وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه محقق اردبیلی

معاونت پژوهشی و فناوری

گزارش نهایی طرح تحقیقاتی

عنوان پژوهش:

بررسی اثرات دگرآسیبی کاتچین از جنبه های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

مجری طرح:

سید مهدی رضوی

گروه: زیست شناسی

دانشکده: علوم پایه

این طرح با تصویب و حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا گردیده است

بهار ۱۳۹۸

چکیده طرح

کاتچین با نام کامل شیمیایی یک فلاوان-۳-ال، ترکیبی است از گروه فلاونویئدها که در برخی گیاهان از جمله چای سبز به مقدار قابل توجهی تولید می شود. برخی گزارشات حاکی از اثرات دگرآسیبی این ترکیب می باشد. در این تحقیق به منطور بررسی قابلیت دگرآسیبی (آللوپاتیک) این ترکیب پاسخ گیاه مدل کاهو از جنبه های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به ایت ترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که این ترکیب منجر به کاهش قابل توجه پارامترهای رشد گیاه کاهو از جمله وزن تر و خشک و طول اندامهای گیاهی یعنی ریشه و اندام هوایی گردید. از طرف دیگر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی این گیاه تحت تاثیر کاتچین افزایش قابل توجهی پیدا کرد. نتایج همچنین نشان داد که الگوی الکتروفورتیک پروتیئنهای گیاه کاهو تحت تاثیر این ماده دچار تغییر شده است و برخی باندهای جدید در این الگو ظاهر شدند که بیانگر ساخت پروتیئنهای جدید در این گیاه می باشد. آنالیز میزان و تراکم کاتچین در گیاه کاهو با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که بعد از تیمار ابتدا میزان این ترکیب در گیاه افزایش یافته و با سپری شدن مدت زمان مشخص در حد چند روز با متابولیزه شدن ایم ماده در گیاه تراز آن به حد قبلی باز می گردد. بررسی اجمالی نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب کاتچین بر روی گیاه مدل کاهو اثرات بازدارندگی بارز نشان می دهد و از اینرو این ترکیب را می توان به عنوان یک ترکیب آللوکمیکال به حساب آورد و در ساخت علف کشهای طبیعی مورد استفاده قرار داد.

کلید واژه ها: کاتچین، کاهو، دگرآسیبی، فیزیولوژی، بیوشیمی

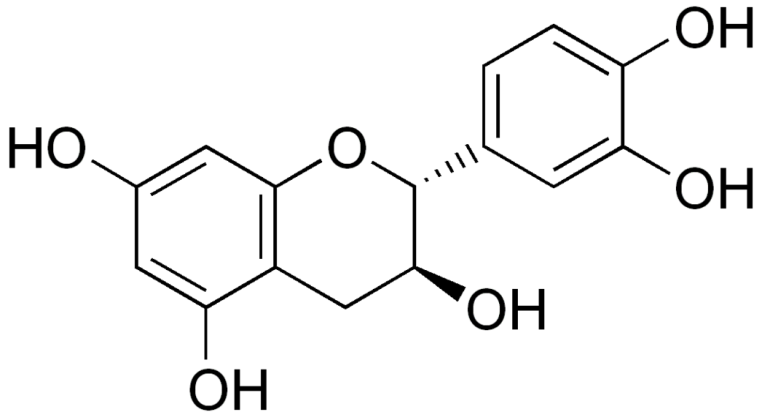
فصل اول:

مقدمه و هدف

۱-۱- مشخصات کاتچین

کاتچین یا **کتیچین** (Catechin) با نام کامل شیمیایی یک فلاوان-۳-ال، ترکیبی است از گروه فلاونویئدها و در واقع یک نوع فنل و آنتی‌اکسیدان طبیعی با ماهیت متابولیت ثانویه گیاهی است. این ترکیب به گروه فلاوان-۳-ال (یا به طور ساده فلاونول‌ها) بخشی از خانواده زردینه تعلق دارد. نام خانواده شیمیایی کتیچین از کَتِیچو گرفته شده است، که آب مازویی یا عصاره جوشیده میموسا کتچو سنگالیا کتچو)است.

