

تأثیر ترکیب دگرآسیب گزانتوتوکسین بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کاهو



سید مهدی رضوی*، زینب قربانی و هادی حسین زاده شاهماربیلگو

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

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۵

چکیده

در این پژوهش اثر ترکیب دگر آسیب گزانتوتوکسین بر روی گیاه مدل کاهو (*Lactuca sativa*) بررسی گردید. به این منظور ابتدا تأثیر غلظت‌های مختلف گزانتوتوکسین بر جوانه زنی دانه گیاه، به منظور تعیین غلظت بهینه برای آزمایش‌های تکمیلی بررسی شده و غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین انتخاب شدند. در مرحله بعد گیاهچه‌های تولید شده به گلخانه منتقل و با محلول غذایی هوگلند حاوی گزانتوتوکسین با غلظت‌های مذکور آبیاری شدند و بعد از رسیدن گیاه به مرحله بلوغ (هفت برگی)، تأثیر تیمار گزانتوتوکسین بر روی جنبه‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که جوانه زنی بذرهای کاهو تحت تیمار گزانتوتوکسین کاهش معنی دار داشت. گزانتوتوکسین تأثیر منفی بر رشد ریشه و اندام هوایی و همچنین وزن تر و خشک گیاه داشت. محتوی کلروفیل و میزان پروتئین محلول گیاه نیز به طور معناداری کاهش داشت اما در فلورسانس کلروفیل تغییر معناداری دیده نشد. از طرف دیگر، در اندام هوایی گیاه فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه کاهو نظیر آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و نیز آنزیم پروتئاز با افزایش غلظت گزانتوتوکسین در محیط کشت گیاه افزایش یافت. الگوی الکتروفورز پروتئین‌های گیاه تحت تیمار این ماده با حذف شدن و کم رنگ شدن برخی از باندها که اساساً وزن مولکولی بیشتر از ۲۵ کیلودالتون دارند، تغییر کرده است. در مجموع این پژوهش نشان داد که گزانتوتوکسین به عنوان یک اثر دگر آسیب از دیدگاه فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تأثیر محسوسی بر گیاه کاهو دارد.

واژه‌های کلیدی: گزانتوتوکسین، دگر آسیبی، الکتروفورز پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۵۳۳۵۱۴۷۰۲، پست الکترونیکی: razavi694@gmail.com

مقدمه

ترکیبات دگرآسیب، ترکیباتی از متابولیت‌های ثانویه گیاه است که رشد و گسترش سیستم‌های زیستی و زراعی دیگر را تحت تأثیر قرارداده و مهار می‌کنند (۱۶ و ۱۵). گزانتوتوکسین ترکیبی از دسته ترکیبات فنلی و از گروه فرانوکومارین‌ها (Coumarins) است که در برخی اعضای تیره چتریان و تیره سداب از مسیر متابولیسمی شیکمات ساخته می‌شوند (۱۸). این متابولیت ثانویه با فرمول مولکولی $C_{12}H_8O_4$ و با نام تجاری متوکسی پسرالن، برای

امروزه استفاده بی‌رویه از علف‌کش‌ها و سموم شیمیایی در کشاورزی، باعث بروز مشکلات زیست محیطی بسیاری نظیر آلودگی منابع آب‌های زیر زمینی، کاهش کیفیت خاک و در نهایت ورود ناخواسته مواد شیمیایی مضر به زنجیره غذایی شده است. یکی از راه‌های کاهش آلودگی چه در بحث غذا و چه در بحث محیط زیست طراحی علف‌کش‌ها و سموم ضد آفت ارگانیک از طریق به کارگیری ترکیبات دگرآسیب (Allochemicals) می‌باشد. منظور از

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 میلی‌متری اندازه‌گیری شد.

کشت گلخانه ای و تیمار گیاه: دانه‌رست‌های گروه شاهد و تیمار شده با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین، به درون گلدان‌های حاوی پیت که قبلاً استریل شده بودند، منتقل شد و در ژرمیناتور با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۸۰ درصد به مدت ۳۲ روز رشد داده شدند. گیاهان گروه شاهد با محلول غذایی هوگلند ۴۰ درصد و گیاهان گروه‌های تیمار با هوگلند ۴۰ درصد حاوی ۱ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین، روزانه به مقدار ۱۰ میلی لیتر برای هر گلدان آبیاری گردیدند. گیاهان تا رسیدن به مرحله هفت برگی (۳۲ روز در این پژوهش) رشد یافته و سپس برداشت شدند.

اندازه‌گیری 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 سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک و توزین شدند. ریشه‌های هر گلدان نیز با دقت خارج و پس از شستشو وزن تر ریشه تعیین شد و وزن خشک نیز بعد از خشک شدن در درون آون اندازه‌گیری گردید.

