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

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

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

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱

چکیده

در این پژوهش اثر ترکیب دگر آسیب گزانتوتوکسین بر روی گیاه مدل کاهو (*Lactuca sativa*) بررسی گردید. به این منظور ابتدا تاثیر 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 مذکورآبیاری شدند و بعد از رسیدن گیاه به مرحله بلوغ (هفت برگی)، تاثیر 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 تاثیر 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 آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه کاهو نظیر آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و نیز آنزیم پروتئاز با افزایش غلظت گزانتوتوکسین درمحیط 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 تاثیر محسوسی بر گیاه کاهو دارد.

واژه های کلیدی: گزانتوتوکسین، دگر آسیبی، الکتروفورزپروتئین، آنزیم های آنتی‌اکسیدان

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

مقدمه

امروزه استفاده بی رویه 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 نا خواسته مواد شیمیایی مضر به زنجیره غذایی شده است. یکی از راه‌های کاهش آلودگی چه در بحث غذا و چه در بحث محیط زیست طراحی علف کش‌ها و سموم ضد آفت ارگانیک از طریق به کارگیری ترکیبات دگرآسیب (Allochemicals) می‌باشد. منظور از ترکیبات دگرآسیب، ترکیباتی از متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاه است که رشد و گسترش سیستم‌های زیستی و زراعی دیگر را تحت تاثیر قرارداده و مهار می‌کنند(۱۶و ۱۵). گزانتوتوکسین ترکیبی از دسته ترکیبات فنلی و از گروه فرانو کومارین‌ها (Coumarins) است که در برخی اعضائ تیره چتریان و تیره سداب از مسیر متابولیسمی شیکمات ساخته می شوند(۱۸). این متابولیت ثانویه با فرمول مولکولی $C_{12}H_8O_4$ و با نام تجاری متوکسی پسورالن، برای

درمان برخی از بیماری‌های پوستی انسان نیز تجویز می شود. بررسی‌ها نشان داده که این ترکیب همانند بسیاری از ترکیبات فنلی اثر دگر آسیبی بر گیاهانی همچون ذرت، آرابیدوپسیس تالیانا، کلزا وحتی علف‌های هرزدارد(۲۰و۱۴). 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 آسیبی است می‌باشد. شناخت اثرات این نوع ترکیبات می‌تواند راهگشای استفاده از ترکیبات دگرآسیب برای دفع علفهای هرز و ساخت علف کشهای با منشا طبیعی گردد(۱۸).

مواد وروشها

تعیین غلظت بهینه گزانتوتوکسین جهت تداوم تیمار: جهت بررسی جوانه زنی، غلظت‌های مختلفی از ماده گزانتوتوکسین (LOBA- chemie,06435) شامل غلظت های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، با حل کردن آن در چند قطره استن و رقیق سازی با آب مقطر تهیه شد. بذرهای کاهو (رقم سیاهو) در پنج تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی تحت تیمار این غلظت‌ها قرار گرفتند. ابتدا بذرها جهت ضد عفونی‌شدن 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 قبلا در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سیلیوس، 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 پتری ها درانکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس قرارداده 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 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 میلی‌متری اندازه گیری شد.

کشت گلخانه ای و تیمار گیاه: دانه‌رست‌های گروه شاهد و تیمار شده با غلظت های ۱ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین، به درون گلدان‌های حاوی پیت که قبلا استریل شده بودند، منتقل شد و در ژرمیناتور با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت، دمای ۲۵ درجه سیلسیوس 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.

اندازه گیری وزن تر و خشک اندام هوایی وریشه: پس از برداشت گیاه، وزن تر اندام هوایی تعیین شد، سپس نمونه ها درون پاکت های جداگانه و در داخل آون در دمای ۷۰ درجه سیلسیوس 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: مقدارکلروفیل 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 گیره های مخصوص دستگاه فلوریمتر Hansetech مدل PEA ساخت انگلستان با شدت نور ۳۵۰۰ لوکس، از محل میانه برگ اندازه گیری گردید. صفات مورد ارزیابی شامل F_O:(فلورسانس کمینه)،

F_M:(فلورسانس بیشینه) و F_V/F_M:(کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم Π) 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 میلی لیتری انتقال و یک میلی لیتر بافر فسفات با قدرت یونی ۰/۱ مولار و pH=۷/۴ به آن اضافه شد و بلافاصله در داخل حمام یخ قرار داده شدند. میکروتیوپ‌ها توسط سانتریفیوژ یخچالدار با سرعت ۱۶۰۰۰g در دمای ۴ درجه سیلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور آن‌ها جدا و از این نمونه ها جهت تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد و اندازه گیری فعالیت آنزیم ها استفاده شد(۲).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH=۶/۵ و۰/۱میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی لیتر اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار در حمام یخ مخلوط گردید. سپس ۰/۱ میلی لیتر 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 میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۸ و ۰/۲ میلی لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار و ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای ۴۰ درجه سیلسیوس اضافه شد و تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه شد (۲).

