بررسی تاثیر عصاره الکلی اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulesis*) بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز و تخریب غشاهای سلولی گیاهچه توق (*Xantium strumarium*)

روزبه فرهودی

شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، گروه شناسایی و مبارزه با علف هرز

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۵

چکیده

به منظور بررسی تاثیر محلول پاشی عصاره متانولی اکالیپتوس بر رشد گیاهچه، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و ساکاروز سنتتاز گیاهچه توق آزمایش در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر در سال ۱۳۹۱ انجام شد. این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرار و ۶ تیمار شامل غلظت های عصاره متانولی برگ اکالیپتوس (۴، ۸، ۱۲، ۱۶و ۲۰ گرم بر لیتر) انجام شد. در تیمار شاهد محلول پاشی انجام نشد. نتایج نشان داد افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب کاهش وزن گیاهچه، غلظت کلروفیل، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز گیاهچه توق شد، اما غلظت مالون دی آلدهید بافت گیاهچه توق افزایش یافت. کمترین فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز (۲/۱۱ نانومول بر میلی گرم پروتیین در دقیقه)، کمترین وزن خشک گیاهچه (۲/۷۶ میلی گرم) و بیشترین میزان غلظت مالون دی آلدهید (۰/۸۷ نانومول بر گرم وزن تر) گیاهچه توق تحت تاثیر تیمار محلول پاشی با عصاره ۲۰ گرم بر لیتر اکالیپتوس مشاهده شد. نتایج بیانگر تاثیر منفی عصاره اکالیپتوس بر رشد، غلظت کلروفیل، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز گیاهچه توق است.

وازه های کلیدی: آللوپاتی، اکالیپتوس، آنزیم آنتی اکسیدان، توق، کلروفیل، مالون دی آلدهید

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۶۹۸۲۶۷۵، پست الکترونیکی: rfarhoudi@gmail.com

مقدمه

علفهای هرز مشکلات بسیاری چون کاهش عملکرد، کاهش کیفیت محصولات زراعی و افزایش هزینه های تولید را ایجاد می نمایند . امروزه استفاده از علف کش های شیمیایی جایگاه ویژه ای در کنترل علف های هرز دارد به طوری که در سال ۲۰۱۰ میلادی بیش از ۴۹ درصد سموم به کار رفته در بخش کشاورزی متعلق به علف کش ها بود (۱۶). در همین حال استفاده گسترده و وابستگی به علف‌کش‌های شیمیایی سبب بروز مشکلاتی نظیر مقاومت علف های هرز به علف‌کش‌ها و اثر سوء این ترکیبات شیمیایی برسلامتی انسان‌ها شده است. به همین منظور متخصصان به دنبال روش‌های جایگزین مانند استفاده از روش های بیولوژیک و زراعی برای کنترل علف‌های هرز وکاربرد محدودترو معقولانه تر علف‌کش‌ها می باشند.

استفاده از خاصیت آللوپاتی یا دگر آسیبی گیاهان یکی از راه های جایگزین سموم شیمیایی است که در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. اصطلاح دگرآسیبی می تواند به عنوان تداخلات شیمیایی بین گیاهان به وسیله رهاسازی ترکیبات شیمیایی در محیط تعریف شود. امروزه دگرآسیبی به صورت هرگونه پاسخ منفی یک گیاه نسبت به مواد شیمیایی تولید شده توسط گیاه دیگر تعریف می شود. این تعریف شامل مواد شیمیایی تولید شده توسط جلبکها، قارچها واکتینومیستها نیزمی شود (۱۳). روشهای

مختلفی برای ورود مواد دگرآسیب به محیط وجود دارد که عمده ترین آنها عبارتند از ترشح از ریشه ی زنده، آبشویی از روی برگ ها ،ساقه ها و میوه ها یا آزاد شدن گازهای سمی به اتمسفر. همچنین مواد شیمیایی ممکن است از طریق آبشویی ازسطح لاشبرگ ها یا آزادشدن از بافت های مرده ریشه نیز وارد خاک شوند (۴،۵). شناسایی مکانیزم های عمل مواد دگرآسِیب در گیاهان می تواند نقش مهمی در معرفی، تولید و استفاده از این مواد به صورت عملی داشته باشد. کاهش فتوسنتز، ایجاد تنش اکسیداتیو و تخریب غشاهای سلولی، تخریب رنگدانه های گیاهی و اختلال در عمل آنزیم های حیاتی از جمله اثرات ترکیبات آللوپاتیک می باشد (۱۲، ۱۶). محمدی و همکاران (۴) مشاهده نمودند عصاره برگ اکالیپتوس سبب کاهش جوانه زنی و رشد گیاهچه سورگوم و لوبیا شد. فرهودی و لی (۱۲) گزارش نمودند ترکیبات آللوپاتیک گلرنگ سبب تخریب غشا سلولی، کاهش فعالیت آنزیم آمیلاز و در نتیجه کاهش رشد گیاهچه خردل وحشی شد. زلقی و همکاران (۱) نیز کاهش رشد گیاهچه ارزن و سورگوم تحت تاثیر عصاره آللوپاتیک آفتابگردان را ناشی از تخریب غشا های سلولی و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گیاهچه های ارزن و سورگوم دانستند. بوهم و همکاران (۸) مشاهده نمودند ترکیبات آللوپاتیک موجب کاهش تقسیم میتوز و کاهش ارتفاع و وزن گیاهچه سویا شد و گلین (۱۴) کاهش فعالیت آنزیم های دخیل در سنتز ساکاروز در برگ برنج تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتی آکاسیا را گزارش نمود.

