مقاله کامل پژوهشی

اثرات تنش ناشی از ترکیب دگرآسیب (-)- کاروون بر جوانه زنی، رشد و فعالیت برخی آنزیم ها در گیاه کاهو

سید مهدی رضوی* سحر حسین زاده، سعید لطیفی نوید

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

چکیده

کاروون (Carvone) ترکیبی از مونوترپن‌ها بوده و در تیره نعناع متداول است و برخی گزارش‌ها حاکی از اثرات بارز دگرآسیبی در این ماده می‌باشد. در این پژوهش، ابتدا تاثیر غلظت‌های مختلف این ماده (یک میکروگرم تا یک میلی‌گرم در میلی لیتر) بر جوانه زنی بذر، رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاه کاهو (*Lactuca sativa* cv. Siahoo) مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد، دانه‌رست‌های این گیاه در بستر پیت رشد داده شده و با محلول غذایی هوگلند واجد کاروون (یک میکروگرم در میلی لیتر) آبیاری شده و اثر این ماده بر روی برخی جنبه‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی این گیاه و الگوی الکتروفورزی پروتئین بررسی گردید. نتایج نشان داد که جوانه‌زنی دانه و رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاه کاهو در غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون کاهش و در غلظت‌های بالاتر به‌طور کامل مهار می‌گردد. در دانه‌رست‌های کشت شده در غلظت فوق نیز وزن تر و خشک، مقدار کلروفیل و پراکسید هیدروژن کاهش یافت. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پروتئاز افزایش یافت ولی تغییری در فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز صورت نگرفت. غلظت پروتئین کل در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد کاهش یافت و تغییرات قابل توجهی در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ به صورت حذف برخی باندها تحت تاثیر تیمار مشاهده گردید. این پژوهش نشان داد ترکیب دگر آسیب کاروون باعث بروز برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاه کاهو می‌شود که شباهت زیادی با پاسخ‌های القاء شده تحت تنش‌های غیر زیستی دارد.

واژه‌های کلیدی: دگرآسیبی، (-)-کاروون، کاهو، الگوی الکتروفورزی، آسکوربات پراکسیداز، پروتئاز، پلی فنل‌اکسیداز

مقدمه

برخی گیاهان ترکیبات شیمیایی خاصی به محیط آزاد می‌کنند که مانع جوانه‌زنی و رشد سایر گونه‌های گیاهی می‌باشند. این ترکیبات شیمیایی را ترکیبات دگرآسیب (Allelochemical) یا ترکیبات آللوشیمیایی می‌نامند. گیاهان تولید کننده این ترکیبات از این روش در جهت حذف گیاهان مجاور و رقیب استفاده می‌کنند. مواد دگرآسیب با اثر بر تقسیم سلولی، تولید هورمون‌های گیاهی، ارتباطات آبی، پایداری و نفوذپذیری غشاء، جذب یون، جوانه‌زنی دانه گرده، سنتز رنگیزه‌ها، سنتز پروتئین و فعالیت ویژه آنزیم‌ها بر رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارند [۹ و ۱۶]. آلکالوئیدها و ترپنوئیدها به‌عنوان متداول‌ترین ترکیبات دگرآسیب به‌حساب می‌آیند و ترپنوئیدها به‌دلیل فرار بودن تاثیر سریع‌تری در بسیاری از زیستگاه‌ها دارند [۱۶].

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: razavi694@gmail.com

کاروون (Carvone) با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$ ترکیبی با ماهیت مونوترپنی است [۱۱]. این ترکیب دارای دو انانتیومر است که هر کدام بوی متفاوتی داشته و جزء اصلی تشکیل دهنده اسانس میوه گیاه زیره سیاه (*Carum carvi*) می‌باشند. در شوید (*Anethum graveolens*) نیز این ترکیب به مقدار قابل توجهی یافت می‌شود [۷]. کاروون در روغن پوست پرتقال و اسانس برخی گونه‌های تیره نعناع نیز دیده می‌شود و گیاه نعناع منبع اصلی تولید کاروون در طبیعت است. برخی روغن‌های گیاهی نیز از جمله روغن گیاه زنجبیل دارای مخلوطی از دو انانتیومر کاروون هستند. بسیاری دیگر از روغن‌های طبیعی تیره نعناع نظیر اسانس نعناع، حاوی مقادیر هر چند ناچیز از کاروون می‌باشند [۱۷].

