Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021

اثرات ترکیب دگرآسیب کومارین بر برخی شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کاهو

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

گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه،دانشگاه محقق اردبیلی،اردبیل،ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰٤/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰۷/۱۱)

چکیده:

ترکیبات کومارینی گروهی از متابولیتهای ثانویه گیاهان از گروه فنیل پروپانوئیدها بوده و عمدتا در تیره چتریان یافت میشوند. کومارین ساده ترین ترکیب در این خانواده بشمار میرود. در این پژوهش اثردگرآسیبی کومارین بر روی گیاه مدل کاهو (*Lactuca sativa*cv.siahoo) 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 بذرهای کاهو در گلدان‌های حاوی پیت کشت داده شده و با محلول غذایی هوگلند واجد کومارین (غلظت های۲و۱۰میکرو گرم بر میلی لیتر) آبیاری شده و بعد از رشد گیاه تأثیر تیمارهای مذکور بر روی جنبه های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد جوانه زنی بذور کاهو تحت تأثیر کومارین کاهش داشته و این کاهش کاملاً 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 تروخشک اندام هوایی و ریشه گیاه و همچنین مقدار کلروفیل نسبی اندام هوایی نیز کاهش معنی‌دار یافته ولی تغییر معنی‌داری در فلروسانس کلروفیل صورت نگرفته است. فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز، پروتئاز و پلی فنل اکسیداز افزایش ولی فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات 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 ی دیگر دیده می‌شود. به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت، ترکیب دگرآسیب کومارین از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، گیاه کاهورا تحت تأثیرقرارداده 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،دگر آسیبی، الکتروفورز

مقدمه:

امروزه توجه محققین به طور گسترده به سمت ترکیبات دگرآسیب خصوصاً سازوکارهای تأثیر این ترکیبات از دیدگاه فیریولوژیک، بیوشیمیایی ومولکولی جلب شده است. هدف این مطالعات زمینه‌سازی در جهت ساخت علف کش‌هایی با منشأ طبیعی (Bio herbicides) می‌باشد. ترکیبات دگر آسیب (Allelochemicals) در اصل متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط یک گیاه می‌باشند که رشد و توسعه سایرگیاهان 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،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: razavi694@gmail.com

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021

لاکتون‌های فنیل پروپانوئیدی ومشتقات 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 درگیاهان 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 وروش‌ها:

تعیین غلظت بهینه کومارین با بررسی روی شاخص‌های رشد: در ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف ماده‌ی کومارین بر جوانه‌زنی گیاه کاهو (رقم سیاهو) در پنج تکرار و در قالب طرح بلوکهای تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیب کومارین از شرکت سیگما-آلدریخ (اس تی لوئیس، میسوری، آمریکا) خریداری شد. محلول این ماده در غلظت‌های۱۰ ،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 در صد به مدت ۵دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر در پتری های مفروش با کاغذ صافی واتمن که قبلاً در اتوکلاو در دمای۱۲۱درجه سیلیوس، به مدت۲۰دقیقه سترون شده بودند، جهت جوانه زنی قرار گرفتند. در داخل هر پتری ۲۰ بذر قرار داده و۱۰میلی لیتر از محلول‌های تهیه شده برای هر پتری ریخته شده و تمامی پتری‌ها به داخل انکوباتور که بر دمای ۲۵درجه سیلسیوس تنظیم شده بود، انتقال گردید. لازم به ذکر است که برای هر غلظت از ماده کومارین ۵ پتری و برای گروه شاهد نیز ۵ پتری در نظر گرفته شد. شمارش بذرهای 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 گلخانه ای و تیمار گیاه: دانه رست‌های گروه شاهد و تیمار شده با غلظت‌های۱۰و۲میکروگرم بر میلی لیتر کومارین، به درون گلدان‌های حاوی پیت که قبلاً استریل شده بودند، منتقل شده و در داخل اتاقک رشد با دوره روشنایی۱۶ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت ودمای۲۵ درجه سیلسیوس و رطوبت۸۰ درصد به مدت ۳۲ روز، رشد داده شدند. گیاهان گروه شاهد با محلول غذایی هوگلند ٤٠ درصد و گیاهان گروه‌های تیمار با هوگلند ٤٠ درصد حاوی ۱۰ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین، روزانه به مقدار۱۰میلی لیتر برای هر گلدان آبیاری گردیدند. گیاهان تا رسیدن به مرحله هفت برگی (۳۲روز 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 دمای۷۰ درجه سیلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک و توزین شدند. ریشه-های هر گلدان نیز با دقت خارج شد و پس از شستشو وزن‌تر ریشه تعیین شد و وزن خشک نیز بعد از خشک شدن در درون آون اندازه‌گیری گردید.

