بررسی اثرات شالکون در گیاه کاهو از برخی جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

سید مهدی رضوی*، فریبا روحی و هادی حسین زاده

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

(تاریخ دریافت: ١٣٩٤/٠٩/٢٢، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٥/٠٢/١٥)

چکیده:

شالکون متابولیت ثانویه متداولی در گیاهان است که به عنوان پیش ساز فلاونوئیدها به شمار می‌آید. در پژوهش حاضر ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف شالکون (١٠٠٠، ١٠٠، ١٠ و ١ میکروگرم بر میلی لیتر) بر روی جوانه زنی بذور کاهو و رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های آن مورد بررسی قرار گرفت تا غلظت بهینه آزمایش تعیین گردد. بر اساس نتایج حاصله، غلظت ١٠٠ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان غلظت بهینه انتخاب و اثر تیمار این غلظت از ماده شالکون بر روی شاخص‌هایی همچون وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی، میزان کلروفیل و میزان فلورسانس کلروفیل، مقدار پروتئین محلول کل، فعالیت ویژه برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاه از جمله آنزیم آسکوربات پراکسیداز، آنزیم کاتالاز، آنزیم پلی فنل اکسیداز، و نیز آنزیم پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تأثیر این ماده بر الگوی الکتروفورز پروتئین‌ها در گروه تیمار شده و گروه شاهد بررسی شد. نتایج حاکی از این است که تحت تیمار ماده شالکون، به میزان ١٠٠ میکرو گرم بر میلی لیتر، وزن‌تر اندام هوایی ٢٧/٩، وزن‌تر ریشه ١٠، وزن خشک اندام هوایی ٣١/٨ و وزن خشک ریشه ١٥/٦ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش معنادار داشته است. تغییرات کارایی فتوشیمیایی برگ (F_v/F_m) از نظر آماری بی معنی بوده ولی میزان کلروفیل در واحد نسبی در گروه تیمار نسبت به شاهد کاهش ٨١/٧ درصدی داشت. از طرف دیگر، میزان پروتئین محلول کل بعد از تیمار ماده شالکون ٢٢/٣ درصد افزایش داشته است. فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز و آنزیم پلی فنل اکسیداز کاهش و فعالیت ویژه آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و آنزیم پروتئاز افزایش داشته، الگوی الکتروفورز پروتئین‌ها نیز از نظر کمی و کیفی با گروه شاهد تفاوت‌هایی نشان داد. به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت با تاثیرشالکون برروی کاهو که به عنوان گیاه مدل در مطالعات دگرآسیبی استفاده می‌شود، برخی پاسخهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در این گیاه ایجاد می‌شود که از آن جمله می‌توان به کاهش میزان کلروفیل و وزن‌تر و خشک گیاه اشاره کرد. اما این تنش که باید آنرا تنش آللوکمیکال به حساب آورد بعضاً پاسخهای متفاوتی را نسبت به تنشهای غیر زیستی از جمله شوری و خشکی ایجاد می‌کند. به عنوان مثال می‌توان به عدم تغییر فلورسانس کاروفیل و نیز تغییر کاهشی در فعالیت بعضی آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت اشاره نمود.

کلمات کلیدی: شالکون، دگرآسیبی، الکتروفورز پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت.

مقدمه:

امروزه مطالعات زیادی در خصوص پدیده دگرآسیبی (Allelophaty) در گیاهان در حال انجام است و هدف این مطالعات شناخت دقیق سازوکارهای این پدیده می‌باشد تا در صورت امکان بتوان روشی کاملاً طبیعی جهت مبارزه با علفهای هرز و دیگر آفات نباتی ارائه نمود. دگرآسیبی به

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]

صورت تأثیر متابولیت های ثانویه تولید شده توسط یک نوع گیاه، قارچ یا میکروارگانیسم که رشد و توسعه سیستم‌های زراعی و زیستی دیگر را محدود نماید، تعریف شده است (Sampietro *et al.*, 2009). این پدیده امروزه می‌تواند به عنوان یک علم استراتژیک در طراحی سموم و علف کش های ارگانیک به عنوان جایگزین انواع شیمیایی این سموم و علف کش‌ها مطرح گردد. ترکیب شالکون با فرمول شیمیایی C15H25O5، به عنوان یک ترکیب فلاونوئیدی و به بیان بهتر پیش ساز سایر فلاونوئیدها شناخته می‌شود (Taiz and Zeiger, 2002). بررسی‌ها نشان داده که شالکون خواص ضد قارچی و باکتریایی دارد، همچنین همانند سایر فلاونوئیدها می‌تواند داری خاصیت دگرآسیبی می‌باشد (Arora *et al.*, 2012; Bitencourt *et al.*, 2007; Hijova, 2006).

