بررسی اثر دگرآسیبی تعدادی از اسید های فنلی بر محتوای پروتئین و فعالیت برخی آنزیم های پاد اکسایشی گیاه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus*)

عذرا صبورا[۱]
ناهید امیری،[۲] خدیجه کیارستمی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۹
تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۲۰

چکیده

اسید های فنلی از جمله متابولیت های ثانویه ای هستند که در ایجاد تنش آللوپاتی نقش دارند و می توانند در جهت مدیریت علفهای هرز مورد استفاده قرار گیرند. در پژوهش حاضر اثر برخی از این ترکیبات در غلظت ۰/۵ و ۲ میلی مولار بر روی محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی گیاه تاج خروس بررسی شده است. بذر گیاه مذکور در محیط کشت MS ½ حاوی یکی از اسید های فنلی سیرنژیک، p- کوماریک، m- کوماریک، p- هیدروکسی بنزوئیک، وانیلیک و فرولیک اسید به مدت ۲۵ روز کشت داده شد سپس سنجش های بیوشیمیایی روی آنها صورت گرفت. نتایج نشان داد که ترکیبات با قدرت آللوپاتی شدید باعث کاهش محتوای آب و درصد پروتئین شده و درنتیجه آسیب کارکرد آنزیم های پاد اکساینده به ویژه کاهش فعالیت کاتالاز و پلی فنل اکسیداز فرایند جاروب کردن رادیکالهای آزاد مختل می گردد. تقریبا در تمامی تیمارها فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به شاهد افزایش یافته بود.

کلید واژه‌ها: *اسید های فنلی، آللوپاتی، آنزیم های پاد اکساینده، تاج خروس، Amaranthus retroflexus*

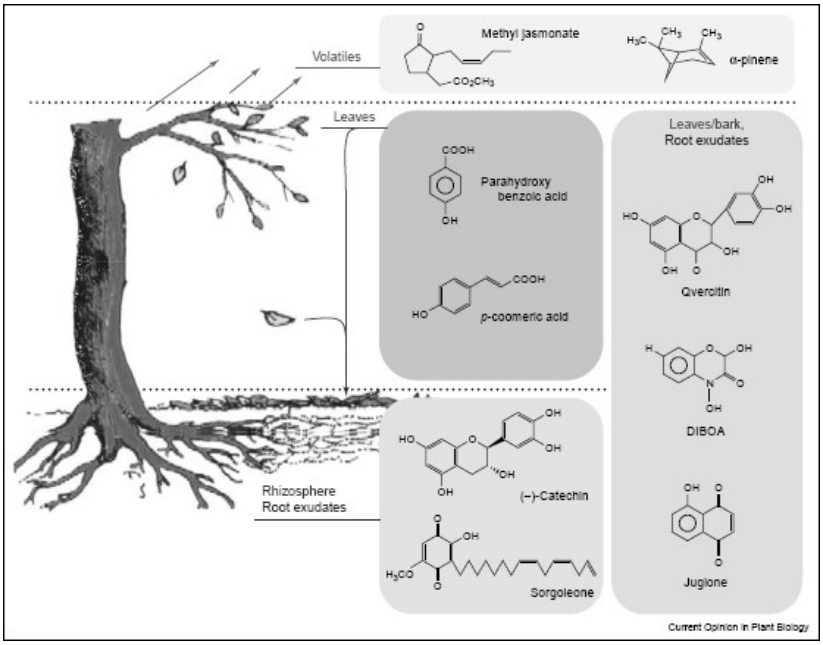
۱. دانشیار گروه زیست دانشگاه الزهرا (س) azrasabora1034@gmail.com
۲. کارشناس ارشد گروه زیست دانشگاه الزهرا (س)
۳. استادیار گروه زیست دانشگاه الزهرا (س)

مقدمه

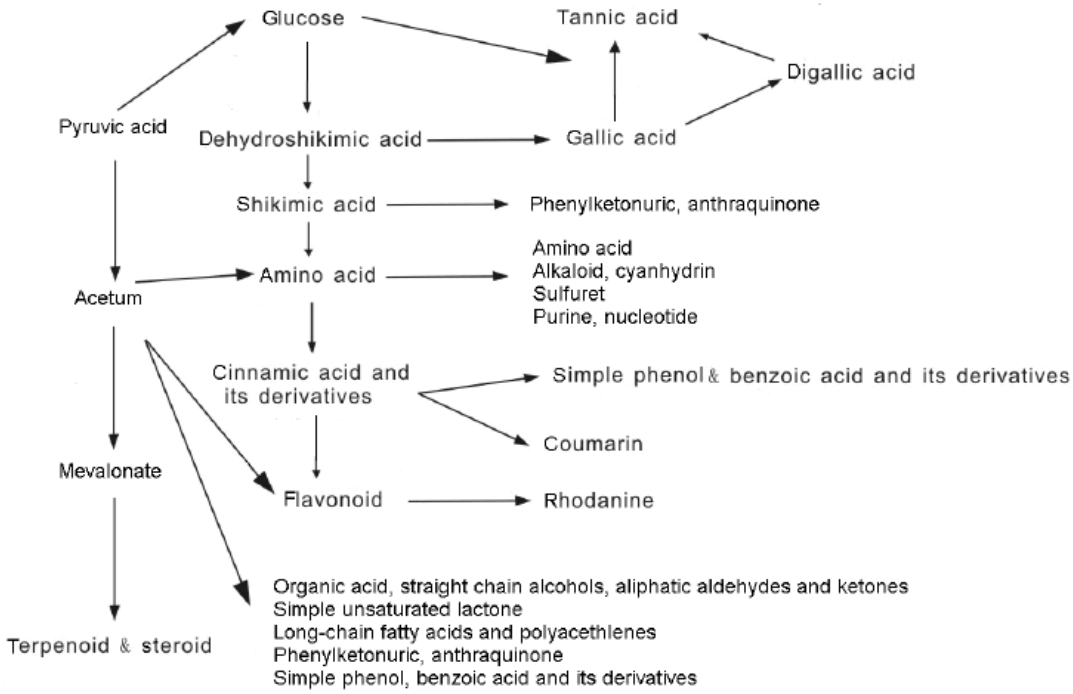
اصطلاح دگر آسیبی (Allelopathy) که برای اولین بار توسط Molisch در سال ۱۹۳۷ ارائه شد مشتق از کلمات یونانی "allelone" و "pathose" به معنای "یکدیگر" و "آسیب دیدن" است (Weir et al. 2004). هر چند در ظاهر این اصطلاح نمایانگر اثر مضر یک موجود بر موجود دیگر است اما در واقع هر دو تاثیر تحریک کنندگی و بازدارندگی را در بر می گیرد. تعریف Torres و همکاران (۱۹۹۶) از آللوپاتی کامل تر بود آنها این واژه را برای تمام فرایندهایی استفاده کردند که باعث تولید متابولیت های ثانوی در گیاهان، میکروارگانیسم ها، ویروس ها و قارچ ها می شد و بر روی رشد و نمو سیستم های زیستی و کشاورزی (به استثنای جانوران) تاثیر مثبت و یا منفی می گذاشت. ترکیبات دگر آسیب[1] در برگ، تراوشات ریشه، گل، میوه و پوست درختان وجود دارند (شکل ۱). رها شدن ترکیبات دگر آسیب به محیط اطراف ریشه (ریزوسفر) اغلب از طریق آبشویی از برگ ها و دیگر اندام های هوایی گیاه، انتشار مواد فرار و یا تراوش از ریشه صورت می گیرد (Weir et al. 2004).

از جمله متابولیت های ثانوی که در ایجاد آللوپاتی دخالت زیادی دارند می توان به اسیدهای فنلی، ساپونین ها، ترپنوئیدها، اسیدهای چرب، روغن های فرار، آمینو اسید های غیر پروتئینی و... اشاره کرد (Li et al. 2010). اغلب ترکیبات فنلی از طریق مسیر های متابولیسمی استیک اسید و شیکمیک اسید بیوسنتز می شوند (شکل ۲). آللوکمیکال های فنلی در هر دو اکوسیستم های طبیعی و مصنوعی یافت شده اند و به دلیل برهم زدن توازن ترکیبات شیمیایی خاک باعث ایجاد مشکلات اقتصادی و اکولوژیکی از قبیل کاهش محصول و عدم بازسازی جنگل های طبیعی می گردند (Apple 1993). ساختار و نحوه عملکرد ترکیبات دگر آسیب فنلی متفاوت است و ممکن است منجر به تولید ترکیباتی گردد که در آینده به عنوان علف کش یا حشره کش مورد استفاده قرار گیرند (Santana et al. 2009). از پتانسیل دگر آسیبی این ترکیبات فنلی می توان برای حل مسائل اکولوژیکی مختلف در راستای توسعه پایدار کشاورزی، جنگلداری منابع طبیعی و حفظ محیط زیست استفاده کرد (Li et al. 2010). با وجود اهمیت آللوپاتی در علوم اکولوژی و کشاورزی، مکانیسم ها ی سازگاری و دفاعی گیاهان در برابر آللوکمیکال ها کمتر شناخته شده است (Bais et al. 2006).