سنجش محتوی و فلورسانس کلروفیل: مقدارکلروفیل 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 سنجش فلورسانس

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021

کلروفیل پس از۲۰دقیقه قرار گرفتن اندام هوایی دانه رست‌ها در تاریکی به وسیله گیره‌های مخصوص دستگاه فلوریمتر PEA، از محل میانه برگ اندازه‌گیری 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 سنجش فعالیت آنزیم‌ها: برگ گیاه در داخل هاون چینی قرار داده شده، مقداری ازت مایع روی آن ریخته و تا حد پودر شدن کوبیده شد. سپس۰/۱ میلیگرم از برگ همگن شده به میکروتیوپ‌های دو میلی لیتری ریخته و یک میلی لیتر بافر فسفات۰/۱مولار به آن اضافه شده و بلافاصله در داخل حمام یخ قرار داده شدند. میکروتیوپ‌ها توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۱٦۰۰۰g در دمای ٤ درجه سیلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژشدند و روشناورآنها جدا و داخل میکروتیوپ های جدید منتقل شده و در فیریزر با دمای۸۰- درجه سیلسیوس جهت نگهداری منتقل گردیدند. از این نمونه ها می توان جهت تعیین مقدار کمی پروتئینها به روش برادفورد و اندازه گیری فعالیت آنزیم ها استفاده کرد (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: دو میلی لیتر بافر فسفات۰/۰۵ مولار با pH=٦/٥ و۰/۱میلی لیتر آب اکسیژنه۳درصد و ۰/۲میلی لیتر اسید آسکروبیک پنج میلی مولار در حمام یخ مخلوط گردید. سپس۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شده و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج۲۹۰ نانومتر ثبت شد.فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸) .

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز: ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات۰/۲مولار با pH=٦/٨ و ۰/۲ میلی لیتر پیروگالل۰/۰۲مولار و ۰/۲میلی لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای٤۰درجه سیلسیوس اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج٤۳۰نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز: دو میلی لیتر کازئین هیدرولیز شده یک درصد با pH=٦ و ۰/٤ میلی لیتر عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای٤٥درجه سیلسیوس برروی صفحه حرارتی نگهداری و سپس برای توقف واکنش به آن۰/٤میلی لیتر تری کلرواستیک اسید٤۰درصد اضافه شد و جذب در۲۸۰ نانومتر ثبت شد فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸) .

سنجش فعالیت ویژه کاتالاز: برای سنجش فعالیت مخصوص آنزیم کاتالاز از آب اکسیژنه۳درصد بعنوان سوبسترا استفاده شد. بدین گونه که ۰/۳ میلی لیتر آب اکسیژنه با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ میلی مولار که داری pH=6.5 بود مخلوط گشته و سپس ۲/ ۰میلی لیتر عصاره آنزیمی به این مجموعه اضافه گشت (تمامی این مراحل در داخل حمام یخ صورت گرفت). سپس تغییرات جذب محلول بلافاصله در طول موج۲٤۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلیگرم پروتئین کل محاسبه گردید (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۸) .

سنجش پروتئین محلول کل: ۰/۱ میلی لیتر از عصاره پروتئینی با پنج میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط شده و جذب محلول حاصل را در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری گردید. براساس منحنی استاندارد ترسیم شده با سرم آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محاسبه شد.برای تهیه محلول های استاندارد ۱۰۰ میلی گرم سرم آلبومین گاوی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و از محلول فوق، غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه گردید. سپس۰/۱میلی لیتر از هر محلول با پنج میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد .سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول۵۹۵ نانومتر اندازه گیری و جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Bradford, 1976).