در پژوهش‌های دیگری اثرات دگرآسیبی انواع مختلفی از ترکیبات فنلی بر روی گیاهانی همچون ذرت، آرابیدوپسیس تالیانا، کلزا و... به اثبات رسیده است (Lupini *et al.*, 2010; Reigosa *et al.*, 1999; 2013). اثرات فیتوتوکسیک شالکون نیز قبلاً بر روی برخی گیاهان مدل همانند کاهو و آرابیدوپسیس و نیز اثرات مهاری آن بر روی برخی علفهای هرز همچون تاج خروس به اثبات رسیده است (Díaz-Tielas *et al.*, 2014). اما مکانیسم تأثیر ماده شالکون بر روی گیاهان، خصوصاً از دیدگاه بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تا کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این پژوهش تأثیر و چگونگی تاثیرات دگرآسیبی ماده شالکون بر روی گیاه کاهو که گیاه مدل برای تحقیقات دگرآسیبی می‌باشد از جنبه‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد وروش‌ها:

تعیین غلظت بهینه شالکون وبررسی جوانه‌زنی: ابتدا غلظت‌های مختلفی از ماده شالکون (Aldrich 136123) تهیه و بذرهای کاهو (رقم سیاهو) تحت تیمار این غلظت‌ها جهت بررسی جوانه زنی قرار گرفتند. این مرحله در پنج تکرار انجام گردید. بدین ترتیب که ابتدا محلول این ماده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰ و ۱ میکروگرم در میلی لیتر با حل کردن در آب مقطر و با افزودن چند قطره استون تهیه شد. بذرها جهت ضدعفونی شدن به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلراید یک درصد قرار داده شده و پس از شستشو با آب مقطر در پتری‌های مفروش با کاغذ صافی واتمن که قبلاً در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سیلیوس، به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده بودند، جهت جوانه زنی قرار گرفتند. در داخل هر پتری ۱۲ 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 ۱۲ درجه سیلسیوس تنظیم شده بود، انتقال گردید. لازم به ذکر است که برای هر غلظت از ماده شالکون ۵ پتری و برای گروه شاهد نیز (که محلولش حاوی آب مقطر و چند قطره استون بود) ۵ پتری در نظر گرفته شد. شمارش بذرهای جوانه زده روزانه و تا یک هفته انجام گرفت. در پایان این مدت، درصد کل جوانه زنی بذرها محاسبه و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه دانه‌رستها نیز در هر ظرف پتری با استفاده از خط کش میلی متری اندازه‌گیری شد.

کشت گیاه و تیمارهای مربوطه: دانه رستهای گروه شاهد و تیمار شده با غلظتهای ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر شالکون، به درون گلدان‌های حاوی پیت که قبلاً استریل شده بودند، منتقل شده و در داخل ژرمیناتور با دوره روشنایی ١٦ ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت و دمای ۲۵ درجه سیلسیوس و رطوبت ۸۰ درصد به مدت ۳۲ روز، رشد داده شدند. گیاهان گروه شاهد با محلول غذایی هوگلند ۵۰ درصد و گیاهان گروه تیمار با هوگلند ۵۰ درصد حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر شالکون، روزانه به مقدار ۱۰ میلی لیتر برای هر گلدان آبیاری گردیدند. گیاهان تا رسیدن به مرحله هفت برگی رشد داده شده و سپس برداشت شدند.