1. allelochemicals



شکل شماره ی ۱. طرح کلی روش آزاد شدن برخی از ترکیبات دگر آسیب گیاهان از پوست، برگ، ریشه و میوه به صورت تراوشات ریشه و یا ترشح ترکیبات فرار (اقتباس از Weir et al. 2004).



شکل شماره ی ۲. مسیر بیوسنتز تعدادی از ترکیبات دگر آسیب (اقتباس از Li et al. 2010)

آللوپاتی به عنوان یک تنش زیستی می تواند باعث خساراتی نظیر آسیب اکسیداتیو در گیاه شود و حیات آن را تهدید کند. در شرایط مطلوب رشد، اشکال فعال اکسیژن (ROS)[1] در اندامک های مختلف سلول های گیاهی در سطح بسیار پایینی تولید می شوند، اما در شرایط تنش زا (زیستی و غیر زیستی) تولید آنها به شدت افزایش می یابد (Batish et al. 2006). افزایش تولید ROS باعث آسیب اکسیداتیو شده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به ماکرومولکول هایی نظیر رنگیزه ها، پروتئین ها و نوکلئیک اسیدها می شود (Blokhina et al. 2003). برای جلوگیری از تخریب سلول توسط ROS، پاد اکساینده های سم زدا مانند آسکوربیک اسید و گلوتاتیون و آنزیم های مهار کننده ی رادیکال های آزاد از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX)[2]، گایاکول پراکسیداز (GPX)[3]، کاتالاز (CAT)[4]، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)[5] و گلوتاتیون ردوکتاز (GR)[6] در سلول ها تولید می شوند (Mittler et al. 2004). این آنزیم ها کارایی سلول را برای سم زدایی از $O_2^{\cdot-}$، H_2O_2 و دیگر رادیکال های آزاد افزایش می دهند. بنابراین سنجش فعالیت آنها ممکن است تصویر روشنی از سیستم دفاعی گیاه را آشکار نماید.

در این پژوهش از تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) به عنوان یک گیاه مدل برای بررسی اثر ترکیبات فنلی با خاصیت آللوپاتی استفاده شده است. این گیاه متعلق به خانواده Amaranthaceae، یک ساله ، تک پایه، دارای ساقه قائم با حداکثر ارتفاع ۳ متر است (Costea et al 2004) و سومین علف هرز غالب دولپه ای در سطح جهان محسوب می شود که به دلیل دارا بودن طبیعت رشد نامحدود و تیپ فتوسنتزی C_4، در دمای بالا و نور شدید به ویژه در کشتزارهای گیاهان زراعی تابستانه و گرما دوست قدرت رقابتی زیادی از خود بروز می دهد (Ronald 2000; Ronald and Smith 2000). تاج خروس گرچه به عنوان گیاه بومی مناطق گرمسیری آمریکا گزارش شده است اما به طور گسترده در اغلب قاره ها و در زیستگاه های مختلف نیز می روید. توان بالای رقابتی در گونه های مختلف تاج خروس موجب شده تا تاثیر منفی تداخل گونه های مختلف آن بر روی عملکرد گیاهان زراعی تابستانه مورد ارزیابی قرار گیرد. شاخص رقابتی این علف هرز در مقیاس صفر تا یک، نزدیک به یک گزارش شده است (میرشکاری و همکاران ۱۳۸۶). به نظر می رسد که نسبت به استفاده انحصاری از علف کش ها، مدیریت علف های هرز جانشین مؤثرتری بوده و ورود دگرآسیبی به این برنامه ارزش زیادی داشته باشد. در حال حاضر محققین تلاش می کنند از دگر آسیبی به عنوان یک استراتژی کاربردی در این رابطه استفاده کنند. این

1. Reactive Oxygen Species
2. Ascorbate peroxidase
3. Guaiacol Peroxidase
4. catalase
5. Superoxide dismutase
6. Glutathione reductase

عمل می تواند از طریق جداسازی، شناسایی، سنتز و کاربرد آللوکمیکال های معین به عنوان علف کش طبیعی انجام شود (نجفی آشتیانی و همکاران ۱۳۸۷).

از آنجا که ویژگی دگر آسیبی بسیاری از گیاهان به ترکیبات فنلی آنها نسبت داده می شود (قربانلی و همکاران ۱۳۸۷)، در این مقاله سعی شده است تاثیر تعدادی از اسیدهای فنلی سنتزی بر تغییر محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی گیاه تاج خروس بررسی شود، به این امید که بتوان با توجه به پاسخ گیاه و تعیین میزان کارایی این آنزیم ها از آللوکمیکال های سنتزی به عنوان ابزاری مهم برای کاهش توان رقابتی این علف هرز در اکوسیستم های زراعی استفاده کرد.

مواد و روش ها

کشت گیاه: ابتدا محیط کشت موراشیگ-اسکوگ[1] بدون هورمون با قدرت نصف مواد مغذی ($MS\ ^1/_2$)، حاوی آگار ۰/۴٪ و ساکارز ۱/۵٪ همراه با غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار از یکی از اسیدهای فنلی شامل: سیرنژیک (s)، *p*- کوماریک (*p*-c)، *m*- کوماریک (*m*-c)، *p*- هیدروکسی بنزوئیک (*p*-hb)، وانیلیک (v) و فرولیک اسید (f) تهیه شد. بذرها پس از سترون شدن با الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۱٪ (به ترتیب ۲ و ۱۵ دقیقه) در محیط های فوق کشت و در اتاق رشد با دوره ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۳ درجه سانتیگراد نگه داری شدند. بعد از ۲۵ روز گیاهچه ها جمع آوری و تا زمان انجام آنالیز هـای بیوشیمیایی در فریزر تحت دمای $-20\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند.

استخراج عصاره پروتئینی و آنزیمی:

دو گرم نمونه منجمد شده گیاهچه تاج خروس مربوط به تیمارهای فنلی مختلف در ml ۵ بافر فسفات پتاسیم (pH 7, 0.05 M) حاوی اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[2] (1 mM)، اسید آسکوربیک (1 mM)، گلیسرول ۱۰٪، دتیوتریتول[3] (1 mM) و پلی وینیل پلی پیرولیدین[4] ۲٪ عصاره گیری شد. سوسپانسیون حاصل در rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. همه مراحل استخراج در دمای $4-\ ^{\circ}C$ ۰ صورت گرفت. بخش روشناور حاصل برای سنجش فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی و پروتئین استفاده شد.

سنجش پروتئین و فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی:

سنجش پروتئین بر طبق روش برادفورد (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA)[5] به عنوان استاندارد انجام شد و غلظت پروتئین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تر محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD EC 1.11.1.7) به روش Liu و همکاران (۱۹۹۹) سنجش گردید. ترکیب واکنش در حجم نهایی ml ۳ شامل بافر سیترات سدیم (pH 4.6, 0.05 M)، گایاکول (15 mM)، H_2O_2 13 mM و µl ۲۵ عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم به صورت میزان افزایش چگالی نوری (در طول موج nm ۴۷۰) در

1. Murashige and skoog (MS)

2. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
3. Dithiothreitol (DTT)
4. Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)
5. Bovine serum albumin

دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین نمونه محاسبه گردید.

