو میلی لیتر کازائین هیدرولیز شده یک درصد با $pH=6$ و $0/4$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای $45^{\circ}C$ درجه سیلیسیوس برروی صفحه حرارتی نگهداری و سپس برای توقف واکنش به آن $4/0$ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید 4 درصد اضافه شد و جذب در 280 نانومتر ثبت شد فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبیسترا ای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجدش فعالیت ویژه کاتالاز: برای سنجدش فعالیت مخصوص آنزیم کاتالاز از آب اکسیژنه 3 درصد بعنوان سوبیسترا استفاده شد. بدین گونه که $0/3$ میلی لیتر آب اکسیژنه با $2/5$ میلی لیتر بافر فسفات $0/05$ میلی مولار که داری $pH=6.5$ بود مخلوط گشته و سپس $2/0$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به این مجموعه اضافه گشت (تمامی این مراحل در داخل حمام یخ صورت گرفت). سپس تغییرات جذب محلول بلافصله در طول موج 240 نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبیسترا ای تبدیل شده در ثانیه در میلیگرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجدش پروتئین محلول کل: $0/1$ میلی لیتر از عصاره پروتئینی با پنج میلی لیتر معرف برادرفورد مخلوط شده و جذب محلول حاصل را در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری گردید. براساس منحنی استاندارد ترسیم شده با سرم آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محاسبه شد. برای تهیه محلول های استاندارد 100 میلی گرم سرم آلبومین گاوی در 10 میلی لیتر آب مقطر حل شد و از محلول فوق، غلظت های $0/1$ ، $0/05$ ، $0/15$ ، $0/2$ و $0/25$ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه گردید. سپس $1/0$ میلی لیتر از هر محلول با پنج میلی لیتر معرف برادرفورد مخلوط و به مدت 15 دقیقه در دمای $40^{\circ}C$ آزمایشگاه نگهداری شد. سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول 595 نانومتر اندازه گیری و جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Bradford, 1976).

کلروفیل پس از 20 دقیقه قرار گرفتن اندام هوایی دانه رستها در تاریکی به وسیله گیره‌های مخصوص دستگاه فلوریمتر PEA، از محل میانه برگ اندازه گیری گردید. پارامترهای مورد ارزیابی شامل Fo : (فلورسانس کمینه)، Fm : (فلورسانس بیشینه) و Fv/Fm : (کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II) بودند (Ibaraki and Murakami, 2006).

استخراج و سنجدش فعالیت آنزیم‌ها: برگ گیاه در داخل هاون چینی قرار داده شده، مقداری ازت مایع روی آن ریخته و تا حد پودر شدن کوییده شد. سپس $0/1$ میلیگرم از برگ همگن شده به میکروتیوب‌های دو میلی لیتری ریخته و یک میلی لیتر بافر فسفات $1/0$ مولار به آن اضافه شده و بلافصله در داخل حمام یخ قرار داده شدند. میکروتیوب‌ها توسط سانتریفیوژ یخچالدار با سرعت $16000g$ در دمای 4 درجه سیلیسیوس به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشنوار آنها جدا و داخل میکروتیوب‌های جدید منتقل شده و در فریزر با دمای $-80^{\circ}C$ درجه سیلیسیوس جهت نگهداری منتقل گردیدند. از این نمونه‌ها می‌توان جهت تعیین مقدار کمی پروتئینها به روش برادرفورد و اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده کرد (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجدش فعالیت آنزیم آسکوربیات پراکسیداز: دو میلی لیتر بافر فسفات $0/05$ مولار با $pH=7/5$ و $1/0$ میلی لیتر آب اکسیژنه 3 درصد و $2/0$ میلی لیتر اسید آسکروبیک پنج میلی مولار در حمام یخ مخلوط گردید. سپس $1/0$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شده و بلافصله تغییرات جذب در طول موج 290 نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبیسترا ای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجدش فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز: $2/5$ میلی لیتر بافر فسفات $2/0$ مولار با $pH=7/8$ و $0/2$ میلی لیتر پیروگالل $2/0$ مولار و $2/0$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای $40^{\circ}C$ درجه سیلیسیوس اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج 430 نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبیسترا ای تبدیل شده در ثانیه در

با استفاده از محلول رنگ بر به مدت ۶ ساعت، رنگبری گردید. محلول رنگ آمیزی ژل حاوی کوماسی آبی R-۲۵۰ با غلظت ۰/۱ درصد و محلول رنگ بر حاوی متانول، استیک اسید کلاسیال و آب مقطر بود (Schagger and Von Jagow, 1987).