اندازه گیری وزن‌تر و خشک اندام هوایی وریشه: پس از برداشت گیاه، وزن‌تر اندام هوایی تعیین شد، سپس نمونه‌ها درون پاکت‌های جداگانه و در داخل آون در دمای ۷۰ درجه سیلسیوس به مدت ٢٤ ساعت خشک و توزین شدند. ریشه‌های هرگلدان نیز با دقت خارج شد و پس از شستشو وزن‌تر ریشه تعیین شد و وزن خشک نیز بعد از خشک شدن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]

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 مابین رگبرگ اصلی و حاشیه برگ صورت گرفت. برای سنجش فلورسانس کلروفیل پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن اندام هوایی دانه‌رستها در تاریکی به وسیله گیره‌های مخصوص دستگاه فلوریمتر PEA، از محل میانه برگ اندازه گیری گردید. شاخص‌های مورد ارزیابی شامل F_O: (فلورسانس کمینه)، F_M: (فلورسانس بیشینه) و F_V/F_M: (کارایی فتوشیمیایی فتوسیستمΠ) 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. سپس ۰/۱ میلی گرم از برگ همگن شده به میکروتیوب‌های دو میلی لیتری ریخته و یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار به آن اضافه شده وبلافاصله در داخل حمام یخ قرار داده شدند. میکروتیوپ‌ها توسط سانتریفیوژ یخچالدار با سرعت ۱۶۰۰۰g در دمای ٤ درجه سیلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور آن‌ها جدا و داخل میکروتیوپ های جدید منتقل شده و در فیریزر با دمای ۸۰- درجه سیلسیوس جهت نگهداری منتقل گردیدند. از این نمونه‌ها می‌توان جهت تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد و اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده کرد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکروبات پراکسیداز: ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH ٦/٥ و ۰/۱ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی لیتر اسید آسکروبیک پنج میلی مولار در حمام یخ مخلوط گردید. سپس ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شده و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (Hu, 1985).

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز: ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=٦/٨ و ۰/۲ میلی لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار و ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای ٤۰ درجه سیلسیوس اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج ٤۳۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (Raymond *et al*., 1993).

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز: ۲ میلی لیتر کازئین هیدرولیز شده یک درصد با pH=٦ و ۰/٤ میلی لیتر عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ٤٥ درجه سیلسیوس بر روی صفحه حرارتی نگهداری و سپس برای توقف واکنش به آن ۰/٤ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ٤۰ درصد اضافه شد و جذب در ۲۸۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (Penner and Aston, 1969).

سنجش فعالیت ویژه کاتالاز: برای سنجش فعالیت مخصوص آنزیم کاتلاز از آب اکسیژنه ۳ درصد 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 ٦/٥ =pH بود مخلوط گشته و سپس ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی اضافه به این مجموعه اضافه گشت (تمامی این مراحل در داخل حمام یخ صورت گرفت). سپس تغییرات جذب محلول بلافاصله در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرمول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید (Aebi, 1983).

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 ٥٩٥ نانومتر اندازه‌گیری گردید. براساس منحنی استاندارد ترسیم شده با سرم آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محاسبه شد. برای تهیه محلول‌های استاندارد ۱۰۰ میلی گرم سرم آلبومین گاوی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و از محلول فوق، غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه گردید. سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر محلول با پنج میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس جذب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]

آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری و جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Bradford, 1976).

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 نمونه‌ها به دروم میکروتیوپ منتقل شده و با سانتریفیوژ یخچالدار در سرعت g ۱۲۰۰۰ در دمای ٤ درجه سیلسیوس به مدت ۲۱ دقیقه 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 مولاربا 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 در SDS-PAGE، یک حجم بافر نمونه و چهار حجم عصاره‌ی پروتئینی مخلوط و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. تا تحت این شرایط پروتئینها تحت اثر سیس و ماده احیا کننده کاملاً واسرشته شده و همچنین بار الکتریکی یک نواختی 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 پروتئین کازئین به عنوان مارکر و همچنین نمونه‌های آماده شده گیاهی به درون چاهک‌های 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. 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، رنگ بری 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 (Schägger and Von Mostafaie, 2003; Jagow, 1987).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش در ۵ تکرار انجام شد و تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و معنی دار بودن داده‌های حاصل با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه در سطح احتمال پنج درصد و مقایسه میانگین‌ها با استفااده از آزمون دانکن و آزمون t-test انجام شد.