سنجش محتوی و فلورسانس کلروفیل: مقدار کلروفیل دانه‌رست‌ها بر اساس واحد نسبی (SPAD) با دستگاه کلروفیل متر از بخش مابین رگبرگ اصلی و حاشیه برگ‌های سوم و چهارم اندازه‌گیری شد. برای سنجش فلورسانس کلروفیل پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن اندام هوایی دانه رست‌ها در تاریکی به وسیله گیره‌های مخصوص دستگاه فلوریمتر Hansatech مدل PEA ساخت انگلستان با شدت نور ۳۵۰۰ لوکس، از محل میانه برگ اندازه‌گیری گردید. صفات مورد ارزیابی شامل F_0 : (فلورسانس کمینه)،

درمان برخی از بیماری‌های پوستی انسان نیز تجویز می‌شود. بررسی‌ها نشان داده که این ترکیب همانند بسیاری از ترکیبات فنلی اثر دگر آسیمی بر گیاهانی همچون ذرت، آرابیدوپسیس تالیانا، کلزا و حتی علف‌های هرز دارد (۱۴ و ۲۰). اما تاکنون مکانیسم این اثرات مهاری مورد مطالعه قرار نگرفته است. هدف و انگیزه این پژوهش بررسی تاثیرات گزانتوتوکسین از دیدگاه بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بر روی گیاه کاهو که گیاه مدل برای تحقیقات دگر آسیمی است می‌باشد. شناخت اثرات این نوع ترکیبات می‌تواند راهگشای استفاده از ترکیبات دگر آسیب برای دفع علف‌های هرز و ساخت علف‌کش‌های با منشا طبیعی گردد (۱۸).

مواد و روشها

تعیین غلظت بهینه گزانتوتوکسین جهت تداوم تیمار: جهت بررسی جوانه زنی، غلظت‌های مختلفی از ماده گزانتوتوکسین (LOBA- chemie, 06435) شامل غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، با حل کردن آن در چند قطره استن و رقیق سازی با آب مقطر تهیه شد. بذرها کاهو (رقم سیاهو) در پنج تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت تیمار این غلظت‌ها قرار گرفتند. ابتدا بذرها جهت ضد عفونی شدن به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلراید یک درصد قرار داده شده و پس از شستشو با آب مقطر در پتری‌های دارای کاغذ صافی واتمن که قبلاً در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده بودند، قرار گرفتند. در داخل هر پتری ۲۵ بذر قرار داده شده و ۱۰ میلی لیتر از محلول‌های تهیه شده برای هر پتری ریخته شد و پتری‌ها در آنکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. لازم به ذکر است که برای هر غلظت از ماده گزانتوتوکسین ۵ پتری و برای گروه شاهد نیز (که محلولش حاوی آب مقطر و چند قطره استون بود) ۵ پتری در نظر گرفته شد. شمارش بذرها جوانه زده روزانه و تا یک هفته انجام گرفت. در

FM: (فلورسانس بیشینه) و Fv/Fm: (کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II) بودند (۸).

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌ها: برگ گیاه در داخل هاون چینی قرار داده شد، مقداری ازت مایع روی آن ریخته و تا حد پودر شدن کوبیده شد. سپس ۰/۱ میلی‌گرم از برگ همگن‌شده به میکروتیوپ‌های دو میلی‌لیتری انتقال و یک میلی‌لیتر بافر فسفات با قدرت یونی ۰/۱ مولار و $\text{pH}=7/4$ به آن اضافه شد و بلافاصله در داخل حمام یخ قرار داده شدند. میکروتیوپ‌ها توسط سانتریفیوژ یخچالدار با سرعت 16000g در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور آن‌ها جدا و از این نمونه‌ها جهت تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد (۲).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با $\text{pH}=6/5$ و ۰/۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر اسید آسکوربیک ۵ میلی‌مولار در حمام یخ مخلوط گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر بعد از ۱۲۰ ثانیه (زمان واکنش) ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید (۲).

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز: ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=6/8$ و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالال ۰/۰۲ مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای ۴۰ درجه سلسیوس اضافه شد و تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه شد (۲).

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز: ۲ میلی‌لیتر کازئین هیدرولیز شده یک درصد وزنی حجمی با $\text{pH}=6$ و ۰/۴ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بر روی صفحه حرارتی نگهداری و سپس برای توقف واکنش به آن ۰/۴ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۴۰ درصد اضافه و جذب در ۲۸۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای (کازئین) تبدیل شده در ثانیه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید (۲).