اکالیپتوس بیش از یکصد سال پیش به ایران وارد گردید و در جنوب کشور که محیط مناسبی برای آن بود کشت شده است. ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره برگ اکالیپتوس که عمدتا فنلی می باشند سبب توقف تقسیم سلولی، کند شدن روند فتوسنتز و تنفس، اختلال در عمل تنظیم کننده های رشد و فعالیتهای آنزیمی در سایر گیاهان می شوند که در نهایت به کاهش رشد گیاهان اطراف منجر می شود (۴). کاهش رشد گیاهچه گیاهان زراعی و علف های هرز تحت تاثیر عصاره اکالیپتوس گزارش شده است (۲، ۴، ۵). سخایی و همکاران (۲) مشاهده نمودند عصاره برگ اکالیپتوس سبب کاهش رشد گیاهچه گندم گردید که نشان دهنده توانایی دگرآسیبی اکالیپتوس است. توق (*Xanthium estrumarium*) گیاهی یکساله و یک پایه از خانواده Astraceae است که علف هرز مهم در مزارع گیاهانی مانند ذرت، حبوبات، سبزیجات، سویا و پنبه می باشد و دارای قابلیت انعطاف جهت ایجاد اکوتیپ ها و ژنوتیپ های جغرافیایی برای سازش در فصول مختلف یک ناحیه است. توانایی استثنایی تطابق چنین علف های هرزی با محیط های جدید آنها را قادر می سازد که تا در مکان های متنوعی گسترش یابند (۲۲). با توجه به پتانسیل دگر آسیبی گیاه اکالیپتوس این تحقیق به منظور بررسی اثرات دگرآسیب عصاره الکلی برگ اکالیپتوس بر رشد و فرایندهای فیزیولوژیک گیاهچه علف هرز توق انجام شد.

مواد و روشها

محل اجرا و طرح آزمایشی: این پژوهش در در آزمایشگاه تکنولوژی بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران در سال ۱۳۹۱ به منظور بررسی اثرات عصاره متانولی برگ اکالیپتوس بر رشد و فیزیولوژی گیاهچه علف هرز توق در ۶ تیمار و ۴ تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد.

روش تهیه عصاره و اندازه گیری صفات مورد آزمایش: تیمارهای این آزمایش عصاره متانولی برگ اکالیپتوس(*Eucalyptus camaldulesis*) با غلظت۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶و ۲۰ درصد بود. در تیمار شاهد محلول پاشی انجام نشد. جهت تهیه عصاره متانولی برگ اکالیپتوس، ابتدا برگ اکالیپتوس در تاریخ ۵ تیر ماه ۱۳۹۱ از محوطه باغ گیاهشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر جمع آوری و به مدت یک هفته در سایه خشک شد. یک لیتر الکل

متانول ۹۶ درصد به ۱۰۰ گرم پودر برگ خشک اکالیپتوس اضافه شد و بعد از ۲۴ ساعت محلول توسط کاغذ صافی صاف و عصاره اکالیپتوس به دست آمد. سپس غلظت های مورد نظر (۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ درصد) با افزودن ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی لیتر عصاره الکلی به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ساخته شد (۵).

جهت رشد توق (*Xantium strumarium L.*) هشت عدد بذر این گیاه در گلدان های پلاستیکی با قطر ۲۰ سانتی متر و ارتفاع ۳۰ سانتی متر حاوی ترکیب خاک رس و کود پوسیده حیوانی به نسبت سه به یک کاشته شدند. پس از استقرار گیاهچه ها تعداد آنها به چهارعدد گیاهچه در هر گلدان رسید. سه هفته پس از سبز شدن بذور توق، محلول پاشی آنها توسط عصاره های اکالیپتوس در سه نوبت (ساعت ۱۰ صبح) به فاصله یک روز در میان انجام شد. یک هفته پس از پایان آخرین محلول پاشی عصاره اکالیپتوس، برداشت گیاهچه های توق جهت بررسی صفات انجام شد.

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز، گوایکول پراکسیداز و گلاتیتیون ردکتاز و فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز: جهت بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان ابتدا پروتئین گیاهچه استخراج شد (۹). برای بررسی فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز، مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافرفسفات ۱۰میلی مولار، ۵ میلی لیتر گویاکول۸ میلی مولار ، سه میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۷۵ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر محلول پروتئینی استخراج شده، تهیه گردید. پس از اضافه کردن پراکسید هیدروژن بلافاصله میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل UV-1700 Shimadzu) به مدت ۶۰ ثانیه قرائت شد(۹). برای بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی استخراج شده از گیاهچه به سه میلی لیتر محلول ۵۰ میلی مولار بافر فسفات اضافه و سپس۳۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن نیز به مخلوط افزوده شد. در نهایت این مخلوط در کووت اسپکتو فتومتر ریخته شد و در طول موج ۲۴۰ نانومتر فعالیت آنزیمی بررسی شد (۹). جهت بررسی فعالیت آنزیم گلاتیتیون ردکتاز، ۸۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ میلی مولار بافر فسفات با ۱۰ میلی مول گلاتیتیون، ۳ میلی مول کلرید منیزیم، ۱ میلی مول NADPH و ۵۰ میکرو لیتر محلول پروتئینی استخراج شده از گیاهچه ترکیب و میزان جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۶ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار بررسی شد (۱۸). فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز به روش کونسه و گراویوس (۱۰) بررسی شد.