امروزه هدف اصلی پژوهش‌های دگرآسیبی، شناخت نحوه عملکرد ترکیبات دگرآسیب در شرایط طبیعی و معرفی ترکیبات دگرآسیبی می‌باشد که در اکوسیستم‌های زراعی از رشد علف‌های هرز و حتی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری نمایند. با توجه به اثرات زیان‌بار زیست محیطی علف‌کش‌ها، استفاده از ترکیبات شیمیایی طبیعی جهت دفع علف‌های هرز موضوع پژوهش‌های گسترده در سال‌های اخیر می‌باشد [۱۰].

بررسی‌های گذشته نشان داده است که کاروون اثرات دگرآسیبی قابل توجهی داشته و به‌ویژه بر روی رشد ریشه‌چه گیاه کاهو اثر بازدارنده دارد [۳ و ٦]. نشان داده شده است که اسانس‌های گیاهی که واجد مقادیر قابل توجهی از ماده کاروون می‌باشند قابلیت دگرآسیبی قابل توجهی دارند [۱۵]. با این حال تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد سازوکار تاثیر این ماده و نحوه پاسخ گیاه به آن از دیدگاه فیزیولوژیک و بیوشیمیایی صورت نگرفته است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی پاسخ‌های گیاه کاهو که گونه‌ای شاخص و استاندارد در بررسی‌های دگرآسیبی محسوب می‌شود، به ماده کاروون از برخی جنبه‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی است.

مواد و روش‌ها

تعیین غلظت بهینه کاروون با بررسی تاثیر آن بر برخی شاخص‌های رشد

ابتدا تاثیر غلظت‌های مختلف ماده‌ی کاروون (Fluka, 22060) بر جوانه‌زنی گیاه کاهو (رقم سیاهو) در سه تکرار و در قالب طرح بلوک‌های تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. محلول این ماده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر با حل کردن در آب مقطر و با افزودن چند قطره توین-۲۰ (Tween-20, Gerbu, 20304) تهیه شد. بذرهای شاهد با استفاده از آب مقطر آبیاری شدند. ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر در ظروف پتری که قبلا در اتوکلاو در ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، به‌مدت ۲۰ دقیقه سترون شده بودند، جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. در داخل هر ظرف پتری ۱۲ عدد بذر بر روی کاغذ صافی قرار داده شد و پنج میلی‌لیتر از محلول کاروون با غلظت معین به آن اضافه گردید. ظروف پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار گرفته و شمارش بذرهای جوانه زده روزانه و تا ۱۰ روز انجام گرفت. در پایان این مدت، درصد کل جوانه‌زنی بذرها محاسبه شده و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه دانه‌رست‌ها نیز در هر ظرف پتری با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد.

کشت گیاهان و تیمارها

دانه‌رست‌های گروه شاهد و تیمار شده با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر کاروون، به گلدان‌های حاوی پیت منتقل شده و در داخل ژرمیناتور به‌مدت ٦۷ روز تحت روشنایی ٦۰۰۰ لوکس که با لامپ مهتابی تامین می‌شد، رشد داده شدند. گیاهان گروه شاهد روزانه با محلول غذایی هوگلند و گیاهان گروه تیمار علاوه بر محلول هوگلند با کاروون (یک میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مقدار ۱۰ میلی‌لیتر در روز برای هر گلدان آبیاری گردیدند. گیاهان تا رسیدن به مرحله‌ی هفت برگی (۹/۵ هفته) رشد داده شده و سپس برداشت شدند.