سنجش فعالیت ویژه کاتالاز: برای سنجش فعالیت مخصوص آنزیم کاتالاز از آب اکسیژنه ۳ درصد به عنوان سوبسترا استفاده شد. ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار که دارای $\text{pH}=6/5$ بود مخلوط و سپس ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به این مجموعه اضافه شد (تمامی این مراحل در داخل حمام یخ صورت گرفت). تغییرات جذب محلول بلافاصله در طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید (۲).

سنجش پروتئین محلول کل: ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره پروتئینی با پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. غلظت پروتئین کل با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با سرم آلبومین گاوی، محاسبه شد (۷).

استخراج عصاره پروتئینی برای الکتروفورز: برای استخراج، ۰/۷ گرم نمونه برگ با چند قطره ازت مایع و ۲/۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (پنج میلی‌لیتر تریس-اسیدکلریدریک ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/5$ ، ۲۰۰ میکرولیتر Na_2EDTA یک مولار و ۳۳ میکرولیتر مرکاپتواتانول ۰/۰۴ درصد با حجم نهایی صد میلی‌لیتر) هموژن شد. سپس نمونه به درون میکروتیوپ منتقل و در سرعت 12000g با

معنی دار بودن داده‌های حاصل با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اثر گزانتوتوکسین بر میزان جوانه زنی، رشد ریشه‌چه و رشد ساقه‌چه در تمامی غلظت‌ها در سطح احتمال ۵ درصد کاهش معنی داری داشته به طوری که میزان جوانه‌زنی در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم نسبت به گروه شاهد، به ترتیب در حدود ۱۲، ۲۵، ۴۵، ۷۵ و ۱۰۰ درصد کاهش داشته است (جدول ۱). با توجه به نتایج جوانه زنی در غلظت‌های متفاوت، غلظت ۱ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین به عنوان غلظت بهینه انتخاب شدند. میزان طول ریشه‌چه برای غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب در حدود ۹۱ و ۴۸ درصد نسبت به گروه شاهد و رشد ساقه‌چه به ترتیب در حدود ۳۱ و ۸ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار داشت (جدول ۲). با توجه به نتایج به دست آمده از رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه کاهو تحت تیمار گزانتوتوکسین می‌توان نتیجه گرفت که این ماده مهارکننده شدید ریشه‌زایی است.

دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشناور حاصل دوباره با سرعت ۱۰۰۰g و دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و روشناور حاصل از این مرحله برای تهیه نمونه مورد استفاده در الکتروفورز به کار گرفته شد (۱۳).

روش الکتروفورز: برای آماده سازی نمونه در SDS-PAGE، یک حجم بافر نمونه و چهار حجم عصاره‌ی پروتئینی مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. تا تحت این شرایط پروتئین‌ها تحت اثر SDS و ماده احیا کننده کاملاً واسرشته شده و همچنین بار الکتریکی یک نواختی بگیرند. غلظت ژل اکریل آمید پایین (جداکننده) و بالا (متراکم کننده) به ترتیب ۱۰ و ۵ درصد بود. سرم آلبومین گاوی و کازئین به عنوان مارکر استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۱۰ ولت و جریان ۳۲ میلی‌آمپر آغاز شد و تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل پایین ادامه یافت. عمل رنگ آمیزی ژل پایین با به کار بردن محلول رنگ آمیزی حاوی کوماسی آبی R-۲۵۰ با غلظت ۰/۱ درصد به مدت ۲ ساعت انجام شد و سپس ژل با استفاده از محلول رنگ‌بر (۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به مدت ۶ ساعت، رنگ بری گردید. (۱۷ و ۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۵ تکرار انجام شد و تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و

جدول ۱- میزان جوانه زنی بذر گیاه کاهو تحت تیمار غلظت‌های مختلف گزانتوتوکسین

۰	۰/۱	۱	۱۰	۱۰۰	۱۰۰۰	غلظت گزانتوتوکسین (میکروگرم بر میلی لیتر)
۲۴±۰/۳ ^a	۲۱±۰/۶ ^b	۱۹±۰ ^c	۱۵±۰/۳ ^d	۷±۰ ^e	۰ ^f	تعداد بذر جوانه زده

در هر ردیف تفاوت بین داده‌ها که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، از نظر آماری معنی دار نبوده است ($p \leq 0.5$).

که این کاهش در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر بود. به طوری که در تیمارهای ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین وزن تر ریشه نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۷۶/۵۵٪ و ۸۴/۷۸٪ وزن تر اندام هوایی نسبت به

نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که علاوه بر اثر گزانتوتوکسین بر میزان وزن تر ریشه و اندام هوایی، وزن خشک ریشه و اندام هوایی نیز در غلظت ۰/۱ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار دارد

گروه شاهد به ترتیب ۱۶/۵۰٪ و ۴۷/۱۶٪، وزن خشک ریشه نسبت به گروه شاهد ۶۳/۶۳٪ و ۸۷/۲۷٪ و وزن خشک اندام هوایی نسبت به گروه شاهد ۱۵/۹۳٪ و ۵۱/۰۹٪ کاهش یافت (جدول ۲).

