زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره دهم، زمستان ۱۳۹۰، صفحه ۲۳-۳۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۲۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۵/۱۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۷/۳۰

تأثیر کومارین بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱

شکوفه انتشاری * و فرزانه اهرابی
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، ج. ا. ایران

چکیده

برخی از فنل‌های گیاهی به عنوان ترکیبات آللوشیمیایی در پدیده آللوپاتی شرکت نموده، جوانه‌زنی، رشد و تکثیر گیاهان دیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند که نتیجهٔ این عمل غالباً کاهش محصولات زراعی است. از جهت دیگر می‌توان از ترکیبات فنلی در کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز استفاده نمود. از آنجایی که گیاه کلزا از جمله گیاهان اقتصادی و استراتژیک در بسیاری از کشورها، از جمله ایران است و هر ساله بر میزان سطح زیر کشت آن افزوده می‌گردد، بنابراین، با بررسی آثار آللوپاتیک برخی از ترکیبات فنلی بر روی این گیاه می‌توان به نتایج مفیدی دست یافت. در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) کومارین بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه، میزان رنگیزه‌ها، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز بررسی شده است. میزان رنگیزه‌های کلروفیل، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها به روش اسپکتروفتومتری، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز به ترتیب در طول موج‌های ۲۴۰ و ۴۳۶ نانومتر اندازه‌گیری گردید. کومارین باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های کلزا شد. میزان کلروفیل نیز در حضور این ترکیب فنلی کاهش یافت، درحالی که میزان آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم نظیر کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در حضور غلظت‌های کومارین از نظر آماری معنی‌دار نیست. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدان با افزایش غلظت این ترکیب فنلی، افزایش نشان داد. از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که حضور ترکیبات فنلی می‌تواند سبب کاهش عملکرد گیاه کلزا گردد، بنابراین، حذف علف‌های هرز از جنبه آللوپاتی نیز برای گیاه کلزا حایز اهمیّت است.

واژه‌های کلیدی: آللوپاتی، ترکیبات فنلی، کلزا، کومارین

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: dr.enteshari@nj.isfpnu.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۳۱۲۷۲۷۱۲۱

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آللوپاتی از واژهٔ یونانی «آللون» (Allelon) به معنی یکدیگر و پسوند «پاتو» یا «پاتوز» (Patho یا Pathose) به معنی رنج بردن یا بیماری و یا احساس منفی، مشتق شده است. مفهوم این واژه، برهم‌کنش‌های مثبت را در بر نمی‌گیرد. دگرآسیبی (آللوپاتی)، بخشی از دانش «اکولوژی شیمیایی» است و به آثار بازدارنده یا تحریکی یک گیاه (دهنده) بر رشد و نمو یا جوانه‌زنی گیاه دیگر (گیرنده) اشاره می‌نماید. Muller و همکاران (۲۰۰۰) واژهٔ تداخل را برای معرفی آثار یک گیاه بر گیاه دیگر و همچنین تأثیرات میکروارگانیسم‌ها بر گیاهان به‌کار بردند. تداخل شامل دگرآسیبی و رقابت است. مواد شیمیایی را که از طریق آللوپاتی ایجاد می‌شود، ترکیبات آللوشیمیایی می‌خوانند (میقانی، ۱۳۸۲). مواد شیمیایی مسؤول دگرآسیبی می‌توانند از گیاه زنده، برگ‌های جدا شده، تراوش‌های گیاه مرده و یا در نتیجهٔ تجزیهٔ میکروبی یا شیمیایی بقایای گیاه، آزاد شود. آلکالوئیدها و ترپنوئیدها به عنوان ترکیبات آللوشیمیایی عمل می‌کنند. ترکیبات فنلی به عنوان متابولیت‌های ثانویه می‌توانند رشد و تکثیر گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند (Inderjit, 1996). تحقیقات نشان داده است که ترکیبات فنلی بر فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اثر می‌گذارند (Leather and Einhellig, 1988). سمّیت ترکیبات آللوشیمیایی تابع غلظت، سن و مرحلهٔ متابولیسمی گیاه، فصل، اقلیم و شرایط محیطی است. علاوه بر این، تولید آنها نه تنها در طول سال، بلکه بر حسب سن، رقم و نوع اندام از نظر کمّی و کیفی متغیر است. غلظت ترکیبات آللوشیمیایی بر اثر تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش‌های دگرآسیبی در زمینه علوم کشاورزی و جنگلداری، حفظ نباتات، میکروبیولوژی، بیوشیمی، علوم خاک، شیمی فرآورده‌های طبیعی، علوم طبیعی، آسیب‌شناسی گیاهی و حشره‌شناسی، کاربرد دارد.

کلزا (*Brassica napus*) گیاهی متعلق به تیره شب‌بو (*Cruciferae-Brassicaceae*) است. این تیره از جدا گلبرگان، گیاهی علفی با دوره رشد یک‌ساله است. میوه به شکل‌های خورجین و خورجینک دیده می‌شود. بذرهای این گونه به رنگ سیاه هستند و نسبت روغن و پروتئین در بذر آن زیاد و مقدار الیاف در کنجاله کمتر است. با توجه به اهمیت اقتصادی و استراتژیک گیاه کلزا، بررسی آثار آللوپاتیک برخی از ترکیبات فنلی بر روی این گیاه می‌تواند نتایج مفیدی در راستای عملکرد این گیاه در بر گیرد (شریعتی و قاضی شهنی‌زاده، ۱۳۷۹؛ کیمبر و مک گرگور، ۱۳۷۸).