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021

استخراج عصاره پروتئینی برای الکتروفورز: برای استخراج، ۰/۷ گرم نمونه برگی از گروه شاهد و ازهر 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 کوبیده شد. سپس نمونه ها به درون میکروتیوپ منتقل شده و با سانتریفیوژ یخچالدار در سرعت g ۱۲۰۰۰در دمای ٤ درجه سیلسیوس به مدت۲۱دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشناور حاصل دوباره با سرعت g۱۰۰۰ و در دمای ٤ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژشده و روشناور حاصل از این مرحله برای انجام عمل الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه بافر استخراج پروتئین، پنج میلی لیتر تریس-اسیدکلریدریک ۵۰ میلی مولار با pH=۷/۵، را با ۲۰۰ میکرولیتر Na_2EDTA یک مولار و ۳۳ میکرولیتر مرکاپتواتانول ۰٤/ درصد مخلوط و با آب مقطر به حجم نهایی صد میلی لیتر رسانده شد.این بافر را می‌توان درون یخچال تا چند هفته نگهداری کرد.

روش الکتروفورز: برای آماده سازی نمونه درSDS-PAGE، یک حجم بافر نمونه و چهار حجم عصاره‌ی پروتئینی مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه درآب جوش قرار داده شد تا تحت این شرایط پروتئین‌ها تحت اثر ماده احیا کننده کاملاً واسرشته شده و همچنین بار الکتریکی یکنواختی بگیرند. بعد از تنظیم قاب شیشه‌ای ژل، محلول‌های ژل پایین (جداکننده) و ژل بالا (متراکم کننده) به ترتیب با غلظت ۱۰ و ۵ درصد تهیه شد. قاب شیشه‌ای 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 نمونه‌های آماده شده گیاهی به درون چاهک‌های ژل بالا با دقت تزریق شد. الکتروفورز با ولتاژ۱۱۰ولت 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 با استفاده از محلول رنگ بر به مدت ٦ 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 گلاسیال و آب مقطر بود(Schagger and Von Jagow, 1987).

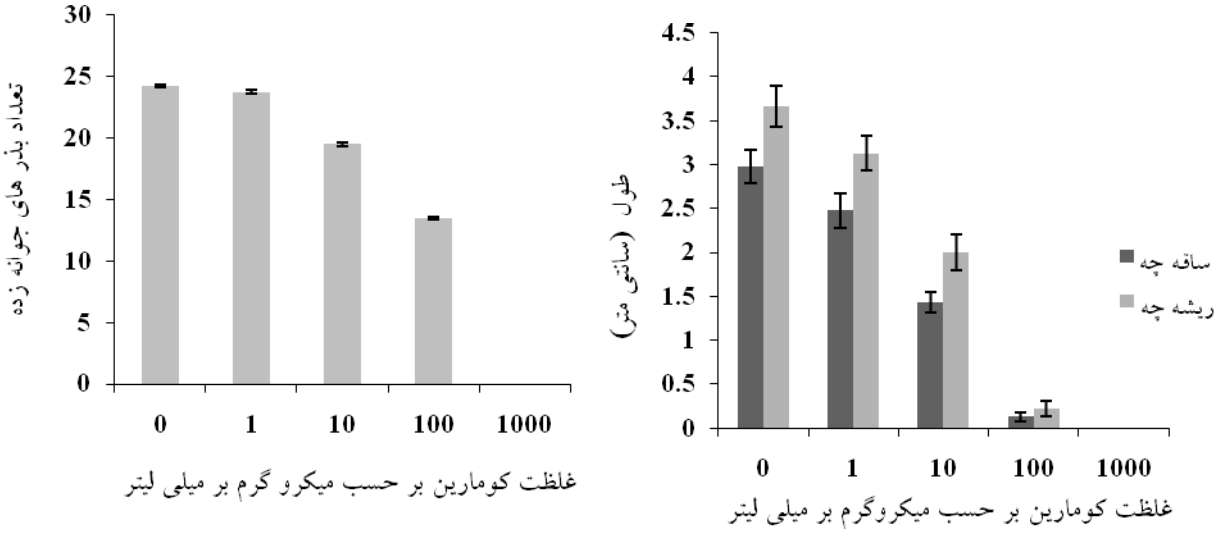
استخراج DNA: به منظور استخراج DNA، نمونه های مربوط به ریشه گیاهان گروه شاهد و هر کدام از تیمارها به طور جداگانه در هاون چینی حاوی نیتروژن مایع و با استفاده از محلول استخراج تشکیل شده از Tris، SDS، CTAB استخراج گردیده، مواد زائد با استفاده از فنول و کلروفرم رسوب داده شده و محلول رویی (فاز آبی) بعد از سانتریفوژ جهت رسوب DNA استفاده گردید. جهت رسوب DNA از الکل اتانول استفاده گردید و رسوب حاصل با استفاده از الکل ۷۰٪ شستشو گردیده و سپس در بافر TE حل گردید. DNA 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 بلوک‌های کامل تصادفی و با ۵ تکرار انجام شد و تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و معنی‌دار بودن داده‌های حاصل با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