پس از برداشت، وزن تر اندام هوایی تعیین شد، سپس نمونه‌ها درون پاکت‌هایی جداگانه و در داخل آون در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت خشک و توزین شدند. ریشه‌های داخل هر گلدان با دقت خارج شد و پس از شسته شدن، وزن تر ریشه تعیین شد و وزن خشک نیز پس از خشک شدن در آون اندازه گیری گردید.

سنجش کلروفیل و غلظت پراکسید هیدروژن در برگ

مقدار کلروفیل دانه‌رست‌های گروه شاهد و تیمار شده براساس واحد نسبی (SPAD) با دستگاه کلروفیل‌متر سنجش شد. این اندازه‌گیری از بخشی مابین رگبرگ اصلی و حاشیه برگ صورت گرفت. برای سنجش پراکسید هیدروژن، یک گرم نمونه‌ی برگ خرد شده و به آن پنج میلی‌لیتر محلول تری کلرو

استیک اسید یک در صد اضافه شد. نمونه‌ی همگن شده در دور ۱۲۰۰۰ و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و ۰/۵ میلی-لیتر از روشناور با پنج میلی‌لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و یک میلی‌مولار KI ترکیب شد و جذب محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر (PG Instrument, UK) در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد ترسیم و غلظت پراکسید هیدروژن محاسبه گردید [٤]. برای ترسیم منحنی استاندارد، آب اکسیژنه در غلظت‌های بین ۱۰-۲ میلی‌مولار تهیه گردید و ۰/۵ میلی‌لیتر از هر غلظت با پنج میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر KI یک مولار ترکیب شد و جذب محلول‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [٤].

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌ها

ریشه‌ی گیاه در داخل هاون چینی کوچک قرار داده شده، مقداری ازت مایع روی آن ریخته و تا حد پودر شدن کوبیده شد. سپس ۰/۱ میلی‌گرم از ریشه همگن شده به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و یک میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه شد و بلافاصله داخل یخ قرار گرفتند. نمونه‌ها با سرعت g ۱٦۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور آن‌ها جدا و داخل میکروتیوب‌های جدید منتقل شد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. این نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها و تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد مورد استفاده قرار گرفتند [٤].

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

دو میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH =٦/٥ و ۰/۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر اسید آسکوربیک پنج میلی‌مولار در حمام یخ مخلوط شد و بلافاصله ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی آنزیمی به آن اضافه گردید و تغییرات جذب در ۲۹۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید [٤].

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

۲/۵میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=٦/٨ و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج ٤۳۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید [٤].

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز

دو میلی‌لیتر کازئین هیدرولیز شده یک درصد با pH=٦ و ۰/٤ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به‌مدت یک ساعت در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد بر روی صفحه حرارتی نگه‌داری و سپس برای توقف واکنش به آن ۰/٤ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ٤۰ درصد اضافه شد و جذب در ۲۸۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در

میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید [٤].

سنجش پروتئین محلول کل

یک میلی‌لیتر از عصاره پروتئینی با پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط و پس از مخلوط کردن، جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس منحنی استاندارد ترسیم شده با سرم آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محاسبه گردید. برای تهیه محلول‌های استاندارد ۱۰۰ میلی‌گرم سرم آلبومین گاوی در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و از محلول فوق، غلظت‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های به‌دست آمده با پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی ماند و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت [۱].

