

بررسی ساختار گیاه یونجه و سنجش مدیکارپین در مراحل مختلف تکوین

فاطمه زرین کمر* و نسترن اسدی

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۷

چکیده

یونجه با نام علمی *Medicago sativa* L. از خانواده باقلائیان، گیاهی است پایا و علوفه‌ای، این گونه دارای ترکیبات متعدد فلاونوئیدی است. یکی از مهمترین این ترکیبات در گیاه یونجه، ایزوفلاونوئید مدیکارپین است که این ایزوفلاونوئید باعث فعال شدن ژنهای ریزوبیومی دخیل در فرایند تشکیل گرهگ می‌شود. در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) در مراحل مختلف تکوین گیاه در سه تکرار شامل مراحل جوانه‌زنی، رویشی و زایشی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و غلظت مدیکارپین توسط کرومانوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. همچنین ساختار تشریحی - تکوین اندام‌های رویشی یونجه در مراحل مختلف نمو توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم PAL در طی رشد رویشی و زایشی متغیر بوده، همچنین میزان غلظت مدیکارپین نیز در مراحل مختلف تکوین تفاوت داشت. نتایج این مطالعه به خوبی نشان داد که فعالیت آنزیم PAL با میزان غلظت مدیکارپین رابطه مستقیم دارد. به‌طوری‌که بیشترین میزان غلظت مدیکارپین و فعالیت آنزیم PAL در مرحله رویشی در ریشه مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: مدیکارپین، تکوین، یونجه، آنزیم PAL

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۴۰ ، پست الکترونیکی: zarinkamar@modares.ac.ir

مقدمه

گیاه و بعد در اندام هوایی تجمع می‌یابد (۱۵). یکی از مهمترین این ترکیبات در گیاه یونجه ایزوفلاونوئید مدیکارپین است که به فرم گلیکوزیده در واکوئل مرکزی سلول انباشته می‌شود که اغلب به‌عنوان یک فیتوآلکسین شناخته می‌شود (۶، ۷). این ایزوفلاونوئید باعث فعال شدن ژنهای ریزوبیومی دخیل در فرایند تشکیل گرهگ می‌شود (۱۵). امروزه توجه زیادی به این فیتوآلکسین در سلامتی انسان می‌باشد. همچنین رژیم غذایی غنی از این ترکیبات با کاهش ابتلا به سرطان، پوکی استخوان، بیماریهای قلبی عروقی و بیماریهای مغزی همراه می‌باشد (۶). یونجه گیاهی است پایا و علوفه‌ای که ارتفاع بوته در این گونه از ۶۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر متغیر و نسبت به گرما و سرما مقاومت خوبی دارد. برگهای اصلی این گیاه به صورت سه برگچه‌ای می‌باشد. برگچه‌ها بیضوی با حاشیه

گیاهان خانواده باقلائیان، منبع غنی از فلاونوئیدها هستند، اغلب فلاونوئیدهای خانواده باقلائیان، ترکیبات فیتوآلکسینی هستند که دارای ساختمان ایزوفلاونوئید می‌باشند (۱۴). فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) اولین آنزیم کلیدی، مهم و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوئید می‌باشد. سوبسترای این آنزیم L- فنیل آلانین می‌باشد (۱۵). عمل اصلی این آنزیم، آمین‌زدایی غیر اکسیداتیو از آمینو اسید L- فنیل آلانین و تبدیل آنها به یون آمونیوم و ترانس سینامیک اسید می‌باشد (۵). این ترکیب به‌عنوان اولین و مهمترین آنزیم در مسیر تولید ایزوفلاونوئید مدیکارپین شناخته شده است (۱۴). یونجه از خانواده باقلائیان دارای ترکیبات متعدد فلاونوئیدی در ریشه و برگهای خود می‌باشد. این ترکیبات معمولاً به فرمهای گلیکوزیده و مالونیل گلیکوزیده، ابتدا در ریشه‌های

نمونه ها برای آنالیز آناتومی در فیکساتور مناسب (الکل ۳۰ درصد) قرار گرفتند. تعدادی دیگر از نمونه ها برای انجام مطالعات بیوشیمیایی در آون به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند.