هدف اصلی پژوهش‌های آللوپاتی، ارائه علتی برای تداخل مواد شیمیایی در شرایط طبیعی و معرفی ترکیبات آللوشیمیایی است که از رشد گیاهان دیگر و میکروارگانیسم ها در اکوسیستم های طبیعی یا زراعی جلوگیری می کنند. هدف دیگر این علم، جداسازی و شناسایی ترکیبات آللوشیمیایی گیاهان یا میکروارگانیسم‌ها یا ترکیبات موجود در محیط و آثار تحریکی آنهاست، که بررسی محدودی روی آنها صورت گرفته است (میقانی، ۱۳۸۲).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی پاسخ‌های زیستی (جوانه‌زنی بذر و شاخص‌های رشد گیاهچه شامل وزن تر، وزن خشک ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، میزان رنگیزه‌ها، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز) گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ نسبت به تنش‌های ایجاد شده توسط ترکیب فنلی کومارین است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی بذرها

بذر کلزا (*Brassica napus*) رقم هایولا ۴۰۱ (Hayola 401) از شرکت دانه‌های روغنی استان فارس تهیه و در پاکت‌های کاغذی در دمای آزمایشگاه و دور از رطوبت نگهداری شد. بذرهای رقم هایولا ۴۰۱ به طور جداگانه با محلول هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند و بذرهای تقریباً هم اندازه به تعداد لازم انتخاب و در آزمایش‌ها استفاده شدند.

آماده‌سازی گیاهچه‌های کلزا

آماده‌سازی گیاهچه برای تعیین میزان رشد در حضور ترکیب فنلی کومارین بدین شکل بود که بذرهای ضدعفونی شده در سبدهای مخصوص جوانه زده و گیاهچه‌های ۷ روزه به ظروف حاوی محلول غذایی هوگلند منتقل شدند و در دمای محیط ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. غلظت‌هایی از ترکیب فنلی (برای انجام آزمایش‌های مختلف، حجم مشخصی از محلول پایه برداشته و با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلول‌های ترکیب فنلی کومارین با غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار حاصل گردد) به محلول هوگلند حاوی گیاهچه‌های ۷ روزه اضافه گردید. پس از تیمار گیاهچه‌ها به مدت یک هفته، گیاهچه‌های ۱۴روزه برای انجام آزمایش‌ها استفاده شدند. هر آزمایش در ۳ تکرار و در هر تکرار ۶ مشاهده بوده است. آزمون به شکل طرح کاملاً تصادفی بود و به منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P<0.05$) استفاده شد.

استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل

برای استخراج و اندازه‌گیری کلروفیل، ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ وزن و در هاون چینی قرار داده شد. پس از افزودن مقداری استون ۸۰ درصد، برگ کاملاً ساییده شده و حجم آن با استون ۸۰ درصد به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول فوقانی برای اندازه‌گیری کلروفیل استفاده شد. بدین منظور، جذب نور به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-A160 که قبلاً با استون ۸۰ درصد تنظیم شده بود، در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Arnon, 1956).

برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئیدها جذب محلول در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰ و ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Eijckelhoff and Dekker, 1997).

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین‌ها

برای اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین‌ها ۰/۱ گرم بافت تازه اندام هوایی در لوله آزمایش قرار داده شد. به هر لوله آزمایش متانول و کلریدریک اسید به نسبت ۱: ۹۹ اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شدند و سپس جذب نور در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Kallithraka *et al*., 2005).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، از گیاهچه‌های ۱۵ روزه برای استخراج آنزیم استفاده شد. یک گرم از بافت برگ در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم همگن گردید. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر Triton X-100 به آرامی اضافه و مخلوط

Archive of SID

www.SID.ir

گردید؛ به صورتی که این محلول کف نکند. Triton X-100 برای حل نمودن غشا و جدا شدن کاتالاز متصل به غشاست. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و به عنوان عصاره خام برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. همهٔ مراحل آزمایش در دمای حدود ۴ درجه سانتیگراد (درون ظرف یخ) صورت پذیرفت تا آنزیم توسط پروتئازها تجزیه نشود. سپس کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر در فواصل زمانی ۵ ثانیه به مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu (مدل UV-A160) اندازه‌گیری و تغییرات جذب نور نسبت به زمان رسم گردید تا فعالیت آنزیم محاسبه شود (Aebi, 1984).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در این آزمایش، از محلول ۰/۴ مولار گایاکول، محلول ۰/۰۳ مولار پراکسید هیدروژن، بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶ و کلرید پتاسیم جامد استفاده شد. ابتدا محلول ۰/۸ مولار کلرید پتاسیم تهیه شد؛ بدین صورت که به ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶، ۰/۷ گرم کلرید پتاسیم اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم بافت ریشه گیاهچه‌ها درون هاون چینی قرار داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر محلول هموژنه (بافر فسفات حاوی کلرید پتاسیم) در هاون ریخته و بافت ریشه به طور کامل ساییده شد.