سنجش فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز: ۲ میلی لیتر کازئین هیدرولیز شده یک درصد وزنی حجمی با pH=۶ و ۰/۴ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه سیلسیوس بر روی صفحه حرارتی نگهداری و سپس برای توقف واکنش به آن ۰/۴ میلی لیتر 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 میلی گرم 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 میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار که دارای pH=۶/۵ بود مخلوط و سپس ۰/۲ میلی لیتر 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 میلی لیتر از عصاره پروتئینی با پنج میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری 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 برگی با چند قطره ازت مایع و ۲/۱ میلی لیتر بافر استخراج (پنج میلی لیتر تریس-اسیدکلریدریک ۵۰ میلی مولاربا pH=۷/۵، ۲۰۰ میکرولیتر Na_2EDTAیک مولار و ۳۳ میکرولیتر مرکاپتواتانول ۰/۰۴ درصد با حجم نهایی صد میلی لیتر) هموژن شد. سپس نمونه به درون میکروتیوپ منتقل و در سرعت g ۱۲۰۰۰با

دمای ۴ درجه سیلسیوس به مدت ۲۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس روشناور حاصل دوباره با سرعت ۱۰۰۰g و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و روشناور حاصل از این مرحله برای تهیه نمونه مورد استفاده درالکتروفورز 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 پروتئین ها تحت اثر SDS و ماده احیا کننده کاملا 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 ولتاژ۱۱۰ 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 گلایسیال و ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به مدت ۶ ساعت، رنگ بری گردید. (۱۷و۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

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

نتایج

نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اثر گزانتوتوکسین بر میزان جوانه زنی، رشدریشه‌چه و رشد ساقه‌چه در تمامی غلظت‌ها درسطح احتمال ۵ درصدکاهش معنی داری داشته به طوری که میزان جوانه‌زنی در غلظت‌های ۰/۱، ۱ ،۱۰، ۱۰۰و۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم نسبت به گروه شاهد، به ترتیب در حدود۱۲، ۲۵، ۴۵، ۷۵و ۱۰۰درصد کاهش داشته است (جدول۱). با توجه به نتایج جوانه زنی در غلظت‌های متفاوت ، غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو گرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین به عنوان غلظت بهینه انتخاب شدند. میزان طول ریشه‌چه برای غلظت ۱و ۰/۱میکرو گرم برمیلی لیتر به ترتیب در حدود ۹۱ و ۴۸درصد نسبت به گروه شاهد و رشد ساقه چه به ترتیب در حدود ۳۱ و ۸ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار داشت (جدول۲). 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.

جدول۱- میزان جوانه زنی بذر گیاه کاهو تحت تیمار غلظتهای مختلف گزانتوتوکسین

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

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 آنالیز داده‌ها نشان داد که علاوه بر اثر گزانتوتوکسین برمیزان وزن تر ریشه و اندام هوایی،وزن خشک ریشه و اندام هوایی نیز درغلظت ۰/۱ و ۱ میکروگرم برمیلی لیتر گزانتوتوکسین، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار دارد که این کاهش در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتربود.به طوری که در تیمارهای ۰/۱ و ۱ میکروگرم برمیلی لیتر گزانتوتوکسین وزن تر ریشه نسبت به گروه شاهدبه ترتیب۵۵/۷۶٪ و ۷۸/۸۴٪وزن تر اندام هوایی نسبت به

گروه شاهدبه ترتیب ۱۶/۵۰٪ و ۴۷/۱۶٪ ،وزن خشک ریشه نسبت به گروه شاهد۶۳/۶۳٪و۸۷/۲۷٪ و وزن خشک اندام هوایی نسبت به گروه شاهد۱۵/۹۳٪ و۵۱/۰۹٪ کاهش یافت (جدول۲).