غلظت مالون دی آلدهید: به منظور تعیین غلظت مالون دی آلدهید گیاهچه توق، ابتدا ۰/۱گرم بافت گیاهچه توق را در محلول ۲۰ درصد تیوکلرو استیک اسید که حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید بود کاملا پودر کرده و آنگاه این مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در حمام بن ماری حرارت داده شد. سپس در حمام یخ سرد شد و غلظت مالون دی آلدئید در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری گردید (۱۹).

غلظت کلروفیل a و b: برای تعیین غلظت کلروفیل a و b برگ ابتدا نیم گرم برگ تازه توق با پنج میلی لیتر محلول استون ۸۰ درصد کوبیده و له شد. سپس نمونه ها توسط کاغذ صافی صاف شدند و حجم آن توسط استون به ۵۰ میلی لیتر رسید. محلول حاصله توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. به این منظور ابتدا دستگاه با استون صفر شده و میزان جذب محلول در طول موج ۶۶۳ نانومتر (کلروفیلa) و طول موج ۶۴۵ نانومتر(کلروفیلb) بررسی شد. بر اساس اعداد خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر غلظت کلروفیل بر اساس میکروگرم بر وزن تر برگ بیان شد (۶).

محاسبات آماری: محاسبات آماری داده های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام شد. برای مقایسهٔ میانگین ها از آزمون دانکن در سطح یک درصد

آماری و برای بررسی همبستگی بین داده ها از نرم افزار SPSS.16 استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمایش بیانگر تاثیر معنی دار محلول پاشی عصاره اکالیپتوس بر کلیه صفات مورد بررسی گیاهچه توق در سطح یک درصد آماری می باشد (جدول ۱).

جدول ۱ – تجزیه واریانس میانگین مربعات تاثیر محلول پاشی عصاره اکالیپتوس بر وزن گیاهچه و خصوصیات فیزیولوزیک گیاهچه توق

منبع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک گیاهچه	ارتفاع گیاهچه	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز	فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز	فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز	غلظت مالون دی آلدهید برگ	غلظت کلروفیل a	غلظت کلروفیل b
تکرار	۳	۱۱/۶ ns	۲/۷ ns	۰/۱۹ **	۰/۲۱ ns	۱/۰۲ **	۰/۱۶ ns	۰/۰۰۱ **	۰/۱۷ ns	۰/۰۲ ns
غلظت عصاره	۵	۱۰۱/۲ **	۱۵/۲ **	۰/۹۸ **	۱/۱۲ **	۱/۹۵ **	۱/۳۹ **	۰/۰۰۱۶ **	۱/۹۲ **	۰/۶۸ **
خطای آزمایش	۱۵	۱۵/۱	۲/۹	۰/۰۸	۰/۱۶	۰/۴۲	۰/۱۶	۰/۰۰۰۱ **	۰/۲۷	۰/۹ **

** و *: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال خطای آماری یک و پنج درصد ns: معنی دار نیست

وزن و طول گیاهچه: نتایج مقایسه میانگین نشان داد کاربرد عصاره اکالیپتوس سبب کاهش ارتفاع و وزن گیاهچه توق شد. بیشترین وزن خشک گیاهچه توق در تیمار شاهد به میزان ۴/۱۸ میلی گرم بر گیاهچه مشاهده شد. محلول پاشی عصاره ۴ درصد اکالیپتوس تاثیر معنی داری بر وزن خشک توق در مقایسه با شاهد نداشت اما کاربرد عصاره ۸ درصد اکالیپتوس وزن خشک گیاهچه توق را در مقایسه با شاهد کاهش داد (۳/۵۶ میلی گرم). افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس از ۸ الی ۲۰ درصد وزن خشک گیاهچه توق را به شدت کاهش داد، به طوری که کمترین وزن خشک گیاهچه توق تحت تاثیر محلول پاشی عصاره ۲۰ گرم بر لیتر اکالیپتوس به میزان ۲/۰۳ میلی گرم دیده شد (جدول ۲). طول گیاهچه توق نیز تحت تاثیر افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس کاهش یافت. بیشترین طول گیاهچه توق تحت تاثیر تیمار شاهد (۱۸/۳ میلی گرم) و عصاره ۴ درصد (۱۸/۷ میلی گرم) اکالیپتوس مشاهده گردید اما عصاره های ۸ و ۱۲ درصد اکالیپتوس طول گیاهچه توق را در مقایسه با شاهد کاهش معنی داری داد. کمترین طول گیاهچه توق در تیمارهای ۱۶ و ۲۰ درصد اکالیپتوس به میزان ۹/۶ و ۸/۹ سانتی متر دیده شد (جدول۱).