مطالعات ساختار تشریحی یونجه: نمونه های گیاهی مورد نظر از بخشهای رویشی شامل ریشه، ساقه و برگ از سه مرحله تکوین انتخاب شدند. برای بررسی بخشهای رویشی نمونه ها در فیکساتور مناسب (مخلوط الکل- آب با نسبت ۱ به ۲) نگهداری شدند و پس از عبور برش ها از آب ژاول و استیک اسید و شستشو با آب مقطر، رنگ آمیزی مضاعف (سبز متیل- کارمن زاجی) انجام شد و برشها با میکروسکوپ نوری مدل Olympus مدل BH2 ساخت کشور ژاپن مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفتند.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز: سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز با استفاده از سینامیک اسید تولید شده با روش wang و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت های خشک اندام هوایی، رویشی و گل به طور جداگانه در بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با pH=8 روی یخ ساییده شده و بعد در ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲-۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید. به هر لوله آزمایش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ریخته و بعد ۶۵۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۴ میلی مولار به آن اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از خارج نمودن نمونه ها از حمام آب گرم به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید ۵ میلی مولار افزوده و تکان داده شد. سپس با ۵ میلی لیتر اتیل استات، سه بار نمونه ها شستشو داده شدند. سپس نمونه ها در معرض هوا قرار داده شدند. به نمونه های خشک شده، NaOH یک مولار اضافه کرده و بعد جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۲، ۱۳).

مضرس و کرک دار بوده است. این گیاه دارای ۲ نوع ریشه می باشد: ریشه های راست که در شرایط بافت مناسب خاک تا عمق ۷ متر می تواند در خاک نفوذ کند و ریشه های جانبی که وظیفه استحکام گیاه در خاک و جذب آب و املاح را بر عهده دارند و گرهگهای تثبیت کننده ازت بر روی این ریشه ها تشکیل می شوند (۱۰). گل های آن به رنگ ارغوانی و بنفش تیره می باشد و آرایش گل به صورت خوشه مرکب با دم گلهای بسیار طویل که در آن ۵ تا ۵۰ گل ممکن است وجود داشته باشد. بیش از ۹۰ درصد یونجه زراعی در ایران مربوط به این گونه می باشد (۴ و ۲). این گونه، از گیاهان دارویی قدیم و مهم بوده و به دلیل خاصیت ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد اسپاسم، تقویت کننده معده و بدن، کاهش قند خون و کلسترول و ضد تب مورد توجه می باشد (۵). هدف از این پژوهش بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و سنجش غلظت مدیکارپین در ریشه، اندام هوایی و گل در مراحل مختلف رشد می باشد. از بین مراحل نمو، سه مرحله جوانه زنی، ساقه دهی و گلدهی مورد توجه قرار گرفت. با توجه به بررسی های انجام شده اطلاعات کافی و دقیقی در مورد ساختار تشریحی - تکوینی گیاه یونجه در دسترس نمی باشد. لذا بررسی ساختار تشریحی - تکوین اندامهای رویشی این گیاه با روشهای سلول - بافت شناسی از اهداف این پژوهش هستند.

مواد و روشها

بذر یونجه از مؤسسه بذر و نهال کرج تهیه شد، نوع رقم یونجه همدانی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

برداشت نمونه های گیاهی: نمونه های گیاهی در ۳ مرحله تکوینی برداشت شدند. اولین برداشت در مرحله جوانه زنی (۳ روز) و برداشت دوم در مرحله رویشی (۲۰ روز) و برداشت سوم در مرحله گلدهی (۵ ماه بعد از کاشت بذرها) انجام شد. بعد از خارج کردن نمونه ها از خاک اندام هوایی از محل یقه از ریشه ها جدا شد. تعدادی از