کلرید پتاسیم برای آزاد شدن آنزیم‌های پراکسیداز متصل به غشا و دیواره سلول است. محلول همگن حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. افزایش جذب نور به علت تولید تتراگایاکول در طول موج ۴۳۶ نانومتر در فواصل زمانی ۱۵ثانیه برای مدت ۲ دقیقه ثبت شد و منحنی تغییرات جذب نسبت به زمان رسم شد تا فعالیت آنزیم محاسبه گردد. مایع فوقانی در لوله سانتریفیوژ به عنوان عصاره خام برای تعیین فعالیت آنزیم استفاده و به ترتیب در طول موج‌های ۲۴۰ و ۴۳۶ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mac-Adam and Nelson Sharp, 1992). اندازه‌گیری آنزیم‌ها به ازای گرم وزن تر برگ یا ریشه صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده حاصل از سنجش شاخص‌های مختلف رشد و نمو، از طریق طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس با ضریب اطمینان ۹۵ درصد توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح $\alpha=0.05$ با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۳، تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

با افزایش غلظت ترکیب فنلی کومارین کاهش در جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه‌های کلزا رقم هایولا ۴۰۱ مشاهده شده است. در حضور غلظت‌های بالای کومارین طول ریشه‌چه کلزا به طور معنی‌داری تحت تأثیر ترکیبات فنلی قرار گرفته و کاهش یافته است (جدول ۱). کاهش در طول ریشه‌چه در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار ترکیب فنلی کومارین از نظر آماری به ترتیب ۳۵ تا ۲۲ درصد نسبت به گروه شاهد بوده است (شکل ۱).

همچنین اثر کاهشی غلظت‌های مختلف ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کومارین بر وزن تر ساقه‌چه رقم هایولا ۴۰۱ به ترتیب به ۷۶ تا ۶۳ درصد نسبت به گروه شاهد رسید

Archive of SID

www.SID.ir

(جدول ۲). غلظت‌های مختلف کومارین سبب کاهش معنی‌دار وزن خشک ساقه‌چه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ شد (جدول ۳). در حضور غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کومارین، میزان کلروفیل به ترتیب ۸۲، ۸۰، ۷۰، ۶۷ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (جدول ۴).

غلظت‌های کومارین بر میزان کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها اثر افزایشی داشت، به طوری که در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کومارین میزان کاروتنوئیدها حدود دو برابر شاهد بود (جدول ۵ و شکل ۲).

میزان آنتوسیانین‌ها در حضور غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۵ ابتدا کاهش جزئی یافته و سپس در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کومارین، به ترتیب ۱۳۶ و ۱۲۶ درصد افزایش نسبت به گروه شاهد شده است که این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار است. همچنین، در حضور کومارین افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار معنی‌دار بوده و به ۱/۴۲ و ۱/۴۴ برابر شاهد رسیده است (شکل ۳).

در حضور این ترکیب فنلی فعالیت آنزیم کاتالاز در همهٔ غلظت‌های مورد آزمایش کاهش مختصری یافته که این میزان کاهش از نظر آماری معنی‌دار نیست (جدول ۶). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ تحت تأثیر ترکیب فنلی کومارین قرار نمی‌گیرد. شکل ۴ اثر کاهندهٔ غلظت‌های مختلف کومارین (برحسب میلی‌مولار) بر رشد گیاهچه‌های ۱۴ روزه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ را نشان می‌دهد.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف کومارین (بر حسب میلی‌مولار) بر طول ریشه‌چه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌متر)

تیمار	غلظت (mM)				
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵	۱۰
کومارین	۶۲/۱۳±۶/۲۰ (۱۰۰)	۶۱/۴۳±۶/۹۲ (۹۹)	۵۶/۰۰±۹/۴۳ (۹۰)	۲۱/۵۳±۷/۸۷ (۳۵)*	۱۳/۸۰±۴/۴۰ (۲۲)*

شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر رشد طولی ریشه‌چه‌های کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌متر)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر وزن تر ساقه‌چه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌گرم)

تیمار	غلظت (mM)				
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵	۱۰
کومارین	۱۶۳/۳۶±۱۱/۷۱ (۱۰۰)	۱۷۲/۵۰±۷/۷۸ (۱۰۵)	۱۵۰/۴۶ ±۹/۵۷ (۹۲)	۱۲۴/۷۳±۱۷/۰۱ (۷۶)*	۱۰۴/۰۳±۱۸/۶۷ (۶۳)*

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر وزن خشک ساقه‌چه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌گرم)

تیمار	غلظت (mM)				
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵	۱۰
کومارین	۱۴/۲۶±۱/۳۵ (۱۰۰)	۱۵ ±۱/۹۶ (۱۰۵)	۱۲/۸ ±۱/۱۱ (۸۹)	۱۰/۸۳ ±۱/۲۶ (۷۶)*	۷/۳۶ ±۱/۵۳ (۵۱)*

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر میزان کلروفیل کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ)

تیمار	غلظت (mM)				
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵	۱۰
کومارین	۱۶۳/۳۶±۱۱/۷۱ (۱۰۰)	۱۷۲/۵۰±۷/۷۸ (۱۰۵)	۱۵۰/۴۶±۹/۵۷ (۹۲)	۱۲۴/۷۳±۱۷/۰۱ (۷۶)*	۱۰۴/۰۳±۱۸/۶۷ (۶۳)*