جدول ۲– بررسی تاثیر محلول پاشی عصاره اکالیپتوس بر رشد گیاهچه و خصوصیات فیزیولوژیک گیاهچه توق

غلظت عصاره (درصد)	وزن خشک گیاهچه (میلی گرم)	طول گیاهچه (سانتی متر)	فعایت آنزیم ساکاروز سنتتاز (نانومول بر میلی گرم پروتیین در دقیقه)	غلظت کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	غلظت کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	غلظت مالون دی آلدهید (نانومول بر گرم وزن تر)
۰	۴/۱۸ a	۱۸/۳ a	۳/۸۶ a	۱/۲۲ a	۰/۹۷ a	۰/۰۲۶ e
۴	۳/۹۳ ab	۱۸/۷ a	۳/۵۷ b	۱/۱۴ ab	۰/۹۴ a	۰/۰۳۳ e
۸	۳/۵۶ b	۱۵/۲ b	۲/۹۶ c	۰/۹۸ b	۰/۹۵ a	۰/۲۹ d
۱۲	۳/۰۹ c	۱۳/۶ c	۲/۵۲ d	۰/۸۲ c	۰/۸۷ ab	۰/۶۵ c
۱۶	۲/۷۶ d	۹/۶ d	۲/۱۱ e	۰/۷۴ d	۰/۸۲ b	۰/۷۸b
۲۰	۲/۰۳ e	۸/۹ d	۲/۰۵ e	۰/۷۳ d	۰/۷۵ c	۰/۹۲ a

در هر ستون اعدادی که حروف مشترک دارنددر سطح اماری ۱ درصد تفاوت معنی داری ندارند

نتایج جدول ۳ نشان داد همبستگی مثبتی میان طول و وزن گیاهچه توق با فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان وجود دارد در حالیکه همبستگی منفی میان وزن گیاهچه توق و غلظت مالون دی آلدهید بیانگر تاثیر منفی تخریب غشاهای سلولی بر رشد گیاهچه است.

جدول ۳- همبستگی میان صفات مورد بررسی گیاهچه توق تحت تاثیر عصاره اکالیپتوس

	وزن گیاهچه	طول گیاهچه	فعایت آنزیم ساکاروز سنتتاز	غلظت کلروفیل a	غلظت کلروفیل b	فعالیت آنزیم پراکسیداز	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم گلاتیتیون ردکتاز	غلظت مالون دی آلدهید
وزن گیاهچه	۱								
طول گیاهچه	۰/۸۷**	۱							
فعایت آنزیم ساکاروز سنتتاز	۰/۹۱**	۰/۵۴*	۱						
غلظت کلروفیل a	۰/۸۹**	۰/۶۸*	۰/۱۸ns	۱					
غلظت کلروفیل b	۰/۷۱**	۰/۳۳ns	۰/۲۹ns	۰/۲۷ns	۱				
فعالیت آنزیم پراکسیداز	۰/۸۲**	۰/۸۶**	۰/۶۹*	۰/۹۱**	۰/۵۶*	۱			
فعالیت آنزیم کاتالاز	۰/۸۷**	۰/۷۹**	۰/۸۸**	۰/۸۴**	۰/۷۱**	۰/۱۶ns	۱		
فعالیت آنزیم گلاتیتیون ردکتاز	۰/۷۶**	۰/۷۸**	۰/۸۲**	۰/۹۱**	۰۰/۱۲ns	۰/۵۴*	۰/۳۱ns	۱	
غلظت مالون دی آلدهید	-۰/۸۸**	-۰/۷۷**	-۰/۹۴**	-۰/۷۶**	۰/۶۱*	-۰/۸۷**	-۰/۸۱**	-۰/۹۲**	۱

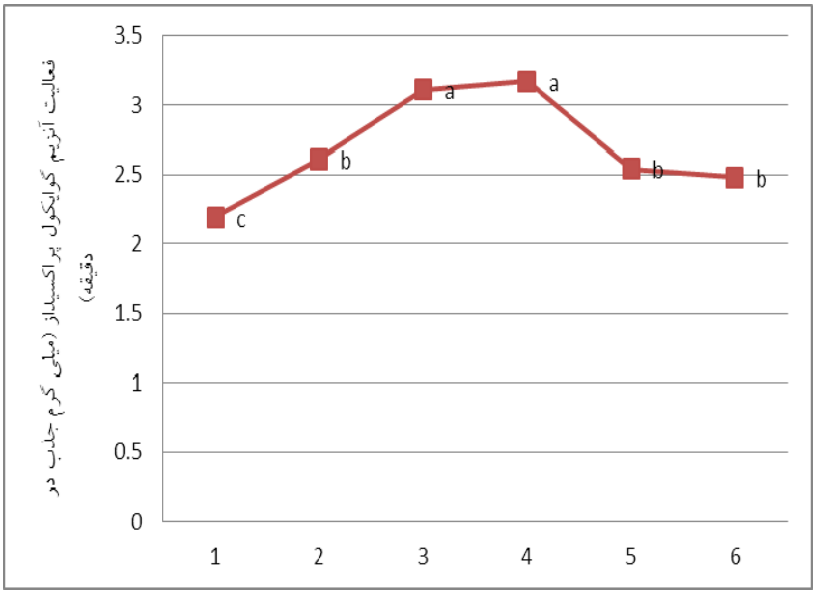
** و *: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال خطای آماری یک و پنج درصد ns: معنی دار نیست

غلظت کلروفیل: افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب کاهش غلظت کلروفیل a و b برگ توق شد(جدول ۲). محلول پاشی عصاره های ۴ ، ۸ و ۱۲ درصد اکالیپتوس تاثیر معنی دار بر غلظت کلروفیل b توق نداشت اما کاربرد عصاره ۱۶ و ۲۰ درصد اکالیپتوس غلظت کلروفیل b برگ توق را در مقایسه با شاهد کاهش داد (به ترتیب۰/۸۲ و ۰/۷۵ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ). تیمار شاهد و عصاره ۴ درصد اکالیپتوس تاثیری بر غلظت کلروفیل a برگ توق نداشت. افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس از ۸ الی ۲۰ گرم بر لیتر سبب کاهش شدید و معنی دار غلظت کلروفیل a شد و کمترین غلظت کلروفیل a تحت تاثیر تیمارهای ۱۶ و ۲۰ درصد عصاره اکالیتوس به میزان ۰/۷۴ و ۰/۷۳ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ مشاهده شد (جدول ۱). نتایج جدول ۳ نشان داد همبستگی مثبتی میان غلظت کلروفیل a و b برگ توق با وزن گیاهچه و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان وجود دارد در حالیکه همبستگی منفی میان غلظت کلروفیل و غلظت مالون دی آلدهید نشانگر تاثیر منفی تخریب غشاهای سلولی بر غلظت کلروفیل است.

فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز: افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب کاهش فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز گیاهچه توق شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد به میزان ۳/۸۶ نانومول بر میلی گرم پروتیین در دقیقه مشاهده شد. محلول پاشی گیاهچه توق با عصاره ۴ درصد اکالیپتوس سبب کاهش معنی دار فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز در مقایسه با شاهد شد (۳/۵۷ نانومول بر میلی گرم پروتیین در دقیقه). کمترین فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز تحت تاثیر تیمارهای ۱۶ و ۲۰ درصد اکالیپتوس به میزان ۲/۱۱ و ۲/۰۵ نانومول بر میلی گرم پروتیین در دقیقه دیده شد (جدول ۲). بین فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز با وزن و طول گیاهچه همبستگی مثبت و معنی داری دیده شد در حالیکه بین این صفت و غلظت مالون دی آلدهید همبستگی منفی مشاهده گردید(جدول ۳).

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان: نتایج آزمایش نشان داد فعالیت هر سه آنزیم کاتالاز، گوایکول پراکسیداز و گلاتیتیون ردکتاز در گیاهچه توق تحت تاثیر محلول پاشی عصاره اکالیپتوس قرار گرفت. همبستگی مثبت میان فعالیت آنزیم های کاتالاز، گوایکول پراکسیداز و گلاتیتیون ردکتاز با طول و وزن گیاهچه، غلظت کلروفیل و فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز بیانگر تاثیر مثبت این آنزیم ها بر رشد گیاهچه توق است (جدول ۳).

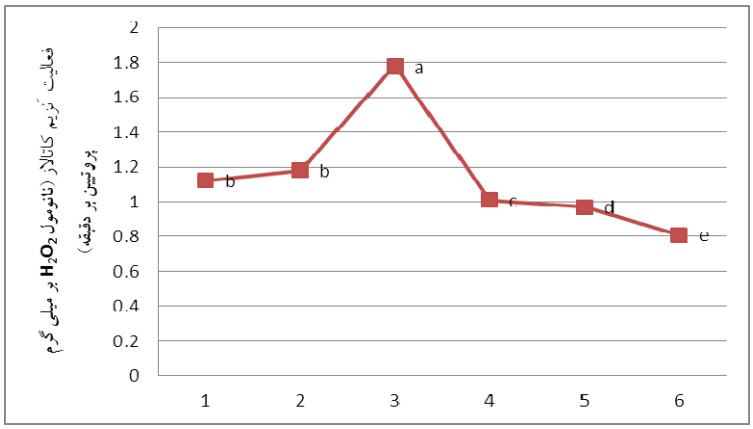
کاربرد عصاره ۴ درصد اکالیپتوس سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با شاهد شد (۲/۶۱ میلی گرم جذب در دقیقه) اما بیشترین فعالیت این آنزیم تحت تاثیر عصاره ۸ و ۱۲ درصد اکالیپتوس به میزان ۳/۱۱ و ۳/۱۷ میلی گرم جذب در دقیقه دیده شد. افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس به ۱۶ و ۲۰ درصد مجددا سبب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با سطوح عصاره ۸ و ۱۲ درصد عصاره اکالیپتوس شد(شکل ۱).



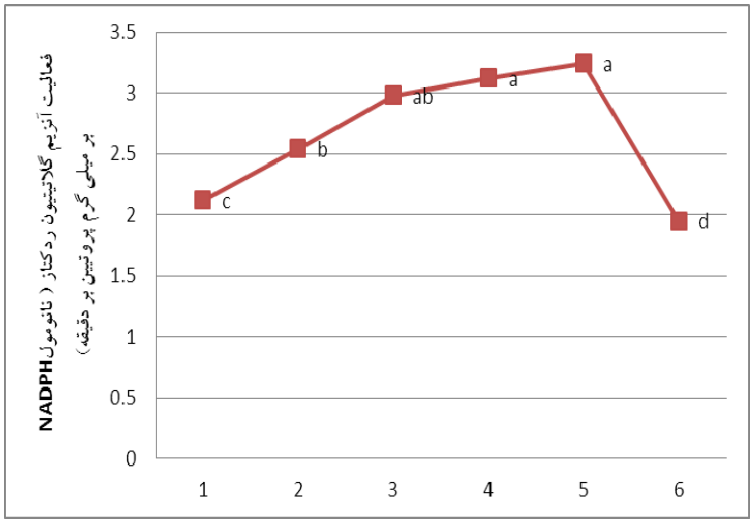
شکل ۱- تاثیر محلول پاشی عصاره اکالیپتوس بر فعالیت آنزیم گوایکول پراکسیداز گیاهچه توق. اعداد ۱تا ۶ بیانگر سطوح غلظت عصاره اکالیپتوس از ۰ تا ۲۰ درصد است.

فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه توق تحت تاثر عصاره ۸ درصد اکالیپتوس در مقایسه با شاهد و سایر سطوح عصاره اکالیپتوس افزایش یافت و به بیشترین میزان خود رسید (۱/۷۸ نانومول H_2O_2 بر میلی گرم پروتیین بر دقیقه). از سطح ۱۲ الی ۲۰ درصد عصاره اکالیپتوس روند کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد و سطح عصاره ۸ درصد عصاره اکالیپتوس مشاهده شد که احتمالا نشانگر حساسیت شدید فعالیت آنزیم کاتالاز به ترکیبات دگر آسیب می باشد. کمترین فعالیت این آنزیم به میزان ۰/۸۱ نانومول H_2O_2 بر میلی گرم پروتیین بر دقیقه تحت تاثیر عصاره ۲۰ درصد اکالیپتوس دیده شد(شکل ۲). فعالیت آنزیم گلاتیتیون ردکتاز گیاهچه توق تحت تاثیر افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس، ابتدا افزایش یافت و بیشترین فعالیت این انزیم تحت تاثیر عصاره های ۸ الی ۱۶ درصد اکالیپتوس دیده شد اما غلظت عصاره ۲۰ درصد اکالیپتوس سبب کاهش شدید فعالیت آنزیم گلاتیتیون ردکتاز گردید (۱/۹۵ نانومولNADPH بر میلی گرم پروتیین بر دقیقه) (شکل ۳). بین فعالیت هر سه آنزیم آنتی اکسیدان مورد بررسی با وزن گیاهچه توق همبستگی مثبت و معنی داری دیده شد (جدول ۳) در حالیکه بین فعالیت این آنزیم ها با غلظت مالون دی آلدهید همبستگی منفی مشاهده شد بنابراین کاهش فعالیت این آنزیم ها در غلظت های بالای

عصاره اکالیپتوس منجر به افزایش تخریب غشاهای سلولی و کاهش رشد گیاهچه توق شد (جدول۲).



شکل ۲- تاثیر محلول پاشی عصاره اکالیپتوس بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه توق. اعداد ۱تا ۶ بیانگر سطوح غلظت عصاره اکالیپتوس از ۰ تا ۲۰ درصد است.



شکل ۳- تاثیر محلول پاشی عصاره اکالیپتوس بر فعالیت آنزیم گلاتیتیون ردکتاز گیاهچه توق. اعداد ۱تا ۶ بیانگر سطوح غلظت عصاره اکالیپتوس از ۰ تا ۲۰ درصد است.

نتایج جدول ۲ نشان داد افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب تخریب غشاهای سلولی و افزایش غلظت مالون دی آلدهید گیاهچه توق شد. روند افزایش تخریب غشا سلولی توق از تیمار محلول پاشی گیاهچه توق با عصاره ۸ درصد اکالیپتوس آغاز شد و بیشترین غلظت مالون دی الدهید گیاهچه توق تحت تاثیر محلول پاشی عصاره ۲۰ درصد اکالیپتوس به ۰/۹۲ میزان نانومول بر گرم وزن تر گیاهچه دیده شد که نشانگر تخریب غشاهای سلولی است. با توجه به همبستگی منفی بین غلظت مالون دی آلدهید با رشد گیاهچه و غلظت کلروفیل a و b گیاهچه توق، کاهش رشد گیاهچه توق تحت تاثیر محلول پاشی اکالیپتوس قابل توجیه است (جدول۳).

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس، وزن خشک و طول گیاهچه توق در مقایسه با شرایط عدم محلول پاشی کاهش معنی داری یافت. این نتایج با تحقیقات محمدی و همکاران (۴) همخوانی دارد. ایشان مشاهده نمودند افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب کاهش رشد گیاهچه لوبیا و سورگوم شد. ترکیبات آللوپاتیک با تاثیر منفی بر تقسیم میتوز، فعالیت آنزیم های حیاتی و پایداری غشا سلولی سبب کاهش رشد گیاهچه سایر گیاهان می شوند (۱۶). نجفی آشتیانی و همکاران (۵) گزارش نمودند عصاره اکالیپتوس سبب کاهش رشد ریشه و ساقه گیاهچه علف هرز سلمک شد. بوهم و همکاران (۸) نیز کاهش رشد گیاهچه سویا تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک را ناشی از کاهش فتوسنتز، تخریب غشای سلول و اختلال در تقسیم میتوز تحت تاثیر این ترکیبات بیان نمودند. کاهش رشد گیاه در حضور ترکیبات آللوپاتیک به دلیل اختلال تقسیم میتوز در سلولهای مریستمی ریشه چه و ساقه چه همراه می شود و در نتیجه طول ریشه و ساقه کاهش می یابد(۷).