نتایج

مطالعه ساختار تشریحی یونجه:

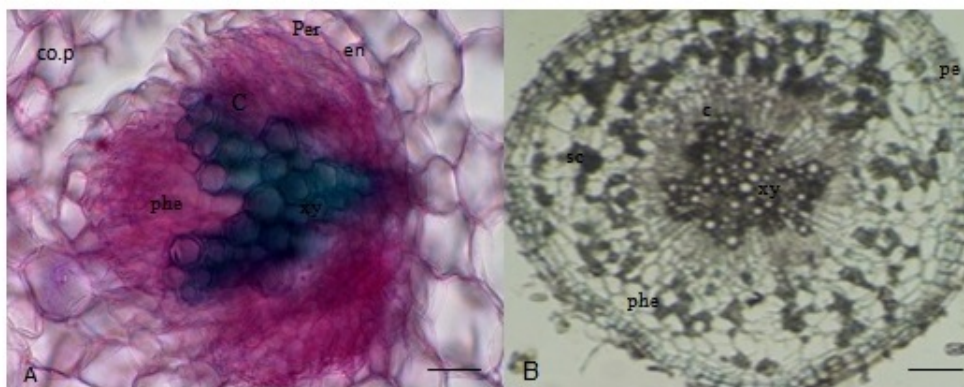
ریشه: در ساختار نخستین ریشه در خارجی ترین لایه پوست اپیدرم دیده می شود که محل تشکیل تارهای کشنده در ریشه است. درونی ترین لایه پوست آندودرم است و به خوبی مرز بین پوست و استوانه آوندی را مشخص می کند. در استوانه آوندی خارجی ترین لایه دایره محیطیه است که از یک لایه سلول پارانشیمی تشکیل شده است. دسته های چوب- آبکش به صورت متناوب قرار گرفته اند. در این منطقه، قطب مولد چوب خارجی است، بنابراین تشکیل چوب برون زا است. تمایز آبکش رو به مرکز است و پرتوفلوئم (آبکش زودرس) به دایره محیطیه و متافلوئم (آبکش دیررس) به محور ریشه نزدیکتر است. با رفتن ریشه به ساختار پسین لایه کامبیوم که در حد فاصل آوند چوب و آبکش قرار دارد به سمت خارج آبکش پسین و به سمت داخل چوب پسین را می سازد (۱۱، ۳) (شکل ۱).

سنجش پروتئین: به ۱۰۰ میلی لیتر از عصاره سانتریفیوژ شده یک میلی لیتر معرف برادفورد اضافه و بعد جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. سنجش پروتئین با روش برادفورد و همکاران در سال ۱۹۷۶ انجام شد (۹).

سنجش مدیکارپین در عصاره های گیاهی: به منظور عصاره گیری این ترکیبات با کمی تغییر از روش Ksouri و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد و محتوای مدیکارپین عصاره ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد.

تحلیل HPLC: از دستگاه HPLC مدل knauer و ستون C18 فاز معکوس Lichrosorb به ابعاد (۴×۲۵۰ mm) برای سنجش مدیکارپین استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل و اسید فسفریک و سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه و مدت کروماتوگرافی ۶۰ دقیقه بود. طیف ها در طول موج ۲۸۳ نانومتر ثبت شدند و مساحت سطح هریک از پیکها محاسبه و منحنی استاندارد مدیکارپین رسم شد.

مطالعات آماری: آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.