در چای سبز به نسبت چای سیاه کاتچین‌ها به مقدار قابل ملاحظه‌ای یافت می‌شوند. امروزه مشخص شده است که پلی فنول‌ها از جمله کاتژین رایج‌ترین آنتی اکسیدان‌های مواد غذایی هستند و از طریق مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مزمن از جمله سرطان دارند. رادیکال‌های آزاد با حمله به غشای سیتوپلاسمی سلول و نابود کردن آن، به DNA داخل سلول دسترسی پیدا می‌کنند و از طریق تغییر DNA باعث سرطان می‌شوند. پلی‌فنول‌ها علاوه بر نابودکردن رادیکال‌های آزاد با تسریع مرگ سلول‌های سرطانی از سلول‌های سالم نیز حفاظت می‌کنند.(Zheng et al., 2008).



شکل ۱: ساختار شیمیایی کاتچین

گزارشاتی وجود دارد که ترکیب کاتچین به عنوان یک ترکیب آللوشیمیایی عمل کرده و بعد از تولید شده در برخی گیاهان به عنوان یک دفاع شیمیایی از این گیاهان رشد و فعالیت سایر گیاهان پیرامون را مهار می نماید. امروزه شناخت و بررسی عملکرد این نوع ترکیبات آللوشیمیایی که در اصل متابولیتهای ثانویه گیاهی هستند اهمیت زیادی دارد.(Dake et al., 2009).

۲-۱-تاریخچه و اهمیت آللوپاتی و ترکیبات آللوکمیکال

پدیده آللوپاتی، در مفهوم تداخل شیمیایی یک گونه گیاهی با جوانه زنی، رشد وتکوین سایر گونه‌های گیاهی بیش از ۲۰۰۰ سال است که شناخته شده است. اولین گزارش از این پدیده مربوط به گیاهان زراعی از جمله نخود (*Cicer arietinum*) و جو (*Hordeum vulgar*) است که رشدعلفهای هرزوگیاهان زراعی دیگررا مهار می کنند درحدود ۳۰۰ سال قبل ازمیلاد گیاهشناس یونانی، تئوفراستوس، اولین شخصی بود که محتوای آللوپاتی گیاهان راکشف کرد او مشاهده کردکه بقایای نخود در خاک باعث از بین رفتن علف‌های هرز می شود. واژه آللوپاتی برای اولین بارتوسط یک محقق آلمانی به نام Molish درسال ۱۹۳۷ معرفی شدو مشتق شده ازکلمه یونانی آللون (allelon) به مفهوم دیگری و پاتوز (pathos) در مفهوم آسیب و به معنی اثرات مضر یک گیاه بر دیگری است. پدیده آللوپاتی به عنوان یک میانجی برای توضیح روابط بین گیاهان در جامعه ی گیاهان می باشد (Miller., 1996). تشخیص بین رقابت وآللوپاتی مهم است زیرا در بر همکنشهای حقیقی بین آللوپاتی و رقابت پیچیدگی زیادی وجود دارد. از نظر تئوری، رقابت برای غذا هم ممکن است بر هم کنش های آللوپاتی را القاء کند که می‌تواند در اثر افزایش تولید متابولیت های ثانویه مؤثر در آللوپاتی در اثر استرس ناشی ازرقابت بوده و یا دراثر افزایش حساسیت گیاه به آللوکمیکال ها به علت کمبود ناشی از رقابت ایجاد گردد. به عبارت دیگر آللوپاتی ممکن است یک برتری رقابتی را برای گیاهی فراهم کند که آللوکمیکال های مهار کننده ی جذب آب و املاح غذایی را به محیط آزاد می‌کند وبه واسطه آنها سیستم حیاتی گیاه دیگر را مختل می‌نماید.

همانند استرس‌های طبیعت پدیده آللوپاتی نیز به گونه‌ای منجر به ایجاد پدیده‌ی استرس می‌شود. تاثیرات فیزیولوژیک قابل مشاهده تعاملات آللوپاتی اغلب به صورت تغییرات در رنج جوانه زنی دانه، یا به صورت کاهش در میزان رشد دانه مشاهده می‌شوند این تاثیرات شامل تغییرات فرایندهای اولیه‌ی گیاه مانند فتوسنتز، تنفس، تقسیم سلولی، سنتز رنگدانه‌ها و تولید هورمون‌های گیاهی و نیز ثبات غشا و نفوذ پذیری، جذب مواد معدنی، فعالیت روزنه ها، و .... می-باشند. (Khalay et al., 2013).