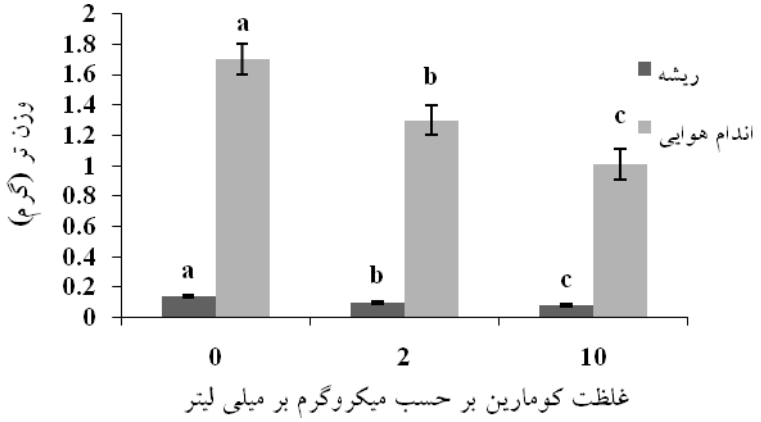
نتایج:

نتایج بدست آمده نشان داد که ترکیب کومارین باعث کاهش معنی‌دار جوانه‌زنی در گیاه کاهو گردیده است، به طوری که در غلظت ۱۰ میکروگرم برمیلی لیتر کومارین فقط ٥٦/٦٧ درصد بذور نسبت به گروه شاهد جوانه زده و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر جوانه زنی به طور کامل مهارگردیده است. همچنین رشد ساقه چه تحت تیمار کومارین در غلظت یک، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ١٤، ٤٠ و ٤٥/٢ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار داشته است. رشد ریشه در غلظت‌های یک، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین به ترتیب ۱۷/۱۱، ٥١/٣٤، ٥٦/٧١ درصد نسبت

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021



شکل۱- جوانه زنی بذر کاهو (سمت چپ) رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های کاهو (سمت راست) تحت تیمار غلظت‌های مختلفی از کومارین.

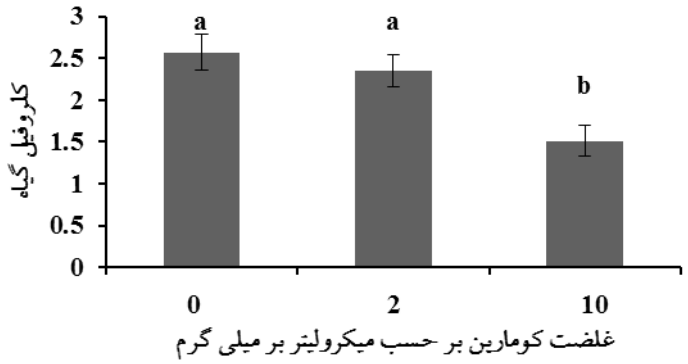


شکل ۲- وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی تحت تأثیر تیمار غلظت‌های متفاوت کومارین در مقایسه با گروه شاهد .
حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.