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT EC EC 1.11.1.6) از روش Cakmak و Marschner (۱۹۹۲) استفاده گردید. ترکیب واکنش در حجم نهایی ۳ ml شامل بافر فسفات پتاسیم (pH 7, 0.05 M)، ۳۰۰ µl H_2O_2 1% و ۱۰۰ µl عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم با اندازه گیری میزان تجزیه H_2O_2 (کاهش میزان جذب در طول موج ۲۴۰ nm در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین نمونه) محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO EC 1.14.18.1) به روش Raymond و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. ترکیب واکنش در حجم نهایی ۳ ml شامل بافر فسفات پتاسیم (pH 6.8 0.1 M)، پیروگالول (0.02 M) و ۱۰۰ µl عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم بر حسب میزان افزایش جذب در طول موج ۴۳۰ nm در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین نمونه محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD EC 1.15.1.1) به روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) بر پایه قدرت این آنزیم در مهار احیای NBT[1] به وسیله یون سوپراکسید اندازه گیری گردید. ابتدا مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم(pH 7, 0.05 M)، L-methionine 13 mM، NBT 75 µM و ریبوفلاوین (75 µM) تهیه شد. در نمونه شاهد جذب مخلوط واکنش هر ۲ دقیقه یک بار طی ۳۰ دقیقه در روشنایی و در طول موج ۵۶۰ nm خوانده شد، سپس نمودار کاهش جذب نسبت به زمان کشیده شد و از روی بخش خطی آن زمان مناسب برای ۵۰٪ بازدارندگی تعیین گردید، تغییرات جذب در این فاصله زمانی برابر یک واحد فعالیت آنزیم (U) در نظر گرفته شد و فعالیت ویژه آنزیم SOD نمونه های تیمار شده از روی تغییرات جذب مخلوط واکنش حاوی ۳۰ µl عصاره آنزیمی طی ۱۲ دقیقه بر حسب واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

آنالیز آماری

داده های حاصل از سنجش های مختلف بر اساس طرح بلوک های کامل تصادفی با توجه به دو عامل اصلی (نوع ترکیب فنلی و غلظت) و با استفاده از نرم افزار SPSS version 12 تجزیه و تحلیل شدند. پس از تعیین معنی دار بودن اختلاف بین میانگین ها ($p<0.05$) بوسیله آنالیز واریانس دوطرفه، مقایسه و گروه بندی میانگین ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه بر حسب عامل غلظت فنل ها و بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن (DMRT)[2] صورت گرفت.

نتایج:

شکل ۳ تفاوت وضعیت ظاهری گیاهچه های تاج خروس را که ۲۵ روز در حضور تعدادی از ترکیبات فنلی رشد کرده بودند نشان می دهد. کمترین میزان رشد در نتیجه تیمار وانیلیک اسید و بیشترین آن پس از تیمار *p*-

1. Nitro Blue Tetrazolium

2. Duncan Multiple Range Test

هیدروکسی بنزوئیک اسید دیده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها در مورد مقایسه محتوای پروتئین گیاهچه ها و هم چنین فعالیت آنزیم POD و SOD نشان داد که کاربرد تیمار های مختلف از ترکیبات فنلی با دو غلظت متفاوت باعث ایجاد اختلاف معنی دار بین میانگین های فاکتور های بررسی شده در تیمار ها و شاهد شد ($p<۰/۰۱$). در مورد میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز تفاوت معنی داری در رابطه با تاثیر نوع ترکیبات فنلی به تنهایی مشاهده نشد اما اثر عامل غلظت تفاوت معنی داری را در سطح $p<۰/۰۱$ پدید آورد. در نتیجه اثر متقابل این دو عامل بر روی فعالیت کاتالازی گیاهچه های تاج خروس در سطح $p<۰/۰۵$ معنی دار شد. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز با تغییر نوع ترکیب فنلی در سطح $p<۰/۰۱$ و با تغییر غلظت آنها در سطح $p<۰/۰۵$ نسبت به شاهد اختلاف معنی دار داشت (جدول ۱).

جدول شماره ی ۱. تجزیه واریانس دوطرفه اثر غلظت و نوع ترکیب فنلی بر روی میانگین فعالیت آنزیمهای پاد اکسایشی و محتوای پروتئینی گیاهچه های تاج خروس در تیمار و شاهد

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		پروتئین	پراکسیداز	کاتالاز	پلی فنل اکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز
ترکیب فنلی	۵	۱/۸۹۸ **	۰/۰۳۹ **	۰/۰۰۰۲ ns	۱/۰۹۱ **	۲۹/۸۱۷ **
غلظت	۱	۱/۷۵۸ **	۰/۱ **	۰/۰۰۴ **	۰/۲۰۹ *	۵/۹۲۰ **
غلظت * فنل	۵	۰/۸۰۷ **	۰/۰۲۱ **	۰/۰۰۰۳ *	۰/۳۷۹ **	۲/۱۴۲ **
خطا	۲۶	۰/۰۲۹	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۳	۰/۱۳۹
کل	۳۹					

** و * به ترتیب وجود تفاوت معنی دار در سطح $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۵$ و ns عدم وجود تفاوت معنی دار را در سطح $p<۰/۰۵$ نشان می دهد.

مقدار پروتئین گیاهچه ها ی ۲۵ روزه در شرایط طبیعی حدود ۱/۶۹ mg g^{-1} FW بود و نمونه های تیمار شده با *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید نیز دارای محتوای پروتئینی مشابهی بودند (۱/۹۸ و ۱/۷ میلی گرم در گرم وزن تر به ترتیب در غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار). بیشترین مقدار پروتئین در مقایسه با شاهد طی تیمار با فرولیک و *m*-کوماریک اسید (در غلظت ۲ میلی مولار) مشاهده شد که نسبت به شاهد به ترتیب حدود ۲/۳ و ۲/۱ برابر بیشتر بود، هم چنین تیمار با سیرنژیک اسید ۰/۵ mM نیز باعث افزایش ۲ برابری محتوای پروتئین گیاهچه ها شد. در همه تیمارها، به جز سیرنژیک و *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید، غلظت ۲ mM ترکیبات فنلی از نظر القا افزایش محتوای پروتئین تاثیر بیشتری داشت. تیمار های *p*- کوماریک و وانیلیک اسید اثرات مشابهی را ظاهر نمودند.

کمتـرین محتـوای پـروتئین پـس از تیمـار بـا *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید دیده شد که در واقع نسبت به شاهد تغییر شاخصی نداشت (شکل ۴).

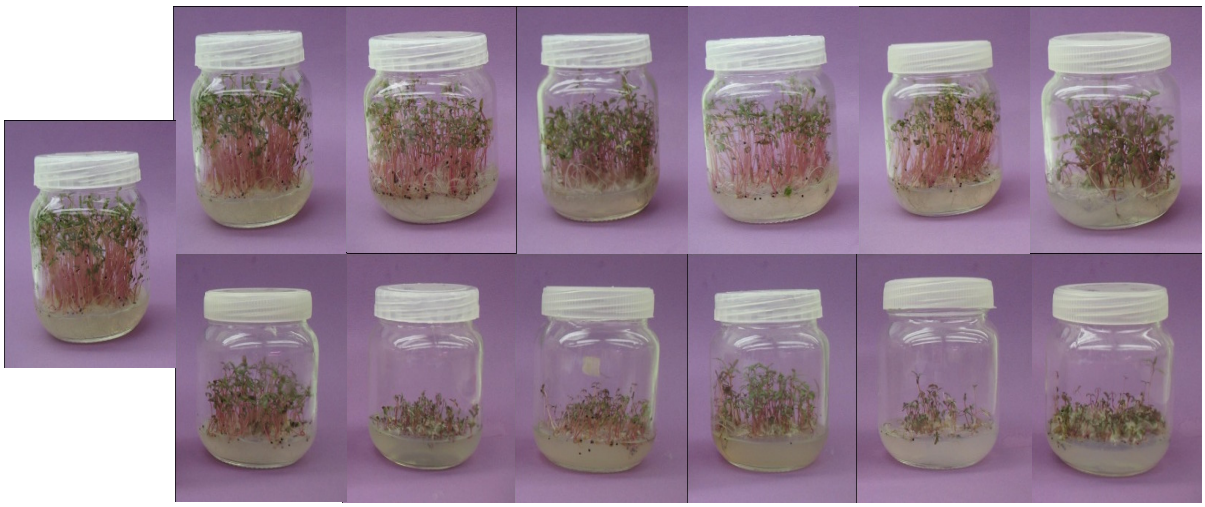
میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز طی تیمار با *p*- هیدروکسی بنزوئیک (۰/۵ mM و ۲ mM) و *m*- کوماریک (۰/۵ mM) تفاوت معنی داری نسبت به شاهد نشان نداد. در حالیکه میزان فعالیت پراکسیداز گیاهچه ها طی تیمار با غلظت ۰/۵ mM سیرنژیک اسید نسبت به سایر ترکیبات در همین غلظت بیشترین مقدار و پس از تیمار با *p*- هیدروکسی بنزوئیک کمترین فعالیت پراکسیدازی را نشان داد که مقدار آن نزدیک به گیاهان شاهد یعنی حدود $U\ mg^{-1}$ protein ۰/۳ بود (شکل ۵). افزایش فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۲ mM از هر یک از ترکیبات فنلی سیرنژیک، *p*- کوماریک و وانیلیک اسید تقریبا مشابه و دارای تفاوت معنی دار با گیاهان شاهد بود (حدود ۱/۶ برابر شاهد). بیشترین فعالیت پراکسیدازی در بین نمونه های تیمار شده با غلظت ۲ mM متعلق به فرولیک و متا– کوماریک اسید بود (به ترتیب $U\ mg^{-1}$ protein ۰/۶ و ۰/۵۸ در مقابل $U\ mg^{-1}$ protein ۰/۲ در گیاه شاهد).