استخراج عصاره‌ی پروتئینی برای الکتروفورز

برای استخراج، ۰/۱ گرم نمونه‌ی برگ گیاه از هر دو گروه (تیمار و شاهد) در ازت مایع کاملا پودر شد. حدود ٦۰۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین به آن اضافه گردید و تا مرحله کف کردن کاملا به هم زده شد. سپس نمونه‌ها به میکروتیوب منتقل شده و با سرعت g ۱٦۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژگردید. روشناور دوباره با سرعت g ۱٦۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و روشناور حاصل از این مرحله برای انجام عمل الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه بافر استخراج پروتئین، پنج گرم تریس- اسید کلریدریک داخل بشر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر حل شد و pH محلول بر روی حدود ۷/۵ تنظیم گردید. جهت

تهیه‌ی Na_2EDTA یک مولار، ۳/۷ گرم از آن با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۲۵ میلی‌لیتر محلول تریس–اسید کلریدریک و ۱۰۰ میلی‌لیتر Na_2EDTA با ۱۰۰ میلی‌لیتر مرکاپتواتانول (۱٪) به حجم نهایی ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

الکتروفورز

برای آماده‌سازی نمونه در SDS-PAGE بافر نمونه با نسبت خاصی به آن افزوده شد سپس برای دقایقی در آب جوش قرار داده شد تا تحت این شرایط پروتئین‌ها به واسطه اثر SDS و ماده احیاکننده کاملا واسرشته شوند [۸]. بعد از تنظیم قالب شیشه‌ای، محلول‌های ژل پایین (ژل جدا کننده) و بالا (ژل متراکم کننده) به ترتیب با غلظت ۱۰ و ٤ درصد تهیه شد. قالب شیشه‌ای با چند گیره به تانک الکتروفورز متصل شده و مخازن بالا و پایین تا ارتفاع مناسب با بافر الکترود پر شدند. به‌منظور آماده‌سازی نمونه جهت الکتروفورز، یک حجم بافر نمونه با چهار حجم نمونه پروتئین مخلوط گردیده و به‌مدت ۱۰–۳ دقیقه در ظرف آب جوش قرار داده شد. الکتروفورز با جریان الکتریکی ثابت با شدت ۲۸ میلی‌آمپر و ولتاژ ۱٤۵ ولت آغاز شد و تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل پایین ادامه یافت. رنگ‌آمیزی ژل ابتدا با کاربرد محلول رنگ‌آمیزی به‌مدت ۲ ساعت و بعد از آن با محلول رنگ‌بر به‌مدت ٦ ساعت، صورت گرفت [۸]. جهت رنگ‌آمیزی ژل از کوماسی آبی R –۲۵۰ با غلظت ۰/۱ درصد، و برای رنگ‌زدایی از محلول رنگ‌بر شامل متانول، اسید استیک گلایسیال و آب مقطر استفاده شد [۸].

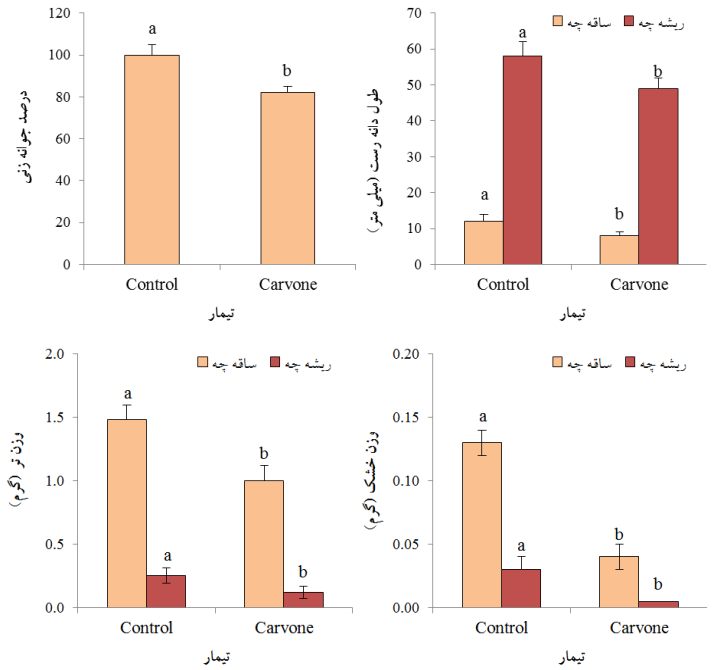
تجزیه آماری

آزمایش در قالب طرح بلوک‌های تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد و تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و معنی‌دار بودن داده های حاصل با استفاده از آزمون T-test در سطح احتمال پنج درصد ارزیابی شد.