فصل دوم:

مواد و روشها

۲-۱-تهیه ی بذور و مکان اجرا

بذر کاهو واریته‌ی سیاهو(*Lactuca sativa* L.v.siyahoo) مورد استفاده در این آزمایش، از شرکت فلات تبریز و ماده کاتچین مورد استفاده اط شرکت سیگما تهیه شده بود.

این پژوهش شامل مراحل کشت آزمایشگاهی و مراحل بررسی‌های آزمایشگاهی بود. عملیات کشت آزمایشگاهی از اردیبهشت ۱۳۹۶ تا بهمن ماه ۱۳۹۷ در دستگاه ژرمیناتور حاوی لامپ مهتابی در آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. پس از طی شدن مراحل کار پرورش گیاهچه ها و انجام یادداشت برداری مربوط به صفات رویشی، بقیه‌ی آزمایش‌ها و اندازه گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در آزمایشگاه زیست شناسی ابزاری گروه زیست شناسی دانشکده‌ی علوم انجام گرفت.

۲-۲-مرحله ی تعیین غلظت اپتیمم ماده ی کاتچین

بذرهای کاهو واریته سیاهو ابتدا با محلول هیپوکلراید سدیم ٪۱ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند سپس سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. غلظت‌هایی مختلف از ترکیب کاتچین برای انجام آزمایش‌های مختلف تهیه شدند. در این راستا حدود ۵۰ میلی گرم از ماده برداشته شد و با استفاده از ۲۰ قطره Tween 20 و آب مقطر به حجم ۵۰ سی سی رسانده شد و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان استوک به دست آمد. غلظتهای پایین از این استوک و با رقیق کردن آن تهیه شد. غلظت های انتخابی از ماده کاتچین شامل غلظتهای ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. و محلول گروه شاهد که فاقد ماده کاتچین بود و تنها با آب مقطر تهیه شده بود. آزمایش ها به صورت ۳ تکرار و در طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. بذرها بعد از استریل بر روی کاغذ صافی واتمن به تعداد ۱۲ عدد چیده شدند و به منظور جوانه زنی درون ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ومیزان رطوبت ٪۷۰ و دوره‌ی روشنایی ۱۶ ساعت و دوره‌ی تاریکی ۸ ساعت قرار داده شدند. شکل(۱-۲). میزان جوانه زنی بذر هر روز ثبت گردید. و این کار تا ۷ روز ادامه یافت. به منظور اندازه گیری طول ریشه چه و طول ساقه چه گیاهچه ها از محیط برداشته شدند و با استفاده از خط کش میلیمتری اندازه گیری انجام شد.

شکل۲-۱-تست جوانه زنی و میزان رشد ساقه چه و ریشه چه گیاهچه کاهو برای بررسی غلظت اپتیمم از ماده ی شالکون

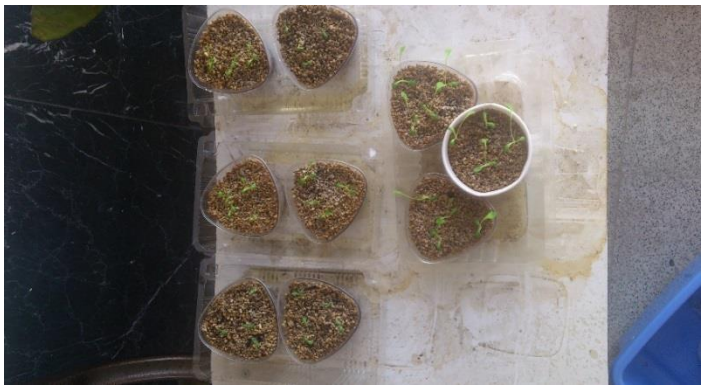
۳-۲-عملیات کاشت بذر کاهو

-پیش تیمار

در این مرحله بعد از تهیه‌ی غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از ماده کاتچین بذرهای کاهو با استفاده از هیپوکلراید سدیم ۱٪ضدعفونی شدند سپس با آب مقطر وسه بار با آب شهری شستشو داده شدند و بر روی کاغذ صافی واتمن که درون پلیت های استریل شده توسط اتوکلاو به تعداد ۵ عدد درون هر پلیت و به تعداد ۳ تکرار چیده شدند و به مدت ۲ روز در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه گذاشته شدند و برای سبز شدن و رشد لپه‌های بذرهای رشد کرده به مدت ۵ روز به ژرمیناتور حاوی لامپ مهتابی منتقل شدند.