استخراج DNA: به منظور استخراج DNA، نمونه های مربوط به ریشه گیاهان گروه شاهد و هر کدام از تیمارها به طور جداگانه در هاون چینی حاوی نیتروژن مایع و با استفاده از محلول استخراج تشکیل شده از CTAB SDS Tris استخراج گردیده، مواد زائد با استفاده از فنول و کلروفرم رسوب داده شده و محلول رویی (فاز آبی) بعد از سانتریفیوژ جهت رسوب DNA استفاده گردید. جهت رسوب از الكل اتانول استفاده گردید و رسوب حاصل با استفاده از الكل ۷۰٪ شستشو گردیده و سپس در بافر TE حل گردید. استخراج شده در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردیده و ژل مذکور با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شد (Sambrook and Russell, 2001).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی و با ۵ تکرار انجام شد و تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و معنی دار بودن داده های حاصل با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

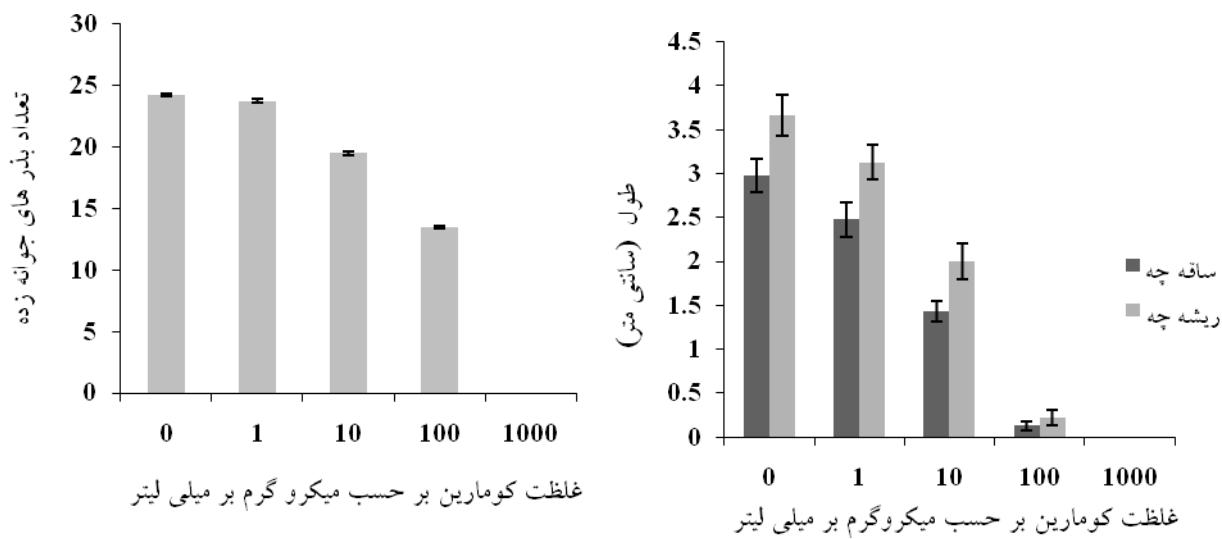
نتایج:

نتایج بدست آمده نشان داد که ترکیب کومارین باعث کاهش معنی دار جوانهزنی در گیاه کاهو گردیده است، به طوری که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین فقط ۵۶/۶۷ درصد بذور نسبت به گروه شاهد جوانه زده و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر جوانه زنی به طور کامل مهار گردیده است. همچنین رشد ساقه چه تحت تیمار کومارین در غلظت یک، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۱۴، ۴۰ و ۴۵/۲ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار داشته است. رشد ریشه در غلظت های یک، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین به ترتیب ۱۱/۱۷، ۳۴/۵۱، ۷۱/۵۶ درصد نسبت