گرم برمیلی لیتر گزانتوتوکسین نسبت به گروه شاهد در سطح احتمال ۵ درصد با ۲۵/۹۷٪ و ۴۱/۹۸٪ کاهش معنی دار همراه بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان داد که تغییرات این پارامتر از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنا دار نبود (جدول ۲).

میزان پروتئین محلول کل در اندام هوایی در تیمار ۱ میکروگرم برمیلی لیتر در حدود ۷۵/۷۶٪ کاهش داشته است که این کاهش می تواند در پاسخ به استرس ایجاد شده توسط ماده گزانتوتوکسین باشد (جدول ۲).

داده‌های حاصل از آنالیز داده‌های محتوی کلروفیل نشان داد که محتوی کلروفیل، تحت تاثیر غلظت ۰/۱ و ۱ میکرو

جدول ۲- تغییرات صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و رشد گیاه کاهو تحت تیمار غلظتهای مختلف گزانتوتوکسین

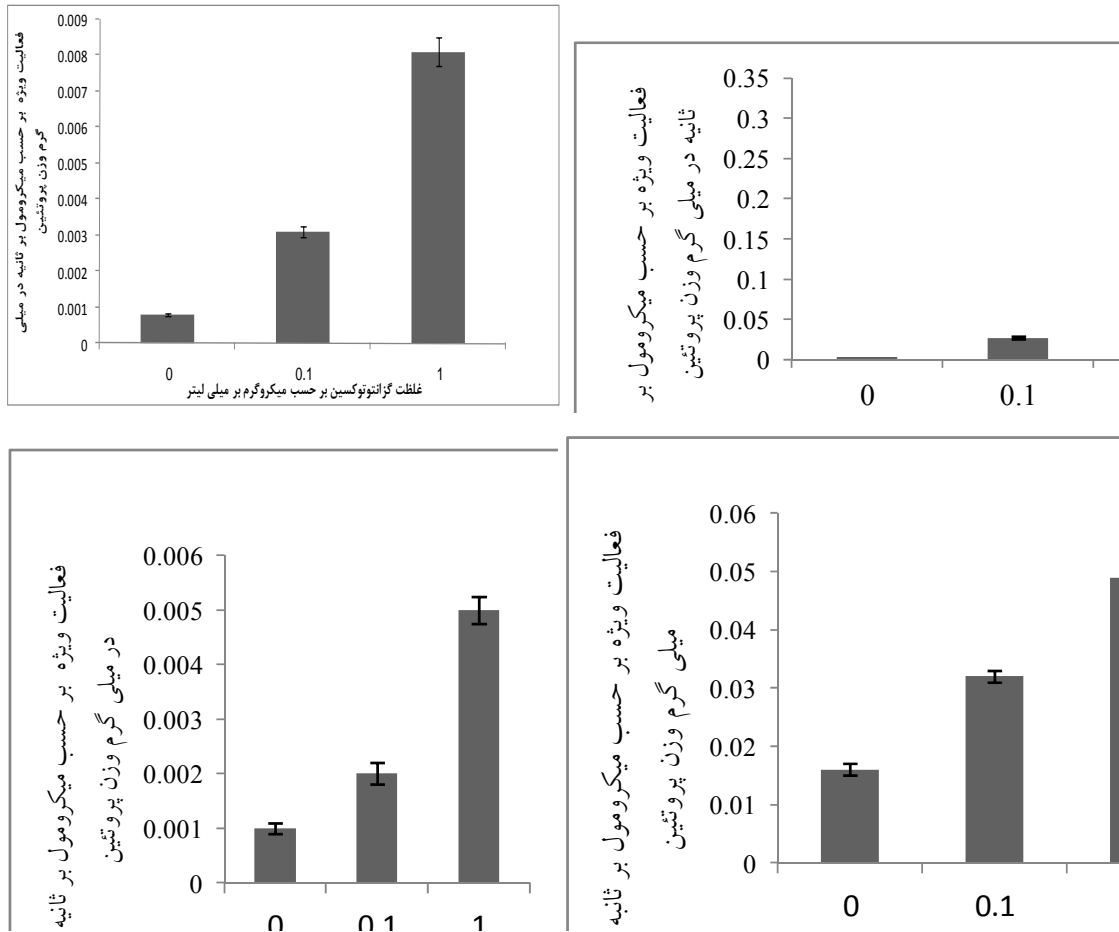
۰	۰/۱	۱	غلظت گزانتوتوکسین (میکروگرم بر میلی لیتر)
			صفات مورد سنجش
۱/۳۹±۰/۱۱ ^a	۰/۷۲±۰/۰۵ ^b	۰/۱۳±۰/۰۶ ^c	طول ریشه چه (سانتی متر)
۱/۳±۰/۲۵ ^a	۱/۲±۰/۲۰ ^a	۰/۹±۰/۱۲ ^b	طول ساقه چه (سانتی متر)
۲/۱۲±۰/۳۱ ^a	۱/۷۷±۰/۱۳ ^b	۱/۱۲±۰/۰۹ ^c	وزن تر اندام هوایی (گرم)
۱/۱۲±۰/۰۲ ^a	۱/۵۳±۰/۰۶ ^b	۰/۸۹±۰/۰۷ ^c	وزن خشک اندام هوایی (گرم)
۰/۵۲±۰/۰۳ ^a	۰/۲۳±۰/۰۳ ^b	۰/۱۱±۰/۰۲ ^c	وزن تر ریشه (گرم)
۰/۳۳±۰/۰۴ ^a	۰/۱۲±۰/۰۲ ^b	۰/۰۴۲±۰/۰۱ ^c	وزن خشک ریشه (گرم)
۸/۱±۱/۲ ^a	۶±۱/۰ ^c	۴/۷±۰/۷ ^c	کلروفیل با واحد نسبی
۰/۸۴±۰/۰۹ ^a	۰/۸۴±۰/۰۸ ^a	۰/۸۲±۰/۰۶ ^a	کارایی فوتوشیمیایی فتوسیستم II
۲۵۶۰±۲۳ ^a	۲۵۵۰±۱۱ ^a	۲۵۰۰±۲۱ ^a	فلورسانس کمینه (میکرومول بر مترمربع در ثانیه)
۲۰۰۰±۱۰ ^a	۲۰۳۰±۱۴ ^a	۲۰۱۰±۱۸ ^a	فلورسانس بیشینه (میکرومول بر مترمربع در ثانیه)
۰۰/۸۷±۰/۱۲ ^a	۰/۲۶±۰/۰۵ ^b	۰/۱۹±۰/۰۴ ^b	مقدار پروتئین کل (میلی گرم بر میلی لیتر)