نتایج نشان داد افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش غلظت مالون دی آلدهید بافت گیاهچه توق شد. بررسی غلظت مالون دی آلدهید بافت گیاهچه می تواند بیانگر میزان تخریب غشا سلولی باشد زیرا این ترکیب تحت تاثیر تخریب و اکسیده شدن غشا سلولی آزاد می شود (۱۹). یکی از اثرات بارز رادیکال های آزاد اکسیژن بر سلامت سلول ها، تخریب غشاهای سلولی است (۱۲، ۱۸). افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس در ابتدا سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گردید اما با افزایش غلظت این ترکیبات اللوپاتیک فعالیت هر سه آنزیم آنتی اکسیدان کاهش یافت. یکی از عوامل اصلی خسارت‌زای تنش‌های محیطی نظیر آللوپاتی بر گیاهان، تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز تنش اکسیداتیو است (۸). حضور گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلولی، سبب تخریب ماکروملکول‌های عمده سلولی نظیر RNA، DNA و آنزیم‌های حیاتی نظیر آلفا آمیلاز، ساکاروز سنتتاز و رابیسکومی‌شود (۱۵، ۱۸). یو و همکاران (۲۱) و اورزاک و همکاران (۱۸) مشاهده نمودند حضور ترکیبات آللوپاتیک سبب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در گیاهچه های هدف می شود زیرا این آنزیم ها با حذف رادیکال های آزاد اکسیژن محیط سلول را از اثرات زیانبار این رادیکال ها حفظ می کنند اما آنزیم های آنتی اکسیدان نیز مانند سایر ترکیبات پروتینی تحت تاثیر غلظت بالای ترکیبات آللوپاتیک قرار گرفته و فعالیت انها کاهش می یابد. فرهودی (۳) مشاهده نمود کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک آفتابگردان سبب کاهش رشد گیاهچه و افزایش تخریب غشاهای سلولی پنیرک و کلزا شد. مافی و همکاران (۱۷) با بررسی تاثیر ترکیبات آللوپاتیک بر رشد گیاهچه خیار بیان نمودند این ترکیبات با تاثیر منفی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان گیاهچه خیار سبب القای تنش اکسیداتیو و کاهش رشد گیاهچه خیار شد. ترکیبات آللوپاتیک آفتابگردان نیز با ایجاد تنش اکسیداتیو موجب تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش غلظت مالون دی آلدهید در گیاهچه خردل وحشی شد. همبستگی معنی داری میان افزایش غلظت مالون دی آلدهید بافت گیاهچه خردل وحشی و کاهش رشد گیاهچه آن تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک مشاهده شد (۱۸).

نتایج آزمایش حاضر نشان داد افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب کاهش غلظت کلروفیل a و b برگ توق شد که بیانگر تخریب رنگیزه های گیاهی تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک است (۱۰). محققین مشاهده نمودند کاربرد عصاره اکالیپتوس سبب کاهش غلظت کلروفیل a و b گیاهچه های هدف شد (۴، ۱۱). یو و همکاران (۲۱) گزارش نمودند ترکیبات آللوپاتیک سبب تخریب شدید رنگیزه های گیاهی نظیر کلروفیل و کارتنویید برگ خیار

شده و در نتیجه موجب کاهش فتوسنتز و رشد گیاهچه خیار شد. لورنزو و همکاران (۱۶) با مطالعه تاثیر محلول پاشی عصاره آکاسیا بر فتوسنتز و غلظت رنگیزه های فتوسنتزی یازده گونه گیاهی مشاهده نمودند افزایش غلظت عصاره آکاسیا سبب کاهش غلظت کلروفیل و کاهش فتوسنتز شد.

افزایش غلظت عصاره اکالیپتوس سبب کاهش شدید فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز گردید. ساکاروز سنتتاز یک آنزیم حیاتی است که در تبدیل مواد فتوسنتزی به ساکاروز و رشد گیاه نقش اساسی دارد لذا هر گونه اختلال در فعالیت آن منجر به کاهش رشد گیاه می گردد (۱۰). وو و همکاران (۲۰) کاهش رشد گیاهچه *Luliom rigidum* تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک گندم را ناشی از کاهش فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز بیان نمودند. فرهودی و لی (۱۲) نیز مشاهده نمودند کاربرد عصاره جو سبب کاهش شدید فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز گیاهچه یولاف وحشی شد.

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد رشد گیاهچه، غلظت کلروفیل و فعالیت آنزیم ساکاروز سنتتاز گیاهچه توق تحت تاثیر عصاره اکالیپتوس کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و تخریب غشا های سلولی تحت تاثیر ترکیبات آللوپاتیک می تواند یکی از دلایل عمده کاهش رشد گیاهچه توق تحت تاثیر حضور مواد آللوپاتیک عصاره اکالیپتوس باشد. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می گردد تحقیقات بیشتری پیرامون شناسایی و چگونگی عمل ترکیبات آللوپاتیک گیاه اکالیپتوس علیه رشد گیاهچه علف های هرز از جمله توق انجام شود تا بتواند راهگشای استفاده از عصاره اکالیپتوس به عنوان یک علف کش زیستی در آینده باشد.

منابع

۱. زلقی، س.، فرهودی، ر. و آریان نیا، ن. ۱۳۹۰. بررسی تاثیرعصاره آللوپاتیک آفتابگردان برجوانه زنی، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و آنتی اکسیدانت های گیاهچه های ارزن و سورگوم. دومین همایش ملی علوم و تکنولوژی بذر، مشهد ، ایران

۲. سخایی،م.، عصاره، م. ح.، شریعت، آ. و بخشی خانیکی، غ. ر. ۱۳۸۸، بررسی اثرات دگرآسیبی برگ های اکالیپتوس بر جوانه زنی و رشد گیاهچه های گندم. فصلنامه پژوهش های علوم گیاهی، جلد ۱۶، شماره ۴، صفحه۶۵- ۵۸.

۳. فرهودی، ر. ۱۳۸۹، بررسی اثرات دگرآسیبی عصاره آبی آفتابگردان بر جوانه زنی و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه کلزا، پنیرک و خردل وحشی. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۸۷ ، صفحه ۷۲-۶۵.