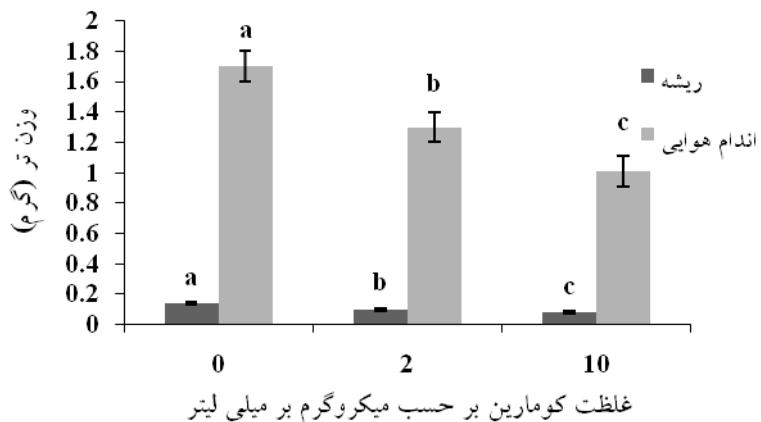
استخراج عصاره پروتئینی برای الکتروفورز: برای استخراج، ۰/۷ گرم نمونه برگی از گروه شاهد و از هر دو گروه تیمار، درون هاون قرار داده و به آن چند قطره ازت مایع و ۲/۱ میلی لیتر بافر استخراج پروتئین اضافه شده و نمونه تا مرز کف زدن و پودر شدن درون هاون کوییده شد. سپس نمونه ها به درون میکروتیوپ منتقل شده و با سانتریفیوژ یخچالدار در سرعت ۱۲۰۰۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۲۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشنوار حاصل دوباره با سرعت ۱۰۰۰g و در ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و روشنوار حاصل از این مرحله برای انجام عمل الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه بافر استخراج پروتئین، پنج میلی لیتر تریس- اسید کلریدریک ۵۰ میلی مolar با pH=۷/۵، را با ۲۰۰ میکرولیتر Na₂EDTA یک مolar و ۳۳ میکرولیتر مرکاپتواتانول ۴ درصد مخلوط و با آب مقطر به حجم نهایی صد میلی لیتر رسانده شد. این بافر را می توان درون یخچال تا چند هفته نگهداری کرد.

روش الکتروفورز: برای آماده سازی نمونه در SDS-PAGE، یک حجم بافر نمونه و چهار حجم عصاره پروتئینی مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد تا تحت این شرایط پروتئین ها تحت اثر ماده احیا کننده کاملاً و اسرشته شده و همچنین بار الکتریکی یکنواختی بگیرند. بعد از تنظیم قاب شیشه ای ژل، محلول های ژل پایین (جدا کننده) و ژل بالا (متراکم کننده) به ترتیب با غلظت ۱۰ و ۵ درصد تهیه شد. قاب شیشه ای با چند گیره به تانک الکتروفورز متصل شده و مخازن بالا و پائین تانک تا ارتفاع مناسبی از بافر الکترود پر شد. سپس سرم آلبومین گاوی و کازئین به عنوان مارکر و همچنین نمونه های آماده شده گیاهی به درون چاهک های ژل بالا با دقت تزریق شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۱۰ ولت و جریان ۳۲ میلی آمپر آغاز شد و تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل پایین ادامه یافت (Mostafaie, 2003). پس از جدا سازی ژل بالا از ژل پایین، عمل رنگ آمیزی ژل پایین با بکار بردن محلول رنگ آمیزی به مدت ۲ ساعت انجام شده و سپس ژل



شکل ۱- جوانه زنی بذر کاهو (سمت چپ) رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های کاهو (سمت راست) تحت تیمار غلظت‌های مختلفی از کومارین.