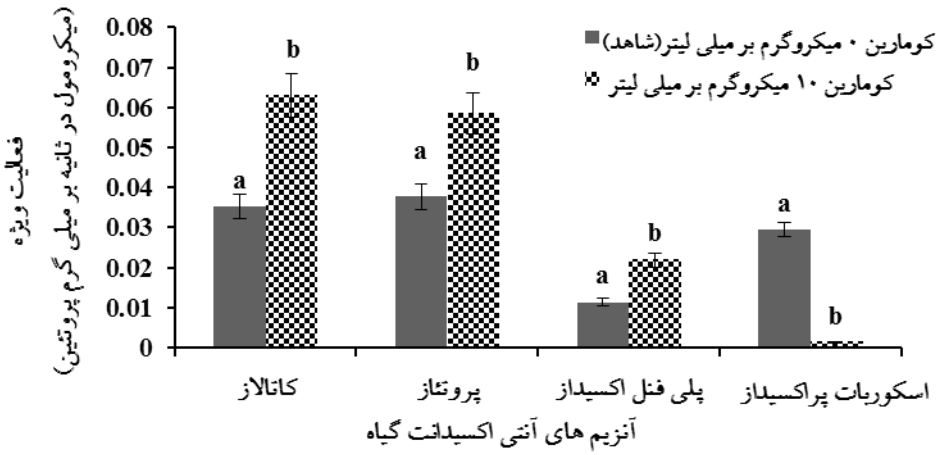
به گروه شاهد کاهش نشان می‌دهد (شکل۱). در غلظت‌های بالاتر ترکیب کومارین بطور کامل باعث مهار شاخص‌های رشد مذکور در ریشه شده است. با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده، غلظت ۱۰و دو میکرگرم بر میلی لیتر کومارین به عنوان غلظت بهینه برای ادامه آزمایش انتخاب شدند.

همچنین وزن ترو خشک ریشه و اندام هوایی گیاه کاهو نیز تحت تأثیر غلظت های کومارین کاهش معنی دار داشته است بطوریکه در غلظت‌های ۲ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین، وزن تر اندام هوایی به ترتیب ۲۳/۵۲ و ۴۱/۱۷ درصد نسبت به گروه شاهدو وزن تر ریشه به ترتیب ۲۸/۵۷ و ۴۲/۵۸ درصد نسبت به گروه شاهدکاهش داشته است. همچنین وزن خشک اندام هوایی به ترتیب ۲۴/۶۵ و ۴۲/۴۶ و وزن خشک ریشه به ترتیب ۳۰ و ۶۰ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (شکل۲). مقدار کلروفیل گیاه بر حسب واحد نسبی (SPAD) نیز تحت تأثیر تیمار ۲ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین به ترتیب ۰/۵ و ۴۶/۷۱ درصد کاهش داشته است که از نظر آماری این کاهش در تیمار ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر کومارین معنی دار می‌باشد (شکل ۳). در مورد فلروسانس بیشینه و کمینه کلروفیل و همچنین کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ، داده‌های بدست آمده از نظر آماری معنی‌دار نبودند به عبارت بهتر نیمار کومارین منجر به تغییر معنی‌دار در فلورسانس کلروفیل گیاه کاهو نگردید.از طرف دیگر مشخص

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021



شکل ۳- تغییرات مقدارکلروفیل گیاه کاهو بر حسب واحد نسبی (SPAD) تحت تأثیر تیمارهای متفاوت از کومارین در مقایسه با گروه شاهد. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.



شکل٤- تغییرات فعالیت آنزیمی گیاه کاهو تحت تیمار کومارین در مقایسه با گروه شاهد. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.