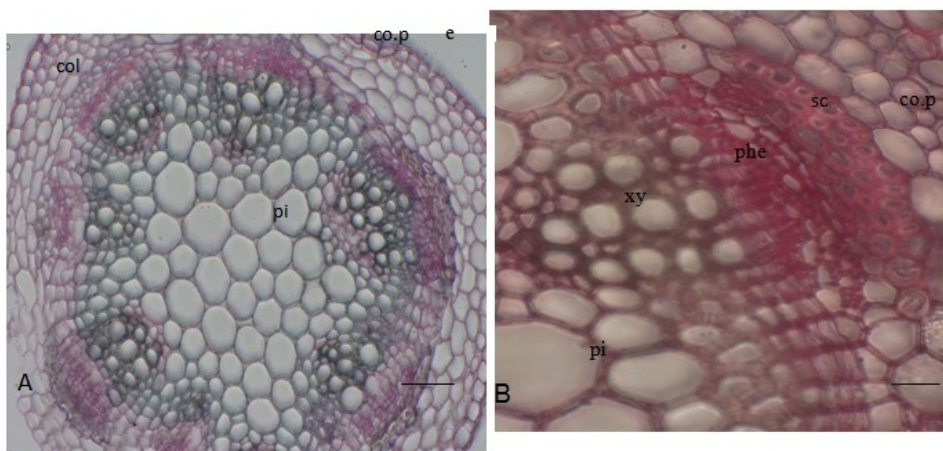
شکل ۱- برش عرضی از ریشه. شکل (A) - ساختار نخستین ریشه: بافت آبکش (phe)، بافت چوب (xy)، پارانشیم پوست (co.p)، آندودرم (en)، دایره محیطیه (per) 6μm. شکل (B) - ساختار پسین ریشه: پریدرم (pe)، بافت آبکش (phe)، بافت چوب (xy)، اسکلائرانشیم (sc)، کامبیوم (c) 60μm.

آبکش می‌شود. در قسمت مرکزی هم سلول‌های پارانشیمی مغز دیده می‌شود (۲، ۱).

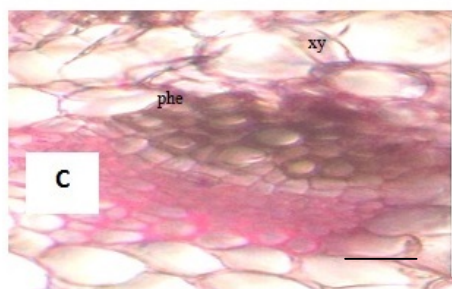
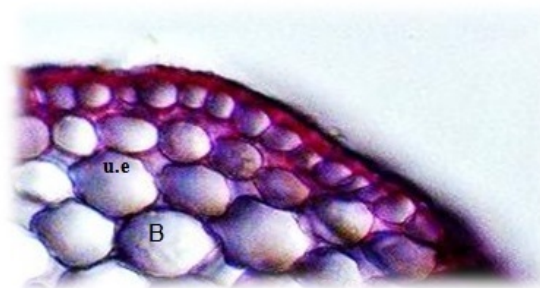
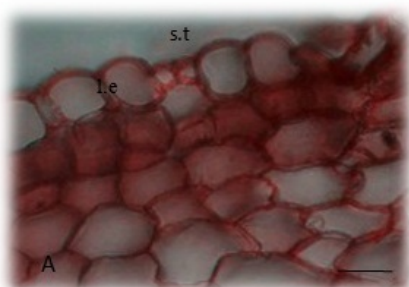
برگ: سلول‌های اپیدرم دارای دیواره ضخیم و چهار وجهی هستند. سلول‌های اپیدرم تحتانی نامنظم‌تر از اپیدرم فوقانی دیده می‌شوند. کوتیکول سطح فوقانی ضخیم‌تر از سطح تحتانی می‌باشد. روزنه در هر دو سطح تحتانی و فوقانی همسطح سلول اپیدرم می‌باشد. بافت پارانشیم مزوفیل شامل دو ردیف پارانشیم نردبانی و یک ردیف پارانشیم اسفنجی است (dorsiventral). آوند مرکزی یک طرفه (collateral) است که آوند چوب بالا و آبکش پائین قرار دارد (شکل ۳).