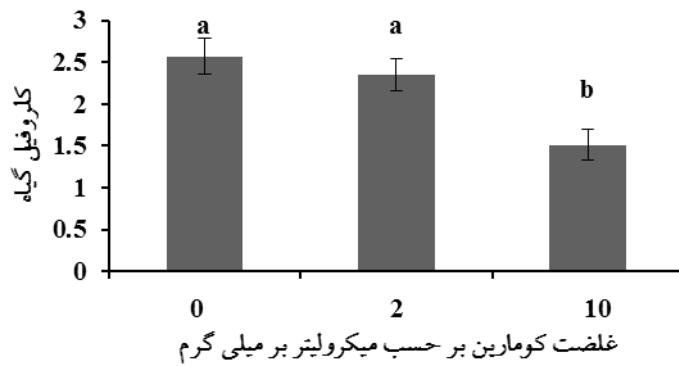


شکل ۲- وزن ترو خشک ریشه و اندام هوایی تحت تأثیر تیمار غلظت‌های متفاوت کومارین در مقایسه با گروه شاهد . حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون آنکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.

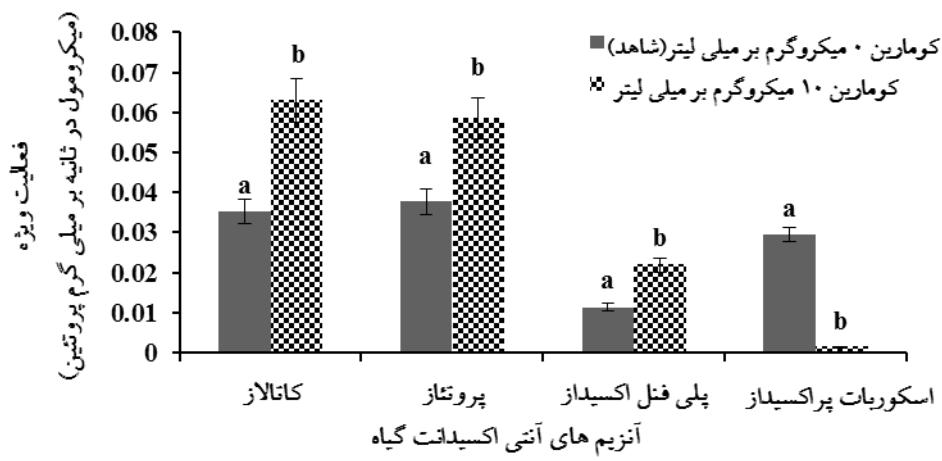
خشک اندام هوایی به ترتیب $24/75$ و $42/6$ و وزن خشک ریشه به ترتیب 30 و 60 درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (شکل ۲). مقدار کلروفیل گیاه بر حسب واحد نسبی (SPAD) نیز تحت تأثیر تیمار 2 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر کومارین به ترتیب $0/5$ و $4/71$ درصد کاهش داشته است که از نظر آماری این کاهش در تیمار 10 میکروگرم بر میلی لیتر کومارین معنی دار می‌باشد (شکل ۳). در مورد فلورسانس بیشینه و کمینه کلروفیل و همچنین کارابی فتوشیمیابی فتوسیستم II ، داده‌های بدست آمده از نظر آماری معنی دار نبودند به عبارت بهتر نیمار کومارین منجر به تغییر معنی دار در فلورسانس کلروفیل گیاه کاهو نگردید. از طرف دیگر مشخص

به گروه شاهد کاهش نشان می‌دهد (شکل ۱). در غلظت‌های بالاتر ترکیب کومارین بطور کامل باعث مهار شاخص‌های رشد مذکور در ریشه شده است. با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده، غلظت 10 او دو میکروگرم بر میلی لیتر کومارین به عنوان غلظت بهینه برای ادامه آزمایش انتخاب شدند.

همچنین وزن ترو خشک ریشه و اندام هوایی گیاه کاهو نیز تحت تأثیر غلظت‌های کومارین کاهش معنی دار داشته است بطوریکه در غلظت‌های 2 و 10 میکروگرم بر میلی لیتر کومارین، وزن تر اندام هوایی به ترتیب $23/52$ و $41/17$ درصد نسبت به گروه شاهدو وزن تر ریشه به ترتیب $28/57$ و $42/58$ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش داشته است. همچنین وزن



شکل ۳- تغییرات مقدار کلروفیل گیاه کاهو بر حسب واحد نسبی (SPAD) تحت تأثیر تیمارهای مختلف از کومارین در مقایسه با گروه شاهد. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بر اساس آزمون آنکن در سطح احتمال پنج درصد می باشند.