جدول ۵- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر میزان آنتوسیانین کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌گرم آنتوسیانین در گرم وزن تر برگ)

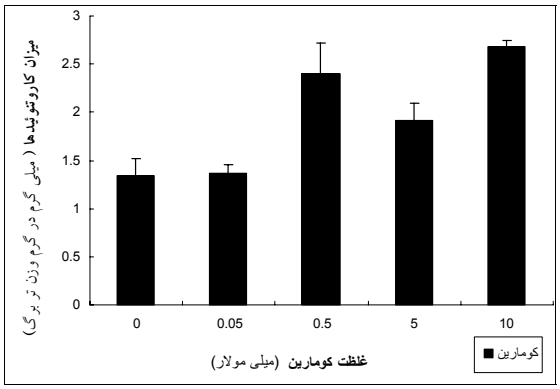
تیمار	غلظت (mM)				
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵	۱۰
کومارین	۰/۱۹±۰/۰۲ (۱۰۰)	۰/۱۷±۰/۰۳ (۸۹)	۰/۱۷±۰/۰۱ (۸۹)	۰/۲۶±۰/۰۲ (۱۳۶)*	۰/۲۴±۰/۰۰ (۱۲۶)*

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (میکرومول در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر بافت گیاه)

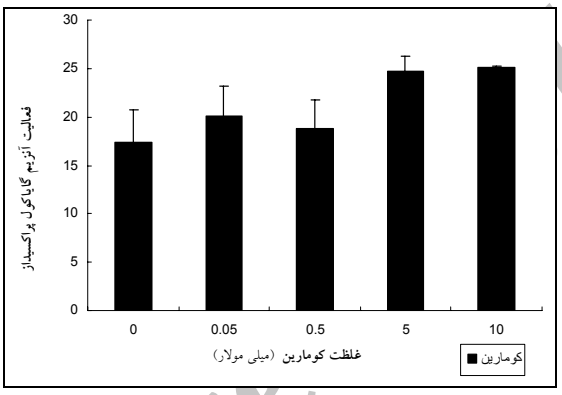
تیمار	غلظت (mM)				
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵	۱۰
کومارین	۰/۲۸۸±۰/۰۲۵ (۱۰۰)	۰/۲۷۴±۰/۰۴۸ (۹۵)	۰/۲۶۲±۰/۰۴۸ (۹۱)	۰/۲۶۷±۰/۰۴۵ (۹۲)	۰/۲۳۲±۰/۰۴۱ (۸۰)

Archive of SID

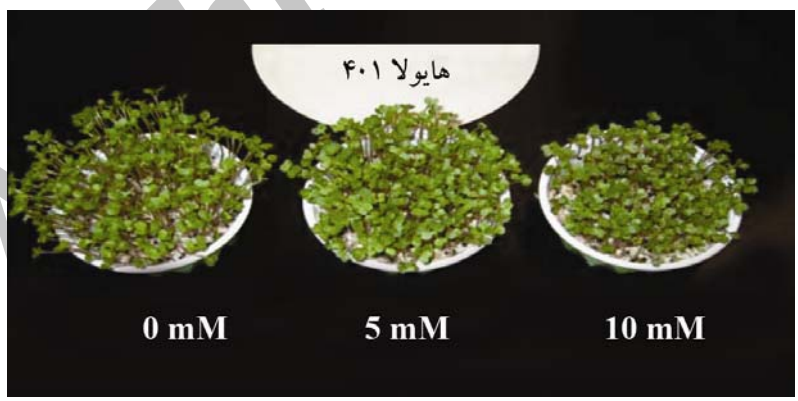
www.SID.ir



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر میزان کاروتنوئیدهای کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی‌گرم کاروتنوئید در گرم وزن تر برگ)



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میکرومول در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر بافت گیاه)



شکل ۴- اثر برخی غلظت‌های کومارین (بر حسب میلی‌مولار) بر رشد گیاهچه‌های ۱۴ روزه کلزا رقم هایولا ۴۰۱

بحث و نتیجه‌گیری

اثر ترکیب فنلی کومارین بر جوانه‌زنی

در پژوهش حاضر نشان داده شده است که با افزایش غلظت ترکیب فنلی کومارین میزان جوانه‌زنی بذرهای کلزا رقم هایولا ۴۰۱ کاهش یافته است؛ به طوری که در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کومارین میزان جوانه‌زنی ۷۷/۸ درصد نسبت به گروه شاهد است. تحقیقاتی که بر گیاه کلزا صورت گرفته، نشان می‌دهد

www.SID.ir

که ترشحات کلزا شامل ترکیباتی است که بر جوانه‌زنی بذر سویا تأثیر می‌گذارد و آثار آللوپاتیک قسمت‌های مختلف کلزا بر جوانه‌زنی گیاه سویا نقش بازدارنده دارد. غلظت‌های بالای ترشحات فنلی جدا شده از گیاهچه کلزا سبب کاهش جوانه‌زنی و رشد طولی گیاهچه سویا در مقایسه با گروه شاهد می‌شود (Haddadchi and Gerivani, 2009).