گرهگ: براساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های سلولی قسمت‌های مختلف گرهگ در دو مرحله ساقه دهی و گلدهی مشخص شد (شکل ۴). با افزایش رشد گیاه، قطر گرهگ و بافت باکترئید افزایش می‌یابد. اما در مرحله گلدهی کاهش معنی‌داری در قطر گرهگ و بافت باکترئید مشاهده شد. همچنین مشخص شد که با افزایش غلظت مدیکارپین، قطر گرهگ و تعداد گرهگ‌ها در ریشه نیز افزایش یافته بود. به‌طوری‌که بیشترین غلظت مدیکارپین و قطر گرهگ در مرحله رویشی مشاهده شد (جدول ۱، شکل ۲).

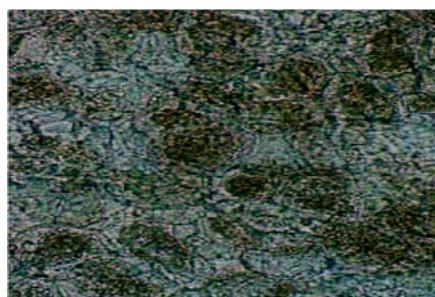
ساقه: در برش عرضی ساقه در ساختار پسین در خارجی‌ترین لایه سلول‌های اپیدرم حالت مکعبی دارند که مشابه بسیاری از دولپه‌هاست. در زیر اپیدرم دولایه سلول پارانشیمی و پس از آن سلول‌های بافت کلانشیم که سلول‌هایی با دیواره‌های ضخیم هستند و بافت مقاوم را تشکیل می‌دهند دیده می‌شود. بافت کلانشیم در این گیاه از نوع کلانشیم گوشه‌دار است. لایه بعدی سلول‌های پارانشیم پوست، در چند ردیف با دیواره نازک و قطر کم و بیش یکسان و چند وجهی هستند. در زیر پارانشیم لایه فیبر اسکرنشیم در داخلی‌ترین لایه پوست و حاشیه استوانه مرکزی، با سلول‌های دارای دیواره ضخیم چوبی وجود دارد که عمل اصلی آن استحکام بخشیدن و محافظت از گیاه است. در استوانه مرکزی دسته‌های آوندی و مغز دیده می‌شود. کامبیوم معمولاً دو نوع سلول دارد: سلول بنیادی دوکی‌شکل که عناصر چوب و آبکش از آن به وجود می‌آیند و سلول بنیادی اشعه که اشعه آوندی را می‌سازد. استوانه کامبیومی بین چوب و آبکش اولیه نمو می‌یابد و چوب ثانویه را به صورت رو به مرکز و آبکش ثانویه را به صورت گریز از مرکز می‌سازد. متاگزیم با اندازه بزرگتر و در سمت آوند آبکش و پروتوگزیم با اندازه کوچکتر در سمت مغز دیده می‌شوند. اشعه آوندی نسبتاً ضخیم است و سبب قطع شدن حلقه‌های چوب و



شکل ۲- برش عرضی از ساقه. شکل (A) - اپیدرم (e)، پارانشیم پوست (co. p)، پارانشیم مغز (pi)، کلانشیم (col) 200µm شکل (B) - اسکرنشیم (sc)، پارانشیم پوست (co.p)، بافت آبکش (phe)، بافت چوب (xy)، پارانشیم مغز (pi) 6 µm



شکل ۳- برش عرضی از پهنک برگ. شکل (A)- اپیدرم تحتانی (l.e) که در آن روزنه (st) وجود دارد $20\mu\text{m}$. شکل (B)- اپیدرم فوقانی (u.e) $20\mu\text{m}$ شکل (C)- رگبرگ میانی. بافت چوب (xy)، بافت آبکش (phe) $6\mu\text{m}$.



A

B

شکل ۴- برش عرضی از گرگ: (A) بافت باکترئید؛ B، سیمای عمومی

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات آناتومیکی حاصل از برش عرضی گرگ در ریشه در سه مرحله تکوین

تعداد گرگ	قطر گرگ (μm)	بافت باکترئید (μm)	بافت / مراحل تکوین
-	-	-	جوانه رنی
۱۲۰	۱۹۶/۲۲a	۱۳۰/۲۷c	ساقه دهی
۱۰۵	۱۷۶/۹۲b	۱۱۲/۶۴d	گلدهی

بحث

آنالیز مدیکارپین نشان داد که نوع بافت و مرحله نمو گیاه نیز می تواند تولید مدیکارپین را تحت تأثیر قرار دهد.