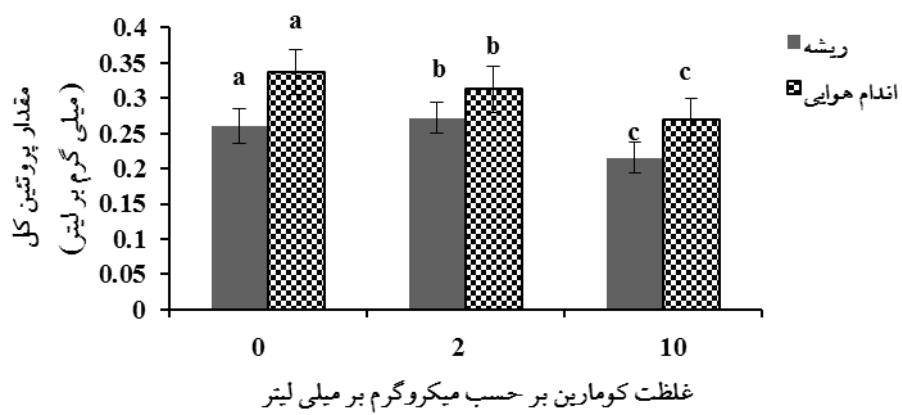
شکل ۴- تغییرات فعالیت آنزیمی گیاه کاهو تحت تیمار کومارین در مقایسه با گروه شاهد. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بر اساس آزمون آنکن در سطح احتمال پنج درصد می باشند.

الگوی الکتروفورتیک پروتئین های گیاه و مقایسه آن با مارکر های موجود نشان داد که یک پروتئین بسیار شاخص گیاه وزن مولکولی بین ۲۵ تا ۶۶ کیلودارد ولی این پروتئین تحت تأثیر تیمار کومارین قرار نمی گیرد. این الگو نشان داد که تحت تیمار کومارین بعضی از باندها که اساساً وزن مولکولی بالاتر از ۶۶ کیلو Dalton دارند کاهش کمی داشته و این کاهش با افزایش غلظت کومارین تیمار شده تشدید می گردد (شکل ۵).

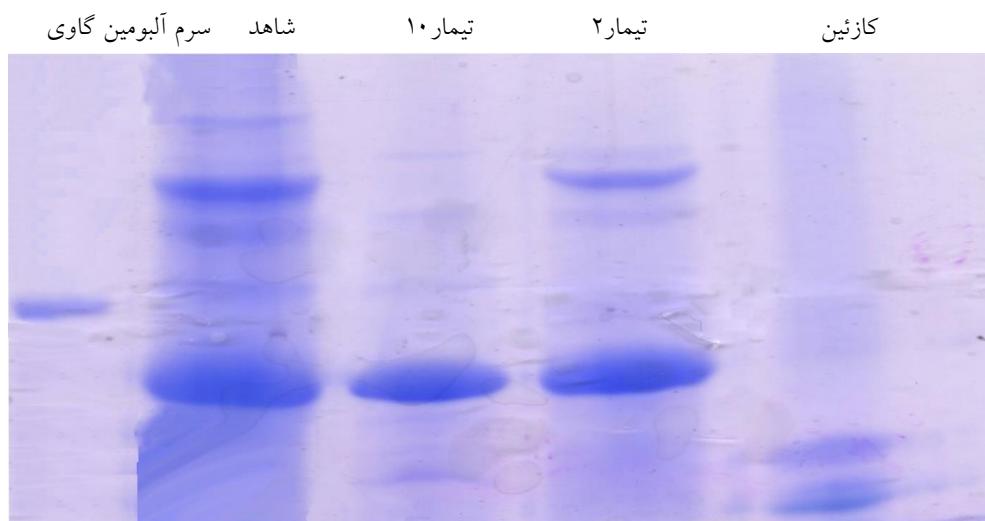
نتایج نشان داد که تیمار کومارین هیچ تأثیری بر DNA گیاه تحت تیمار نداشته است و در تیمارها همانند شاهد فقط یک باند در ژل اکاروز قابل مشاهده است (شکل ۶).