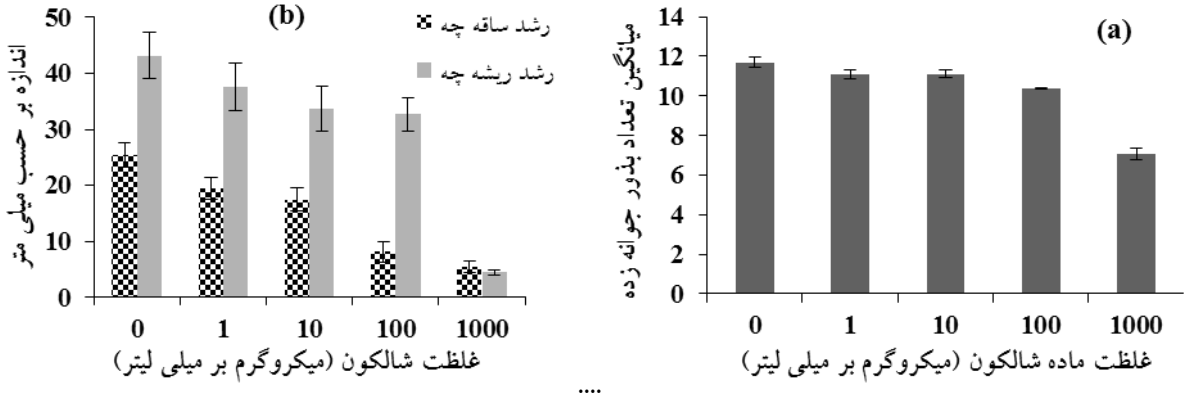
نتایج:

نتایج حاصل نشان داد که تحت تیمار ماده شالکون در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰،۱۰۰ و ۱ میکرو گرم بر میلی لیتر میزان جوانه زنی دانه‌های کاهو به ترتیب ۳۹/۷، ۱۱/۳، ۵/۲ و ۵/۲ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش نشان دادکه این تفاوت‌ها بین غلظت‌های ۱ و ۱۰ مشابه بوده است (شکل 1a). همچنین طول ساقه چه، ۷۸/۷، ۲۹/٦۷،۹/۹ و ۲۳/۳ و طول ریشه چه ۸۹/۸، ۲٤/۳، ۲۲ و ۱۲/۹ درصد نسبت به گروه شاهد، کاهش نشان داد (شکل 1b). این یافته‌ها نشان می‌دهد که میزان جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه گیاهچه‌های کاهو تیمار شده با شالکون در سطح احتمال ۵ درصد با کاهش معنی داری همراه بود.

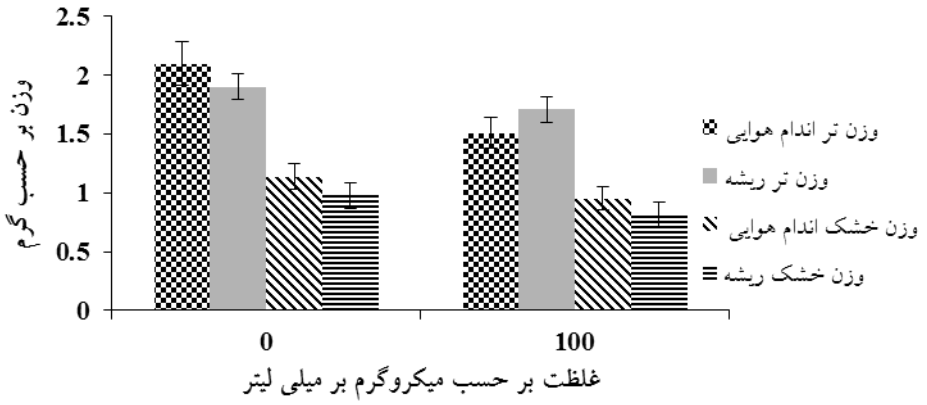
وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی: نتایج حاصل از بررسی وزن‌تر و خشک اندامهای گروه تیمار و مقایسه آنها با گروه شاهد نشان داد که تحت تیمار ماده شالکون با غلظت ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر، وزن‌تر اندام هوایی ۲۷/۹، وزن‌تر ریشه ۱۰، وزن خشک اندام هوایی ۳۱/۸ و وزن خشک ریشه ۱۵/٦ درصد. نسبت به گروه شاهد کاهش معنادار داشته

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]



شکل ۱ - تأثیر غلظت‌های مختلف شالکون بر جوانه‌زنی گیاه کاهو (a) بر رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌های کاهو(b).



شکل ۲- تأثیر شالکون بر وزن‌تر و خشک اندامهای گیاه کاهو.

است (شکل ۲).