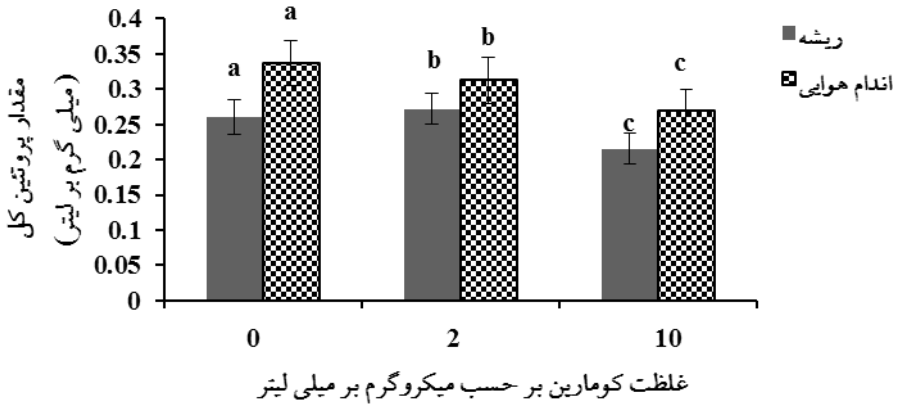
شد فعالیت ویژه آنزیم‌های پروتئاز، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز در گیاه کاهو تحت تیمار کومارین افزایش معنی‌دار داشته در صورتی که فعالیت ویژه آنزیم آسکروبات پراکسیداز تحت تیمار کومارین کاهش نشان می‌دهد (شکل٤).

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 ۲۷/۰۷ و ۳۹/٤۳ درصد نسبت به گروه شاهد و در ریشه به ترتیب ۲/۷۷ و ۳٤/۱ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است .در غلظت دو میکروگرم بر میلی لیتر کومارین در ریشه تغییرات نسبت به شاهد معنی‌دار نیست (شکل٥).

الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های گیاه و مقایسه آن با مارکر های موجود نشان داد که یک پروتئین بسیار شاخص گیاه وزن مولکولی بین ۲۵ تا ٦٦ کیلودارد ولی این پروتئین تحت تأثیر تیمار کومارین قرار نمی‌گیرد. این الگو نشان داد که تحت تیمار کومارین بعضی از باندها که اساساً وزن مولکولی بالاتر از ٦٦ کیلودالتون دارند کاهش کمی داشته و این کاهش با افزایش غلظت کومارین تیمار شده تشدید می‌گردد (شکل٦).

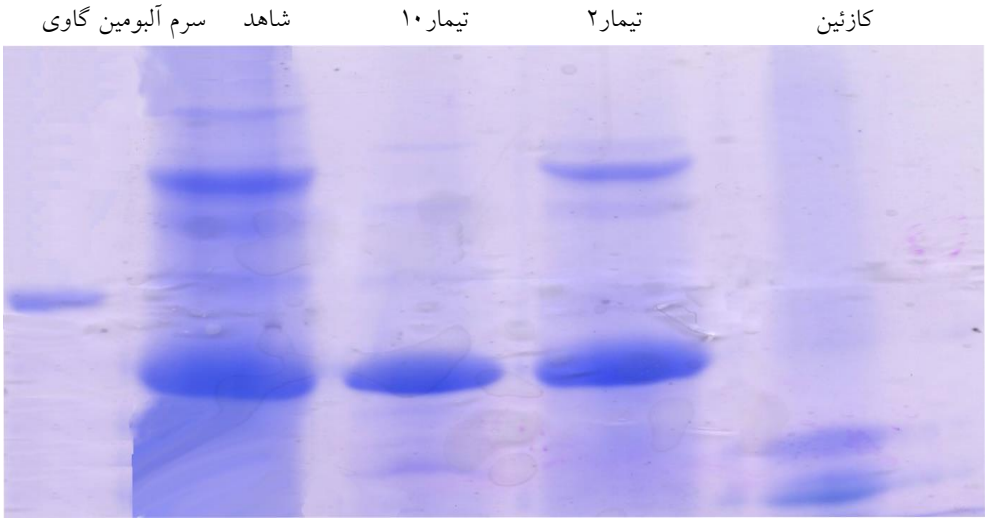
نتایج نشان داد که تیمار کومارین هیچ تأثیری بر DNA گیاه تحت تیمار نداشته است ودر تیمارها همانند شاهد فقط یک باند در ژل اگاروز قابل مشاهده است (شکل۷).