۲-۴ -کشت گلخانه ای گیاهچه های کاهو

بعد از سبز شدن لپه‌ها گیاهچه ها با استفاده از پنس‌های استریل شده برداشته شده و در گلدان‌های پلاستیکی که برای گروه شاهد و گروه تیمار شده ۳ تکرار در نظر گرفته شده بود و حاوی پیت بودند در عمق ۲ سانتی متری تا حدودی بالاترین سطح ریشه چه درون پیت ها قرار داده شدند شکل (۲-۲) و به دستگاه ژرمیناتور حاوی لامپ مهتابی که در دمای ۲۵ درجه و رطوبت ۵۷ درجه سانتی گراد تنظیم شده بود منتقل شدند.



شکل۲-۲-گیاهچه های کاهو در مرحله ی جوانه زنی

-روش آبیاری گیاهچه ها با محلول هوگلند

گیاهان گروه تیمار با محلول هوگلند ترکیب شده با غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از ماده کاتچین و گروه کشت‌های گروه شاهد با محلول هوگلند هر روز آبیاری شدند. و بعد از ۶۷ روز و رسیدن به مرحله ی ۷ برگی شکل (۳-۲) برای بررسی های فیزیولوژیکی و مولکولی برداشت شدند.

-روش تهیه ی محلول هوگلند

محلول هوگلند شامل عناصر زیر می باشد:

جدول ۲-۱ – عناصر مورد نیاز برای تهیه ی محلول هوگلند

عناصر پرمصرف	
عناصر	مقادیر
نیترات کلسیم۴ آبه	۲۳۶/۱۶ گرم در لیتر
پتاسیم نیترات	۱۰۱/۱۰ گرم در لیتر
آمونیوم فسفات	۱۱۵/۰۸ گرم در لیتر
منیزیم سولفات ۷ آبه	۲۴۵/۴۰ گرم در لیتر
عناصر کم مصرف	
بوریک اسید	۱/۵۴۶ گرم در لیتر
پتاسیم کلرید	۳/۷۲۸ گرم در لیتر
منگنز سولفات ۱ آبه	۰/۸۹۶ گرم در لیتر
روی سولفات ۷ آبه	۰/۷۵۷ گرم در لیتر

مس سولفات ۵ ابه	۰/۱۲۵ گرم در لیتر
مولیبدیک اسید	۰/۰۸۱ گرم در لیتر
Fe-EDTA	۶/۰۲۲ گرم در لیتر
مقادیر به کار رفته جهت تهیه ی ۱ لیتر محلول هوگلند	
نیترات کلسیم ۴ ابه	۴ میلی لیتر
پتاسیم نیترات	۶ میلی لیتر
امونیوم فسفات	۲ میلی لیتر
منیزیم سولفات ۷ ابه	۱ میلی لیتر
عناصر کم مصرف	۱ میلی لیتر
Fe-EDTA	۱ میلی لیتر

-PH محلول هوگلند با استفاده از اسید کلریدریک و پتاسیم هیدروکسید رقیق شده در حدود۶/۵ تنظیم شد.

شکل ۲-۳-گیاهچه های کاهوی گروه تیمار شده با گروه شاهد در مرحله ی هفت برگی

برخی از صفات فیزیولوژیکی مانند فلورسانس کلروفیل، محتوی کلروفیل ،وزن تر و وزن خشک ریشه و اندام هوایی اندازه گیری شد و بررسی های مولکولی بعد از عصاره گیری پروتئینی در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید.

۲-۵ -اندازه گیری فلورسانس کلروفیل

پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن گیاهچه‌ها در تاریکی به وسیله ی گیرنده‌های مخصوص، وضعیت کلروفیل فلورسانس، به وسیله‌ی دستگاه فلوریمتر PEA از محل میانه برگ، بین رگبرگ اصلی و لبه‌ی برگ اندازه گیری و ثبت شد. شکل (۴-۲). پارامترهای مورد ارزیابی شامل : F_o (فلورسانس کمینه، زمانی که نور در سطح معمول بوده و تمام مراکز واکنش باز هستند. F_m (فلورسانس بیشینه، هنگامی که برگ در معرض پالس شدیدی از نور قرار دارد و تمامی مراکز واکنش اشباع و بسته هستند) و F_v/F_m (کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II)بودند.