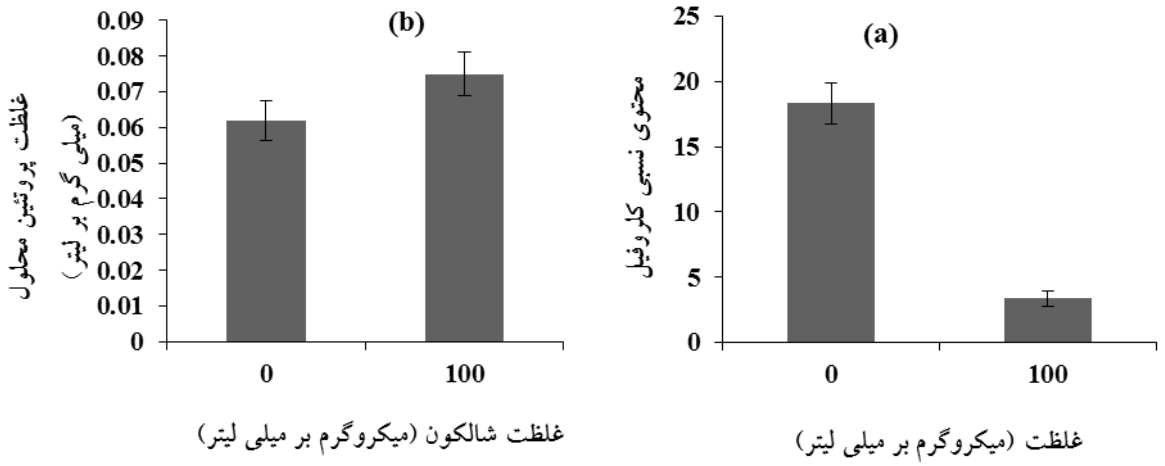
نتایج بررسی تغییرات فلورسانس کلروفیل: یکی از بارزترین پاسخ‌های گیاه به تنش ایجاد شده توسط ترکیبات آللوپاتیک، کم شدن فتوسنتز ناشی از اختلال در عملکرد فتوسیستم Π می‌باشد. در نتیجه به دنبال کاهش فتوسنتز عملکرد کوانتومی فتوسیستم Π کاهش یافته و در واقع میزان مصرف انرژی الکترون برانگیخته شده از طریق غیرفتوشیمیایی یعنی گرما و فلورسانس افزایش می‌یابد. (اسفندیاری، ۱۳۸۹; Ahmad *et al*., 2008). اما نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که از نظر آماری فلورسانس کلروفیل و در نتیجه تغییرات کارایی فتوشیمیایی برگ در سطح احتمال ۵ درصد بی معنی می‌باشد.

نتایج بررسی محتوی کلروفیل: بر اساس آنالیز داده‌های حاصل از سنجش محتوای کلروفیل، با تیمار ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از ماده شالکون میزان کلروفیل حدود ۸۱/۷ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت که نشانگر حساسیت بالای سنتز کلروفیل به شرایط تیمار شالکون می‌باشد (شکل a ۳).

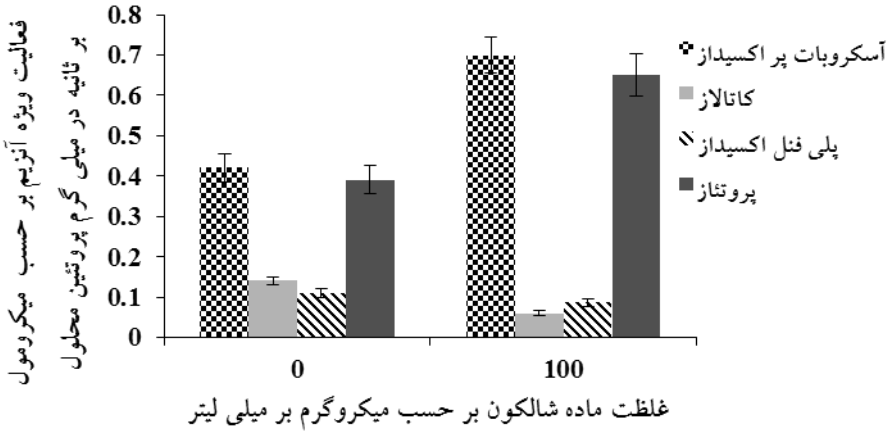
سنجش مقدار کمی پروتئین: با سنجش پروتئین در هر دو گروه شاهد و تیمار مشخص گردید که میزان پروتئین محلول کل در حدود ۲۲/۳٪ در نمونه گروه تیمار شده با شالکون (۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) افزایش داشته است که این افزایش می‌تواند در پاسخ به استرس ایجاد شده توسط ماده‌ی شالکون ایجاد شده باشد (شکل b ۳).

نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و آنزیم پروتئاز: نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیمی نشان داد که تحت تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از ماده شالکون به

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]



شکل ۳- تأثیر شالکون بر کلروفیل نسبی گیاه کاهو (a) بر محتوی پروتئین کل گیاه (b)



شکل ٤- تأثیر شالکون بر فعالیت ویژه برخی آنزیم‌ها.

ترتیب فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیدازحدود ٦٦/٦٪ و فعالیت آنزیم پروتئاز حدود ٦٦/٦٪ افزایش یافت. و فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز حدود ۲۱/۱٪ کاهش داشت و فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز حدود ٥٦/۹٪ کاهش یافت (شکل ٤).

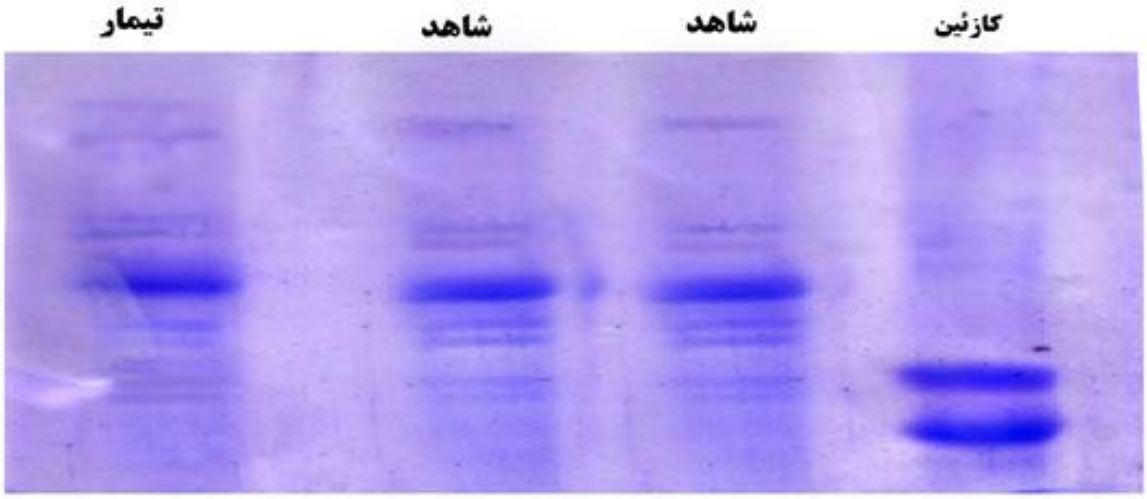
نتایج حاصل از الکتروفورز: الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های مربوط به نمونه شاهد و تیمار شده با شالکون در شکل ٥ ارائه شده است. باندهای سمت راست باندهای مربوط به پروتئین کازئین می‌باشد که به عنوان مارکر در نظر گرفته شده است و دو ردیف باندهای بعدی مربوط به نمونه شاهد و ردیف بعدی مربوط به نمونه تیمار می‌باشد.

با توجه به وزن مولکولی ایزومرهای پروتئین کازئین که بین ۲۲ تا ۲٥ کیلو دالتون می‌باشد می‌توان نتیجه‌گیری نمود که غالب باندهای ظاهر شده وزن مولکولی بالاتر از ۲٥ کیلو دالتون دارند، زیرا بالاتر از مارکر ظاهر شده‌اند. با تیمار شالکون تغییرات کمی و کیفی در الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های گیاه کاهو مشاهده می‌گردد. افزایش برخی باندها در نمونه تیمار احتمالاً مربوط به برخی ترکیبات سازگارکننده اسمزی می‌باشد. در بررسی کمی پروتئین‌ها با تست برادفورد نیز افزایش معادل ۲۲ درصد مشاهده شد که با همان توجیه قابل تفسیر می‌باشد.