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021



شکل ۵- تغیرات 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.



شکل٦- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های گیاه کاهو تحت تیمار کومارین با غلظت‌های ۲ و۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر. سرم آلبومن گاوی و کازیئن به عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

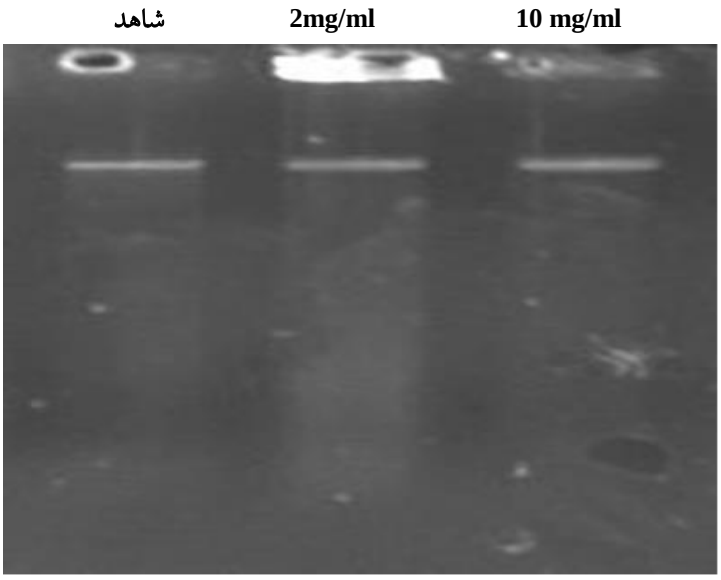
بحث:

تاکنون 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 می شوند (Taiz and Zaiger, 2002; Razavi, 2011). با این حال مطالعات کمی در خصوص سازو کارهای مؤثر دردگرآسیبی این ترکیبات تا به حال ارائه شده است.

در این پژوهش مشخص شد که ترکیب کومارین که ساده ترین ترکیب گروه کومارین‌ها ست منجر به کاهش روند کلی 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 دگر آسیب 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

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021



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

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 دگراسیبی اثر مخرب بر غشاهای فتوسنتزی ندارند. این پدیده در دیگر ترکیبات دگراسیب 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 مدعا 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 می دهد یکی از سازو کارهای عملکردی ترکیبات دگرآسیب قطعه قطعه کردن DNA و القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌های گیاهی است (*et al.*, 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 منشا کاملاً طبیعی است.

نتیجه‌گیری کلی:

به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت تأثیر کومارین بر گیاه کاهو که در اصل نوعی تنش از تیپ آللوکمیکال می‌باشد، منجر به پاسخ‌های خاص فیزیولوژیکی بیوشیمیایی می‌گردد که تا

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

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: ۳۱-۲٤.

حسین زاده، م.، کیارستمی، خ.، ایلخانی زاده ، م. و صبورا، ع. (۱۳۸۸). بررسی اثرات ترکیبات آللوپاتیک جو خودرو بر میزان پروتئینها ، کربوهیدارت ها و فعالیت برخی از آنزیم های گندم. مجله زیست شناسی ایران۲۲: ٤۰٦-۳۹۲.

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 cervices cancer Hela cells through a mithchondria 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. Yadavaran Press, Tehran.

Razavi, S. M. (2011). Plant coumarins as allelopathic agents. Inernational 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.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021

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)(

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 8:13 IRST on Saturday October 23rd 2021

Abstract:

Coumarins are regarded as a class of plant secondary metabolites of phenyl propanoid group distributed in Apiaceae family. Cocumarin is the simplest compound in this family. In the present work, allelopathic potentiality of coumarin on *Lactuca sativa* cv.*siahoo* 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 florescence 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 afected 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