نتایج

ترکیب دگر آسیب کاروون موجب کاهش معنی دار جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه چه و ساقه‌چه گیاه کاهو در تمامی غلظت‌های مورد تیمار گردید. در غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر میزان کاهش جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه به‌ترتیب ۱٦/٦۷، ۱٦/٤۸ و ۱٤/۲۵ درصد بود. هم‌چنین وزن تر ریشه‌چه ٤۸، وزن تر اندام هوایی ۳٤، وزن خشک ریشه‌چه ۸۱ و وزن خشک اندام هوایی ٦٤ درصد کاهش یافت (شکل ۱).

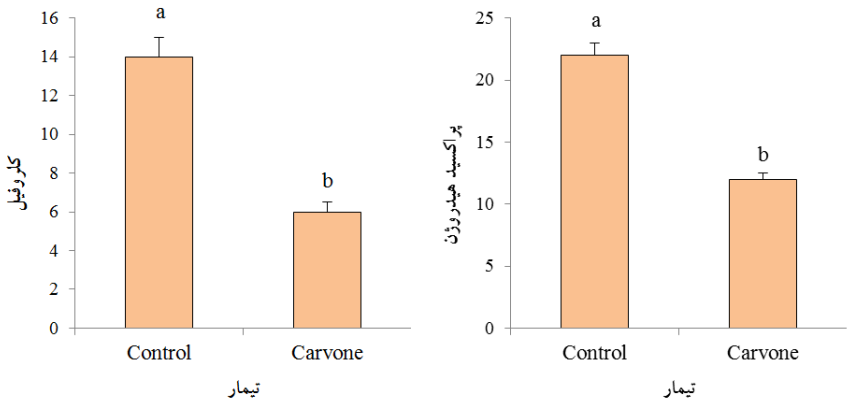
در غلظت‌های بالاتر ترکیب کاروون به‌طور کامل باعث مهار شاخص‌های مذکور گردید (داده ها نشان داده نشدند). به این ترتیب غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون به‌عنوان غلظت بهینه برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد.



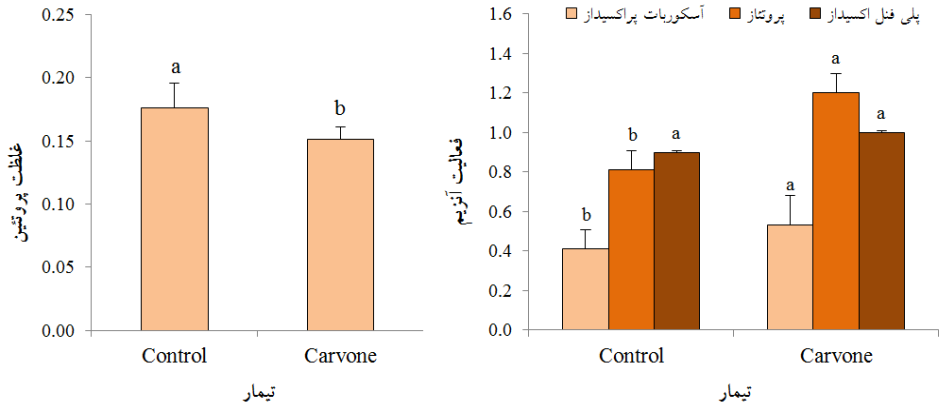
شکل۱ درصد جوانه‌زنی بذر و شاخص‌های رشد دانه‌رست‌های کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. تفاوت بین داده‌های هر اندام که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \leq ۰/۵$).

مقدار نسبی کلروفیل تحت اثر غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون نسبت به شاهد با ٦٠ درصد کاهش معنی‌دار همراه بود. هم‌چنین، غلظت پراکسید هیدروژن برگ در نمونه تیمار شده با کاروون حدود ۱۷/۵ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل۲).