Reigosa و همکاران (۱۹۹۹) اثر شش ترکیب فنلی (شامل فرولیک اسید، گالیک اسید، کوماریک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید و وانیلیک اسید) را بر جوانه‌زنی برخی از علف‌های هرز (شامل *Chenopodium album* L.، *Plantago lanceolata*، *Amaranthus retroflexus*، *Solanum nigrum* L.، *Cirsium sp.* و *Rumex crispus* L.) آزمایش کردند. مطالعات آنها نشان داد، غلظت‌های بالای ترکیبات فنلی بر جوانه‌زنی بذرهای گیاهان تحت آزمایش اثر بازدارنده داشته، در حالی که غلظت‌های پایین این ترکیبات تأثیری بر جوانه‌زنی بذرها ندارد و حتی محرکی برای جوانه‌زنی نیز بوده است. آنها دریافتند ترکیبی از ترکیبات آللوشیمیایی ذکر شده می‌تواند باعث تشدید آثار بازدارنده گردد. همچنین، مطالعات انجام شده توسط Schuab و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که کوماریک اسید باعث تأخیر در جوانه‌زنی بذرهای گیاه سویا می‌شود.

NG و همکاران (۲۰۰۳) آثار فیزیولوژیک برخی ترکیبات آللوشیمیایی (شامل سینامیک اسید، بنزوئیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید، گالیک اسید و وانیلیک اسید) را بر جوانه‌زنی بذرهای کلزا بررسی کردند. مطالعات آنها نشان داد که پس از تیمار ۱۲۰ ساعته بذرهای کلزا توسط سینامیک اسید، کافئیک اسید، پاراکوماریک اسید، بنزوئیک اسید و پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید تغییری در درصد جوانه‌زنی بذرها مشاهده نمی‌شود، درحالی‌که گالیک اسید، وانیلیک اسید، سالیسلیک اسید و فرولیک اسید باعث کاهش جوانه‌زنی بذرهای کلزا می‌شوند.

Turk و Tawaha (۲۰۰۳) مشاهده کردند که ترشحات گیاه کلزا (*Brassica nigra*) به کاهش جوانه‌زنی گیاه *Avena fatua* منجر می‌گردد. بیشترین آثار آللوپاتیک در گیاهان به ترشحاتی مربوط است که از بافت‌های مختلف برگ استخراج شده‌اند.

اثر ترکیب فنلی کومارین بر رشد گیاهچه‌های کلزا

در پژوهش حاضر نشان داده شده است که با افزایش غلظت ترکیب فنلی کومارین، میزان رشد گیاهچه‌های کلزا رقم هایولا ۴۰۱ کاهش یافته است. در حضور غلظت‌های بالای کومارین طول ریشه‌چه کلزا به طور معنی‌داری تحت تأثیر ترکیب فنلی کومارین قرار گرفته و کاهش یافته است. این کاهش در طول ریشه‌چه در غلظت‌های بالای کومارین معنی‌دار بوده است. همچنین، غلظت‌های مختلف کومارین اثر کاهشی بر وزن تر ساقه‌چه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ داشته‌اند. اثر غلظت‌های مختلف کومارین موجب کاهش وزن خشک ساقه‌چه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ شد، که در غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌مولار معنی‌دار بوده است.

تأثیرات منفی ترکیبات فنلی بر رشد گیاه کلزا توسط Baleroni و همکاران (۲۰۰۰) نیز گزارش شده است که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات آنها نشان داد، غلظت‌های بالای سینامیک اسید به کاهش رشد طولی ریشه گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ منجر می‌شود. همچنین، با افزایش غلظت ترکیبات فنلی مانند فرولیک اسید، وزن ریشه و یا در واقع رشد ریشه گیاه کلزا کاهش می‌یابد. با توجه به مطالعات Vanghan و Ord (۱۹۹۰) وانیلیک اسید، پارا کوماریک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید و فرولیک اسید در غلظت‌های بالا (یک میلی‌مولار) سبب کاهش رشد ریشه‌ها در *Pisum sativum* شده‌اند. همچنین، اسیدهای فنلی یاد شده بر مورفولوژی ریشه اثر گذاشته، به طوری که با تأثیر بر رشد ریشه اصلی، تعداد، اندازه و ضخامت ریشه‌های جانبی نیز تغییر کرده است. میزان تأثیر ترکیبات فنلی بر رشد به نوع این ترکیبات بستگی دارد و برای آنکه این ترکیبات بیشتر اثر خود را اعمال کنند، باید به طور دایم در محیط گیاه وجود داشته باشند. تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها، مراحل ضروری در نمو ریشه هستند.آللوکمیکال‌هایی مانند کومارین و آمبلی فرون می‌توانند تغییراتی در این مراحل ایجاد کنند. غلظت‌هایی از ترکیبات فنلی که افزایش در طول ریشه اصلی را مهار می‌کنند، از تقسیم سلولی نیز جلوگیری می‌نمایند.