نتایج حاصل از بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان داد که تغییرات این پارامتر از نظرآماری در سطح احتمال ۵ درصد معنا دار نبود(جدول۲).

داده‌های حاصل از آنالیز داده‌های محتوی کلروفیل نشان داد که محتوی کلروفیل،تحت تاثیر غلظت ۰/۱ و ۱میکرو گرم برمیلی لیتر گزانتوتوکسین نسبت به گروه شاهد در سطح احتمال ۵ درصد با۲۵/۹۷٪ و ۴۱/۹۸٪کاهش معنی دار همراه بود(جدول۲).

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 ایجادشده توسط ماده گزانتوتوکسین باشد(جدول۲).

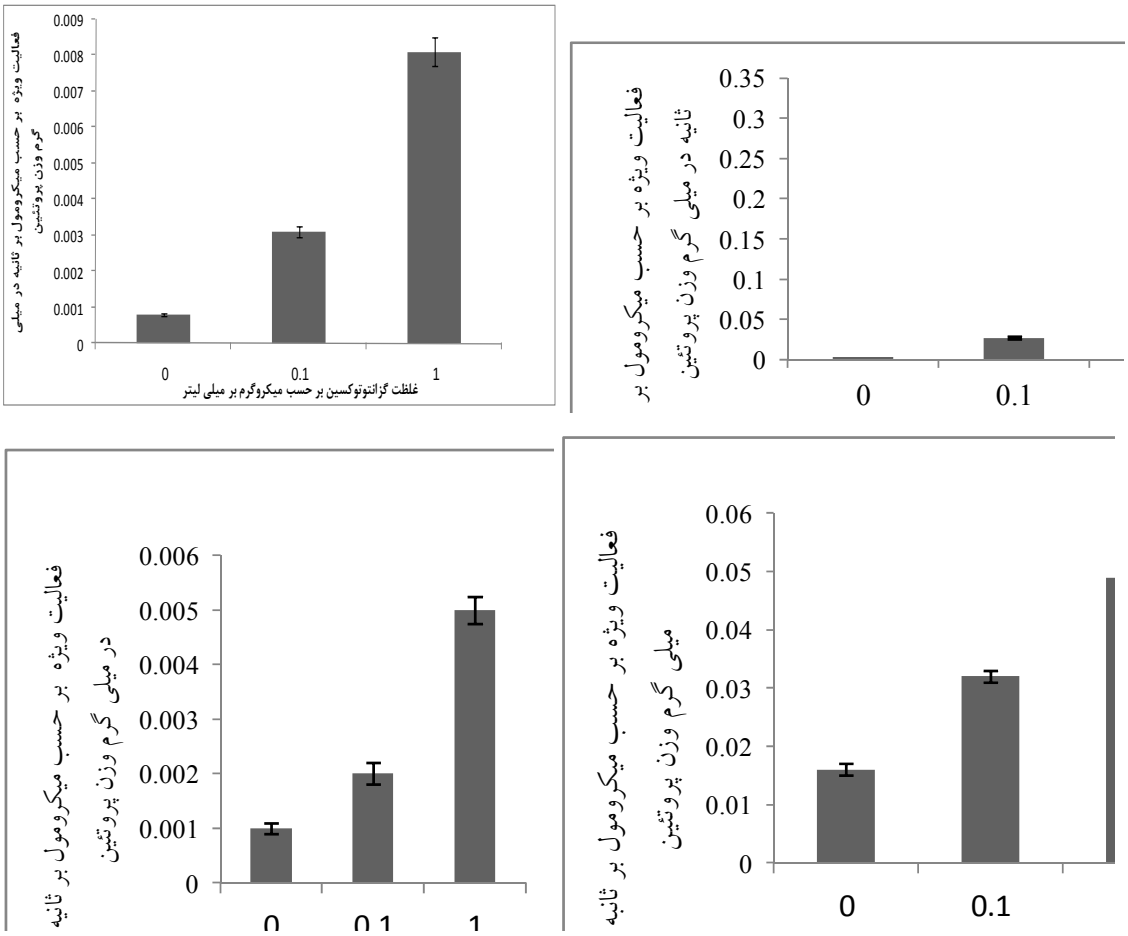
جدول۲- تغییرات صفات فیزیولوژیک ، بیوشیمیایی و رشدگیاه کاهو تحت تیمار غلظتهای مختلف گزانتوتوکسین