مقایسه میانگین فعالیت کاتالاز گیاهچه ها پس از تیمارهای فنلی با غلظت ۰/۵ و ۲ میلی مولار تفاوت معنی دار را نشان داد (شکل۶). کاربرد غلظت ۰/۵ mM هر یک از انواع ترکیبات فنلی مورد استفاده، به ویژه *m*-کوماریک اسید، موجب کاهش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه های تاج خروس به میزان ۳۰ تا ۵۰ درصد گیاهان شاهد شد. کمترین فعالیت کاتالاز با تیمار ۰/۵ mM *m* - کوماریک اسید حدود $U\ mg^{-1}$ protein ۰/۰۲ به دست آمد که حدود ۲/۵ برابر کمتر از شاهد بود. برعکس، در غلظت ۲ میلی مولار ترکیبات فنلی بیشترین میزان فعالیت آنزیم پس از تیمار با *m* و *p*- کوماریک و وانیلیک اسید مشاهده شد، اختلاف آنها با شاهد در سطح $p<۰/۰۵$ معنی دار بود. کاربرد سیرنژیک اسید با هر دو غلظت مورد استفاده باعث کاهش محسوس فعالیت کاتالازی گیاهچه ها شد اما برخلاف ترکیبات فنلی دیگر اثر غلظت در این تیمار معنی دار نبود.

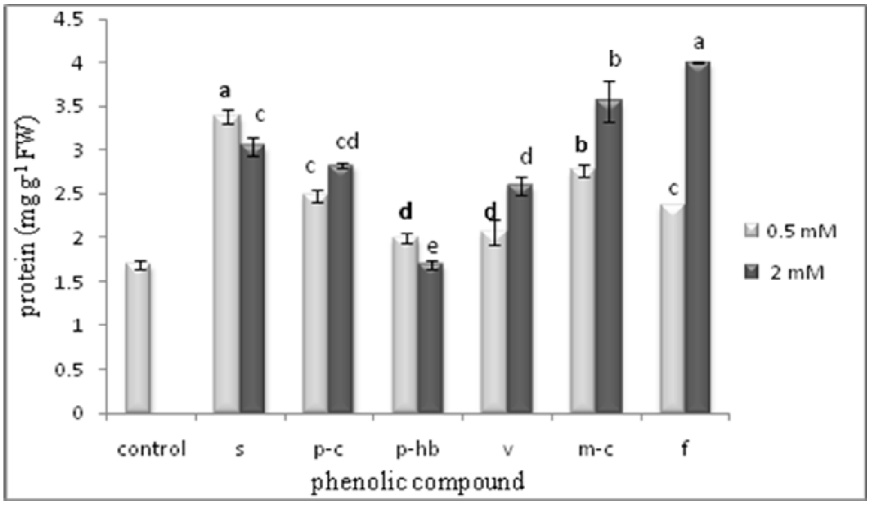
کاربرد تیمار پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید نسبت به سایر ترکیبات فنلی دیگر اثری کاملا شاخص بر افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز داشت به طوریکه بیشترین فعالیت آنزیم فوق در هر دو غلظت ۰/۵ و ۲ میلی مولار این ترکیب سنجیده شد (به ترتیب ۲/۳ و ۲/۷ واحد آنزیمی به ازای هر میلی گرم پروتئین). کاربرد غلظت ۰/۵ mM وانیلیک اسید نیز اثر مشابهی بر فعالیت آنزیم فوق داشت (شکل ۷). میزان فعالیت PPO گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس که با ترکیبات فنلی دیگر تیمار شده بودند اغلب کمتر از گیاهچه های شاهد بود (شکل ۷). غلظت های ۰/۵ mM سیرنژیک و ۲ mM فرولیک و *m*-کوماریک اسید باعث کاهش شدید فعالیت آنزیم فوق شدند که گاه این کاهش نسبت به شاهد بالغ بر ۵۰٪ می شد. مقایسه اثر دو غلظت مورد استفاده ترکیبات فنلی برای تیمار نشان داد که فقط در مورد فرولیک و سیرنژیک اسید عامل غلظت باعث ایجاد تفاوت های قابل توجه در میانگین فعالیت پلی فنل اکسیدازی گیاهچه ها می

شد و ترکیبات دیگر به استثنای *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید با افزایش غلظت ترکیب فنلی کاهش مختصری را در میزان فعالیت پلی فنل اکسیدازی گیاهچه ها آشکار ساختند (جدول ۱، شکل ۷).

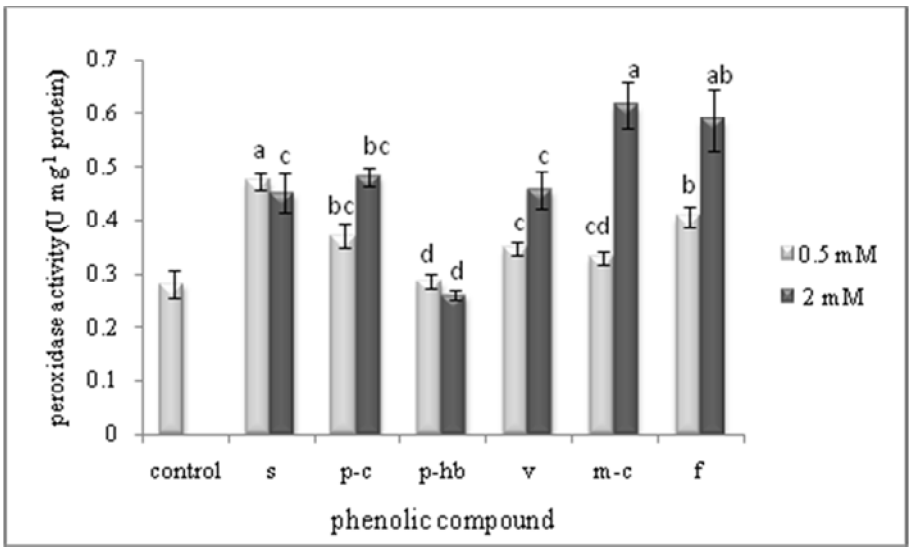
مقایسه فعالیت SOD در بین نمونه های مختلف به خوبی نشان داد که کمترین فعالیت آنزیم متعلق به نمونه شاهد (۰/۷۸U mg^{-1} protein) می باشد (شکل ۸). همانند بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، تفاوت چشمگیری بین میزان فعالیت آنزیم SOD گیاهچه های تیمار شده با غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید نسبت به شاهد مشاهده شد (به ترتیب حدود ۱۱ و ۷/۸ برابر شاهد). این تفاوت حتی در مقایسه با ترکیبات دیگر نیز چشمگیر بود (شکل ۸). پس از آن بیشترین فعالیت آنزیم طی تیمار با غلظت ۰/۵ mM فرولیک و غلظت ۲ mM وانیلیک اسید (به ترتیب ۴/۰۶ و ۴/۵ برابر شاهد) دیده شد. تفاوت میانگین فعالیت آنزیم فوق در گیاهچه های تیمار شده با غلظت ۰/۵ mM هر یک از ترکیبات فنلی سیرنژیک، *m* و *p*- کوماریک اسید معنی دار نبود ودر سطحی نزدیک به نمونه شاهد قرار داشت.



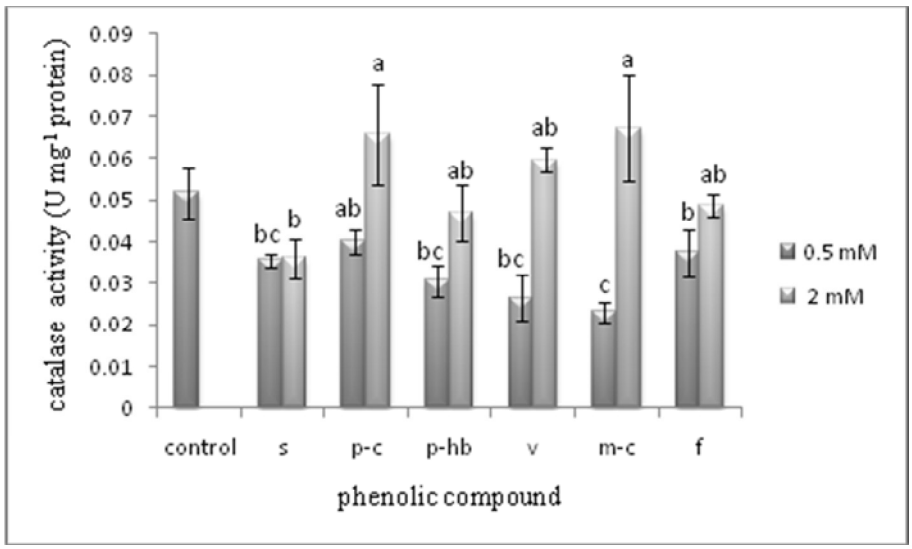
شکل شماره ی ۳ . گیاهچه های تاج خروس پس از ۲۵ روز رشد در محیط MS $^1/_2$ حاوی ۰/۵ یا ۲ میلی مولار از ترکیبات فنلی. شاهد در سمت چپ تصویر، ردیف بالا غلظت های ۰/۵ میلی مولار و ردیف پایین غلظت های ۲ میلی مولار تیمار های فنلی را نشان می دهد که به ترتیب از سمت چپ شامل: *p* - هیدروکسی بنزوئیک (*p*-hb)، *m*- کوماریک (*m*-c)، فرولیک اسید (f)، سیرنژیک (s)، وانیلیک (v) و *p*- کوماریک (*p*-c) می باشند.