شد فعالیت ویژه آنزیم های پروتئاز، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز در گیاه کاهو تحت تیمار کومارین افزایش معنی دار داشته در صورتی که فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تیمار کومارین کاهش نشان می دهد (شکل ۴).

به همین ترتیب مشخص شد مقدار پروتئین کل دریشه و اندام هوایی گیاه با افزایش غلظت کومارین کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است بطوریکه در اندام هوایی پروتئین کل تحت تیمار ۲ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر کومارین به ترتیب $\frac{39}{43}$ و $\frac{27}{43}$ درصد نسبت به گروه شاهد و در ریشه به ترتیب $\frac{2}{77}$ و $\frac{34}{1}$ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است. در غلظت دو میکرو گرم بر میلی لیتر کومارین در ریشه تغییرات نسبت به شاهد معنی دار نیست



شکل ۵- تغییرات میزان پروتئین ریشه و اندام هوایی گیاه تحت تیمار کومارین نسبت به گروه شاهد. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.



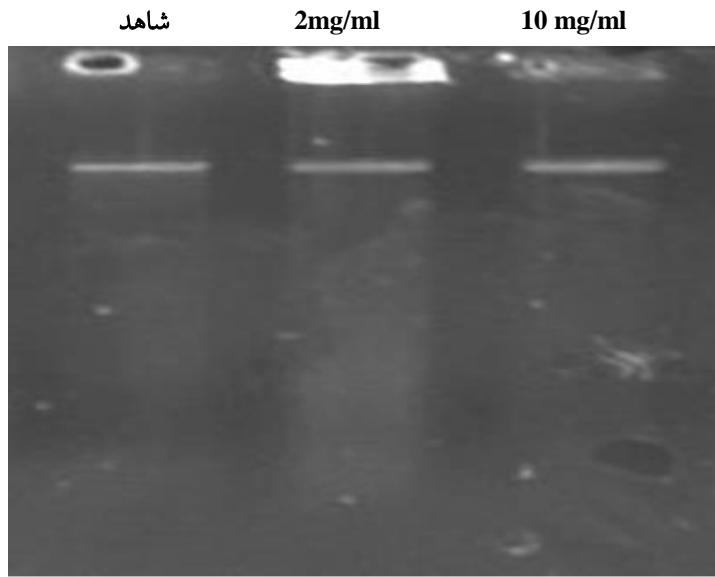
شکل ۶- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های گیاه کاهو تحت تیمار کومارین با غلظت‌های ۲ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر. سرم آلبومین گاوی و کازین به عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

بیوسنتز در گیاه کاهو می‌گردد. کاهش وزن خشک و تر و نیز میزان کلروفیل و پروتئین کل گیاه در این راستا می‌باشد. این روند می‌تواند ناشی از تأثیر مخرب کومارین بر ساختار یا عملکرد آنزیم‌های بیوسنتزی گیاه باشد (Taiz and Zaiger, 2002). از طرف دیگر کاهش یا حذف برخی باندها در الگوی الکتروفورتیک گیاه تحت تیمار کومارین می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که ترکیب دگرآسیب مذکور از مسیر قبل یا بعد از ترجمه نیز ممکن است عمل نماید.

نتایج بدست آمده نشان داد که در پاسخ به تأثیر کومارین پاسخ مستقیم گیاه، افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های سم زدا از

تحاکنون گزارشات چندی مبنی بر قابلیت دگرآسیبی مشتقات کومارینی ارایه شده است. این گروه از متابولیت‌های ثانویه که از آمینواسید فنیل آلانین مشتق می‌شوند در گروه مستقلی به نام فنیل پروپانوئیدها قرار داشته و غالباً در تیره چتریان یافت می‌شوند (Taiz and Zaiger, 2002; Razavi, 2011). با این حال مطالعات کمی در خصوص سازو کارهای مؤثر در دگرآسیبی این ترکیبات تا به حال ارائه شده است.

در این پژوهش مشخص شد که ترکیب کومارین که ساده ترین ترکیب گروه کومارین‌هاست منجر به کاهش روند کلی



شکل ۷- تأثیر کومارین بر DNA استخراج شده از کاهو تحت تیمار. از چپ به راست نمونه شاهد، تیمار با غلقت ۲ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر کومارین.