تحقیقات نشان دادند چنانچه گیاهچه‌های ۳ روزه سویا به مدت ۴۸ ساعت در معرض کومارین و پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید قرار داده شوند، رشد طولی ریشه‌چه در آنها کاهش پیدا می‌کند. عدم تعادل برخی هورمون‌ها با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، سبب کاهش رشد در گیاه می‌گردد. مونو فنل‌هایی مانند پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید، وانیلیک اسید، پارا کوماریک اسید میزان اکسین را از طریق افزایش دکربوکسیدلاسیون اکسین کاهش می‌دهند (Doblinski *et al*., 2003).

همچنین، Einhellig و Eckrich (۱۹۸۴) تأثیر غلظت یک میلی‌مولار از ترکیب پاراکوماریک اسید را بر رشد طولی ریشه‌چه گیاه کلزا بررسی کردند. مطالعات آنها نشان داد، ترکیبات فنلی سبب تنش اکسیداتیو می‌شوند که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) است. این رادیکال‌ها شامل پراکسید هیدروژن، سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل هستند. رادیکال‌های فعال اکسیژن باعث تخریب ماکرومولکول‌ها می‌شوند و با صدمه زدن به غشای سلولی از رشد ریشه و ساقه جلوگیری می‌کند. برای کاهش این رادیکال‌ها در گیاه، دو سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل غیر آنزیمی و آنزیمی وجود دارد: آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند گلوتاتیون، فلاونوئید، کاروتنوئید و آسکوربات هستند و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نیز سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیدازها، کاتالاز و آنزیم‌های مسؤول تجدید آسکوربات احیا شده هستند. همچنین، مطالعات انجام شده توسط Balenori و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که برخی از ترکیبات فنلی سبب کاهش معنی‌داری در رشد ساقه‌چه‌های گیاه کلزا می‌گردد. از طرف دیگر، کاهش طول ساقه‌های گیاه سورگوم در حضور فرولیک وکوماریک اسید توسط Rasmussen و Einhelling (۱۹۷۷) بررسی و مشخص شده است که فرولیک اسید و کومارین وزن گیاهچه سورگوم را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهند.

NG و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند که ترکیبات فنلی مانند سینامیک اسید، پاراکوماریک اسید،

Archive of SID

www.SID.ir

بنزوئیک اسید، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید، گالیک اسید، وانیلیک اسید، فرولیک اسید به کاهش وزن تر اندام‌های هوایی گیاه کلزا منجر می‌شوند.

همچنین مطالعات انجام شده توسط Haddadchi و Gerivani (۲۰۰۹) نشان داد که عصاره کلزا بر رشد گیاهچه سویا اثر بازدارنده دارد و وزن خشک ساقه گیاهچه سویا تحت تأثیر ترکیبات فنلی موجود در عصاره گیاه کلزا کاهش می‌یابد.

اثر ترکیب فنلی کومارین بر رنگیزه‌ها، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز گیاهچه کلزا

در پژوهش انجام شده پس از تیمار گیاهچه‌های کلزا رقم هایولا ۴۰۱ توسط ترکیب فنلی کومارین، کاهش در میزان کلروفیل و افزایش در میزان کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها صورت گرفته است، که افزایش در میزان آنتوسیانین‌ها نسبت به کاروتنوئیدها کمتر بوده است. همچنین، با آزمایش‌های صورت گرفته مشخص شده است که میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در حضور ترکیب فنلی کومارین افزایش یافته و در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش معنی‌داری صورت نگرفته است.

احتمالاً به دلیل افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن در رویارویی گیاه با تنش آللوپاتیک، افزایش آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی پایین مانند کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌هایی با وزن مولکولی بالا مانند آنزیم گایاکول پراکسیداز صورت گرفته تا سبب حذف آثار ترکیب فنلی شود و گیاه صدمه جدی نبیند.

Mattagajasingh و Kar (۱۹۸۹) مشاهده کردند که در حضور برخی غلظت‌های ترکیبات فنلی میزان کلروفیل در برگ گندم افزایش یافته است.همچنین، مطالعات انجام شده توسط Khosravinejad و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که کلرید سدیم باعث کاهش میزان کلروفیل و افزایش میزان کاروتنوئیدها در دو رقم جو می‌شود. در رقمی که میزان کلروفیل کاهش بیشتری یافته، افزایش کاروتنوئید بیشتر بوده است.

بررسی اثر وانیلیک اسید، کلروژنیک اسید، فرولیک اسید و پاراکوماریک اسید بر فتوسنتز در سلول‌های برگ گیاه *Abutilon theophrasti* که بر اساس میزان CO_2 تثبیت شده (Calvin cycle) انجام می‌شود، نشان داده است که وانیلیک اسید و فرولیک اسید در غلظت یک میلی‌مولار آثار بازدارندگی بر فتوسنتز اعمال می‌کنند، در صورتی که کلروژنیک اسید و پاراکوماریک اسید تأثیر بازدارندگی بر فتوسنتز ندارند (Einhellig and Stille, 1979). تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی، تنش فلزات سنگین و متابولیت‌های ثانویه نیز سبب افزایش در میزان آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم نظیر کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها در گیاهان و جلبک‌ها می‌گردند (میقانی، ۱۳۸۲).

