

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 مونوترپن ها بوده و در تیره نعناع متداول است و برخی گزارش ها حاکی از اثرات بارز دگرآسیبی در این ماده می باشد. در این پژوهش، ابتدا تاثیر غلظت های مختلف این ماده (یک میکروگرم تا یک میلی گرم در میلی لیتر) بر جوانه زنی بذر، رشد ریشه چه و ساقه چه گیاه کاهو (*Lactuca sativa cv. Siahoo*) مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد، دانه رست های 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 جنبه های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی این گیاه و الگوی الکتروفورزی پروتئین بررسی گردید. نتایج نشان داد که جوانه زنی دانه و رشد ریشه چه و ساقه چه گیاه کاهو در غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر کاروون کاهش و در غلظت های بالاتر به طور کامل مهار می گردد. در دانه رست های کشت شده در غلظت فوق نیز وزن تر و خشک، مقدار کلروفیل و پراکسید هیدروژن کاهش یافت. فعالیت آنزیم های آسکوربات پراکسیداز و پروتئاز افزایش یافت ولی تغییری در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز صورت نگرفت. غلظت پروتئین کل در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد کاهش یافت و تغییرات قابل توجهی در الگوی الکتروفورزی پروتئین های برگ به صورت حذف برخی باندها تحت تاثیر تیمار مشاهده گردید. این پژوهش نشان داد ترکیب دگر آسیب کاروون باعث بروز برخی پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاه کاهو می شود که شباهت زیادی با پاسخ های القاء شده تحت تنش های غیر زیستی دارد.

واژه های کلیدی: دگرآسیبی، (-) - کاروون، کاهو، الگوی الکتروفورزی، آسکوربات پراکسیداز، پروتئاز، پلی فنل اکسیداز

مقدمه

برخی گیاهان ترکیبات شیمیایی خاصی به محیط آزاد می کنند که مانع جوانه زنی و رشد سایر گونه های گیاهی می باشند. این ترکیبات شیمیایی را ترکیبات دگرآسیب (Allelochemical) یا ترکیبات آلو شیمیایی می نامند. گیاهان تولید کننده این ترکیبات از این روش در جهت حذف گیاهان مجاور و رقیب استفاده می کنند. مواد دگرآسیب با اثر بر تقسیم سلولی، تولید

هورمون های گیاهی، ارتباطات آبی، پایداری و نفوذپذیری غشاء، جذب یون، جوانه زنی دانه گرده، سنتز رنگیزه ها، سنتز پروتئین و فعالیت ویژه آنزیم ها بر رشد و نمو گیاهان اثر می گذارند [۹ و ۱۶]. آلکالوئیدها و ترپنوئیدها به عنوان متداول ترین ترکیبات دگرآسیب به حساب می آیند و ترپنوئیدها به دلیل فرار بودن تاثیر سریع تری در بسیاری از زیستگاه ها دارند [۱۶].

ماده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر با حل کردن در آب مقطر و با افزودن چند قطره تونین-۲۰ (Tween-20, Gerbu, 20304) تهیه شد. بذره‌های 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 قبلاً در اتوکلاو در ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت 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 بذره‌های 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 به مدت ۶۷ روز تحت روش‌نمایی ۶۰۰۰ 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) به مقدار 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 به مدت ۲۴ 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 اندازه‌گیری 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

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 ۶]. 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 تأثیر 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 تأثیر آن بر برخی شاخص‌های رشد

ابتدا تأثیر 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

ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید [۴].

سنجش فعالیت آنزیم پروتاز

دو میلی لیتر کازئین هیدرولیز شده یک درصد با $\text{pH}=6$ و $0/4$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای 45 درجه سانتی گراد بر روی صفحه حرارتی نگهداری و سپس برای توقف واکنش به آن $0/4$ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید 40 درصد اضافه شد و جذب در 280 نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید [۴].

سنجش پروتئین محلول کل

یک میلی لیتر از عصاره پروتئینی با پنج میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط و پس از مخلوط کردن، جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری و بر اساس منحنی استاندارد ترسیم شده با سرم آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محاسبه گردید. برای تهیه محلول های استاندارد 100 میلی گرم سرم آلبومین گاوی در 10 میلی لیتر آب مقطر حل شد و از محلول فوق، غلظت های 0 ، $0/05$ ، $0/1$ ، $0/15$ ، $0/2$ ، $0/25$ میلی گرم در لیتر تهیه گردید. سپس $0/1$ میلی لیتر از غلظت های به دست آمده با پنج میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط و به مدت 15 دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی ماند و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری و جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت [۱].

استخراج عصاره پروتئینی برای الکتروفورز

برای استخراج، $0/1$ گرم نمونه برگ گیاه از هر دو گروه (تیمار و شاهد) در ازت مایع کاملاً پودر شد. حدود 600 میکرو لیتر بافر استخراج پروتئین به آن اضافه گردید و تا مرحله کف کردن کاملاً به هم زده شد. سپس نمونه ها به میکروتیوب منتقل شده و با سرعت 16000 g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ گردید. روشناور دوباره با سرعت 16000 g به مدت 15 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 500 میلی لیتر حل شد و pH محلول بر روی حدود $7/5$ تنظیم گردید. جهت

استیک اسید یک در صد اضافه شد. نمونه ی همگن شده در دور 12000 و به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ گردید و $0/5$ میلی-لیتر از روشناور با پنج میلی لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم 10 میلی مولار و یک میلی مولار KI ترکیب شد و جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر (PG Instrument, UK) در طول موج 390 نانومتر اندازه گیری گردید. منحنی استاندارد ترسیم و غلظت پراکسید هیدروژن محاسبه گردید [۴]. برای ترسیم منحنی استاندارد، آب اکسیژنه در غلظت های بین $10-2$ میلی مولار تهیه گردید و $0/5$ میلی لیتر از هر غلظت با پنج میلی لیتر بافر فسفات 10 میلی مولار و یک میلی لیتر KI یک مولار ترکیب شد و جذب محلول ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 390 نانومتر اندازه گیری شد [۴].

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم ها

ریشه گیاه در داخل هاون چینی کوچک قرار داده شده، مقداری ازت مایع روی آن ریخته و تا حد پودر شدن کوبیده شد. سپس $0/1$ میلی گرم از ریشه همگن شده به میکروتیوب های دو میلی لیتری منتقل و یک میلی لیتر بافر فسفات به آن اضافه شد و بلافاصله داخل یخ قرار گرفتند. نمونه ها با سرعت 16000 g در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور آن ها جدا و داخل میکروتیوب های جدید منتقل شد و در فریزر با دمای -80 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. این نمونه ها جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم ها و تعیین مقدار کمی پروتئین ها به روش برادفورد مورد استفاده قرار گرفتند [۴].

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

دو میلی لیتر بافر فسفات $0/05$ مولار با $\text{pH}=6/5$ و $0/1$ میلی لیتر آب اکسیژنه 3 درصد و $0/2$ میلی لیتر اسید آسکوربیک پنج میلی مولار در حمام یخ مخلوط شد و بلافاصله $0/1$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه گردید و تغییرات جذب در 290 نانومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین کل محاسبه گردید [۴].

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

$2/5$ میلی لیتر بافر فسفات $0/2$ مولار با $\text{pH}=6/8$ و $0/2$ میلی لیتر پیروگال $0/02$ مولار و $0/2$ میلی لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله آزمایش در دمای 40 درجه سانتی گراد اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج 430 نانومتر ثبت شد. فعالیت

۲۵۰-R با غلظت ۰/۱ درصد، و برای رنگ‌زدایی از محلول رنگ‌بر شامل متانول، اسید استیک گلاسیسیال 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 داده‌های حاصل با استفاده از آزمون T-test در سطح احتمال پنج درصد ارزیابی شد.

نتایج

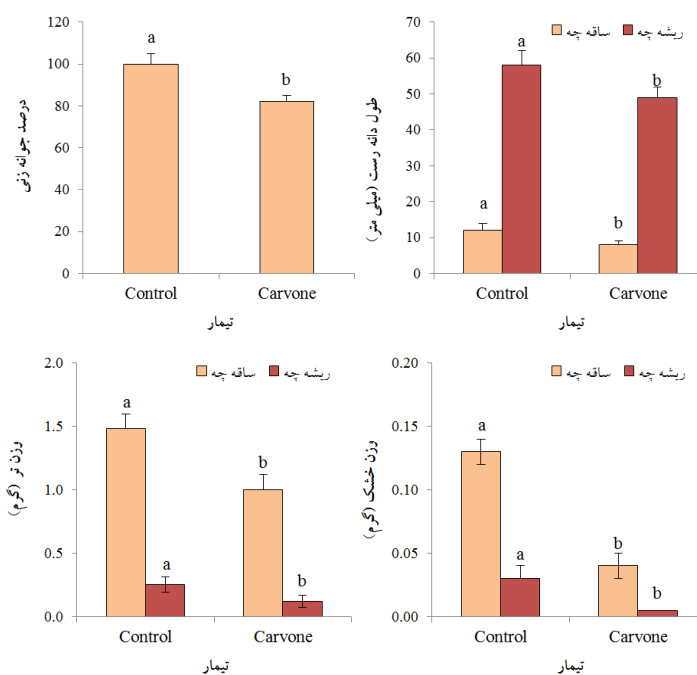
ترکیب دگر آسیب کاروون موجب کاهش معنی‌دار جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه چه و ساقه‌چه گیاه کاهو در تمامی غلظت‌های مورد تیمار گردید. در غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر میزان کاهش جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه به ترتیب ۱۶/۶۷، ۱۶/۴۸ و ۱۴/۲۵ درصد بود. هم‌چنین وزن تر ریشه‌چه ۴۸، وزن تر اندام هوایی ۳۴، وزن خشک ریشه‌چه ۸۱ و وزن خشک اندام هوایی ۶۴ درصد کاهش یافت (شکل ۱).

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

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

الکتروفورز

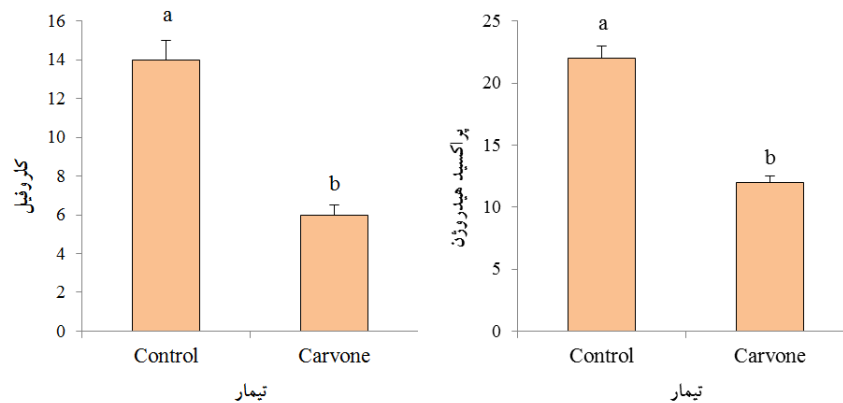
برای آماده‌سازی نمونه در SDS-PAGE بافر نمونه با نسبت خاصی به آن افزوده شد سپس برای دقایقی در آب جوش قرار داده شد تا تحت این شرایط پروتئین‌ها به واسطه اثر SDS و ماده احیاکننده کاملاً واسرشته شوند [۸]. بعد از تنظیم قالب شیشه‌ای، محلول‌های ژل پایین (ژل جدا کننده) و بالا (ژل متراکم کننده) به ترتیب با غلظت ۱۰ و ۴ درصد تهیه شد. قالب شیشه‌ای با چند گیره به تانک الکتروفورز متصل شده و مخازن بالا و پایین تا ارتفاع مناسب با بافر الکتروود 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 میلی آمپر و ولتاژ ۱۴۵ 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 ۶ ساعت، صورت گرفت [۸]. جهت رنگ‌آمیزی ژل از کوماسی آبی



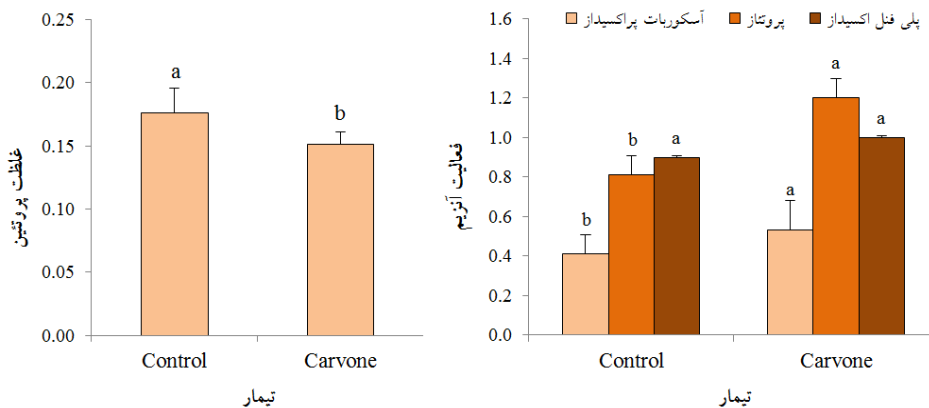
شکل ۱ درصد جوانه‌زنی بذر و شاخص‌های رشد دانه‌رست‌های کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. تفاوت بین داده‌های هر اندام که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \leq 0/5$).

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).

مقدار نسبی کلروفیل تحت اثر غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون نسبت به شاهد با ۶۰ 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 (شکل ۲).



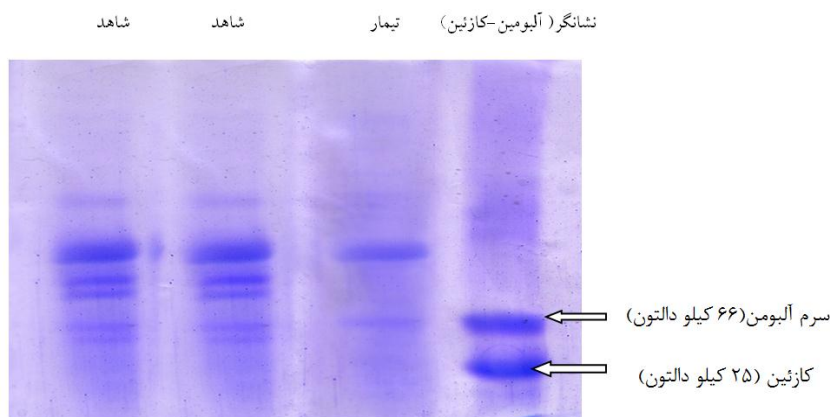
شکل ۲ مقدار کلروفیل (واحد نسبی) و غلظت پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر) در برگ‌های گیاه کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. تفاوت بین داده‌ها که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p \leq 0/5$).



شکل ۳ غلظت پروتئین (میلی‌گرم در گرم وزن خشک) و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل 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 ($p \leq 0/5$).

و دارای وزن مولکولی ۶۶ 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.

الگوی الکتروفوری پروتئین نشان داد که بسیاری از باندهای مشاهده شده در هر دو نمونه شاهد و تیمار دارای وزن مولکولی بالاتر از ۶۶ کیلو دالتون می‌باشند (شکل ۴). یکی از باندهای پروتئینی هم‌ردیف با پروتئین سرم آلبومین گاوی بوده



شکل ۴ الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ گیاه کاهو در تیمار با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر کاروون. از کازئین و سرم آلبومین گاوی به عنوان نشانگر استفاده شد.

بحث

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 ۶۶ کیلودالتون دارند، این موضوع را اثبات می‌کند. پژوهش‌هایی که قبلاً صورت گرفته حاکی از این است که ترکیبات مونوترپنی مختلف از جمله بتا اسیمین و آلواسیمین 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 [۱۲].

احتمال می‌رود در این بررسی تنها یک سازوکار سبب کاهش رشد گیاهان نشده بلکه ماده‌ی دگرآسیب کاروون با تأثیر بر فرآیندهای متعددی علاوه بر کاهش سنتز و یا تخریب کلروفیل، تأثیر 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 ۱۴].

با توجه به محدودیت‌هایی که در استفاده از علف‌کش‌های مصنوعی به دلیل 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 تأثیر آن‌ها جهت جایگزینی با انواع مصنوعی می‌تواند راه‌گشای مشکلات مربوطه باشد [۱۶].

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 نسبتاً 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 تأثیر کاروون مشاهده شد. در بسیاری از تنش‌های محیطی مانند سرما و خشکی کاهش کلروفیل و واکنش‌های فتوشیمیایی دیده شده است که دلیلی بر تأثیر مخرب این تنش‌ها بر تیلاکوئیدها است [۱۵].

فعالیت آنزیم مسئول سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر ماده کاروون افزایش نشان داد، این روند در تنش‌های غیرزیستی از جمله خشکی و شوری نیز دیده می‌شود. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در تنش دگرآسیبی نیز رادیکال‌های آزاد در گیاه افزایش می‌یابند و برای خنثی‌سازی آن‌ها فعالیت آنزیم‌های سم‌زدایی‌کننده 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 سم‌زدا 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 کرده‌اند. با این حال افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در گیاه کاهو تحت تنش کاروون می‌تواند نشان‌دهنده تسریع فرآیند پیری تحت تأثیر این ماده باشد.

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.

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 Eco-agriculture* **17**: 307–311.
4. Hossein Zadeh M, Kiarostemi KH, Elkhazizadeh M, Sabora O (1388) Investigation on allelopathic effects of wild barley 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.

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, Mohaghege Ardebili University, Ardebil, Iran

Abstract

Carvone is a monoterpene compound and has allelopathic effects. In the present work, effect of different concentrations of exogenous carvone (1-1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) 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 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 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 allelochemical 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