غلظت گزانتوتوکسین (میکروگرم بر میلی لیتر) صفات مورد سنجش	۱	۰/۱	۰
طول ریشه چه (سانتی متر)	۰./۱۳±۰/۰۶^{c}	۰/۷۲±۰/۰۵^{b}	۱/۳۹±۰/۱۱^{a}
طول ساقه چه (سانتی متر)	۰/۹±۰/۱۲^{b}	۱/۲±۰/۲۰^{a}	۱/۳±۰/۲۵^{a}
وزن تر اندام هوایی (گرم)	۱/۱۲±۰/۰۹^{c}	۱/۷۷±۰/۱۳^{b}	۲/۱۲±۰/۳۱^{a}
وزن خشک اندام هوایی (گرم)	۰/۸۹±۰/۰۷^{c}	۱/۵۳±۰/۰۶^{b}	۱/۸۲±۰/۰۲^{a}
وزن تر ریشه (گرم)	۰/۱۱±۰/۰۲^{c}	۰/۲۳±۰/۰۳^{b}	۰/۵۲±۰/۰۳a
وزن خشک ریشه (گرم)	۰/۰۴۲±۰/۰۱^{c}	۰/۱۲±۰/۰۲^{b}	۰/۳۳±۰/۰۴^{a}
کلروفیل با واحد نسبی	۴/۷±۰/۷^{c}	۶±۱/۰^{c}	۸/۱±۱/۲^{a}
کارایی فوتوشیمیایی فتوسیستم II	۰/۸۲±۰/۰۶^{a}	۰/۸۴±۰/۰۸^{a}	۰/۸۴±۰/۰۹^{a}
فلورسانس کمینه(میکرومول بر مترمربع در ثانیه)	۲۵۰۰±۲۱^{a}	۲۵۵۰±۱۱^{a}	۲۵۶۰±۴۳^{a}
فلورسانس بیشینه(میکرومول بر مترمربع در ثانیه)	۲۰۱۰±۱۸^{a}	۲۰۳۰±۱۴^{a}	۲۰۰۰±۱۰^{a}
مقدار پروتئن کل(میلی گرم بر میلی لیتر)	۰/۱۹±۰/۰۴^{b}	۰/۲۶±۰/۰۵^{b}	۰۰/۸۷±۰/۱۲^{a}

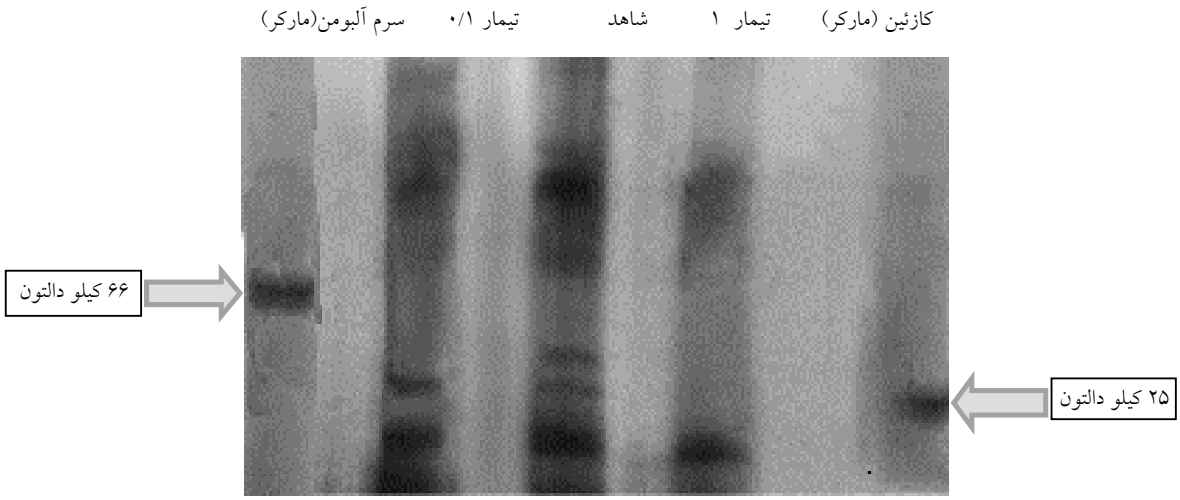
در هر ردیف تفاوت بین داده ها که با حروف یکسان مشخص شده اند، از نظر آماری معنی دار نبوده است ($p\leq0.5$).

