

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 آللوپاتی در پدیده آللوپاتی شرکت نموده، جوانه‌زنی، رشد و تکثیر گیاهان دیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند که نتیجه 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 اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: آللوپاتی، ترکیبات فنلی، کلزا، کومارین

مقدمه

آللوپاتی از واژه یونانی «آلون» (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، برهم کنش‌های 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) واژه تداخل را برای معرفی آثار یک گیاه بر گیاه دیگر و همچنین تأثیرات میکروارگانیسم‌ها بر گیاهان به کار بردند. تداخل شامل دگرآسیبی و رقابت است. مواد شیمیایی را که از طریق آللوپاتی ایجاد می‌شود، ترکیبات آلووشیمیایی می‌خوانند (میقانی، ۱۳۸۲). مواد شیمیایی مسؤول دگرآسیبی می‌تواند از گیاه زنده، برگ‌های جدا شده، تراوش‌های گیاه مرده و یا در نتیجه تجزیه میکروبی یا شیمیایی بقایای گیاه، آزاد شود. آلكالوئیدها و ترپنوئیدها به عنوان ترکیبات آلووشیمیایی 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). سمیت ترکیبات آلووشیمیایی تابع غلظت، سن و مرحله 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 کمی و کیفی متغیر است. غلظت ترکیبات آلووشیمیایی 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. بذرها 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 آلووشیمیایی است که از رشد گیاهان دیگر و میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی یا زراعی جلوگیری می‌کنند. هدف دیگر این علم، جداسازی و شناسایی ترکیبات آلووشیمیایی 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 گیاهیچه شامل وزن تر، وزن خشک ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، میزان رنگیزه‌ها، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز) گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ نسبت به تنش‌های ایجاد شده توسط ترکیب فنلی کومارین است.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی بذرها

بذر کلزا (*Brassica napus*) رقم هایولا ۴۰۱ از شرکت دانه‌های روغنی استان فارس (Hayola 401) تهیه و در پاکت‌های کاغذی در دمای آزمایشگاه و دور از رطوبت نگهداری شد. بذرهاي رقم هایولا ۴۰۱ به طور جداگانه با محلول هیپو کلرید سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند و بذرهاي 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 بذرهاي 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 ۱۴ روزه 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 اسپکتروفومتر 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 (Eijkelhoff 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

موج ۴۳۶ نانومتر در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه 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 کلزارقم 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

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. همه 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 اسیدیت 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 اسیدیت ۶، ۰/۷ گرم کلرید پتاسیم اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم بافت ریشه گیاهچه‌ها درون هاون چینی قرار داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر محلول هموزنه (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 تترایاکول در طول

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 همه 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 کاهنده غلظت‌های مختلف کومارین (برحسب میلی‌مولار) بر رشد گیاهچه‌های ۱۴ روزه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ را نشان می‌دهد.

(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 ۸۰، ۸۲، 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

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

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



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

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

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

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

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

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

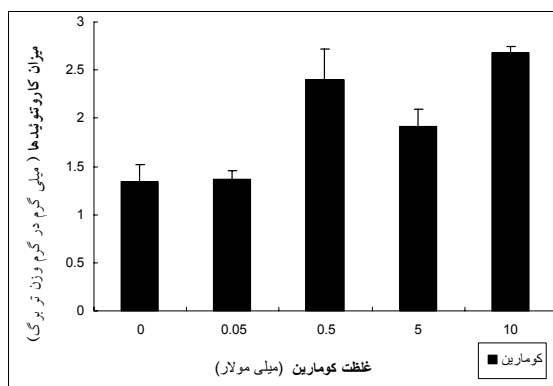
تیما	غلظت (mM)			
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵
کومارین	۱۶۳/۳۶±۱۱/۷۱	۱۷۲/۵۰±۷/۷۸	۱۵۰/۴۶±۹/۵۷	۱۲۴/۷۳±۱۷/۰۱
	(۱۰۰)	(۱۰۵)	(۹۲)	(۷۶)*
				۱۰۴/۰۳±۱۸/۶۷
				(۶۳)*

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

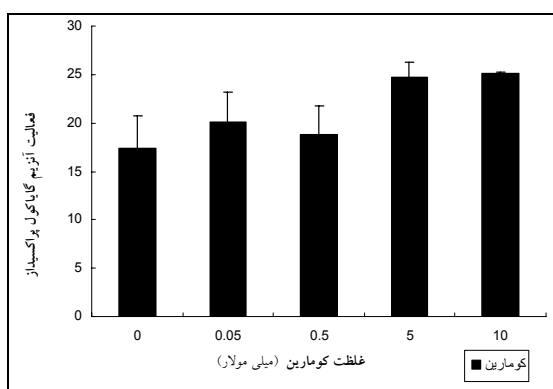
تیما	غلظت (mM)			
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵
کومارین	۰/۱۹±۰/۰۲	۰/۱۷±۰/۰۳	۰/۱۷±۰/۰۱	۰/۲۶±۰/۰۲
	(۱۰۰)	(۸۹)	(۸۹)	(۱۳۶)*
				۰/۲۴±۰/۰۰
				(۱۲۶)*

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)

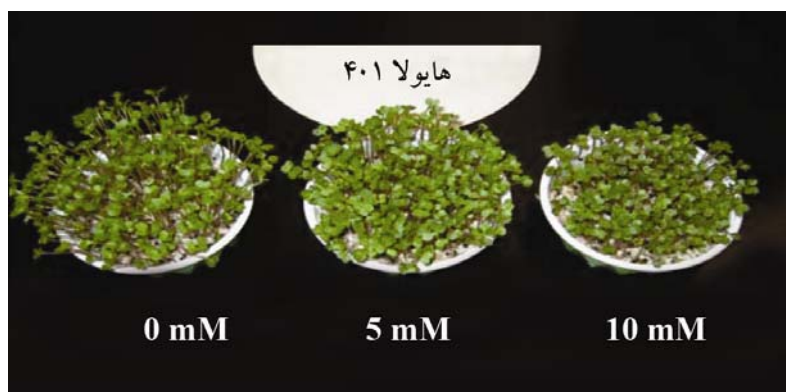
تیما	غلظت (mM)			
	شاهد	۰/۰۵	۰/۵	۵
کومارین	۰/۲۸۸±۰/۰۲۵	۰/۲۷۴±۰/۰۴۸	۰/۲۶۲±۰/۰۴۸	۰/۲۶۷±۰/۰۴۵
	(۱۰۰)	(۹۵)	(۹۱)	(۹۲)
				۰/۲۳۲±۰/۰۴۱
				(۸۰)



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کومارین بر میزان کاروتنوئیدهای کلزا رقم هایولا ۴۰۱ (بر حسب میلی گرم کاروتنوئید در ۱۰۰ 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 میلی مولار) بر رشد گیاهچه‌های ۱۴ روزه کلزا رقم هایولا ۴۰۱

بذرهای کلزا رقم هایولا ۴۰۱ کاهش یافته است؛ به طوری که در غلظت ۱۰ میلی مولار کومارین میزان جوانه‌زنی ۷۷/۸ درصد نسبت به گروه شاهد است. تحقیقاتی که بر گیاه کلزا صورت گرفته، نشان می‌دهد

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

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، سالیسیلیک 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.

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 (*Plantago lanceolata* L., *Chenopodium album*, *Solanum nigrum* L., *Amaranthus retroflexus*, *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 آلوشیمیایی 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 آلوشیمیایی (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

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 غیر آنزیمی مانند گلوکاتیون، 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 و کوماریک اسید توسط Rasmussen و Einhellig (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،

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، پاراکوماریک 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. آلوکمی‌کال‌هایی 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. مونوفنل‌هایی مانند پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید، وانیلیک اسید، پاراکوماریک اسید میزان اکسین را از طریق افزایش

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

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 رنگزه‌ها، 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.

Kar و Mattagajasingh (۱۹۸۹) مشاهده کردند

بیوشیمیایی و فیزیولوژیک شوند که در نهایت، کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را سبب می‌گردند. 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 آلودگای 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 می‌گردد. بنابراین، این دانش اهمیت جهانی یافته و نزد متخصصان علوم کشاورزی و زیستی، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است.

فیزیولوژی، به‌نژادی، تکنولوژی زیستی. ترجمه عزیز، م.، سلطانی، ا. و خاوری خراسانی، س. انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد.

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 غیر آنزیمی 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 آلوکوشیمیایی، 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 می‌توانند در بر گیرد و موجب ایجاد برخی پاسخ‌های

منابع

شریعتی، ش. و قاضی‌شهنی‌زاده، پ. (۱۳۷۹) کلزا، وزارت جهاد کشاورزی، تهران.
کیمبر، دی. و مک‌گرگور، دی. آی. (۱۳۷۸) کلزا

- میقانی، ف. (۱۳۸۲) آللوپاتی (دگرآسیبی). انتشارات پرتو واقع، تهران.
- Aebi, H. (1984) Catalase invitro: Methods of Enzymatic Analysis. Academic press, New York.
- Arnon, D. I. (1956) Photosynthesis by isolated chloroplast IV central 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 archives of Biology and Technology* 46(2): 193-198.
- Eijkelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophylla, pheophytin and β -carotene contents of isolated photosystem II 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 antioxidative capacity of carotenoids, α -tocopherol and polyphenolics in compartmentation of tomatos grown under saline conditions. *Journal of Acta Horticulure* 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

- 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 Gonzalez, 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 *pisum sativum*. *Journal of Sciences of Food and Agriculture* 52: 289-299.

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 guaiacol peroxidase were investigated. Pigments content was measured spectrophotometrically, catalase and guaiacol peroxidase activities were determined at 240 and 436 nm. Coumarin reduced seed germination and seedling growth of canola Hyola 401 cultivar. Chlorophyll 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. Guaiacol 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