(Reigosa, 2006). با این حال نتایج بدست آمده از استخراج DNA بر روی ژل نشان داد که تیمار کومارین در گیاه کاهو منجر به قطعه قطعه شدن آن و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی نمی‌گردد و بر روی ژل اگاروز در باندهای مربوط به نمونه‌های تیمار مشابه نمونه شاهد و منفرد می‌باشند. با توجه به اینکه ترکیب کومارین به طور گسترده در سلول‌های انسانی مرگ برنامه ریزی شده سلول و قطعه قطعه DNA را باعث می‌شود (Chung *et al.*, 2007) می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عملکرد این ترکیب در سلول‌های گیاهی کاملاً متفاوت است. در چند دهه اخیر رشد بی رویه استفاده از علف کش‌های مصنوعی از یک طرف باعث ایجاد مقاومت در علف‌های هرز شده و از طرف دیگر منجر به آلودگی‌های زیست محیطی مخرب گردیده است. از این‌رو توجه به ترکیبات دگرآسیب در گیاهان و بررسی نحوه تأثیر آنها مورد توجه محققین بوده است. هدف نهایی این تحقیقات ارایه علف کش‌هایی با منشأ کاملاً طبیعی است.

نتیجه‌گیری کلی:

به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت تأثیر کومارین بر گیاه کاهو که در اصل نوعی نتش از تیپ آللوكمیکال می‌باشد، منجر به پاسخ‌های خاص فیریولوژیکی بیوشیمیابی می‌گردد که تا

جمله پلی فنل اکسیداز و کاتالاز می‌باشد. این نوع پاسخ در تنش‌های محیطی دیگر از جمله شوری و خشکی نیز مشاهده می‌شود (Taiz and Zaiger, 2002). این موضوع تأییدی بر این نکته است که مکانیسم پاسخ گیاه به تنش‌های ناشی از ترکیبات دگرآسیب تا حدی همانند تنش‌های غیر زیستی است. با این حال به دنبال تنش ناشی از ترکیب دگرآسیب کومارین، تغییری در فلورسانس کلروفیل گیاه تحت تیمار مشاهده نشد که بیانگر این نکته است که برخلاف تنش‌های غیر زیستی (Ibaraki and Murakami, 2006) تنش‌های دگرآسیبی اثر مخرب بر غشنهای فتوستتری ندارند. این پدیده در دیگر ترکیبات دگرآسیب نیز مشاهده شده است (رضوی و همکاران، ۱۳۹۳).

از طرف دیگر نتایج نشان داد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان گروه تیمار شده با کومارین نه تنها افزایش نداشته بلکه کاهش نیز نشان می‌دهد که این موضوع می‌تواند دلیلی بر این مدعای باشد که تنش ناشی از ترکیب کومارین در گیاه کاهو چرخه گلوتاتیون-آسکوربات را القا نکرده و روند سم زدایی از مسیرهای دیگر مثلاً از طریق آنزیم پلی فنل اکسیداز صورت می‌گیرد.

بررسی منابع نشان می‌دهد یکی از سازو کارهای عملکردی ترکیبات دگرآسیب قطعه قطعه کردن DNA و القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌های گیاهی است (Chung *et al.*, 2007).

آنزیم‌های سم زدا مثل کاتالاز و پلی فنل اکسیداز و همچنین تغییر کمی و کیفی در پروتئین‌های گیاه اشاره نمود.

حدی به پاسخ‌های تنش‌های غیر زیستی مثل خشکی، شوری و غیره شباهت دارند. از جمله این پاسخ‌ها می‌توان به کاهش میزان کلروفیل، وزن تر و خشک گیاه، افزایش فعالیت برخی

منابع:

- رضوی، س.م.، حسین زاده، س. و لطیفی، س. (۱۳۹۳). اثرات تنش ناشی از ترکیب دگرآسیب (-)-کاروون بر جوانه زنی، رشد و فعالیت برخی آنزیمها در گیاه کاهو. *فیزیولوژی تنش گیاهان* ۱: ۳۱-۲۴.
- حسین زاده، م.، کیارستمی، خ.، ایلخانی زاده، م. و صبورا، ع. (۱۳۸۸). بررسی اثرات ترکیبات آللوباتیک جو خودرو بر میزان پروتئینها، کربوهیدارت‌ها و فعالیت برخی از آنزیم‌های گندم. *مجله زیست‌شناسی ایران* ۲۲: ۴۰۶-۳۹۲.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chung, J. Y., Hung, Y. E., Lu, H. F., Ho, H. C., Yang, J. S., Li, T. M., Chang, N. W. and Chung, J. G. (2007) Coumarin induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervix cancer HeLa cells through a mitochondria and caspase 3 dependent mechanisms and NF-KB down regulated. *In Vivo* 21: 1003-1010.
- Ibaraki, Y. and Murakami, J. (2006) Distribution of chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm within individual plants under various stress conditions. Paper presented at the XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Advances in Environmental Control, Automation 761.
- Inderjit, Dakshini, K. M. M. and Foy, C. L. (1999) Principles and Practices in Plant Ecology: Allochemical Interactions. CRC Press. Boca Raton.
- Lupini, A., Araniti, F., Sunseri, F. and Abenavoli, M. (2013) Gravitropic response induced by coumarin: Evidences of ROS distribution involvement. *Plant Signaling and Behavior* 8: 23156.
- Lupini, A., Sorgonà, A., Miller, A. J and Abenavoli, M. R. (2010) Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis. *Plant Signaling and Behavior* 5: 1395-1400.
- Mostafaie, A. (2003). Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. Yadavar Press, Tehran.
- Razavi, S. M. (2011). Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry* 5, 86-90 .
- Reigosa, M. J., Pedrol, N. and Gonzalez, L. (2006) Allelopathy, a Physiological Process with Ecological Implications. Springer, Dordrecht. PP. 637 -639.
- Reigosa, M. J., Souto, X. C. and Gonz, L. (1999) Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation* 28: 88-93.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular cloning, a laboratory manual. CSHL press, Newyork.
- Sampietro, D. A, Catalan, A.N. and Vattuone, M. A. (2009) Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. CRC Press. London.
- Schagger, H. and Vonj agow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002) Plant Physiology. Sinauer Publication, Sunderland.

Allochemical effects of coumarin on some physiological and biochemical parameters of lettuce

Seyed Mehdi Razavi*, Hadi Hoseinzadeh, Saber Zahri

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 8 July 2015, Accepted: 3 September 2015)

Abstract:

Coumarins are regarded as a class of plant secondary metabolites of phenyl propanoid group distributed in Apiaceae family. Coumarin is the simplest compound in this family. In the present work, allelopathic potentiality of coumarin on *Lactuca sativa* cv.*siahou* from physiological and biochemical aspects, was investigated. At first stage, the effects of different concentration of the compound on some growth parameters of the plant such as seed germination, radicle and gemmule growth were studied. After determination of the compound optimal concentration, the germinated seeds of lettuce were cultured in peat contained pots and then were watered with Hoagland nutrition solution enriched with 2 and 10 µg/mL of coumarin. After plant growth, the effects of coumarin on some physiological and biochemical parameters were evaluated. Our results showed that lettuce seed germination was reduced by coumarin in a dose dependent manner. At the concentration of 1mg/mL the germination was inhibited entirely. Radicle and gemmule growth, fresh and dry weight of roots and aerial parts of treated plants and SPAD chlorophyll was significantly reduced by coumarin treating. However, no significant difference was recorded in chlorophyll fluorescence between control and coumarin treated plants. The specific activity of some antioxidant enzymes like catalase, protease and poly phenol oxidase was increased in treated plants compared to the control, however, the activity of ascorbate peroxidase was decreased. Total protein decreased and quantitative and qualitative changes in electrophoretic pattern of aerial parts proteins were observed in treated group than control. It was concluded that coumarin as an allochemical affected lettuce of different physiological and biochemical aspects. The plant response to the stress as allochemical stress was similar to some abiotic stress such as drought or salinity.

Key words: Coumarin, Allelopathy, Electrophoresis.

*corresponding author, Email: razavi694@gmail.com