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 معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ داشته است. همچنین فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز نیز با افزایش غلظت گزانتو توکسین، افزایش داشته است (شکل۱).

الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های مربوط به برگ‌های گیاه کاهوی تیمار شده با گزانتوتوکسین و مقایسه آن با نمونه شاهد نشان داد که تغییرات کمی و کیفی معنی‌دار در باندهای پروتئینی که اساساً وزن مولکولی بالاتراز ۲۵ و پایین تر از ۶۶ کیلودالتون دارند قابل مشاهده است (شکل۲). حذف برخی از باندها در گروه تیمار نشان‌دهنده تاثیر بازدارنده ماده گزانتوتوکسین در بیوسنتز پروتئین می‌باشد. این تاثیر در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر گزانتوتوکسین شدیدتر از غلظت ۰/۱ می باشد.



شکل۱- تاثیر غلظت گزانتوتوکسین بر فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز(بالا-راست) آسکوروبات پراکسیداز بالا- چپ)،)، کاتالاز(پائین- راست) و پروتئاز(پائین- چپ)



شکل۲- الگوی الکتروفورز پروتئین های گیاه تحت تیمار گزانتوتوکسین. کازئین و سرم آلبومن گاوی به ترتیب با وزن مولکولی۲۵ و ۶۶کیلودالتون به عنوان مارکرمورد استفاده بوده است..

بحث و نتیجه گیری

بررسی منابع نشان داد که اثرات آللوپاتیک ترکیب گزانتوتوکسین قبلا مورد بررسی قرار گرفته است. خصوصا ثابت شده است که این ماده جوانه زنی بذر کاهو را همانند برخی دیگر از ترکیبات فرانوکومارینی مهار می نماید (۲۰و۱۱). در پژوهش حاضر نیز اثرات گزانتوتوکسین بر کاهش معنی داری جوانه زنی بذور کاهو مورد تاکید قرار گرفت. کاهش جوانه زنی بذر ممکن است احتمالا 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 معنی دار مانع ریشه‌زایی بذرها می شود که این نیز احتمالا به دلیل کاهش سنتز پروتئین می باشد. کاهشی که در نتایج بدست آمده در پژوهش اخیر کاملا مشخص و در حد ۸۰٪ بود. البته در این خصوص مهار ریشه زایی 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 بررشدطولی ریشه چه گیاه کلزا نشان دادکه این ترکیب که ساختار نزدیکی به فرانوکومارین ها دارد سبب تنش اکسیداتیو می شود که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن است و این رادیکال‌هابا تخریب ماکرومولکول‌ها سبب صدمه به غشاهای سلولی شده و از رشدریشه 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 کرده اند (۲۰و ۱۹).

یکی دیگر از احتمالات پیشنهادی در مورد توقف رشد دانه رست‌ها طی تنش دگرآسیبی تغییر نرخ تنفس میتوکندریایی است که باعث کاهش تولیدATP می شود. قبلا ثابت شده که کوماریل موجوددرعصاره اکالیپتوس که به نوعی از پیش سازهای فرانوکومارین ها از جمله گزانتوتوکسین می باشد، نرخ تنفس میتوکندریایی را درپیازکاهش داده است. کاهش تولید ATP می تواند باعث تغییردرسایرفرایندهایی سلولی ازجمله جذب یون ها و رشدکه مراحل پرمصرفی از نظر انرژی هستند گردد.کاهش رشدگیاه درحضورترکیبات آللوپاتیک باتوقف شدیدمیتوزدرسلول های مریستمی ریشه چه و ساقه چه همراه می شود و درنتیجه طول ریشه و ساقه کاهش می یابد(۶).

یکی دیگراز اثرات ماده گزانتوتوکسین کاهش وزن تروخشک ریشه واندام هوایی گیاه کاهو نسبت به گروه شاهد است که احتمالاً از طریق اثر مواددگرآسیبدرکاهش جذب کاهش جذب یون‌های معدنی و موادغذایی شده توسط ریشه ودرنهایت کاهش وزن تروخشک گیاهچه باشد و یا اینکه این کاهش به دلیل تقلیل میزان پروتئین در گیاه می باشد (۹،۱۰). این چنین کاهشی در وزن تر و خشک درگیاهان زراعی دیگر نیز از جمله گندم، به دنبال تاثیر متابولیتهای ثانویه از عصاره های گیاهی مختلف مشاهده شده است (۴و۳).