بحث:

دگرآسیبی یکی از انواع تنش‌های زیستی می‌باشد که منجر به وارد شدن صدمات فراوران و گاه جبران ناپذیری به گیاهان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]



شکل ۵- تصویر الکتروفورز پروتئین‌های برگی گیاهان گروه شاهد و گروه تیمار شده با شالکون

می‌شود و میانگین تولید محصولات زراعی را به مقدار زیادی کاهش می‌دهد. در این مطالعه نیز نشان داده شد که تحت تأثیر ماده شالکون محتوای کلروفیل در گیاه کاهو کاهش یافت که ممکن است به دلیل آهسته‌تر شدن سنتز یا شکستن و تخریب سریع رنگیزه های کلروفیلی از طریق افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز باشد، زیرا ممکن است میزان این آنزیم تحت شرایط تنش ترکیبات دگرآسیب افزایش یابد. همچنین از دیگر عوامل دخیل در کاهش محتوای کلروفیل را می‌توان به حمله رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش‌های اکسیداتیو نسبت داد (Weise and Naylor, 1989). میزان پروتئین محلول اندام هوایی تحت تأثیر تیمار ماده شالکون افزایش پیدا کرد که می‌تواند نوعی پاسخ مقاومتی نسبت به تیمار ماده شالکون باشد. به طور کلی افزایش پروتئین‌های محلول، می‌تواند ناشی از سنتز پروتئین‌های شبه اسمزی مثل اسموتین یا افزایش پروتئین‌های اختصاصی تغییر دهنده خواص دیواره و یا تولید آنزیمهای آنتی اکسیدانت باشد (Vierling and Kimpel, 1992).

عدم تأثیر معنی‌دار شالکون بر روی کارایی فتوشیمیایی گیاه کاهو می‌تواند به این نتیجه گیری منجر گردد که این نوع نتش برخلاف سایر تنش‌ها همچون شوری یا خشکی بر ساختار سیستم تیلاکوئیدی فتوسنتزی گیاه تأثیر تخریبی ندارد.

کاتالاز و آسکوربات اکسیداز دو آنزیم مهم آنتی‌اکسیدانی‌اند که نقش مهمی در زدودن H_2O_2 ایفا می‌کنند. در حقیقت تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها از جمله پاسخ‌های عمومی گیاه به انواع تنش‌ها و استرس‌ها می‌باشد (Farnham, 2003). پلی فنل اکسیدازها نیز از دیگر آنزیم‌های مهم درگیر در انواع تنش‌ها و استرس‌های اکسیداتیو به شمار می‌آیند. در حقیقت سوبسترای پلی فنل اکسیدازها ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی و عمدتاً فلاونوئیدها می‌باشند (Ahmad *et al*., 2008). می‌توان بیان کرد که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز می‌تواند ناشی از کاهش میزان پراکسید هیدروژن در اثر تیمار با شالکون باشد که این ترکیب خود به عنوان یک نوع ترکیب فنولی به عنوان آنتی اکسیدانت می‌تواند عمل نماید. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز می‌تواند نوعی مکانیسم برای ایجاد مکانیسم مقاومتی موثرتر باشد. همچنین در خصوص نتایج الکتروفورز پروتئین‌ها می‌توان استنباط کرد که حضور باندهای پروتئین کازئین در طی مرحله‌ی کار می‌تواند گواهی بر درستی تهیه‌ی ژل‌های الکتروفورزی و سلامت اجزای درگیر در الکتروفورز و درستی مراحل کار باشد. از این رو تمامی عوامل منع کننده بروز باندهای مورد نظر قابل چشم پوشی بوده و حذف شدن و یا ایجاد برخی باندها ممکن است با اعمال تغییراتی در شدت بیان ژن‌های خاص بوده باشد که توسط ماده شالکون ایجاد شده است. افزایش باندهای الکتروفورتیک در نونه های تیمار شده با شالکون احتمالاً مربوط به ترکیبات سازگارکننده اسمزی باشد که قاعدتاً وزن

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]

مولکولی بالاتر از ۲۵ کیلو دالتون دارند. کاهش شدت برخی باندها نیز می‌تواند در اثر کاهش تولید پروتئینهای خاص مثلاً برخی آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مثل کاتالاز باشد. طبق آزمایشات مشابه انجام گرفته از اثرات ترکیبات آللوپاتیک جو خودرو بر روی میزان فعالیت و الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داده شد که در حضور ترکیبات دگرآسیب جو خودرو الگوی الکتروفورزی آنزیم‌ها از جمله آسکوربات پراکسیداز در گروه شاهد و تیمار یکسان نبوده و در گروه تیمار منجر به ایجاد برخی باندهای اضافی و کم رنگتر شدن تعدادی از باندها شد که ناشی از فعالیت کم آن‌هاست و این نتایج ناشی از تأثیرپذیری متفاوت آنزیم‌ها از ترکیبات دگرآسیب می‌باشد (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