غلظت پروتئین محلول کل در نمونه تیمار حدود ۱۵ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۱۲ و آنزیم پروتئاز ۳۹ درصد افزایش یافت ولی در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تغییری تحت تاثیر تیمار کاروون مشاهده نشد (شکل ۳).

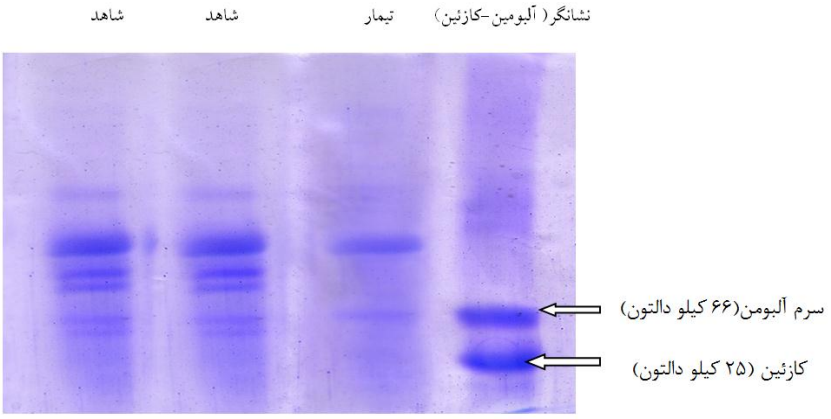


شکل۲ مقدار کلروفیل (واحد نسبی) و غلظت پراکسید ئیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر) در برگ‌های گیاه کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. تفاوت بین داده‌ها که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \leq ۰/۵$).



شکل۳ غلظت پروتئین (میلی‌گرم در گرم وزن خشک) و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و پروتئاز (میکرومول بر ثانیه بر میلی‌گرم پروتئین) در برگ‌های گیاه کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. تفاوت بین داده‌های هر شاخص که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \leq ۰/۵$).

الگوی الکتروفورزی پروتئین نشان داد که بسیاری از باندهای مشاهده شده در هر دو نمونه شاهد و تیمار دارای وزن مولکولی بالاتر از ٦٦ کیلو دالتون می‌باشند (شکل٤). یکی از باندهای پروتئینی هم‌ردیف با پروتئین سرم آلبومین گاوی بوده و دارای وزن مولکولی ٦٦ کیلو دالتون بود. دو باند بسیار بارز نمونه شاهد در نمونه تیمار دیده نشد و نشان داد که ماده کاروون بر کیفیت و کمیت پلی پپتیدی گیاه تحت تیمار تاثیر قابل توجهی داشته است.



شکل٤ الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ گیاه کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. از کازئین و سرم آلبومن گاوی به عنوان نشانگر استفاده شد.

بحث

نتایج به‌دست آمده از این بررسی نشان داد کاروون که به‌عنوان یک ترکیب مونوترپنی در برخی گیاهان ساخته شده و از اسانس این گیاهان متصاعد می‌شود، یک ترکیب دگرآسیب نسبتا قوی می‌باشد. این ترکیب حتی در غلظت‌های بسیار پایین موثر بوده و جوانه‌زنی، رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاه کاهو را که به‌عنوان گیاه استاندارد در بررسی‌های دگرآسیبی کاربرد دارد مهار می‌نماید. کاهش وزن تر و خشک گیاه همراه با کاهش کلروفیل برگ‌ها تحت تاثیر کاروون مشاهده شد. در بسیاری از تنش‌های محیطی مانند سرما و خشکی کاهش کلروفیل و واکنش‌های فتوشیمیایی دیده شده است که دلیلی بر تاثیر مخرب این تنش‌ها بر تیلاکوئیدها است [۵].

فعالیت آنزیم مسئول سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر ماده کاروون افزایش نشان داد، این روند در تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی و شوری نیز دیده می‌شود. می‌توان نتیجه گیری نمود که در تنش دگرآسیبی نیز رادیکال‌های آزاد در گیاه افزایش می‌یابند و برای خنثی‌سازی آن‌ها فعالیت آنزیم‌های سم زدایی کننده افزایش می‌یابد. در این پژوهش مشخص شد که غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه تیمار شده با کاروون کمتر از شاهد است که می‌تواند نتیجه عملکرد آنزیم‌های سم زدا مانند آسکوربات پراکسیداز باشد که هم‌زمان با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در طی تنش، از نظر فعالیت افزایش داشته و در جهت حذف این رادیکال‌های آزاد عمل کرده اند. با این‌حال افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در گیاه کاهو تحت تنش کاروون می‌تواند نشان دهنده تسریع فرآیند پیری تحت تاثیر این ماده باشد.

تنش دگرآسیبی ناشی از کاروون در گیاه کاهو باعث تغییرات کمی و کیفی در پروتئین‌های گیاه گردید. کاهش مقدار کل پروتئین و نیز کاهش تعداد یا شدت باندهای الکتروفورزی که وزن مولکولی بالاتر از ٦٦ کیلودالتون دارند، این موضوع را اثبات می‌کند. پژوهش‌هایی که قبلا صورت گرفته حاکی از این است که ترکیبات مونوترپنی مختلف ازجمله بتا اسیمن و آللواسیمن باعث القای پاسخ‌های دفاعی خاصی در گیاهان، مشابه برخی دیگر از تنش‌های محیطی می‌گردند. از جمله این پاسخ‌ها، تولید متیل جاسمونات، تولید برخی پروتئین‌ها از جمله آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیداتیو می‌باشد [۲].

احتمال می‌رود در این بررسی تنها یک سازوکار سبب کاهش رشد گیاهان نشده بلکه ماده‌ی دگرآسیب کاروون با تاثیر بر فرآیندهای متعددی علاوه بر کاهش سنتز و یا تخریب کلروفیل، تاثیر در فعالیت آنزیم‌ها و غیره موجب اختلال در جذب آب و یون‌های معدنی نیز شده و در نهایت کاهش رشد دانه رست را سبب گردیده است. در اقلیم‌های خشک و نیمه خشک، گیاهان با تولید ترکیبات فراری هم‌چون کاروون رشد و نمو گیاهان اطراف را مهار کرده و به این ترتیب در رقابت با آن‌ها در کسب فضا، آب و عناصر پیشی می‌گیرند [۱۲، ۱۳ و ١٤].

با توجه به محدودیت‌هایی که در استفاده از علف‌کش‌های مصنوعی به‌دلیل ایجاد تدریجی مقاومت در علف‌های هرز و نیز آثار زیان‌بار زیست محیطی این نوع علف‌کش‌ها وجود دارد، امروزه تلاش در جهت شناخت ترکیبات دگرآسیب در گیاهان و نیز بررسی سازوکار تاثیر آن‌ها جهت جایگزینی با انواع مصنوعی می‌تواند راه‌گشای مشکلات مربوطه باشد [١٦].

در این راستا، ترکیب دگرآسیب کاروون می‌تواند به‌عنوان نمونه‌ای برای پژوهش‌های بیشتر در نظر گرفته شود.