شکل ۲-۴-فلورسانس متر

۲-۶-اندازه گیری محتوی کلروفیل

اندازه گیری محتوی کلروفیل با استفاده از کلروفیل متر SPAD از محل میانه برگ، بین رگبرگ اصلی و لبه برگ اندازه گیری و ثبت شد. شکل (۵-۲). کلروفیل متر غلظت نسبی کلروفیل برگ را بر اساس مقدار نور عبور کرده از برگ، در دو طول موجی که جذب کلروفیل در آن ها تفاوت دارد نشان می‌دهد. بیشترین جذب کلروفیل در دو طول موج قرمز

و آبی و کمترین جذب در طول موج سبز بوده و در طول مادون قرمز کلروفیل هیچ جذبی ندارد. بنابراین اساس کار این دستگاه بر مبنای اختلاف بین نور قرمز تابیده شده به برگ با نور قرمز دور عبور کرده از برگ می‌باشد. زیرا نور قرمز درصورت زیاد بودن کلروفیل در برگ به مقدار بیشتری جذب می شود. بر این اساس طول موج انتخاب شده برای اندازه گیری به وسیله‌ی دستگاه طول موج قرمز (که بیشترین جذب را داشته و تحت تاثیر کاروتن قرار نمی‌گیرد) و طول موج مادون قرمز (که جذب آن بسیار کم است) می باشد. نحوه کار کلروفیل متر بدین ترتیب است که در قسمت اول Illuminating یا تولید کننده نور قرار داشته و نور قرمز تولید می‌کند و نور پس از گذشتن از نمونه برگ به یک سری گیرنده یا Receptors رسیده که نور عبوری را به علایم الکتریکی آنالوگ تبدیل می‌کند. این علائم به وسیله ی یک آمپلی فایر تقویت شده و پس از آن به وسیله ی یک تبدیل کننده به علائم دیجیتال تبدیل می‌شود. سپس آن علائم به وسیله ی میکرو پروسسور تفسیر شده و عدد دیجیتالی در صفحه نمایان شده و به صورت اتوماتیک در حافظه نگه داری می‌شود. باید توجه داشت که عدد SPAD به هیچ عنوان مقدار کلروفیل را مشخص نمی‌کند بلکه تخمینی از غلظت کلروفیل را نشان می دهد. این عدد همبستگی بالایی با مقدار کلروفیل برگ دارد.

شکل ۲-۵-کلروفیل متر

۷-۲-اندازه گیری وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی

پس از برداشت گیاهچه‌های کاهو از ارتفاع ۱۲ سانتی متری سطح خاک گلدان وزن‌تر بخش هوایی با استفاده از ترازویی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. سپس اندام هوایی هر گلدان درون پاکت‌هایی به طور جداگانه در داخل آون در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. توزین گیاهچه‌های خشک شده به وسیله‌ی آون نیز با دقت ۰/۰۰۱ گرم انجام شد. ریشه‌های داخل هر گلدان با دقت در آورده شده و کاملا شسته شدند. وزن‌تر ریشه با دقت ۰/۰۰۱ محاسبه شد و برای محاسبه‌ی وزن خشک ریشه در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت داخل آون قرار گرفتند و وزن خشک پس از در آوردن ریشه ها از آون اندازه گیری شد.

۸-۲-استخراج پروتئین کل محلول

ترکیبات بافر استخراج

-۲۵ میلی‌لیتر تریس –اسیدکلریدریک[1] ۱ مولار (pH= ۷/۵) ،۱۰۰ میلی‌لیتر Na_2EDTA ۱ مولار، ۱۰۰میلی لیترمرکاپتواتانول.[2]

-روش تهیه ی بافر استخراج پروتئین

۵ گرم تریس وزن کرده و در داخل بشر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانیده شد،و ۶/۶ میلی لیتر HCl به آن اضافه گردید و pH محلول حدود ۷/۵ تنظیم شد. و برای تهیه‌ی Na_2 EDTA یک مولار حدود ۳/۷ گرم وزن شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. برای تهیه‌ی بافر استخراج حدود ۲۵ میلی لیتر محلول تریس-اسیدکلریدریک و ۱۰۰ میلی لیتر Na_2EDTA با ۱۰۰ میلی لیتر مرکاپتواتانول و با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰۰ میلی لیتر رسانیده شد(Moradi et al., 2018)..