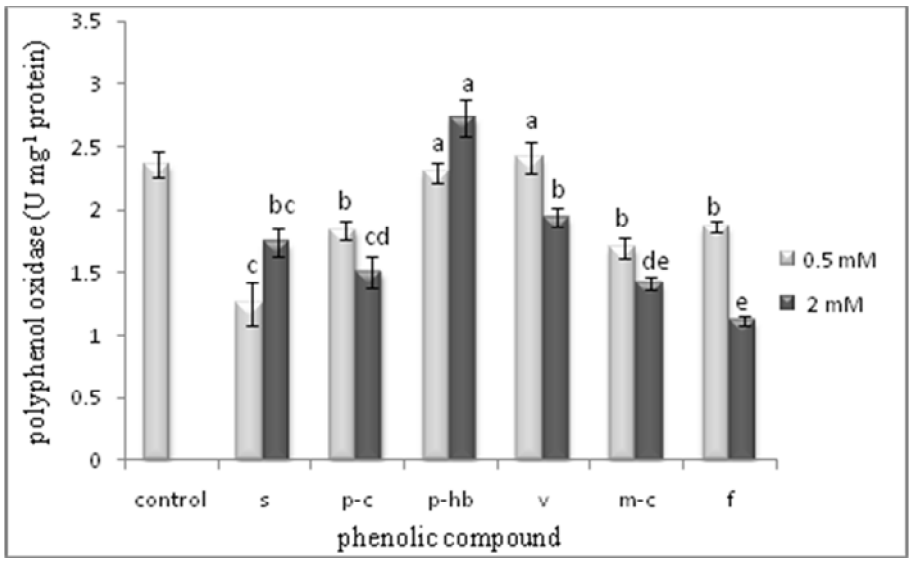
شکل شماره ی ۴. مقایسه محتوای پروتئین گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) در شرایط طبیعی (control) و پس از تیمار با ترکیبات فنلی مختلف. حروف مشابه در هر یک از غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار به طور جداگانه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح p<۰/۰۵ می باشد. اسیدهای فنلی شامل: سیرنژیک (s)، *p*- کوماریک (p-c)، *m*- کوماریک (m-c)، *p*- هیدروکسی بنزوئیک (p-hb)، وانیلیک (v) و فرولیک اسید (f) می باشند.



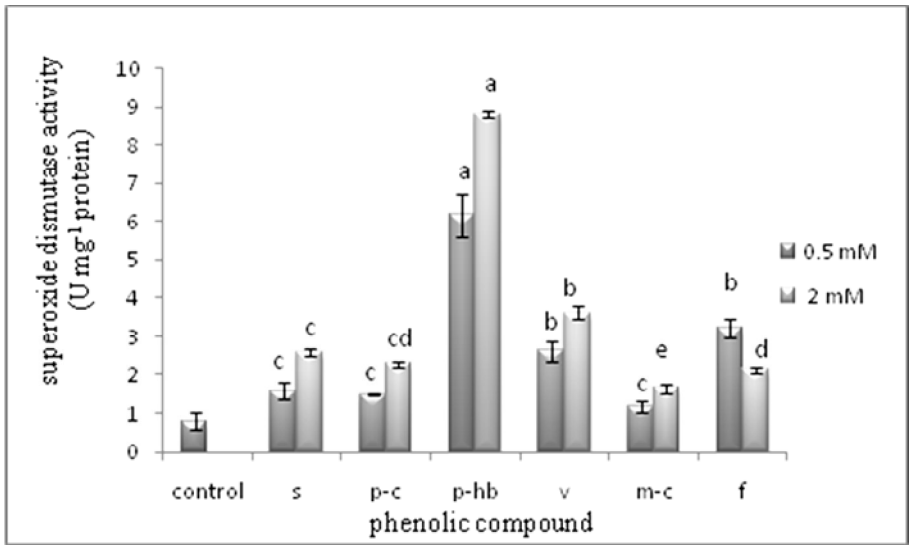
شکل شماره ی ۵. مقایسه فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) در شرایط طبیعی (control) و پس از تیمار با ترکیبات فنلی مختلف. حروف مشابه در هر یک از غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار به طور جداگانه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح p<۰/۰۵ می باشد. اسیدهای فنلی شامل: سیرنژیک (s)، *p*- کوماریک (p-c)، *m*- کوماریک (m-c)، *p*- هیدروکسی بنزوئیک (p-hb)، وانیلیک (v) و فرولیک اسید (f) می باشند.



شکل شماره ی ۶. مقایسه فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) در شرایط طبیعی (control) و پس از تیمار با ترکیبات فنلی مختلف. حروف مشابه در هر یک از غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار به طور جداگانه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح p<۰/۰۵ می باشد. اسیدهای فنلی شامل: سیرنژیک (s)، *p*- کوماریک (p-c)، *m*- کوماریک (m-c)، *p*- هیدروکسی بنزوئیک (p-hb)، وانیلیک (v) و فرولیک اسید (f) می باشند.



شکل شماره ی ۷. مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) در شرایط طبیعی (control) و پس از تیمار با ترکیبات فنلی مختلف. حروف مشابه در هر یک از غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار به طور جداگانه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح p<۰/۰۵ می باشد. اسیدهای فنلی شامل: سیرنژیک (s)، *p*- کوماریک (p-c)، *m*- کوماریک (m-c)، *p*- هیدروکسی بنزوئیک (p-hb)، وانیلیک (v) و فرولیک اسید (f) می باشند.



شکل شماره ی ۸. مقایسه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.) در شرایط طبیعی (control) و پس از تیمار با ترکیبات فنلی مختلف. حروف مشابه در هر یک از غلظت های ۰/۵ و ۲ میلی مولار به طور جداگانه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p<0/05$ می باشد. اسیدهای فنلی شامل: سیرنژیک (s)، *p*- کوماریک (p-c)، *m*- کوماریک (m-c)، *p*- هیدروکسی بنزوئیک (p-hb)، وانیلیک (v) و فرولیک اسید (f) می باشند.

بحث

بررسی میزان پروتئین و فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی گیاهچه های ۲۵ روزه تاج خروس که با ۶ ترکیب فنلی مختلف و رایج در ایجاد اثرات آللوپاتی تیمار شده بودند نشان داد که اغلب این ترکیبات به استثنای *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید باعث افزایش قابل ملاحظه میزان پروتئین بافت تر می شدند. این نتایج مطابق با نتایج مطالعه ای است که Verma و Rao (۲۰۰۵) در رابطه با اثرات دگر آسیبی عصاره های ۴ گونه علف هرز بر روی واریته های مختلف سویا (*Glycine max* L.) انجام دادند. آنها نشان دادند که میزان پروتئین کل سویا در اغلب تیمار ها در مقایسه با شاهد افزایش داشت و گاهی این افزایش تا ۶/۶ برابر شاهد بود. پروتئین ها و کربوهیدراتها دو نشانگر اساسی منعکس کننده وضعیت فیزیو لوژیکی سلولها هستند (Yang et al. 2011). افزایش پروتئین ممکن است نشان دهنده سنتز پروتئین های جدید از جمله آنزیم های پاد اکساینده برای ایجاد مقاومت به تنش های محیطی باشد (Yang et al. 2011) یا ممکن است به علت کاهش میزان آب گیاهچه ها باشد که باعث افزایش مصنوعی غلظت آن در سیتوپلاسم شده است. محاسبه پروتئین بر حسب میانگین درصد وزن خشک در بین تیمارهای فنلی تفاوت معنی داری را از نظر اثر غلظت یا نوع ترکیب

فنلی نشان نداد اما این عامل وقتی برحسب درصد وزن تر برآورد شد کاملا تفاوت تیمار ها را از نظر محتوای آب مشخص نمود (داده های منتشر نشده). بررسی ها نشان داده است که مشتقات بنزوئیک و سینامیک اسید باعث کاهش جذب یونها و آب و افزایش نشت یون ها می گردند (Yu and Matsui 1997; Ye et al. 2006; Lyu and Blum 1990) اما میزان تاثیر آللوکمیکال ها بستگی به غلظت، pH، و فعالیت میکروارگانیسم های خاک دارد. به نظر می رسد تحت تیمار این مواد میزان ABA نیز افزایش می یابد (Holapp and Blum 1991). هورمون فوق یکی از اجزا اصلی سیستم ترارسانی علامت پاسخ های گیاهان به تنش های زیستی و غیر زیستی است و بسته شدن سلولهای محافظ روزنه، افزایش مقاومت روزنه ای و کاهش جذب آب از نتایج مورد انتظار تاثیر این تنظیم کننده رشد می باشد (Taiz ang Zeiger 2002).