سنجش مدیکارپین و اندازه گیری میزان فعالیت PAL

در مراحل مختلف تکوین: بررسی میزان فعالیت آنزیم PAL با استفاده از دستگاه HPLC در مراحل مختلف تکوین نشان داد از مرحله جوانه زنی تا مرحله گلدهی میزان فعالیت آنزیم PAL در ریشه و اندام هوایی به ترتیب $(0.31 \mu\text{mol CA mg}^{-1} \text{ pr}^{-1})$ و $(0.22 \mu\text{mol CA mg}^{-1} \text{ pr}^{-1})$ افزایش می یابد. به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL زمانی در گیاه مشاهده می شود که گیاه در مرحله رویشی قرار دارد. بنابراین می توان گفت سن گیاه بر میزان فعالیت آنزیم تأثیر گذاشته است (جدول ۲).

به طوری که از مرحله جوانه زنی تا مرحله رویشی میزان مدیکارپین در گیاه رو به افزایش بوده، این افزایش از نظر آماری معنی دار بود (جدول ۲). اما در مرحله زایشی غلظت مدیکارپین در گیاه کاهش یافته است. مکانیسم احتمالی افزایش غلظت مدیکارپین در ریشه می تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم PAL در ریشه باشد. به طوری که بیشترین غلظت مدیکارپین در ریشه در مرحله ساقه دهی وجود دارد ($1 \text{ FW}^{-1} \text{ nmol g}^{-1}$).

جدول ۲- سنجش مدیکارپین و اندازه گیری فعالیت آنزیم PAL در سه مرحله نمو

غلظت مدیکارپین $\text{nmol gr}^{-1} \text{ FW}$	PAL فعالیت آنزیم $\mu\text{mol CA mg}^{-1} \text{ pr}^{-1}$	
		ریشه
$2/1 \pm 0.3^c$	0.90 ± 0.09^d	مرحله جوانه زنی
$7/1 \pm 4/0^a$	0.31 ± 0.04^a	مرحله ساقه دهی
$3/2 \pm 2/0^b$	0.18 ± 0.01^c	مرحله گلدهی
		اندام هوایی
$0/1 \pm 0^e$	0.40 ± 0.09^d	مرحله جوانه زنی
$1/0 \pm 0.3^d$	0.22 ± 0.01^b	مرحله ساقه دهی
$0/8 \pm 0^e$	0.22 ± 0.01^c	مرحله گلدهی
0 ± 0^e	0.66 ± 0.03^d	گل

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.01$).

منجر به افزایش بیوستنز ایزوفلاونوئید مدیکارپین شده باشد. نتایج حاصل از سنجش مدیکارپین با نتایج Tsiri و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد (۱۶ و ۱۷).

نتایج این مطالعه به خوبی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم PAL، با تجمع مدیکارپین و سن گیاه رابطه مستقیم دارد. بنابراین به احتمالی می توان گفت که آنزیم PAL در تنظیم مقدار مدیکارپین نقش داشته است.

Dakora و همکاران در سال ۱۹۹۳ اظهار داشتند که مدیکارپین در فعال شدن ژنهای ریزوبیومی دخیل در تشکیل گرهگ نقش دارد. به طوری که افزایش این فیتوآلکسین در افزایش نفوذ باکتری به گرهگ، قطر گرهگ و عملکرد گیاه تأثیر بسزایی دارد (۱۰).