---

[1] . Tris - HCl

[2] . Mercapto ethanol

۹-۲-روش استخراج عصاره ی پروتئینی برای انجام الکتروفورز

۰/۱ گرم از نمونه‌ی برگی گیاهی از هر دو گروه (نمونه تیمار و شاهد) وزن شد و با ازت مایع کاملا پودر شد. حدود ۶۰۰ ماکرولیتر بافراستخراج پروتئینی به آن اضافه شد و کاملا هم زده شد تا کف بکند. سپس به میکروتیوپ های کوچک ریخته شد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی برداشته شد و همین محلول رویی دوباره با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد وکل محلول سانتریفیوژ شده برای انجام عمل الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت(Moradi et al., 2018).

-روش تهیه ی بافر پتاسیم فسفات

۱-برای تهیه‌ی استوک مولار K_2HPO_4 مقدار ۱۷۴۰ میلی گرم از آن وزن شد و به حجم ۱۰ سی سی با آب مقطر رسانیده شد و برای تهیه‌ی استوک مولارKH_2PO_4 مقدار ۶۸۰ میلی گرم از آن وزن شد و با آب مقطر به حجم ۵ سی‌سی رسانیده شد.

۹۸-۱/۲ میلی لیتر از استوک مولار KH_2PO_4 و ۸/۰۲ میلی لیتر از استوک مولار K_2HPO_4 برداشته و کل مجموعه با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانیده شد. به این ترتیب ۱ لیتر بافر فسفات با قدرت یونی ۰/۰۱ مولار و با pH=7/4 تهیه شد.

۱۰-۲-روش استخراج عصاره ی آنزیمی جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم

ابتدا مقداری از ریشه‌ی گیاهچه‌ی کاهو در داخل هاون چینی کوچک قرار داده شدند سپس مقداری ازت مایع روی آن ریخته و تا حد پودر شدن کوبیده شدند. سپس به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم برداشته و در درون میکروتیوپ های ۲ میلی-لیتری قرار داده و به مقدار یک میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه شدو بلافاصله میکروتیوپ ها داخل یخ گذاشته شدند. (لازم به ذکر است که تمام مراحل رو یخ و در حمام یخ انجام گرفت). سپس نمونه ها با استفاده از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور بردقیقه در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی را برداشته و داخل میکروتیوپ‌های دیگر ریخته و مشخصات نیز به لوله‌ی جدید منتقل شدند. و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری

شدند. این نمونه ها جهت اندازه گیری فعالیت آنزیمی به کار برده شدند و این نمونه‌ها برای تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها به روش برادفورد مورد استفاده قرار گرفتند(Moradi et al., 2018).

-تعیین مقدار کمی پروتئین به روش برادفورد با اسفاده از اسپکتروفوتومتر

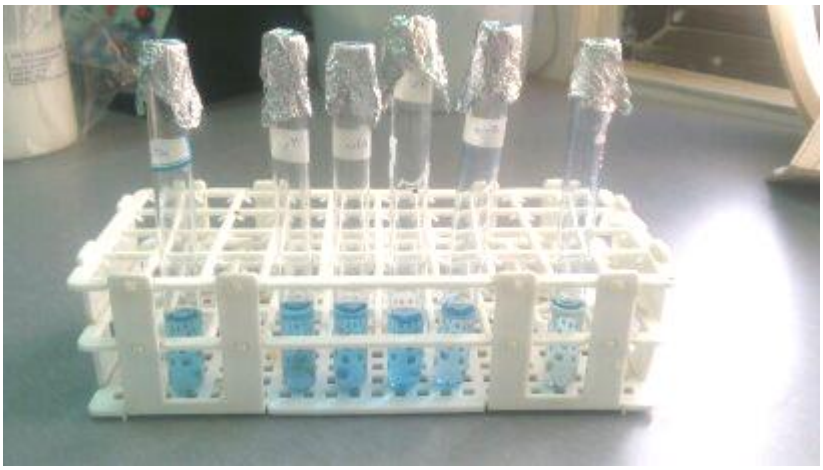
-روش تهیه ی محلول برادفورد

۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بلو G در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شده و محلول به ۱۰۰ میلی لیتر از اسید فسفریک ٪۸۵ اضافه شد. و با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. محلول به رنگ قرمز تیره شد و pH آن در حدود ۰/۰۱ بود. این محلول قابل نگه داری در یخچال به مدت یک ماه می‌باشد. معرف قابل استفاده با اضافه کردن ۱ حجم از استوک فوق الذکر با ۴ حجم آب مقطر به دست آمد و pH آن برابر ۱/۱ شد.