برخلاف یافته های ما، نتایج برخی مطالعات دیگر در رابطه با تغییر محتوای پروتئین ها طی تنش آللوپاتی مبتنی بر کاهش آن می باشد. بر اساس تحقیقات Weir و همکاران (۲۰۰۴) رادیکال های آزاد می توانند بر روی نفوذ پذیری غشا تاثیر گذاشته و باعث آسیب به پروتئین ها شوند. همچنین بر طبق مطالعات Ilori و همکاران (۲۰۰۷) اثر عصاره آبی گیاه *Tithonia diversifolia* بر روی دانه رست های *Amaranthus cruentus* باعث کاهش محتوای پروتئین گیاهچه ها در مقایسه با شاهد گردید. این کاهش به ورود پروتئین به مسیر های بیوسنتزی دیگر در دانه رستهای بالغ نسبت داده شده است.

طی تنش های محیطی مختلف از جمله آللوپاتی ممکن است تنش های اکسیداتیو ناشی از تولید رادیکال های آزاد اکسیژن به وجود آید که به رشد گیاه در این شرایط آسیب فراوانی می رساند (دولت آبادیان و همکاران ۱۳۸۷). سلول های موجودات زنده به طور طبیعی رادیکال های آزاد را با مکانیسم های دفاع پاد اکسایشی حذف می نمایند. با انباشتگی $O_2^{\cdot-}$ و H_2O_2 فعالیت آنزیمهایی مانند SOD، CAT، APX و POD زیاد شده و به حذف یا کاهش سطح ROS کمک می کنند (Blokhina 2003). مطابق با این نتایج بررسی فعالیت برخی از آنزیم های پاد اکسایشی تاج خروس تغییر معنی داری را در جهت حذف رادیکالهای آزاد نشان داد.

مرور کلی نتایج این پژوهش حاکی از آن است که در تمام تیمارها فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز گیاهچه ها نسبت به شاهد چندین برابر شده بود. افزایش فعالیت SOD در گیاهان تیمار شده بیانگر تولید بیش از حد معمول $O_2^{\cdot-}$ هدف گیری شده توسط ترکیبات فنلی بود. این مسئله به ویژه در تیمار با *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید بیشتر به چشم می خورد. واکنش مهلر و تنفس نوری از مهمترین منابع تولید ROS در سلولهای فتوسنتز کننده هستند (Foyer 1996; Foyer and Mullineaux 1994). بنابراین احتمال دارد افزایش فرایند های فتواکسیداسیون القا شده توسط تنش مواد آللوکمیکال به ویژه *p*-hb سطح

رادیکالهای آزاد را در سلول ها افزایش داده باشد. میزان تغییر فعالیت پراکسیداز و کاتالاز گیاهچه ها در این تیمار عکس تغییر فعالیت آنزیم های SOD و PPO بود. این مسئله پیشنهاد می نماید که اولین رادیکال های آزاد اکسیژن تولید شده در این گیاهچه ها آنیون های سوپراکسید و آنیون های فنلی هستند که طی تنش اکسیداتیو ناشی از اثرات آللوپاتی *p*-hb تشکیل و باعث افزایش فعالیت یا افزایش رونویسی و سنتز این آنزیم ها می شدند. علاوه بر *p*-hb، کاربرد چهار ترکیب فنلی وانیلیک، فرولیک، سیرنژیک و پارا کوماریک اسید نیز افزایش تولید $O_2^{\cdot-}$ (افزایش فعالیت SOD) را در سطحی پایین تر تائید کردند.

در گیاهان متعددی نتایج مشابه با یافته های ما پس از کاربرد ۲-بنزوکسازولینون و ترکیبات فنلی دیگر گزارش شده است (Batish et al. 2006; Yu 2003; Wu et al. 2002; Lin et al. 2007). در ریشه های *Malus prunifolia* آللوکمیکالهایی نظیر فتالیک اسید باعث القاء تنش اکسیداتیو از طریق تولید رادیکال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن شد که در نتیجه آن فعالیت SOD افزایش یافته بود (Bai et al. 2009).

از طرف دیگر مقایسه افزایش فعالیت SOD گیاه تاج خروس در پاسخ به افزایش غلظت ترکیبات فنلی این نظر را القا نمود که میزان تولید رادیکال آزاد سوپراکسید در گیاهان تیمار شده همبستگی مثبتی با غلظت این ترکیبات فنلی داشته است و چنانچه هدف از کاربرد ترکیبات فنلی صدمه به سیستم دفاع پاد اکسایشی تاج خروس باشد باید از غلظت مناسب هر ترکیب استفاده نمود.

در مورد تیمار با *p*-hb به نظر می رسد آنزیم های SOD و PPO نسبت به دو آنزیم دیگر نقش موثرتری را در رابطه با حذف اشکال فعال اکسیژن تولید شده داشته باشند. از آنجا که کاهش محتوای پروتئینی پس از تیمار با *p*-hb مشاهده شده بود و این عامل با افزایش محتوای آب گیاهچه ها همراه بود و همچنین فعالیت کاتالازی نیز کاهش مشخصی را نشان می داد بنابراین می توان نتیجه گرفت که اثر اللوپاتی این ماده بر گیاه تاج خروس کم بوده و سیستم دفاعی گیاه به خوبی قادر به جاروب کردن رادیکالهای سوپر اکسید و پلی مریزه کردن فنل ها می باشد به همین علت تولید H_2O_2 کاهش یافته و نیازی به القای فعالیت کاتالاز نیست. در واقع رشد بهتر تاج خروس در حضور این ترکیب می تواند مربوط به تخفیف تنش باشد.

افزایش فعالیت SOD و کاهش فعالیت کاتالاز طی تیمار دانه رست های تاج خروس با سیرنژیک اسید نیز مشابه وضعیت *p*-hb بود. این پدیده با یافته های دیگر در این زمینه همخوانی دارد. به طور مثال بررسی اثر آللوپاتی عصاره ریشه *Cucumis sativus* L. بر روی خود گیاه (اثرات خود مسمومی) و نیز اثر کاربرد تعدادی از اسید های فنلی بر روی رشد آن نشان داد که تیمار با عصاره ریشه در غلظت های مختلف، فعالیت POD و SOD را به ترتیب ۸۸ و ۷۳ درصد بیشتر از شاهد افزایش داده بود اما برعکس فعالیت کاتالاز را در گیاه فوق پایین آورده بود (Yu et al. 2003). هم چنین نتایج محققان مختلف نشان داده است که بنزوئیک و سینامیک اسید، از

آللوکمیکالهای رایج، فعالیت POD را بین ۱۱۹-۶۱ درصد و فعالیت SOD را بین ۹۱-۱۰ درصد افزایش می دادند. این آنزیم ها از ابزارهای مهم در سم زدایی مقادیر بالای ROS تولید شده هستند (Yu et al. 2003).