اثر شوری بر افزایش میزان کاروتنوئیدها در گیاه گوجه‌فرنگی توسط Kraub و همکاران (۲۰۰۰) گزارش شده است. بر اساس پژوهش‌های انجام شده توسط Smironff (۱۹۹۳) مشخص گردید که حضور کومارین در غلظت یک میلی‌مولار در گیاه برنج (*Oryza sativa*) سبب کاهش سریع فعالیت آنزیم‌های پراکسیدازی می‌گردد، اما در غلظت‌های بالاتر (۱۰ میلی‌مولار) فعالیت این آنزیم‌ها به حالت طبیعی خود

Archive of SID

www.SID.ir

بازگشته است. آثار تنش محیطی بر گیاهان کلم قرمز و گوجه‌فرنگی، تخریب کلروفیل و افزایش آنتوسیانین را نشان داد (Eryilmaz, 2006). مطالعات Politycka (۱۹۹۶) بر آثار ترکیبات فنلی بر فعالیت آنزیم پراکسیدازی در گیاهچه کدو نشان داد که ترکیبات فنلی مشتقات سینامیک اسید نسبت به مشتقات بنزوئیک اسید تأثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم اعمال می‌کنند.

پژوهش‌های متعدد حاکی از افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و پراکسیداز و آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی نظیر فلاونوئیدها در حضور تنش‌های محیطی در برخی از گیاهان است (Teixeira *et al*., 2005; Telesinski *et al*., 2008).

Haddadchi و Gerivani (۲۰۰۹) در بررسی خود بر گیاه سویا به این نتیجه رسیدند که ترکیبات فنلی موجود در قسمت‌های مختلف کلزا، تفاوت معنی‌داری بر فعالیت کاتالاز ندارد. این نتیجه، با مشاهدات موجود در پژوهش حاضر هماهنگی دارد.

جمع‌بندی

به علت تنوع ساختمانی ترکیبات آللوشیمیایی، به نظر نمی‌رسد که آثار اولیه آنها یکسان باشد، بلکه مکانسیم‌های مختلفی از تغییر در فراساختار غشایی تا تغییر در کنترل بیان ژن و فعالیت آنزیم‌ها و رنگیزه‌ها را می توانند در بر گیرد و موجب ایجاد برخی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک شوند که در نهایت، کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را سبب می گردند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در حضور کومارین، کاهش در رشد گیاهچه کلزا (شامل کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، کاهش وزن تر و خشک بخش هوایی و زمینی گیاه) و کاهش در میزان کلروفیل و افزایش در میزان کاروتنوئید و آنتوسیانین‌ها صورت می‌پذیرد، اما افزایش در میزان آنتوسیانین‌ها نسبت به کاروتنوئیدها کمتر بوده است. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز توسط کومارین افزایش یافته، در حالی که در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش معنی‌داری صورت نگرفته است.

نتایج نشان می‌دهد که گیاه کلزا به ترکیبات فنلی حساس است، بنابراین، کنترل علف‌های هرز در مزارع کلزا از جنبه آللوپاتی نیز حایز اهمیت است. از ترکیبات فنلی می‌توان به عنوان چالشی نوین در تولید علف‌کش‌های سازگار با محیط زیست نیز استفاده نمود. علاوه بر آن، دگرآسیبی به عنوان استراتژی کاهش آلودگی محیط و افزایش تولیدات کشاورزی در کشاورزی پایدار، مطرح می گردد. بنابراین، این دانش اهمیت جهانی یافته و نزد متخصصان علوم کشاورزی و زیستی، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است.

منابع

شریعتی، ش. و قاضی شهنی‌زاده، پ. (۱۳۷۹) کلزا، وزارت جهاد کشاورزی، تهران.

کیمبر، دی. و مک گرگور، دی. آی. (۱۳۷۸) کلزا فیزیولوژی، به‌نژادی، تکنولوژی زیستی. ترجمه عزیزی، م.، سلطانی، ا. و خاوری خراسانی، س. انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد.

Archive of SID

www.SID.ir

میقانی، ف. (۱۳۸۲) آللوپاتی (دگرآسیبی). انتشارات پرتو واقعه، تهران.

Aebi, H. (1984) Catalase invitro: Methods of Enzymatic Analysis. Academic press, New York.

Arnon, D. I. (1956) Photosynthesis by isolated chloroplast IV centeral concept and comparison of three photochemical reaction. Biochimica et Biophysica Acta 20: 449-461.

Baleroni, C. R. S., Ferrarese, M. L. L., Braccini, A. L., Scapim, C. A. and Ferrarese-filho, O. (2000) Effects of ferulic and *p*-coumaric acids on canola (*Brassica napus* L. cv Hayola 401) seed germination. Seed Science and Technology 28: 333-340.

Doblinski, P. M. F., Ferrarese, M. L. L., Huber, D. A., Scapim, C. A., Braccini , A. L. and Ferrarese-filho, O. (2003) Peroxidase and lipid peroxidase of soybean roots in response to *p*-coumaric and *p*-hydroxybenzoic acids. Brazilian archivesbof Biology and Technology 46(2): 193-198.

Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophylla, pheophytin and β-carotene contents of isolated photosystem Π reaction center complexes. Photosynthesis Research 52: 69-73.

Einhellig, F. A. and Eckrich, P. C. (1984) Interactions of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. Journal of Chemical Ecology 10: 161-170.

Einhellig, F. A. and Stille, M. L. (1979) Effects of ferulic and *p*-coumaric acids on plant water status. Botanical Society of America 157: 40-41.