۴. محمدی، ن.، رجایی، پ. و فهیمی، ح. ۱۳۹۱، بررسی اثر آللوپاتی عصاره برگ اکالیپتوس بر پارامترهای مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان تک لپه و دو لپه. مجله زیست شناسی ایران، جلد، ۲۵ ، شماره ۳، صفحه ۴۶۶-۴۵۴.

۵. نجفی آشتیانی، ا.، عصاره، م. ح.، باغستانی، م.ع. و انگجی، س.ج. ۱۳۸۷، بررسی اثر آللوپاتیک اندام هوایی گیاه اکالیپتوس بر جوانه زنی و رشد گیاهچه علف هرز سلمک. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴ ، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۲۹۶-۳۰۳.

6. Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes is isolated chloroplasts pollyphenol oxidase in *Betavulgaris*. Plant physiology. 24:1-15.

7. Bertin, C., Yang, X., Weston, L.A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant soil. 256:67-83.

8. Bohm, P. A. F., Zanardo, F. M. L., Ferrarese, O. (2006). Peroxidase activity and lignification in soybean root growth-inhibition by juglone. Biology Plantarum. 50 (2):315-317.

9. Chance, B., Maehly, A. C. (1995). Assay of catalase and peroxidases. Method of Enzymology. 2:764-775.

10. Counce, P. A., Gravois, K. A. (2006). Sucrose Synthase Activity as a Potential Indicator of High Rice Grain Yield. Crop Science. 46:1501-1508.

11. Dganaguiraman, M., Vaidyanathan, R. (2005).Physiological responses of *Eucalyptus globus* leaf leachate on seedling physiology of rice, sorghum and blackgram. International Journal of Agriculture. 7:34-38.

12. Farhoudi,R., Lee,D. (2013) Allelopatic Effects of Barley Extract (*Hordeum vulgare*) on Sucrose Synthase Activity, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymatic Activities of *Hordeum spontoneum* and *Avena ludoviciana*, Proceedings of the National Academy of Science. 80:(1):213-220

13. Farooq, M., Jabran, K., Rehman, H., Hussain, M. (2008). Allelopathic effects of rice on seedling development in wheat, oat, barley and berseem. Allelopathy Journal. 22: 385-390.

14. Glenn, A. (2008). Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata* on the rice seedling growth, 5th World Congress on Allelopathy, New York, USA.

15. Kato-Noguchi, H., Ino, T. (2001). Assesment of allelopatic potential of root exudates of rice seedling. Biology Plantarum. 44 (4):635-638.

16. Lorenzo, P., Palomera-Pe´rez, A., Reigosa, M. J., Gonza´l, L. (2011). Allelopathic interference of invasive Acacia dealbata Link on the physiological parameters of native understory species. Plant Ecology. 212: 403-411.

17. Maffei, M., Bertea, C. M., Garneri, F., Scanneri, S. (1999). Effect of benzoic acid hydroxy- and methoxy-ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. I. Isocitrate lyase and catalase activity. Plant Science. 141:139-147.

18. Oracz, K., Bailly, C., Gniazdowska, A., Côme, D., Corbineau, D., Bogatek, R. (2007). Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. Journal of chemical ecology. 33:251-264.

19. Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovi, L., Gasparikora, O. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, memberane stability and water relation in two maize cultivar. Plant, Soil and Enviroment. 52 (4):186-191.

20. Wu, H., Pratley, J., Haig, T. (2000). Laboratory screening for allelopatic potential of wheat accessions against annual raygrass (*Luliom rigidum*). Australian journal of Agriculture Reserch. 51:259-266.

21. Yu, J. Q., Fye, S., Zhang, M .F., Hu, W.H. (2003). Effects of root exudates and aqueous root extract of cucumber and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. Biological Systems and Ecology. 31:129-139.

22. Zhang, P., Kolhe, S. S., Tripathi,R.S. (2008). Germination and seedling vigor of chickpea as affected by allelopathy of *X. estrumarium* L. International chickpea Newsletter. 22:23-29.

Effect of *Eucalyptus camaldulesis* alcoholic extract on antioxidant enzyme activates, sucrose synthesis enzymes and cell membrane damage of *Xantium strumarium* seedling

Farhoudi R.

Weed Science Dept., Islamic Azad University, Shoushtar Branch, Shoushtar, I.R. of Iran

Abstract

In order to evaluate the allelopatic potential of *Eucalyptus camaldulesis* alcoholic extract on antioxidant enzyme activites, cell membrane damage and sucrose synthesis enzymes activity of *Xantium strumarium*, the expriments was coducted in Islamic Azad University, Shoushtar branch at 2012. The experiment was laid out according to Completely Randomized Design with four replications and treatments were various concentration of *E. camaldulesis* alcoholic extract (0, 4, 8, 12, 16 and gr/L). Results indicated *E. camaldulesis* alcoholic extract application exhibited gradual rise inhibitory effect on seedling weight, antioxidants enzymes activities and sucrose synthetesis enzymes activity but elevated the malondialdehyde concentration in *Xantium strumarium* seedlings. The lowest sucrose synthesis activity (2.11 nmol prot^{-1} min^{-2}), seedling dry weight (2.76mg) and highest malondialdehyde concentration (0.92 nmol gr fw^{-1}) were noted at 20 gr L^{-1} concentration of *E. camaldulesis* alcoholic extract. In conclusion, *E. camaldulesis* alcoholic extract decreased seedling growth, chlorophyll content, antioxidant enzymes activates and sucrose synthesis enzymes activity of *X. strumarium* seedling.

Key words: allelopathy antioxidant enzyme, chlorophyll, malondialdehyde, *Xantium strumarium*