در هر ردیف تفاوت بین داده ها که با حروف یکسان مشخص شده اند، از نظر آماری معنی دار نبوده است ($p \leq 0.5$).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی نشان داد که فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاهو نظیر کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز با افزایش غلظت گزانتوتوکسین افزایش معنی داری در سطح احتمال ۵٪ داشته است. همچنین فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز نیز با افزایش غلظت گزانتو توکسین، افزایش داشته است (شکل ۱).

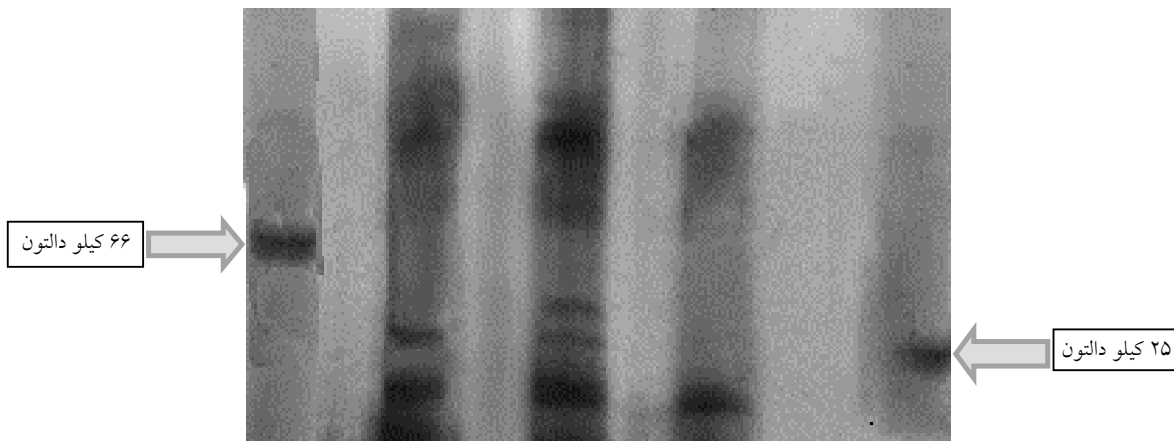
شاهد نشان داد که تغییرات کمی و کیفی معنی دار در باندهای پروتئینی که اساساً وزن مولکولی بالاتر از ۲۵ و پایین تر از ۶۶ کیلودالتون دارند قابل مشاهده است (شکل ۲). حذف برخی از باندها در گروه تیمار نشان دهنده تاثیر بازدارنده ماده گزانتوتوکسین در بیوسنتز پروتئین می باشد. این تاثیر در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین شدیدتر از غلظت ۰/۱ می باشد.

الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مربوط به برگ‌های گیاه کاهوی تیمار شده با گزانتوتوکسین و مقایسه آن با نمونه



شکل ۱- تاثیر غلظت گزانتوتوکسین بر فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز (بالا-راست) آسکورویات پراکسیداز بالا-چپ)، کاتالاز (پائین-راست) و پروتئاز (پائین-چپ)

کازئین (مارکر) تیمار ۱ شاهد تیمار ۰/۱ سرم آلبومین (مارکر)



شکل ۲- الگوی الکتروفورز پروتئین های گیاه تحت تیمار گزانتوتوکسین. کازئین و سرم آلبومین گاوی به ترتیب با وزن مولکولی ۲۵ و ۶۶ کیلو دالتون به عنوان مارکرمورد استفاده بوده است..

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی منابع نشان داد که اثرات آللوپاتیک ترکیب گزانتوتوکسین قبلاً مورد بررسی قرار گرفته است. خصوصاً ثابت شده است که این ماده جوانه زنی بذر کاهو را همانند برخی دیگر از ترکیبات فرانوگومارینی مهار می‌نماید (۱۱ و ۲۰). در پژوهش حاضر نیز اثرات گزانتوتوکسین بر کاهش معنی‌داری جوانه زنی بذر کاهو مورد تأکید قرار گرفت. کاهش جوانه زنی بذر ممکن است احتمالاً به دلایل احتمالی همچون کاهش تقسیمات میتوزی در مریستم ریشه، کاهش فعالیت آنزیم‌ها و اختلال در جذب یون‌های معدنی در حضور ماده آللوکیمیکال باشد. از طرف دیگر، مشاهده شد که ماده گزانتوتوکسین به طور معنی‌دار مانع ریشه‌زایی بذرهای کاهو می‌شود که این نیز احتمالاً به دلیل کاهش سنتز پروتئین می‌باشد. کاهشی که در نتایج بدست آمده در پژوهش اخیر کاملاً مشخص و در حد ۸۰٪ بود. البته در این خصوص مهار ریشه‌زایی عوامل دیگری نیز از جمله اتصال ترکیب به DNA و ممانعت از تکثیر آن پیشنهاد شده است (۱۱). همچنین مطالعات صورت گرفته در خصوص بررسی ترکیب پاراکوماریک اسید بر رشد طولی ریشه چه گیاه کلزا نشان داد که این ترکیب که ساختار نزدیکی به فرانوگومارین‌ها دارد سبب تنش اکسیداتیو می‌شود که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن است و این رادیکال‌ها با تخریب ماکرومولکول‌ها سبب صدمه به غشاهای سلولی شده و از رشد ریشه ممانعت می‌کنند. شاید اثر مهاری گزانتوتوکسین بر رشد ریشه نیز با این سازوکار قابل توجیه باشد (۱۶). برخی منابع حتی کاهش رشد ریشه را مکانیزم فراری برای ممانعت از جذب ترکیبات آللوپاتیک معرفی کرده‌اند (۱۹ و ۲۰).

یکی دیگر از احتمالات پیشنهادی در مورد توقف رشد دانه رست‌ها طی تنش دگرآسیبی تغییر نرخ تنفس میتوکندریایی است که باعث کاهش تولید ATP می‌شود. قبلاً ثابت شده که کوماریل موجود در عصاره اکالیپتوس که به نوعی از پیش

سازهای فرانوگومارین‌ها از جمله گزانتوتوکسین می‌باشد، نرخ تنفس میتوکندریایی را در پیاز کاهش داده است. کاهش تولید ATP می‌تواند باعث تغییر در سایر فرایندهایی سلولی از جمله جذب یون‌ها و رشد که مراحل پرمصرفی از نظر انرژی هستند گردد. کاهش رشد گیاه در حضور ترکیبات آللوپاتیک باتوقف شدید میتوز در سلول‌های مریستمی ریشه چه و ساقه چه همراه می‌شود و در نتیجه طول ریشه و ساقه کاهش می‌یابد (۶).

یکی دیگر از اثرات ماده گزانتوتوکسین کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه کاهو نسبت به گروه شاهد است که احتمالاً از طریق اثر مواد دگرآسیب‌رکاهش جذب کاهو جذب یون‌های معدنی و مواد غذایی شده توسط ریشه و در نهایت کاهش وزن تر و خشک گیاهچه باشد و یا اینکه این کاهش به دلیل تقلیل میزان پروتئین در گیاه می‌باشد (۹، ۱۰). این چنین کاهشی در وزن تر و خشک در گیاهان زراعی دیگر نیز از جمله گندم، به دنبال تاثیر متابولیت‌های ثانویه از عصاره‌های گیاهی مختلف مشاهده شده است (۳ و ۴).