آنزیم PAL اولین آنزیم در مسیر متابولیسمی مدیکارپین می باشد، به طوری که افزایش فعالیت مذکور ممکن است

منابع

- ۱- رضائی، عبدالمجید. ۱۳۷۲، به نژادی یونجه. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران. چاپ اول. ۲۳۳ ص.
- ۲- فان. آ. ترجمه آذرنوش جعفری. ۱۳۸۷، آناتومی گیاهی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- ۳- کریمی، هادی. ۱۳۶۹، یونجه. مرکز نشر دانشگاهی تهران. ۳۷۱ ص.
- ۴- صالحی سورمقی، محمد حسین. ۱۳۹۰، گیاهان داروئی و گیاه درمانی. انتشارات دانشگاه تهران.
- ۵- قلیچ سیما، زرین کمر فاطمه، نیکنام وحید. ۱۳۹۴، بررسی میزان انباشتگی سرب و تأثیر آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در مرحله جوانه زنی در گیاه یونجه،

- ۶- آلبوغبیش نسا، زرین کمر فاطمه. ۱۳۹۳، بررسی تغییرات ساختاری در اندامهای زایشی بابونه آلمانی ناشی از تنش سرب. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) ۲۷(۳): ۳۳۶-۳۴۵.
- 7- Akoi, T., Akashi, T., Ayabe, Sh; 2000. Flavonoid of Leguminous Plant: Structure, biological activity and biosynthesis. Journal of Plant Research. 113:475-488.
- 8- Boonyuen, C., Wangkarn, S., Suntornwat, O., Chaisuksant, R; 2009. Capacity and phenolic content of *mimusops elengi* fruit extract. Kasetsart Journal of Natural Sciences. 43:21-27.
- 9-Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- 10-Dakora, F.D., Joseph, C.M., Phillips, D.A; 1993. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoid in the presence of Rhizobium Melilotus. Plant Physiology. 101:819-824.
- 11-Hakl, J., Fuksa, P., Maskova, k; Basu P.S; 2011. The development of lucern root morphology traits under high initial stand density within a seven year period. Plant Soil Environ. 57: 81-87.
- 12-Ksouri, R; Mediche, W; Dabez, A; Falleh, M; Grignon and Abdelly, C; 2007. Salinity effect on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *cakile maritime*. Plant Physiology and Biochemistry. 45:244-248.
- 13- Markovic, J., Radovic, J., Lugic, Z., Sokolovic D; 2007. The effect of development stage on chemical composition of alfalfa leaf and steam. Biotechnology in Animal Husbandry. 23: 383-388.
- 14- Marinova, D., Ribarava, F., Atanassava, M; 2005. Total phenolic and total flavonoid in ulgarion fruits and vegetables. J. Univ. chemistry Technology Metal. 40:225-260.
- 15- Matsouka, I., Beri, D., Chinou, I., Haralampidis, K., Spyropoulos, C; 2011. Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedling: a potential detoxification mechanism. Plant soil, Published online.
- 16-Tsiri, D., Chinou I., Haralampidis, K., Spyropoulos, C; 2009. The origin of copper induced medicarpin accumulation and it secretion from roots of young fenugreek seedling are regulated copper concentration. Plant Science, 176: 376-374.
- 17- Wang; 2006. PAL gene expression and activity. Advanced studies in Biology, 5:9, 403-412.

Anatomy of *Medicago sativa* and quantity medicarpin in different stages of development

Zarinkamar F and Asadi N.

Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Medicago sativa is from Fabaceae family that has several flavonoid compound in roots and shoots. Medicarpin is a dominant isoflavonoid that induces nod gene. In this study, PAL (phenyl alanine amonialyase) activity was assayed using spectrophotometer. In this research the concentration of medicarpin by HPLC (high performance liquid chromatography) were studied in different stages of development also anatomical structure of alfalfa were studied in different stages of development by optic microscope. The results indicated that activity of PAL enzyme are altered during the plant development. Changes of medicarpin content were correlated to the activity PAL enzyme. The highest level of the concentration of medicarpin and activity PAL enzyme were achieved budding stage of growth in root.

Key words: *Medicago sativa* L, Medicarpin, PAL enzyme, Stages of development