مقایسه فعالیت سایر آنزیم های پاد اکسایشی تاج خروس پس از تیمار با ۵ ترکیب فنلی دیگر اهمیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز را در سم زدایی بافتها پس از تیمار با هر دو ایزومر پارا- و متا- کوماریک اسید خاطر نشان می سازد. هم چنین فرولیک و سیرنژیک اسید نیز باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه ها شده بودند. این نتایج نشان داد که این مشتقات سینامیک اسید با افزایش تولید H_2O_2 تنش اکسیداتیو را برای گیاه ایجاد می نمایند و غلظت ترکیبات فنلی اثر تعیین کننده ای در تولید این گونه فعال اکسیژن داشت به طوری که معمولا غلظت بالاتر آنها (۲ mM) اثرات معنی داری را در افزایش فعالیت آنزیم های فوق پدید آورد. مقایسه فعالیت کاتالاز پس از تیمار ترکیبات فنلی نشان داد که برخلاف *p*-hb، تیمار با غلظت ۲ میلی مولار پارا- و متا-کوماریک و وانیلیک اسید، فعالیت این آنزیم تا حد قابل ملاحظه ای افزایش یافته بود. آنزیم اخیر H_2O_2 را به آب و اکسیژن مولکولی می شکند در حالی که پراکسیداز H_2O_2 را در ترکیب با گهرمایه هایی نظیر ترکیبات فنلی و / یا پاد اکساینده های دیگر تجزیه می کند (Arora et al. 2002). فعالیت پراکسیداز نیز طی تیمار با اغلب مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش به استثنای *p*-hb و بخصوص در غلظت ۲ میلی مولار افزایش یافته بود. از آنجا که برخی از پراکسیدازها فعالیتی مشابه با آنزیم کاتالاز در جاروب کردن رادیکال های آزاد هیدروکسیل و حذف H_2O_2 دارند، فعالیت بیشتر هر دو آنزیم با افزایش غلظت ترکیبات فنلی قابل پیش بینی بود. وقتی گیاه در معرض تنش اکسیداتیو ملایم قرار می گیرد مجموعه ای از پاسخ های سازشی بروز می نماید تا بتواند خود را در برابر تنش های شدید تر محافظت نماید. به طور مثال می توان به سنتز یا افزایش فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی به عنوان یک پاسخ سازگار کننده به تنش اکسیداتیو در برخی اندامها اشاره کرد (Yu et al. 2003). این مسئله در مورد غلظتهای پائین ترکیبات فنلی تیمار شده و *p*-hb درست بود. اما در مورد وانیلیک و فرولیک اسید و همچنین مشتقات کوماریک اسید، کاهش شدید رشد نشانه هایی از آسیب به سیستم دفاع پاداکسایشی را نشان داد. احتمالا این پدیده می تواند به دلیل اثرات بسیار مخرب این ترکیبات فنلی بر روی ساختار پروتئین های غشایی و القای فعالیت پروتئازها باشد که بر روی فعالیت پلی فنل اکسیدازی گیاهچه ها نیز اثر منفی و کاهش دهنده گذاشته بود. رادیکالهای $OH^{\cdot}$ و $HO_2^{\cdot}$ می توانند نفوذ پذیری غشا را تحت تاثیر قرار داده و باعث آسیب به DNA و پروتئین ها گردند (Weir et al. 2004). به طور مثال تیمار گیاه خیار با سینامیک اسید آسیب های غشایی را افزایش داد (Ding et al. 2007). همینطور گزارش شده است که تیمار کاهو با ۲- بنزوکسازولینون (یکی از بازدارنده های رشد) می تواند باعث افزایش تولید H_2O_2 و آسیب های

غشایی شود (Sanchez and Reigosa 2005). شواهد حاکی از آن است که افزایش ROS به علت تخریب آنتی اکسیدان ها یا دیگر فرایند های ثانویه مانند پراکسیداسیون لیپیدها ایجاد می شود (جوانی جونی و همکاران ۱۳۸۷). انباشتگی این گونه های فعال برای حفظ ساختار و عملکرد پروتئین های غشایی از جمله آنزیم های پاد اکسایشی بسیار مضر است (Ding et al. 2007).

به نظر می رسد در تیمارهای *m* و *p*- کوماریک و هم چنین وانیلیک اسید مقدار زیادی H_2O_2 تشکیل می شود که با فعالیت POD و CAT این گونه بسیار خطرناک اکسیژن تا حدودی اما نه کامل حذف می گردد. در نتیجه فعالیت شدید POD طول این گیاهچه ها نسبت به بقیه تیمار ها کوتاهتر بودند. پراکسیداز ها در چوبی و سوبرینی شدن سلولها از طریق دخالت در بیوسنتز دیواره اسکلتی نقش دارند و رشد را محدود می کنند (Negrel and Lherminier 1987; Polle et al. 1994; Espelie et al. 1986). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد افزایش فعالیت POD با کاهش رشد همبستکی نزدیکی دارد این مسئله تاثیر منفی اسید های فنلی ذکر شده را بر رشد تاج خروس تائید می نماید. افزایش فعالیت POD در دانه رستهای سویا ی تیمار شده با بنزوئیک و سینامیک اسید هم مشاهده شده است. در این گیاه فعالیت POD بعد از تیمار با *p*- کوماریک اسید ۰/۵ میلی مولار حدود ۴۲ درصد و پس از تیمار با *p*- هیدروکسی بنزوئیک اسید حدود ۴۵ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته بود (Doblinski et al. 2003). افزایش فعالیت پراکسیداز و کاهش فعالیت پلی فنل اکسیداز در دانه رستهای ذرت رشد یافته در حضور غلظت های ۰/۵ و ۳ میلی مولار فرولیک اسید نیز گزارش شده است. به نظر می رسد افزایش سنتز لیگنین و ترکیبات فنلی ناشی از افزایش فعالیت POD باشد (Devi and Prasad 1996).

با توجه به نیمرخ فعالیت ۴ آنزیم بررسی شده احتمال داده می شود که طی تنش آللوپاتی فعالیت آنزیم های پاد اکسایشی تاج خروس در یک الگوی خاص تغییر می نماید یعنی با توجه به انباشتگی نوع رادیکال تولید شده و کارایی آنزیم های پاد اکسایشی تقدم و تاخری از نظر زمان تاثیر آن ها وجود دارد. افزایش فعالیت SOD نشانه غلبه رادیکالهای $O_2^{\cdot-}$ نسبت به اشکال دیگر اکسیژن فعال است که معمولا به علت آغاز تنش اکسیداتیو (با ویژگی درصد پروتئین بیشتر در وزن خشک) و یا آسیب های گسترده غشایی (با ویژگی درصد پروتئین کمتر) پدید می آید. از طرف دیگر افزایش فعالیت پراکسیداز و کاتالاز معرف پیشرفت تنش اکسیداتیو و تبدیل $O_2^{\cdot-}$ به H_2O_2 است. مقایسه فعالیت این دو آنزیم و محتوای پروتئین تاج خروس در تیمار های مختلف نشان دهنده همبستگی مثبت بین محتوای پروتئین در وزن تر گیاهچه ها و فعالیت پراکسیدازی بود به عبارت دیگر به نظر می رسد متناسب با تغییرات محتوای پروتئین و شدت تنش، مقدار این آنزیم افزایش یا کاهش می یابد اما در مورد آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز چنین رابطه ای دیده نشد. فعالیت پلی فنل اکسیداز فقط در طی تیمار

با پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید افزایش یافته بود. از آنجا که فعالیت شدید این آنزیم در بافتهای مسن و به عنوان نشانه ای از پیری یا واکنش های بسپاری فنلها گزارش شده است و همچنین با توجه به درصد بالای پروتئین در وزن خشک گیاهچه های تیمار شده با پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید (علیرغم محتوای پائین پروتئین در وزن تر) می توان نتیجه گرفت که فعالیت فوق العاده شدید SOD و افزایش PPO نشانه کارکرد صحیح سیستم دفاعی گیاه در برابر رادیکالهای آزاد اکسیژن است و ترکیب شیمیایی که باعث چنین پدیده ای شده باشد نمی تواند به عنوان یک ماده علف کش خوب معرفی گردد.

در بین ۶ ترکیب فنلی بررسی شده گذشته از اثر تحریک کننده هر یک از این مواد بر فعال کردن سیستم دفاع پاد اکسایشی آنزیمی تنها *m* و *p*-کوماریک و وانیلیک اسید قدرت غلبه بر این سد دفاعی را داشتند. اثر برخی سموم گیاهی بر مهار فعالیت تعدادی از آنزیم ها ثابت شده است (Meazza et al. 2002). هم چنین پیشنهاد شده است که کاهش فعالیت آنزیم ها ممکن است اثر ثانویه این ترکیبات سمی و در نتیجه ی کاهش محتوای پروتئین کل باشد که به طور معمول طی تنش ها اتفاق می افتد (Weir et al. 2004). این نتیجه کاملا با تاثیر سه ترکیب ذکر شده .بر محتوای آب و درصد پروتئین در وزن خشک گیاهچه های تاج خروس و فعالیت آنزیمهای POD و CAT آن منطبق بود. همچنین ممکن است بر اثر افزایش تولید رادیکال های آزاد تعادل بین اکسیدان ها و پاد اکساینده ها به هم خورده و فعالیت پاد اکساینده ها کاهش یافته باشد. کاربرد صحیح ترکیبات شیمیایی موتر و کاهنده رشد علف های هرز در غلطت های کم موجب افزایش قدرت رقابت گیاهان زراعی در کشتزارها می گردد. بنابراین آنالیز ریشه تعدادی از محصولات کشاورزی که دارای مقدار قابل توجهی از سه ترکیب معرفی شده در این پژوهش، با خاصیت آللوپاتی شدید، باشند از پتانسیل لازم برای استفاده در روشهای تناوب کشت و مهار رشد تاج خروس برخوردار خواهند بود.