از طرف دیگر، مطالعه حاضر نشان داد که گزانتوتوکسین منجر به کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل و کاهش توان فتوسنتزی کاهو شده است. این کاهش می‌تواند به دلیل تشدید فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز در شرایط تنش و یا به دلیل کاهش روند بیوسنتز کلروفیل باشد. مشخص شده است که در شرایط بروز تنش غلظت برخی مواد تنظیم‌کننده رشد از جمله آبسزیک اسید و اتیلن افزایش می‌یابد و این مواد موجب تحریک فعالیت کلروفیل‌لاز می‌شوند، قبلاً به اثبات رسیده است که کلروفیل‌لاز با جدا کردن فیتول از کلروفیل و جدا کردن منیزیم از کلروفیلید و تشکیل فنوفورید و در نهایت انهدام حلقه‌ی تتراپیرولی، موجب تجزیه کلروفیل می‌شود (۱۱). همچنین رایس ۱۹۷۴ در سال در مطالعات خود پیشنهاد کرد که مواد دگرآسیب تولید پیش‌پورفیرین در بیوسنتز کلروفیل را مهار می‌کند (۱۵).

کیفیت و کمیت باندهای پروتئین‌های گیاه کاهو کاهش یافته است. در غلظت ۱ میکرو گرم بر میلی لیتر از این ماده حذف برخی از باندها قابل مشاهده است. باندهایی که در مقایسه با مارکر، وزن مولکولی بالاتر از ۲۵ و پایین تر از ۶۶ کیلو دالتون دارند. دلیل توجهی برای کاهش این باندها، افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در نتیجه گزانتوتوکسین است. از طرف دیگر وجود باندهای تغییرنیافته در گروه تیمار و شاهد می‌تواند نشان دهنده‌ی مقاومت برخی پروتئین در برابر تاثیر گزانتوتوکسین باشد.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش گیاه کاهو به عنوان گیاه مدل در مطالعات آللوپاتی مورد استفاده قرار گرفت. که در این نتایج بدست آمده نشان داد که پاسخ گیاه کاهو به گزانتوتوکسین شباهت فراوان به پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی مثل شوری و خشکی داشته و تبعاً نوعی تنش محسوب می‌شود. در واقع این نوع تنش‌ها که نیز که اصطلاحاً تنش‌های آللوکیمیکال نامیده می‌شوند همانند سایر انواع تنش‌ها پاسخ‌های خاص فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی را در گیاهان بر می‌انگیزد. از جمله این پاسخها تشدید فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی نیز و آنزیم پروتئاز است. کاهش برخی باندها در الگوی الکتروفوریتیک پروتئینهای گیاه تیمار شده با گزانتوتوکسین شاید نتیجه افزایش فعالیت پروتئاز باشد.

با توجه به اینکه تاثیر گزانتوتوکسین تاثیر معنی دار بر فلورسانس کلروفیل گیاه کاهو نداشت می‌توان استنباط نمود که تنش دگرآسیبی گزانتوتوکسین بر روی ساختار کلروپلاست (ساختار تیلاکوئیدوفتوسیستم II) تاثیری نداشته است.

از طرف دیگر، نتایج حاصل از بررسی مقدار پروتئین تحت تیمار با گزانتوتوکسین کاهش معنی دار را نشان داد که این کاهش می‌تواند در نتیجه اثر ترکیبات فنولی بر کاهش روند به هم چسبیدن اسیدهای آمینه باشد که سبب کاهش تبدیل آنها به پروتئین شده و سنتز پروتئین را پایین بیاورند (۵). کاهش پروتئین در اثر افزایش ترکیبات فنولی در برخی تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش خشکی هم مشاهده شده است.

در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه کاهو تحت تیمار گزانتوتوکسین، افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز مشاهده شد که احتمالاً به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در رویارویی گیاه با تنش دگرآسیبی افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها صورت گرفته تا سبب کاهش آثار ترکیب فنولی شود. همین نوع افزایش را می‌توان در مورد آنزیم پروتئاز هم مشاهده کرد. افزایش آنزیم پروتئاز تحت تنش می‌تواند نشان دهنده‌ی تسریع فرآیند پیری باشد.