منابع

1. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
2. Godard KA, White R, Bohlman J (2008) Monoterpene induced molecular responses in *Ardabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **69**: 1839–1849.
3. Haibin W, Bin HH, Ming ZC, Ying LY, Xiong LW (2009) Allelopathic effects of oxygenic terpenoid on Echinochloa crus-galli, L. *Chinese Journal of Echo-agriculture* **17**: 307–311.
4. Hossein Zadeh M, Kiarostemi KH, Elkhanizadeh M, Sabora O (1388) Investigation on allelopathic effects of wild barly on protei, carbohydrate contents and some wheat enzyme activities. *Iranian Journal of Biology* **22**: 392–406 *(In Persian*).
5. Ibaraki Y Murakami J (2007) Distribution of chlorophyll florescence paterrn Fv/FM with individual plants under various stress condition. *Acta Horticulture* **761**: 255–260.
6. Inderjit, A., Muramatsu, M., Nishimura, H. (1997). On the allelopathic potential of certain terpenoids, phenolics, and their mixtures and their recovery from soil. *Canadian Journal of Botany* **75**: 888–891.
7. Joy PP, Thomas J, Mathew S, Skaria BP (1998) Medicinal plants. *Tropical horticulture* **2**: 449–632.
8. Mostefaii A (1378) Protein gel electrophoresis, A guide to theory and practice. Tehran, Iran, Tazkiyeh Publication (*In Persian*)
9. Narwal SS (1996) Suggested methodology for allelopathy laboratory bioassay. Allelopathy: Field Observation and Methology. Joudpur, India, Scientific Publisher.
10. Naylov REL (2002) Weed Management Hndbook. 9th Ed. Oxford, UK, Blackwell publishing company.
11. Rahman AU (2000) Studies in natural product chemistry, Vol 24. Amesterdam, Netherland, Elsevier.
12. Razavi SM, Nejad-Ebrahimi S (2009) Chemical composition, allelopatic and antimicrobial potentials of the essential oil of *Zosima absinyhifolia* (Vent) Link. Fruits from Iran. *Natural Product Research* **24**: 1125–1130.
13. Razavi SM, Nejad-Ebrahimi S (2009) Chemical composition, allelopatic and cytotoxic effects of essential oils of flowering tops and leaves of *Crambe orientalis*. *Natural Product Research* **23**: 1492–1498.
14. Razavi SM, Nejad- Ebrahimi S (2010) Phytochemical analysis and allelopathic activity of essential oils of *Ecballium elaterium* A. Richard growing in Iran, *Natural Product Research* **24**: 1704–1709.
15. Razavi SM (2012). Chemical composition and some allelopathic aspects of essential oils of *Prangos ferulaceae* (L) Lindl at different stages of growth. *Journal of Agriculture Science and Tecnology* **14**:349–356.
16. Reigosa MJ, Pedrol N, Gonzalez L (2006) Allelopathy, A Physiological process with ecological implications. Dordrecht, Netherland, Springer.
17. Simonsen J L (1953) The Terpenes: The sesquiterpenes, diterpenes and their derivatives. Cambridge, UK, Cambridge University Press.

The effects of (-)-carvone as an allelochemical compound on germination, growth and activity of enzymes in lettuce plants

Seyed Mehdi Razavi*, Sahar Heseinzadeh and Saied Latifi Navid

Department of Biology, Faculty of Sciences, Mohaggege Ardebili University, Ardebil, Iran

Abstract

Carvone is a monoterpenoid compound and has allelopathic effects. In the present work, effect of different concentrations of exogenous carvone (1-1000 µg ml^{-1}) was studied on seed germination and growth of young seedlings in lettuce (*Lactuca sativa* cv. Siahoo) plants. Thereafter, lettuce seedlings were cultured in Hoagland nutrient solution containing 1 µg ml^{-1} of carvone for 9 weeks. Seed germination, seedling growth parameters and the amount of chlorophyll and total protein were reduced by carvone treatment. Activity of ascorbate peroxidase and protease increased while activity of polyphenol oxidase remained unchanged under carvone treatment. A remarkable change in the electrophoretic pattern of the plant leaf proteins was observed between control and carvone-treated plants as elimination of a number of bands. It can be concluded that (-)-carvone as an allochemical compound influences lettuce growth and metabolism similar with the effect of abiotic stress factors.

Keywords: Allelopathy, –(–) Carvone, Lettuce, Electrophoretic pattern, Ascorbate peroxidase, Protease, Polyphenol oxidase.

*Corresponding author, Email: Rrazavi694@gmail.com