منابع

جوانی جونی، ف.، عبدالمالکی، پ. و قناتی، ف. (۱۳۸۷). "بررسی میدان مغناطیسی ایستا بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت و محتوای فلاوونوئیدی در گیاه باقلا (*Vicia faba* L.)". مجله علوم پایه دانشگاه اصفهان ۳۵(۶): ۱۹۵- ۲۰۸.

دولت آبادیان، ا.، مدرس ثانوی، ع.م. و اعتمادی، ف. (۱۳۸۷). "اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک بر جوانه زنی بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش شوری".مجله زیست شناسی ایران ۲۱: ۶۹۲ – ۷۰۲.

قربانلی، م.، بخشی خانیکی، غ. و شجاعی، ا. (۱۳۸۷). "بررسی اثرات آللوپاتی درمنه (*Artemisia sieberi* Besser) بر جوانه زنی بذور و رشد دانه رست های یولاف وحشی (*Avena lodoviciana* L.) و تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.)". پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی ۷۹: ۱۲۹-۱۳۴.

میرشکاری، ب.، دباغ محمدی نسب، ع.، جوانشیر، ع.، نورمحمدی، ق. و رحیمیان مشهدی، ر. (۱۳۸۶). "بررسی اثرات رقابتی تاج خروس ریشه قرمز (*Amaranthus retroflexus* L.) بر روی عملکرد و اجزای عملکرد آفتابگردان هیبرید آذر گل (*Helianthus annuus* L.)". مجله علوم کشاورزی ۱: ۱۷۹ – ۱۷۱.

نجفی آشتیانی، ا.، عصاره، م. ح.، باغستانی، م. ع. و انگجی، ج. (۱۳۸۷). "بررسی اثرات دگرآسیبی عصاره برگ اکالیپتوس (*Eucalyptu-scamaldulensis* Dehnh) بر جوانه زنی و رشد گیاهچه علف هرز تاج خروس (*Amaranthus retroflexus* L.)". پژوهش و سازندگی در علوم طبیعی ۸۱: ۵۹ – ۶۸.

Appel, H.M. (1993). "Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation" J. Chem. Ecol. 19: 1521-1552.

Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. (2002) "Oxidative stress and antioxidant system in plants" Curr Sci 82:1227–1238.

Bai R., Ma, F., Liang, D. and Zhao, X. (2009). "Phthalic Acid Induces Oxidative Stress and Alters the Activity of Some Antioxidant Enzymes in Roots of Malus prunifolia"J Chem Ecol 35:488–494

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M. (2006). "The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms" The Annual Review of Plant Biology 57:233–66.

Batish, D.R., Singh, H.P., Setia N., Kaur, S. and Kohli, R.K. (2006). "2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*)" Plant Physiology and Biochemistry 44:819–827.

Beuchamp, C. and Fridovich, I. (1971). "Superoxide dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels" Analytical Biochemistry 44: 276-287.

Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt. K.V. (2003). "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress : a review" Annals of botany 91: 179-194.

Bradford, M.M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" Analytical biochemistry 72: 248-254.

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.

Costea, M., Weaver, S. and Tardif, F.J. (2004). "The biology of Canadian weeds. 130. *Amaranthus retroflexus* L., *A. powellii* S. Watson and *A. hybridus* L." Can. J. Plant Science 84: 631–668.

Devi, R.S. and Prasad M.N.V. (1996). "Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth" Biol Plant 38(3): 387-395.

Ding, J., Sun, Y., Xiao, C.L., Shi, K., Zhou, Y.H. and Yu, J.Q. (2007). "Physiological basis of different allelopathic reactions cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid" Journal of Experimental Botany 58(13): 3765–3773.

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 peroxidation of soybean roots in response to *p*-Coumaric and *p*-Hydroxybenzoic acids" Brazilian Archive of Biology and Technology. 46(2):193-198.

Espelie, K.E., Franceschi, V.R. and Kolattukudy, P.E. (1986). "Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with uberization in wound-healing potato tuber tissue" Plant Physiol. 81: 487–492.

Foyer, C.H. and Mullineaux,P.M. (1994). "Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants" CRC Press, Boca Raton, FL.

Foyer,C.H. (1996). "Oxygen processing in photosynthesis" Biochem. Soc. Trans., 24, 427–433.

Holapp, L. and Blum, U. (1991). "Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compound, on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber, and bean" J. Chem. Ecol. 17: 865–886.

Ilori, O.J., Otusanya, O.O. and Adelusi, A.A. (2007). "Physiological response of Amaranthus cruentus and Oryza sativa to phytotoxins of Tithonia diversifolia"Research jurnal of phytochemistry" 1(1): 12-20.

Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.D. and Jiang, D.A. (2010). "Phenolics and Plant Allelopathy" Molecules 15: 8933-8952.

Lin, R. Z., Wang, X. R., Luo, Y., Du, W.C., Guo, H.Y. and Yin, D.Q. (2007). "Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)" Chemosphere 69:89–98.

Liu, W., Fang, J., Zhu, W.M. and Gao, P.J. (1999). "Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var HH2" Journal of the Science of Food and Agriculture 79:779-785.

Lyu, S.W. and Blum, U. (1990). "Effects of ferulic acid, an allelopathic compounds, on net P, K, and water uptake by cucumber seedling in a split-root system" J. Chem. Ecol. 16: 2429–2439.

Meazza, G., Scheffler, B.E., Tellez, M.R., Rimando, A.M., Romagni, J.G., Duke, S.O., Nanayakkara, D., Khan, I.A.,

Abourashed, E.A. and Dayan, F.E.(2002). "The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase" Phytochemistry 60:281-288.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. V. (2004). "Reactive oxygen gene network of plants" TRENDS in Plant Science 9: 490-498.

Negrel, J. (1987). "Lherminier, Peroxidase-mediated integration of tyramine into xylem cell walls of tobacco leaves" Planta 172: 494–501.

Polle, A., Otter, T.and Seifert, F. (1994). "Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.)" Plant Physiol. 106: 53–60.

Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza J.L. (1993). "Purification and some properties from sunflower of polyphenoloxidase seeds" Phytockmistry 34: 927-931.

Ronald, A.E. (2000). *Amaranthus retroflexus* / pigweed. U.S. Department of Agriculture.

Ronald, A.E. and Smith, E.C. (2000). The flora of the Nova Scotia. Halif Nova Scotia museum. 746p.

Sanchez-Moreiras, A.M. and Reigosa, M.J. (2005). "Whole plant response of lettuce after root exposure to BOA (2(3H)-benzoxazolinone)" J. Chem. Ecol. 31: 2689–2703.

Santana, C.M., Ferrera, Z.S., Padrón, M.E.T. and Rodríguez, J.J.S. (2009). "Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New Approaches" Molecules 14: 298-320.

Taiz, L. and Zeiger, E.(2002). Plant physiology. Sinauer Associates. USA.

Torres, A., Oliva, R.M., Castellano, D. and Cross, P. (1996). First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future., pp. 278. SAI (University of Cadiz). Spain, Cadiz.

Verma, M. and Rao, P.B. (2005). "Allelopathic effect of four weed species extracts on germination, growth and protein in different varieties of *Glycine max* L. Merrill" Journal of Environmental Biology 27(3): 571-577.

Weir, T.L., Park, S.W. and Vivanco, J.M. (2004). "Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals" Current Opinion in Plant Biology 7:472–479.

Wu, F.Z., Huang, C.H. and Zhao, F.Y. (2002)." Effects of phenolic acids on growth and activities of membrane protective enzymes of cucumber seedlings" Agric. Sci. China 35:821–825.

Yang, C.Y., Liu S.J., Zhou, S.W., Wu, H.F., Yu, J.B. and Xia, C.H. (2011). "Allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) induces oxidative damage and antioxidant respones in Phaeodactylum tricornutum" Pesticide biocemistry and Physiology 100: 93-103.

Ye, S.F., Zhou, Y.H., Sun, Y., Zou, L.Y. and Yu, J.Q (2006). "Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of

Fusarium wilt" Environ. Experimen. Bot. 56: 255-262.

Yu, J.Q. and Matsui, Y. (1997). "Effects of root exudates of cucumber (Cucumis sativus) and allelochemicals on uptake by cucumber seedlings" J. Chem. Ecol. 23: 817–827.

Yu, J.Q., Ye, S.F., Zhang, M.F. and Hu, W.H. (2003). "Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber" Biochem. Syst. Ecol 31:129–139.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.