از طرف دیگر، مطالعه حاضر نشان داد که گزانتوتوکسین منجر به کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل و کاهش توان فتوسنتزی کاهو شده است. این کاهش می تواند به دلیل تشدید فعالیت آنزیم کلروفیلاز درشرایط تنش ویا به دلیل کاهش روند بیوسنتز کلروفیل باشد. مشخص شده است که در شرایط بروز تنش غلظت برخی موادتنظیم کننده رشدازجمله آبسیزیک اسیدو اتیلن افزایش می‌یابد و این موادموجب تحریک فعالیت کلروفیلاز می شوند، قبلا به اثبات رسیده است که کلروفیلاز باجداکردن فیتول از کلروفیل و جداکردن منیزیم از کلروفیلید وتشکیل فئوفوربید و درنهایت انهدام حلقه‌ی تتراپیرولی، موجب تجزیه کلروفیل می شود (۱۱). همچنین رایس ۱۹۷۴درسال درمطالعات خود پیشنهادکردکه مواددگرآسیب تولید پیش پورفیرین در بیوسنتز کلروفیل را مهار می کند(۱۵).

با توجه به اینکه تاثیر گزانتوتوکسین تاثیر معنی دار بر فلورسانس کلروفیل گیاه کاهو نداشت می توان استنباط نمود که تنش دگرآسیبی گزانتوتوکسین برروی ساختار کلروپلاست(ساختارتیلاکوئیدوفتوسیستمII) 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 می تواند درنتیجه اثر ترکیبات فنولی برکاهش 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 فنلی در برخی تنش‌های غیر زیستی از جمله تنش خشکی هم مشاهده شده است.

در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه کاهو تحت تیمار گزانتوتوکسین، افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز مشاهده شد که احتمالاً به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در رویارویی گیاه با تنش دگرآسیبی افزایش آنتی اکسیدان ها صورت گرفته تا سبب کاهش آثارترکیب فنلی 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 برگی می‌توان چنین ذکر کرد که با تیمارگزانتوتوکسین کیفیت و کمیت باندهای پروتئین های 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 کیلودالتون دارند. دلیل توجیهی 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 دربرابرتاثیرگزانتوتوکسین 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 تبیعتاً نوعی تنش محسوب می شود.در واقع این نوع تنش‌ها که نیز که اصطلاحاًتنش‌های آللوکیمیکال نامیده می شوند همانند سایر انواع تنش‌ها پاسخ‌های خاص فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی را در گیاهان بر می انگیزد. از جمله این پاسخها تشدید فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی نیز و آنزیم پروتئاز است. کاهش برخی باندها در الگوی الکتروفورتیک پروتئینهای گیاه تیمار شده با گزانتوتوکسین شاید نتیجه افزایش فعالیت پروتئاز باشد.

منابع

۱- انتشاری،ش.،و اهرابی،ف.۱۳۹۰.تاثیرکومارین بربرخی شاخص های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه کلزا رقم هایولا۴۰۱. مجله زیست شناسی گیاهی ،جلد سوم، شماره ۱۰. صفحه۲۲-۳۶،

۲- حسین زاده، م.، کیارستمی، خ.، ایلخانی زاده ، م. و صبورا، ع. ۱۳۸۸. بررسی اثرات ترکیبات آللوپاتیک جو خودرو بر میزان پروتئین ها ، کربوهیدارت ها و فعالیت برخی از آنزیم های گندم. مجله زیست شناسی ایران. جلد شماره ۲۲. صفحه ۴۰۶-۳۹۲.

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.، صبورا ع. ۱۳۹۴. بررسی اثر آللوپاتی تفاله حاصل از روغن کشی 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. andWeston, L.A.2003. The rol 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.PartoveVaghe 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. Inernational 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. andVattuone, M. A. 2009.Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. CRC Press. London.

17- Schägger, H. andVonjagow, 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.

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 Xantothoxin as an allochemical on some Physiological and biochimical 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 µg/mL, the lettuce seeds were potted in greenhouse condition and watered with the xanthotoxin concentrations. A control group of plants were watered with distillated 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 Electrophortic pattern of protein in acryl amid gel. The results showed that seed germination,dry and fresh weight, Spad chlorophyll,protein of the reated seedlings were significantly reduced than control group at $p \leq 0.05$. It was also found that the activity of ascorbat 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 trated and control group which was due to the response of Lactuca sativa.L to existence of xantothoxin. 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