Eryilmaz, F. (2006) The relationships between salt stress and antocyanine content in higher plants. Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment 15: 47-52.

Haddadchi, G. R. and Gerivani, Z. (2009) Effects of phenolic extracts of canola (*Brassica napus* L.) on germination and physiological responses of soybean (*Glycin max* L.) seedlings. International journal of Plant Production 3(1): 63-74.

Inderjit, K. (1996) Plant phenolics in allelopathy. Botanical Review 62: 168-202.

Kallithraka, S., Mohdaly, A. A., Makris, D. P. and Kefalas, P. (2005) Determination of major anthocyanin pigments in hellenic native grape varieties (*Vitis unifera* sp.) association with antiradical activity. Journal of Food Composition and Analysis 18: 375-386.

Khosravinejad, F., Heydari, R. and Farboobnia, T. (2008) Effects of salinity on photosynthetic pigments, respiration, and water content of two barley varieties. Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 2438-2442.

Kraub, S., Schnitzler, W. H., Grabmann, J. and Woitke, M. (2000). Content and antioxidantive capacity of carotenoids, α-tocopherol and polyphenolics in compartmentation of tomatos grown under saline conditions. Journal of Acta Hotticulture 43: 283-288.

Leather, G. R. and Einhellig, F. A. (1988) Bioassay of naturally occurring allelochemicals for toxicity. Chemical Ecology 14: 1821-1828.

Mac-Adam, J. W. and Nelson Sharp, C. J. (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. Plant Physiology 99: 872-878.

Mattagajasingh, S. N. and Kar, M. (1989) Changes in the antioxidant system during the greening of etiolated wheat leveas. Journal of Plant Physiology 134: 656-660.

Muller-Scharer, H., Scheepens, P. C. and Greaves, M. P. (2000) Biological control of weeds in European crops: recent achievements and future work. Weed Research 40(1): 83-98.

NG, P. L. L., Ferrarese, M. L. L., Huber, D. A., Ravagnani, A. L. S. and Ferrarese-filho, O. (2003) Canola (*Brassica napus* L.) seed

Archive of SID

www.SID.ir

germination influenced by cinnamic and benzoic acids and derivatives: effects on peroxidase. Seed Science and Technology 31(1): 39-46.

Politycka, B. (1996) Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids. Acta Physiologia Plantarum 18(4): 365-370.

Rasmussen, J. A. and Einhellig, F. A. (1977) Synergistic inhibitory effects of *p*-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. Journal of Chemical Ecology 3(2): 197-205.

Reigosa, M. J., Souto, X. C. and Gonzlez, L. (1999) Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. Plant Growth Regulation 28(2): 83-88.

Schuab, S. R. P., Braccini, A. L., Ferrares-filho, O. F., Scapim, C. A. and Braccini ,M. C. L. (2001) Physiological seed quality evaluation and seedling lipid and protein content of soybean (*Glysin max* L.) in the presence of *P*-coumaric acid. Seed Science and Technology 29: 151-162.

Smironff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist 125: 27-58.

Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Galvao, V. C. and Margis-Pinheiro, M. (2005) Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. Genetic and Molecular Biology 28: 529-538.

Telesinski, A., Nowak, J., Smolik, B., Bubowska, A. and Skrzypiec, N. (2008) Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean plants. Journal of Elementology 13: 401-409.

Turk, M. A. and Tawaha, A. M. (2003) Allelopathic effect of black mustard (*Brassica napus* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). Crop Protection 22: 673-677.

Vanghan, D. and Ord, B. (1990) Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *pissum sativum*. Journal of Sciences of Food and Agriculture 52: 289-299.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of coumarin on some biochemical and physiological responses of canola, Hyola 401 cultivar

Shekoofeh Enteshari * and Farzaneh Ahrabi

Department of Biology, Payame Noor University, 19395-4697 Tehran, I. R. of IRAN

Abstract

Some plant phenolics as allelochemicals take part in allelopathy and affect seed germination and seed growth, thereby reduce plant productivity. On the other hand, these allelochemicals maybe used to control pests, plant pathogens and eradication of weeds. In the present study, the effects of different concentrations of coumarin (0, 0.05, 0.5, 5 and 10 Mm) on seed germination, seedling growth, pigments content, activity of catalase and guiacol peroxidase were investigated. Pigments content was measured spectrophotometrically, catalase and guiacol peroxidase activities were determined at 240 and 436 nm. Coumarin reduced seed germination and seedling growth of canola Hyola 401 cultivar. Cholorophyll content was also decreased in the presence of this phenolic compound. Low molecular weight antioxidants, such as carotenoids and anthocyanins, were increased by coumarin. At higher concentrations of coumarin, catalase activity was not decreased significantly. Guaicol peroxidase, an antioxidant enzyme showed a significantly increase in activity in the presence of this phenolic compound. We concluded that this allelochemicals investigation could result in the development of herbicides with less adverse effect on environment and ecosystem. The presence of some phenolic compounds can reduced canola yield therefore, elimination of weeds, containing these compound are very important, from allelopathic point of view, to enhance canola production.

Key words: Allelopathy, Canola, Coumarin, Phenolic compounds

***** Corresponding Author: dr.enteshari@nj.isfpnu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir