اثرات دگرآسیبی عصاره‌های آبی و الکلی برگ گیاه کما (*Ferula foetida*) بر جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی (*Lycopersicun esculentum*)

قدیر طاهری*

*- **نویسنده مسئول:** استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور (ghadirtaheri@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۹

چکیده

هدف این تحقیق مطالعه اثرات دگرآسیبی عصاره‌های آبی و الکلی برگ‌های گیاه کما، جمع‌آوری شده در مراحل اولیه رشد رویشی بر واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در حین جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی بود. بدین منظورآزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور انجام شد. مواد آللوپاتیک در سه سطح شامل عصاره‌آبی و الکلی برگ‌های روزت مرحله رویشی گیاه کمای بینالودی با غلظت ۱۰ درصد و شاهد و زمان‌های نمونه‌گیری در پنج سطح شامل ٢٤، ٤٨، ٧٢، ٩٦، ١٢٠ ساعت پس از آبنوشی و اعمال تیمارها اجرا شد. نتایج بیانگر آن است که قابلیت حیات بذور گوجه‌فرنگی، مقدار مالون‌دی‌آلدئید، مقدار پراکسید هیدروژن و مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تأثیر تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان دادند. کمترین مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در زمان‌های اول آبنوشی بذور با آب مقطر، در عصاره آبی و عصاره الکلی مشاهده شد، در حالی‌که فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در بالاترین مقدار بود. بیشترین زوال حیات گیاهچه‌های بذری، پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید در بذور تیمار شده با عصاره آبی و پس از ۱۲۰ ساعت و بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداسیونی بعد از ۷۲ ساعت از شروع آزمایش اندازه‌گیری شد. داده‌های این تحقیق نشان داد که علی‌رغم فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر مواد دگرآسیبی کما، افزایش مقدار اکسیژن‌های فعال باعث بروز صدمه به سلول‌های هدف در گوجه‌فرنگی و کاهش تدریجی قابلیت حیات بذور آن شد.

کلید واژه‌ها : دگرآسیب، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، قابلیت حیات، پراکسیداسیون لیپیدها، تنش.

مقدمه

آللوکمیکال‌ها گروه‌های متنوعی از مواد شیمیایی را شامل می‌شوند و مکانیسم عمل و نحوه تأثیر آن‌ها بسیار متنوع است (Lara- Nonez *et al.*, 2006). به‌طورکلی وقتی این مواد باعث کاهش رشد گیاهان دیگر می‌شوند، آن را نوعی تنش زیستی یا تنش آللوشیمیایی نامگذاری کرده‌اند (Cruz- Ortega *etal.*,2002). نظیر سایر عوامل تنش‌زا، آللوکمیکال‌ها چندین مولکول هدف دارند و نحوه عمل برخی از آن‌ها مطالعه شده است. این اثرات شامل اختلال در نفوذپذیری غشاهای سلولی؛ جذب یون‌ها؛ جلوگیری از انتقال الکترون در زنجیر انتقال الکترون مسیرهای فتوسنتز و تنفس؛ و کاهش تقسیم سلولی است (Demidchik *et al.*, 2003؛ Czarnota *et al.*, 2001؛ Cruz-Ortega *et al.*, 2002؛ Lehman and Blum, 1999). تنش دگرآسیبی

ممکن است باعث به‌هم‌خوردن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مقدار تولید انواع اکسیژن فعال شود که در نهایت باعث بروز تنش اکسیداسیونی می‌شود (Orcaz *et al.*, 2007).

گیاهان دارای سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی برای حفاظت غشاها و اندامک‌هایشان در برابر خسارت ناشی از انواع اکسیژن فعال هستند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی یا آنتی‌اکسیدان‌ها را احیا کرده باعث تولید مجدد مواد آنتی‌اکسیدانی می‌شوند، از این گروه می‌توان آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز[1] و گلوتاتیون ردوکتاز[2] را نام برد و یا آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز[3] و کاتالاز[4] که خود مستقیم درگیر واکنش می‌شوند (Foyer and Noctor, 2005). سنتز آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به‌عنوان واکنش دفاعی سلول‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های مختلف بررسی شده است (Singh *et al.*, 2006). علاوه براین نقش آسکوربات پراکسیداز در تنش‌های طولانی مدت نیز اثبات شده است (Mittler and Poulos, 2005). کمپلکس آنزیمی پلی‌فنل اکسیداز[5] که باعث تبدیل برخی ترکیبات فنلی به کینون‌ها می‌شود نقش مهمی در زنجیر انتقال الکترون تنفسی دارد و به‌عنوان یکی از اعضای مهم سیستم اکسیداسیونی دانه‌ها و گیاهچه‌های بذری گزارش شده است (Kocaqqliskan and Kabar, 1990). نقش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در واکنش‌های گیاه به عوامل بیماری‌زا در گیاهان گزارش شده است ولی اطلاعات چندانی درباره دخالت آن در پاسخ به تنش‌های دگرآسیبی در دسترس نمی‌باشد (McMahon *et al.*, 2007). کما[6] یکی از جنس‌های بزرگ خانواده چتریان است. بر اساس آنالیزهای بیوشیمیایی، گونه‌های آن غنی از متابولیت‌های ثانویه و صمغ‌های روغنی مختلف‌اند (Zargari, 1995).

گزارش شده که برخی از این مواد قادرند از طریق تحریک تولید اکسیژن‌های فعال در بذور در حال جوانه‌زنی گیاهان هدف، باعث القای اثرات دگرآسیبی گردند (Devi and Prasad, 1996). بر اساس این مدارک و به‌منظور درک چگونگی تأثیر عصاره این گیاه کما[7] بر جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی[8] این تحقیق انجام شد. گیاه کما در مناطق وسیعی در شمال شرق، مرکز و جنوب شرقی ایران می‌روید. به‌صورت علفی، چند ساله و مونوکارپیک است و به دلیل خواص دارویی متعددی که دارد مورد توجه مردم محلی قرار گرفته است (Zargari, 1995). بررسی اثرات دگرآسیبی و شناخت مکانیسم عمل آللوکمیکال‌ها می‌تواند این گیاه را به‌عنوان کاندیدای مناسبی در جهت ساخت علفکش‌های طبیعی قرار دهد. اهداف این تحقیق عبارتند از: ۱- ارزیابی اثرات تنش دگرآسیبی ایجاد شده توسط کما بر گیاه گوجه‌فرنگی در سطح بیوشیمیایی، به‌ویژه بر مقدار فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی ۲- اندازه‌گیری مقدار تولید پراکسید هیدروژن و صدمه غشاهای سلولی بر اساس مقدار تولید مالون‌دی‌آلدئید ۳- بررسی قابلیت حیات بذور گیاه گوجه‌فرنگی تحت تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی کما در زمان جوانه‌زنی.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی مکانیسم نحوه تأثیر مواد دگرآسیبی بر جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی رقم ریوگراند آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل مواد دگرآسیبی (عصاره‌های آبی و

1- Ascorbate_Peroxidase (APX)
2- Glutathione Reductase (GR)
3- Superoxide dismutase (SOD)
4- Catalase (CAT)
5- Polyphenol Oxidase (PPO)
6- *Ferula* spp.
7- *F. foetida* (Bunge) Regel
8- *Lycopersicun escolentum* Mill.

الکلی گیاه کما و آب مقطر به‌عنوان شاهد) و زمان‌های نمونه‌گیری (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ ساعت پس از آبنوشی و اعمال تیمارهای دگرآسیبی) بود. برای تهیه عصاره‌های آبی و الکلی، برگ‌های روزت کما در اواخر فروردین ۱۳۹۳ از زیستگاه‌های طبیعی آن در منطقه عطائیه نیشابور و از ارتفاعات ۱۸۰۰ تا ۱۸۵۰ متری در شیب جنوب‌شرقی جمع‌آوری گردید. حداقل برگ‌های پنج گیاه تقریبا همسان برای عصاره‌گیری در سایه و دور از نور خورشید خشک شدند. ابتدا برگ‌ها در هاون چینی ساییده شدند. برای تهیه عصاره آبی ۱۰ گرم از برگ‌های پودر شده توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در طی ۲۴ عصاره‌گیری شد. عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده شد و برای حذف کامل ناخالصی‌ها، به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مواد رویی به‌عنوان عصاره آبی حاوی مواد دگرآسیب استفاده شد. برای تهیه عصاره الکلی مقدار ۲۵ گرم برگ‌های خشک در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری قرار گرفت و به آن ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد و با سوکسله در طی ۳ ساعت عصاره‌گیری انجام شد. بذور گوجه‌فرنگی با هیپوکلریت سدیم ۵ در هزار به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. هر تیمار آزمایش بر روی ۱۰۰ عدد بذر انجام شد. ابتدا بذور مطابق نقشه طرح به مدت ۳۰ دقیقه در محلول دگرآسیبی قرار گرفتند و پس از آن تعداد ۲۵ بذر در پتری‌دیش‌هایی به قطر تقریبی ۹ و ارتفاع ۳ سانتی‌متر (۴ پتری‌دیش برای هر تیمار)، بر روی کاغذ صافی چیده شدند و به هر پتری‌دیش مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول اضافه شد. پتری‌دیش‌ها درون پلاستیک در بسته قرار گرفتند تا تبخیر از آن‌ها به حداقل برسد و سپس به ژرمیناتور با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت و دمای ۱۶/۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. شمارش بذور جوانه‌زده در فواصل ۲۴ ساعت انجام شد. بذور وقتی جوانه‌زده تلقی شدند که ریشچه غلاف پوسته بذر را پاره کرده و طول آن به حدود ۲ میلی‌متر رسیده باشد (Khalaj *et al.*, 2013). تعیین قابلیت حیات بذور از آزمون تترازولیوم و به روش Moore (۱۹۷۳) انجام شد. بدین منظور پوسته بذور شکسته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی در محلول ۵، ۳، ۲- تری فنیل تترازولیوم کلرید قرار گرفتند. بذوری که جنین رنگ‌پذیری نشان نداد و به رنگ مایل به قرمز دیده نشد به‌عنوان دانه‌های غیرزنده تلقی شدند. غلظت پراکسید هیدروژن موجود در نمونه‌ها به روش O'Kane و همکاران (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شد. ابتدا نمونه‌ای از گیاهچه‌های بذری در حضور نیتروژن مایع ساییده شدند تا کلیه فعالیت‌های حیاتی و بیوشیمیایی آن‌ها متوقف شود. ۰/۵گرم از پودر حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار مخلوط و به خوبی هم زده شد تا همگن‌سازی گردد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. pH ماده رویی با کمک پتاسیم هیدروکسید[1] غلظت ۴ مولار تنظیم شد (pH=۷/۵) و از ماده رویی برای تعیین غلظت پراکسید هیدروژن استفاده گردید. مخلوط واکنش برای اسپکتروفتومتری در حجم نهایی ۱/۵ میلی‌لیتر (شامل ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده مرحله قبلی، دی متیل آمینوبنزوئیک اسید ۲/۵ میلی مولار، ۳-متیل-۲-نیتروتیازولیدون هیدرازون ۱/۲۵ میلی مولار، پراکسیداز ۲۰ میکرولیتر) تهیه شد. واکنش با اضافه کردن پراکسیداز آغاز می‌شود. افزایش مقدار جذب در طول موج ۵۹۰ نانومتر و بعد از ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد. برای تهیه منحنی کالیبراسیون مقدار جذب پراکسید هیدروژن در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲۰ میکرومول در گرم اندازه‌گیری شد. نتایج بر مبنای میکرومول در گرم وزن‌تر نمونه گزارش گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ابتدا عصاره آنزیمی به روش Singh و

1- Potassium Hydroxide

همکاران (۲۰۰۶) استخراج شد. همه مراحل استخراج بر روی یخ و دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر مبنای جلوگیری از احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم[1] کلراید و به روش Beauchamp and Fridovich (۱۹۷۱) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۴ میلی‌لیتر تهیه گردید و محتوی ۶۳ میکرو مولار نیتروبلو تترازولیوم، ۱۳ میلی مولار متیونین، ۰/۱ میلی مولار اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید، ۱۳ میکرو مولار ریبوفلاوین، ۰/۵ مولار کربنات سدیم و ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی (در تیمار شاهد همان مقدار آب مقطر) بود. لوله‌های آزمایش در زیر ۲ لامپ لوله‌ای فلوئورسنت ۱۵ وات به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم بر مبنای واحد آنزیمی بر میلی‌گرم وزن‌تر گزارش شد. هر واحد فعالیت آنزیمی مقدار مورد نیاز آنزیم برای جلوگیری از احیای ۵۰ درصد نیتروبلو تترازولیوم در مقایسه با لوله‌های فاقد عصاره آنزیمی تعریف شده است. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Cakmak and Marschner (۱۹۹۲) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲۵ میلی مولار بافر فسفات (pH=۷)، ۱۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری مقدار حذف پراکسید هیدروژن در طی ۱ دقیقه در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر مبنای ضریب خاموشی ۳۹/۴ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه شد. هر واحد آنزیمی مقدار آنزیم مورد نیاز برای اکسیداسیون ۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه تعریف شده است. مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Nakano and Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش محتوی ۲۵ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=۷)، ۰/۱ میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید، ۰/۲۵میلی مولار آسکوربات، ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ۲/۸ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر و با اندازه‌گیری کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر بر دقیقه اندازه‌گیری شد و به‌عنوان واحد آنزیمی بر گرم وزن‌تر گزارش گردید. هر واحد آنزیمی بر اساس مقدار آنزیم مورد نیاز برای اکسیداسیون ۱ میکرومول آسکوربات در دقیقه تعریف شده است. سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز به روش Kar and Mishra (۱۹۷۶) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر شامل ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار با pH=۰/۸، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالول ۰/۳ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بیان گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید[2] از روش Heath and Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. مقدار این ماده از تغییر مقدار جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ۱۵۵ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه شد. نتایج بر مبنای نانومول در گرم وزن تر گزارش گردید. داده‌های تحقیق با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C تجزیه آماری شد و میانگین‌ها به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

قابلیت حیات بذر

با توجه به معنی‌دار بودن اثرات متقابل دوجانبه و اهمیت کاربردی آن، از بحث اثرات ساده و مقدار آن‌ها صرف‌نظر گردیده است. اثرمتقابل مواد دگرآسیب × زمان بر قابلیت حیات بذر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

1- Nitroblue Tetrazolium

2- Malondialdehid (MAD)

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) ویژگی‌های مورد بررسی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تأثیر مواد دگرآسیبی و زمان‌های نمونه‌گیری

Table 1. Analysis of variance (Mean square) of characters investigated in tomato under allelopatic materials and time of sampling

منابع تغییر S. O. V.	درجه آزادی df	مالون‌دی‌آلدئید MAD	پلی‌فنل اکسیداز PPO	آسکوربات پراکسیداز APX	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	پراکسید هیدروژن H_2O_2	قابلیت حیات Viability
زمان نمونه‌گیری Time of sampling (A)	4	4.1**	4.15**	10032**	69.4**	136.1*	52.2**	5020*
مواد دگرآسیبی Allelopatic material (B)	2	8.1**	8.45**	4077**	114**	108.1**	73.7**	13037**
اثر متقابل A×B	8	0.56**	0.595**	778**	11.6**	20.07**	7.46**	1278**
خطا Error	45	0.075	0.09	72.53	1.02	1.26	0.174	12.52

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

* and ** significant at the 5 and 1 % probadility level, respectively.

بیشترین درصد حیات بذر در زمان ۲۴ ساعت در هر سه مواد دگرآسیب ثبت شد. با گذشت زمان درصد حیات بذر در عصاره الکلی و عصاره آبی به شدت کاهش یافت (به‌ترتیب ۲۶/۳ و ۱۵/۳ درصد در عصاره آبی و الکلی در زمان ۱۲۰ساعت)، در صورتی‌که در تیمار شاهد با گذشت زمان تغییری در درصد حیات بذر مشاهده نشد (جدول ۲). کاهش معنی‌دار درصد حیات بذر در عصاره آبی و عصاره الکلی پس از ۴۸ ساعت آغاز شد ولی شدت کاهش قابلیت حیات بذر در بذور تیمار شده با عصاره آبی بیشتر بود (شکل ۱-الف). این مطلب نشان می‌دهد مواد دگرآسیب با روش استخراج آبی بیشتر استحصال شده‌اند و یا حلال برخی مواد دگرآسیب آب می‌باشد. گزارش‌ها بیانگر آن است که مواد دگرآسیب قادرند با افزایش مقدار انواع اکسیژن فعال باعث القای تنش اکسیداسیونی شوند (Angelini *et al*, 2009). افزایش مقدار پراکسیداسیون غشاهای سلولی در گیاهچه‌های بذری تحت تأثیر مواد دگرآسیب، کاهش قابلیت حیات و درصد جوانه‌زنی بذور توسط محققان در گیاه گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Lara- Nonez *et al.*, 2006). همبستگی منفی بین قابلیت حیات بذور با مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و پراکسید هیدروژن در این تحقیق جدول (۲)، بیانگر آن است که مواد دگرآسیب موجود در عصاره‌های آبی و الکلی کما از طریق تحریک تولید انواعی از اکسیژن فعال و صدمه به غشاهای سلولی اثرات دگرآسیبی خود را نشان داده‌اند.

پراکسید هیدروژن

اثرمتقابل مواد دگرآسیب × زمان بر مقدار پراکسید هیدروژن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). با گذشت زمان مقدار تولید این ماده روند افزایشی داشت ولی مقدار افزایش آن در تیمارهای مواد دگرآسیب متفاوت بود، به‌طوری‌که مقدار آن در ۱۲۰ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت در تیمار شاهد، عصاره آبی و عصاره الکلی به‌ترتیب ۳/۴، ۱۱/۶ و ۱۱ برابر افزایش یافته بود (شکل ۱-ب). Oracz و همکاران،

۲۰۰۷؛ Singh و همکاران، ۲۰۰۶ گزارش دادند که افزایش مقدار پراکسید هیدروژن تحت تأثیر برخی مواد دگرآسیب و بروز تنش اکسیداسیونی به سلول‌های گیاهی شده است.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

اثر متقابل مواد دگرآسیب × زمان بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقدار مالون‌دی‌آلدئید در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع آزمایش تحت تأثیر مواد دگرآسیبی قرار نگرفت. به‌طورکلی بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در هر یک از زمان‌های ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت در گیاهچه‌های بذری تیمار شده با عصاره‌آبی به‌دست آمد (شکل۱-ج).

گزارش شده که تنش‌های محیطی به دلیل تولید برخی از انواع اکسیژن فعال باعث افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بافت‌های هدف شده و خسارت به غشاهای سلولی را باعث می‌شوند (Heath and Packer, 1968). بنابراین افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و وجود همبستگی مثبت بین مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید در این تحقیق جدول (۳) بیانگر آن است که عصاره‌های آبی و الکلی کما باعث بروز تنش‌اکسیداسیونی از طریق افزایش تولید برخی از انواع اکسیژن فعال شده‌اند. نتایج این تحقیق با گزارش‌های Khalaj و همکاران (۲۰۱۳) که بیان می‌کنند مواد دگرآسیبی باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند، مطابقت دارد.

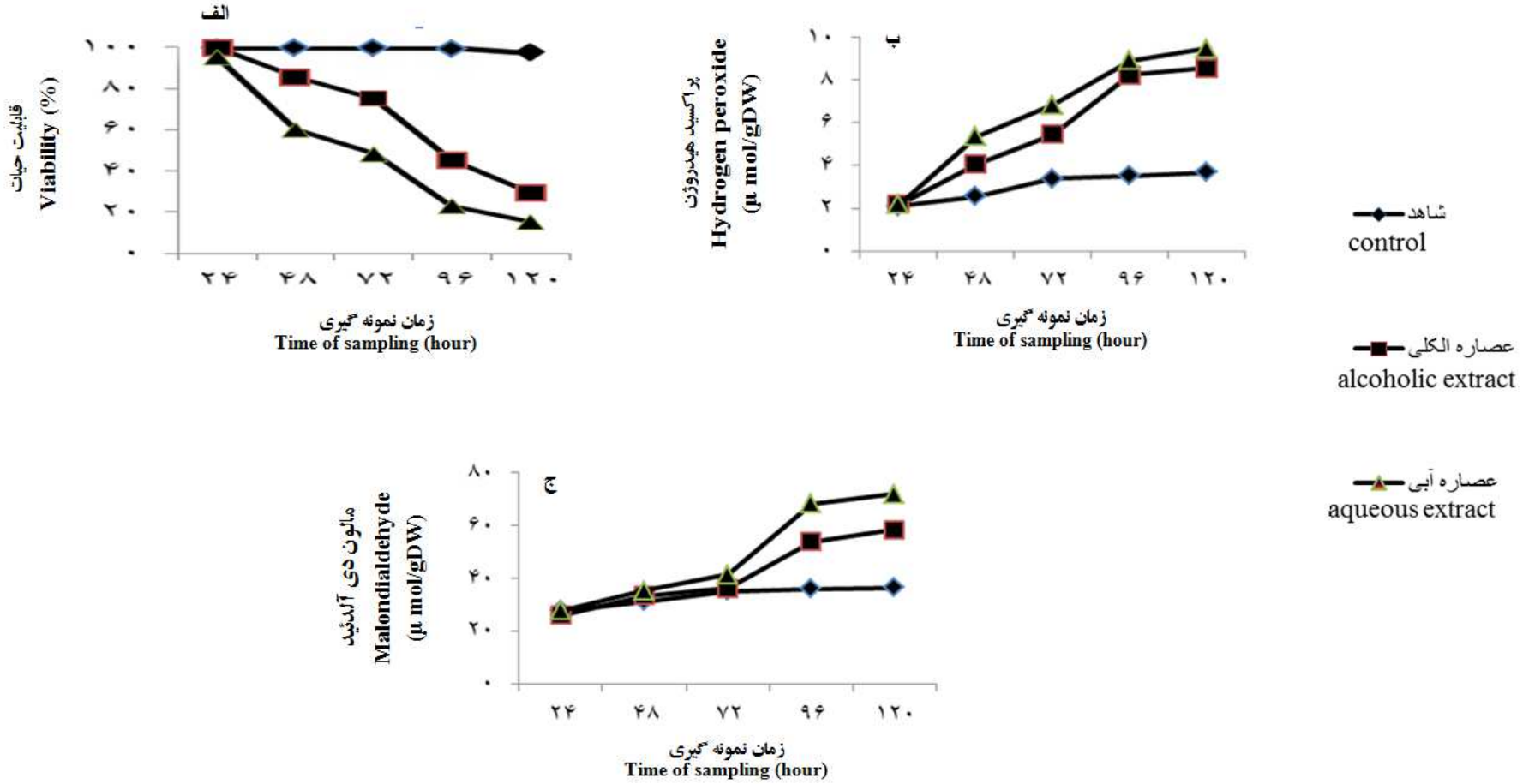
جدول ۲- تأثیر مواد دگرآسیب و زمان نمونه‌گیری بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز بذور درحال جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی

Table 2. Effects of allelopatic material and time of sampling on antioxidant enzyme activity of SOD, CAT, APX and PPO in tomato's seed germination

تیمارها Treatment					
مواد دگرآسیبی Allelopatic materials	زمان نمونه‌گیری Time of sampling	آسکوربات پراکسیداز APX (unite mg^{-1} FW)	پلی‌فنل اکسیداز PPO (unite mg^{-1} FW)	کاتالاز CAT (unite mg^{-1} FW)	سوپراکسید دیسموتاز SOD (unite mg^{-1} FW)
آب مقطر Water	24	35.4^{f}	2.5^{a}	0.12^{f}	1.55^{e}
	48	36.1^{f}	2.15^{ab}	0.45^{f}	2.18^{de}
	72	37.8^{f}	2.12^{ab}	0.99^{ef}	3.1^{de}
	96	57.7^{d}	1.18^{b}	2.24^{cde}	3.69^{d}
	120	62.4^{d}	0.2^{d}	1.57^{def}	3.34^{d}
عصاره آبی Aqueous extract	24	37.4^{f}	0.69^{c}	0.13^{f}	1.49^{e}
	48	44.5^{ef}	1.62^{abc}	3.41^{c}	3.46^{d}
	72	53.9^{de}	0.46^{cd}	6.56^{b}	7.05^{c}
	96	124^{a}	0.03^{e}	9.86^{a}	13.15^{a}
	120	104^{b}	0.16^{d}	9.69^{a}	10.23^{b}
عصاره الکلی Alcoholic extract	24	39.5^{f}	2.13^{a}	0.15^{f}	1.35^{e}
	48	36.9^{f}	1.87^{ab}	2.11^{cde}	2.89^{de}
	72	45.7^{ef}	1.25^{b}	3.14^{cd}	6.18^{c}
	96	84.6^{c}	0.74^{bc}	6.12^{b}	12.29^{a}
	120	109^{b}	0.47^{cd}	5.82^{b}	9.54^{b}

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Similar letter in each culmn indicated that there was not significant differences among them based on Duncan test in 5% level.



شکل ۱- تأثیر مواد دگرآسیبی و زمان نمونه‌گیری بر قابلیت حیات، مقدار تولید پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید بذور در حال جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی

Fig. 1. Effect of allelopatic materials and time of sampling on tomato's seed viability, hydrogen peroxide and malondialdehyde concentration.

جدول ۳- ضرایب همبستگی ساده مقدار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و قابلیت حیات گوجه‌فرنگی

Table 3. Simple correlation coefficient activity of Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Polyphenol oxidase (PPO), Malondialdehyde (MDA), Hydrogen peroxide (H_2O_2) and viability (V. A.) of Tomato.

	سوپراکسید دیسموتاز SOD	کاتالاز CAT	پلی‌فنل اکسیداز PPO	آسکوربات پراکسیداز APX	پراکسید هیدروژن H_2O_2	مالون‌دی‌آلدئید MAD	قابلیت حیات V.A
سوپراکسید دیسموتاز SOD	1						
کاتالاز CAT	0.85**	1					
پلی‌فنل اکسیداز PPO	-0.52*	-0.56**	1				
آسکوربات پراکسیداز APX	0.51**	0.62**	-0.68*	1			
پراکسید هیدروژن H_2O_2	0.66*	0.76**	-0.66**	0.80**	1		
مالون‌دی‌آلدئید MAD	0.42**	0.61**	-0.63**	0.84**	0.88**	1	
قابلیت حیات V.A	-0.61**	-0.60**	0.52**	0.72**	-0.84**	-0.75**	1

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

* and ** as significant differences in 5% and 1%, respectively.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو

اثر متقابل مواد دگرآسیب × زمان بر مقدار فعالیت آنزیم‌های فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در زمان‌های آغازین آزمایش و کاهش مجدد آن در اندازه‌گیری‌های بعد از ۹۶ ساعت و روند افزایشی مقدار پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید در نمونه‌های بررسی شده بیانگر آن است که سیستم دفاعی سلول‌های گیاهی در این زمان از کارایی مناسبی برخوردار نبوده و باعث کاهش قابلیت حیات بذور گوجه‌فرنگی شده‌اند. بررسی اثرات متقابل مواد دگرآسیبی و زمان آزمایش بیانگر آن است که مقدار فعالیت کاتالاز در شروع آزمایش تحت تأثیر نوع ماده دگرآسیبی قرار نگرفت ولی در اندازه‌گیری‌های انجام شده بعدی مقدار فعالیت آنزیم در گیاهان تیمارشده با عصاره آبی کما بیشتر از تیمار با عصاره الکلی و شاهد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تا ۷۲ ساعت بعد از شروع آزمایش تحت تأثیر نوع ماده دگرآسیبی نوساناتی را نشان داد ولی اختلاف آن‌ها از نظر آماری غیرمعنی‌دار بود. بیشترین مقدار فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تیمار با عصاره آبی و زمان ۹۶ ساعت به‌دست آمد و اختلاف آن با تیمار عصاره الکلی در همان زمان غیرمعنی‌دار بود (جدول ۲).

تولید اکسیژن‌های فعالی نظیر سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل[1] و پراکسید هیدروژن تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است (Munir, 2011). این مولکول‌ها قادرند باعث بروز صدمه اکسیداسیونی در غشاها، پروتئین‌ها، رنگیزه‌های فتوسنتزی و لیپیدها شوند. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن تحت تأثیر مواد دگرآسیبی را می‌توان با افزایش مقدار فعالیت آنزیم‌های حذف‌کننده اکسیژن‌های فعال مرتبط دانست. تغییر مقدار فعالیت آنزیم‌ها به نوع و غلظت مواد دگرآسیبی بستگی دارد (Oracz *et al.*, 2007). بر اساس داده‌های این تحقیق، فعالیت کاتالاز با شروع آزمایش به سرعت تغییر نمود ولی با گذشت زمان و بعد از ۹۶ ساعت فعالیت آن کاهش یافت (جدول ۲). محققان گزارش کرده‌اند که فعالیت آنزیم کاتالاز در طی حیات سلول از نوسانات بالایی برخوردار است و تنظیم موقتی پراکسید هیدروژن درون سلولی را بر عهده دارد ولی ثابت ماندن سطح پراکسید هیدروژن درون سلولی در طولانی مدت به فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز وابسته است (Lara- Nonez *et al.*, 2006).

یافته‌های این تحقیق نیز بیانگر ثابت بودن فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در زمان‌های اول شروع آزمایش و تغییرشدید فعالیت کاتالاز در زمان ۷۲ ساعت بود ولی در زمان‌های بعدی فعالیت کاتالاز ثابت و مقدار فعالیت آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت (جدول ۲).

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

اثر متقابل مواد دگرآسیب × زمان بر مقدار پراکسید هیدروژن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در زمان ۲۴ ساعت و گیاهچه‌های تیمار شده با آب مقطر و کمترین آن در بذور تیمار شده با عصاره آبی و زمان ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد (جدول ۲). با گذشت زمان مقدار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در بذور تیمار شده با عصاره الکلی و آب مقطر روند کاهشی نشان داد ولی در بذور تیمار شده با عصاره آبی تا زمان ۴۸ ساعت افزایش و پس از آن مقدار فعالیت آنزیم کاهش یافت. کمپلکس آنزیمی پلی‌فنل اکسیداز که تبدیل برخی ترکیبات فنلی به کینون‌ها را کاتالیز می‌کند، نقش مهمی در زنجیره تنفسی بازی می‌کند و یکی از سیستم‌های اکسیداسیونی گزارش شده در بذرهای در حال جوانه‌زنی و گیاهچه‌های بذری است (Brown and Wray, 1968). از طرفی این آنزیم تولیدATP را از طریق تولید کینون‌ها تحریک می‌کند (Kocaqaliskan and Kabar, 1990).

تغییرات شدید فعالیت آنزیم در طی جوانه‌زنی بیانگر ارتباط نزدیک آن با رخدادهای جوانه‌زنی است ولی مکانیسم عمل این ارتباط به‌ویژه در پاسخ به حضور مواد دگرآسیب به خوبی شناخته نشده است. بر اساس داده‌های تحقیق جدول (۳) مقدار فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز با قابلیت‌حیات بذور گوجه‌فرنگی همبستگی مثبت و با مقدار تولید پراکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی همبستگی منفی نشان داد که بیانگر تأثیر منفی مواد دگرآسیبی گیاه کما بر فعالیت این آنزیم در گوجه‌فرنگی است.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این تحقیق بیانگر آن است که عصاره‌های آبی و متانولی گیاه کما با تغییر مقدار تولید انواعی از اکسیژن‌های فعال در بذور در حال جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی باعث بروز صدمه شده‌اند، هر چند که فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه برای جلوگیری از تجمع پراکسید هیدروژن و یا جلوگیری از تخریب غشاها و پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافته‌است ولی مقدار آن کافی به نظر نیامده و در نهایت سبب بروز

1- Hydroxyl (OH^-)

خسارت و یا مرگ سلولی شده است. کاهش بیشتر درصد جوانه‌زنی و قابلیت حیات بذور گوجه‌فرنگی تیمار شده با عصاره آبی گیاه کما، مواد محلول در آب این گیاه را کاندیدای مناسب‌تری برای ساخت علف‌کش‌ها می‌داند.

References

1. Angelini, P., Pagiotti, R., Venanzoni, R., and Granetti, B. 2009. Antifungal and allelopathic effects of Asafoetida against *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus* spp. Allelopathy Journal, 23(2): 357-368.

2. Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acryl amide gels. Analytical Biochemistry, 44: 276-286.

3. Brown, A.P. and Wray, J.L. 1968. Correlated changes of some enzyme activities and cofactor and substrate contents of Pea cotyledon tissue during germination. Biochemical Journal, 108: 437-444.

4. Cakmak, I., and Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology, 98: 1222-1227.

5. Cruz-Ortega, R., Ayala-Cordero, G., and Anaya, A.L. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. Physiologia Plantarum, 116: 20-27.

6. Czarnota, M.A., Paul, R.N., Dayan, F.E., Nimbal, C.I., and Weston, L.A. 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature and activity of sorgoleone: A potent PSII inhibitor in *Sorghum spp*. root exudates. Weed Technol, 15: 813-825.

7. Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B., Tester, M.A., and Davies, J.M. 2003. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} and K^{+} permeable channels in plant root cells. Journal of Cell Science, 116**:** 81-88.

8. Devi, S.R. and Prasad, M.N.V. 1996. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. Biologia Plantarum, 38: 387-395.

9. Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: A reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell Environ, 28: 1056-1071.

10. Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.

11. Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57(2): 315-319.

12. Khalaj, M.A., Amiri, M., and Azimi, M.H. 2013. Allelopathy: physiological and sustainable agriculture important aspects. International journal of Agronomy and Plant Production, 4(5): 950-962.

13. Kocaqaliskan, I. and Kabar, K. 1990. Effect of salinity on polyphenol oxidase during seed germination. Doga Turkish Journal of Botany, 15: 41-49.

14. Lara-Nunez, A., Romero-Romero, T., Ventura, J., Blancas, V., Anaya, A., and Cruz Ortega, R. 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant, Cell and Environment, 29**:** 2009-2016.

15. Lehman, M.E. and Blum, U. 1999. Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose: effective concentration. Journal of Chemical Ecology, 25: 2585-2600.

16. McMahon, A.M., Doyle, E.M, Brooks S., and Oconnor, K.E. 2007. Biochemical characterization of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F_6. Enzyme and Microbial Technology, 40(5): 1435-1441.

17. Mittler, R. and Poulos, T.L. 2005. Ascorbate peroxidase. In Antioxidants and reactive oxygen species in plants N. Smirnoff (ed.). Blackwell Publishing L^{td}, Chennai, India, pp: 87-100.

18. Moore, R.R. 1973. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: Heydecker, W. (ed.), seed ecology. Butter Worths, London. pp: 347-367.

19. Munir, R. 2011. Evaluating the role of allelopathy in improving the resistance against heat and drought stresses in wheat. M. Sc. thesis, Department of Agronomy, University of agriculture, Faisalabad, Pakistan.

20. Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880

21. O'Kane, D., Gill, V., Boyd, P., and Burdon, R. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. Planta, 198: 371-377.

22. Oracz, K., Bailly, C.H, Gniazdowska, A., Come, D., Corbineau, F, and Bogatek, R. 2007. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. Journal of Chemical Ecology, 33: 251-264

23. Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, S., Arora, K., and Kohli, R.K. 2006. A-pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. Annals of Botany, 98: 1261-1269.

24. Zargari, A. 1995. Medicinal plants. Tehran University Publications, pp: 598-602. [In Farsi]