در توضیح نتایج به دست آمده از الکتروفورز پروتئینهای برگ می‌توان چنین ذکر کرد که با تیمار گزانتوتوکسین

منابع

- ۱- انتشاری، ش.، و اهرابی، ف. ۱۳۹۰. تاثیر کومارین بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱. مجله زیست‌شناسی گیاهی، جلد سوم، شماره ۱۰. صفحه ۲۲-۳۶.
- ۲- حسین زاده، م.، کیارستمی، خ.، ایلخانی زاده، م. و صبور، ع. ۱۳۸۸. بررسی اثرات ترکیبات آللوپاتیک جو خودرو بر میزان پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و فعالیت برخی از آنزیم‌های گندم. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد شماره ۲۲. صفحه ۳۹۲-۴۰۶.
- ۳- صفاخانی، ع.، و قوشچی، ف. ۱۳۹۳. تاثیر عصاره آبی و بقایای چند گونه علف هرز بر جوانه زنی و رشد گیاهچه گندم. مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۲۷، شماره ۱. صفحه ۱۰۹-۱۰۰.
- ۴- وفائی، م.، سیدنژاد، س.م.، گیلانی، ع.، صبور، ع. ۱۳۹۴. بررسی اثر آللوپاتی تفاله حاصل از روغن کشتی زیتون (*Olea europaea*) بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی گیاهچه سه رقم گندم (*Triticum aestivum* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۲۸، شماره ۲. صفحه ۴۵۸-۴۴۵.

- 5- Baziramakenga, R., Leroux, G.D., Simard, R.R. and Nadeau, P. 1997. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 75: 445-450
- 6- Bertin, C., Yang, X. and Weston, L.A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere plants oil, 256: 57-83
- 7- 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.
- 8- 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.
- 9- Lupini, A., Araniti, F., Sunseri, F. and Abenavoli, M. 2013. Gravitropic response induced by coumarin: Evidences of ROS distribution involvement. *Plant signaling & behavior*, 8: 1-4.
- 10- 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 & behavior*, 5: 1395-1400.
- 11- Macias, F.A., Galindo, J.C.G., Massanry, G.M., Rodriguez, F., Zubia, E. 1993. Allochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 1371-1379.
- 12- Mighany, F. 2003. Allelopathy from concept to application. *Partove Vaghe Press*. 54: 256-261
- 13- Mostafaie, A. 2003. Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. *Yadavaran Press, Tehran*.
- 14- Razavi, S.M. 2011. Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry*, 5: 86-90.
- 15- 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.
- 16- Sampietro, D. A., Catalan, A.N. and Vattuone, M. A. 2009. Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. *CRC Press, London*.
- 17- Schägger, H. and Vonjagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379.
- 18- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. *Plant physiology*. Sinauer Publication, Sunderland.
- 19- Ziaebrahimi, L. and Khavari-nejad, R.A. 2007. Effects of aqueous eucalyptus extracts on seed germination, seedling growth and activities of Peroxidase and Polyphenoloxidase in three wheat cultivar seedling. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 3415-3419.
- 20- Zobel, A.M. and Brown, S.A. 1995. Coumarins in the interactions between plants and its environment. *Allelopathy journal*, 2: 9-20.

Investigation on effects of Xanthotoxin as an allelochemical on some Physiological and biochemical aspects of Lettuce

Razavi S.M., Goorbani Z. and Hosseinzadeh shahmarbiglo H.

Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, I.R. of Iran

Abstract

In the present work, allelopathic effects of xanthotoxin on *Lactuca sativa*, as a model plant were investigated. After determination of optimal concentration of Xanthotoxin using seed germination assay as 0.1 and 1 $\mu\text{g/mL}$, the lettuce seeds were potted in greenhouse condition and watered with the xanthotoxin concentrations. A control group of plants were watered with distilled water. After seedling growth up to 7 leave stage, some physiological and biochemical parametres of plants were evaluated. The evaluated aspects contain dry and fresh weights of the plants shoots and roots, Spad chlorophyll, chlorophyll fluorescence, the activity of enzymes like Ascorbate peroxidase, Catalase, Poly phenol oxidase and Protease, and also Electrophoretic pattern of protein in acryl amid gel. The results showed that seed germination, dry and fresh weight, Spad chlorophyll, protein of the treated seedlings were significantly reduced than control group at $p \leq 0.05$. It was also found that the activity of ascorbate peroxidase, protease, poly phenyl oxidase and catalase enzymes increased in xanthotoxin treated plant than control one. There were remarkable changes in arrangement of electrophoresis bands of leaf protein between treated and control group which was due to the response of *Lactuca sativa* to existence of xanthotoxin. It was concluded that Xanthotoxin as an allelochemical can effects on plants in different physiological, molecular and biochemical aspects.

Key words: Xanthotoxin, Allelopathy, antioxidant enzymes, electrophoretic pattern