نتیجه‌گیری کلی:

بر اساس داده‌های مطالعه اخیر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با تاثیرشالکون برروی کاهو که به عنوان گیاه مدل در مطالعات دگرآسیبی استفاده می‌شود، برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در این گیاه ایجاد می‌شود که از آنجمله می‌توان به کاهش میزان کلروفیل و وزن‌تر و خشک گیاه اشاره کرد. اما این تنش که باید آنرا تنش آللوکمیکال به حساب آورد بعضاً پاسخهای متفاوتی را نسبت به تنشهای غیر زیستی از جمله شوری و خشکی ایجاد می‌کند. به عنوان مثال می‌توان به عدم تغییر فلورسانس کاروفیل و نیز تغییر کاهشی در فعالیت بعضی آنزیمهای آنتی اکسیدانت اشاره کرد. با توجه به منشأ طبیعی شالکون و تخریب پذیری آن در محیط زیست، می توان با مطالعات بیشتر امکان استفاده از این ترکیب را جهت از بین بردن علف‌های هرز در مزرعه قبل از کشت گیاهان زراعی بررسی نمود. امروزه مطالعات صورت گرفته در خصوص ساز و کارهای بیوشیمیایی، مولکولی و فیزیولوژیک پدیده نازیستی در حال گسترش است و هدف نهایی این مطالعات بررسی به کارگیری ترکیبات آللوکمیکال در دفع آفات و علف‌های هرز و جایگزین نمودن آنها با آفتکش‌های مصنوعی است.

منابع:

اسفندیاری، ع. (۱۳۸۹). اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال بر توان دفاعی سلول با افزایش سن برگ در گندم. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی، ٤: ۲۲۷-۲۱۹.

حسین زاده، م.، کیارستمی، خ.، ایلخانی زاده، م. و صبورا، ع. (۱۳۸۸). بررسی اثرات ترکیبات آللوپاتیک جو خودرو بر میزان پروتئین‌ها، کربوهیدارت‌ها و فعالیت برخی از آنزیم‌های گندم. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۲: ٤۰٦-۳۹۲.

Aebi, H.E. (1983). Catalase methods of enzymatic activity.Verleg Chem, LC., Deerfield Beach, Florida. Pp. 273-286.

Ahmad, P., Sarwat, M. and Umar, S. (2008). Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L.under salt stress. International Journal of Plant Production 2: 4-6.

Arora, V., Arora, P. and Lamba, H.S. (2012). Synthesis and evalution of chalcone derivatives of 2-acetyl naphthalene for antifungal and antibacterial activity. Scholars Research Library, 4:554-557.

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.

Bitencoutr, H.R., Santos, L.S. and Souza Filho, A.P.S. (2007). Allelopathic activity of synthetic chalcone precursors and of related cetones and aldehydes. Planta daninha 25:747-753.

Díaz-Tielas, C.; Sotelo Pérez, T., Graña, E., Reigosa, M. J. Sánchez-Moreiras, A. M. (2014). Phytotoxic Potential of Trans-chalcone on Crop Plants and Model Species. Journal of Plant Growth Regulation 33: 181- 194.

Farnham, D. (2003). Corn Perspective and Culture. American Association of Cerial Chemicals 2:1-33.

Hijova, E. (2006). Bioavailability of chalcones. Bratisl Lek Listy 107:80-84.

Hu, Q.H. (1985). Wffects of coumarin on some physiological process in boron-deficient plants. Plant Communications 6:25-26.

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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]

Mostafaie, A. (2003). Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. Yadavaran Press, Tehran.
Penner, D. and Aston, F.M. (1969). Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. Ploant Physiology 42: 791-796.
Raymond, J., Rekariyathem N. and Azanza, J.L. (1993). Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seed. Phytochemistry 34: 927-931.
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.
Sampietro, Diego A, Catalan, Cesar AN, &Vattuone, Marta A. (2009).Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. CRC Press. London.
Schägger, 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.
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.
Vierling, E. and Kimpel, J.A. (1992). Plant responses to environmental stress. Journal of Current Opinion in Biotechniligy 3: 164-170.
Wise, R.R. and Naylor, A.W. (1989). Chilling enhanced photo-oxidation, the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiology 83:278-282.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.9.1]