- روش تهیه ی پروتئین استاندارد

جهت تهیه‌ی پروتئین استاندارد ۱۰۰ میلی گرم از پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد واز استوک سرم BSA [3]غلظت های0/25, 0/20, 0/1,0/15, 0/05 میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. سپس ۰/۱ سی سی از عصاره‌ی پروتئینی با ۵ سی سی معرف برادفورد مخلوط و پس از ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی ماند و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد و بر اساس منحنی استاندارد رسم شده غلظت پروتئینی محاسبه گردید. منحنی استاندارد از غلظت های ۰ تا ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی تهیه شد شکل(۶-۲).(Moradi et al., 2018).

[3] . Bovine Serum albumin



شکل ۲-۶- غلظت های متفاوت از سرم آلبومین گاوی

-سنجش مقدار کمی پروتئین

۱ سی‌سی از عصاره پروتئینی با ۵ میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط و پس از ورتکس جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. و بر اساس منحنی استاندارد رسم شده توسط سرم آلبومین گاوی غلظت پروتئینی محاسبه گردید (Moradi et al., 2018).

۱۱-۲-سنجش فعالیت ویژه ی آنزیمهای آنتی اکسیدانی

-سنجش فعالیت ویژه ی آنزیم کاتالازوتخمین زمان واکنش و سرعت ماکزیمم واکنش و ترسیم منحنی میکائیلس- منتن از سرعت ماکزیمم آنزیم

غلظت‌های متفاوت از سوبسترای واکنش که در این سنجش آب اکسیژنه ۳ ٪ می باشد شامل 5,10,20,40 میکرولیتر بود به ترتیب با ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی با استفاده از بافر فسفات با pH=7 مخلوط شد و حجم محلول به ۳ میلی لیتر رسانیده شد این فرآیند داخل حمام یخ صورت گرفت و جذب محلول‌های به دست آمده توسط غلظت‌های

متفاوت از آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. به این ترتیب که جذب اولیه بلافاصله بعد از افزودن عصاره‌ی گیاهی و جذب ثانویه تا دو دقیقه پس از آن به فواصل ۱۰ ثانیه قرائت شد. تا زمان واکنش (زمانی که پس از گذشت فواصل هر ۱۰ ثانیه یک بار میزان جذب نوری ثابت شود. و مرحله‌ی تعیین کاهش غلظت سوبسترا با رابطه‌ی زیر برای هر جذب و در هر لحظه و میزان سرعت لحظه‌ای نیز در هر زمان با رابطه‌ی (۲-۱) و فعالیت ویژه آنزیم ها با رابطه (۲-۲) زیر محاسبه گردید.(Moradi et al., 2018).

(۲-۱)

$$A=\epsilon lc$$

-که در این رابطه، A: میزان جذب از دستگاه اسپکتروفوتومتر، -ϵ: ضریب خاموشی: $۲/۸mM^{-1}cm^{-1}$ ،l: طول سل کوارتز، C: غلظت سوبسترا می باشد.(۲-۲).

$$B=A2-A1/\epsilon.t.c$$

که در این رابطه، B: میزان فعالیت ویژه: (میکرومول سوبسترای تبدیل شده در ثانیه در میلی گرم پروتئین.)، A_2 : میزان جذب نوری ثابت شده، A_1:میزان جذب نوری گروه شاهد، ϵ:ضریب خاموشی: $۲/۸Mm^{-1}cm^{-1}$ ،t : زمان واکنش C: غلظت سوبسترا می باشد.

-سنجش فعالیت ویژه ی آنزیم آسکوربات پراکسیداز و تخمین زمان واکنش و سرعت ماکزیمم واکنش و ترسیم منحنی میکائیلس- منتن از سرعت ماکزیمم آنزیم

۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار باpH=6/5 و غلظت‌های متفاوت از سوبسترای واکنش که در این سنجش آب اکسیژنه ۳٪ می باشد شامل0/4, 0/2, 0/05,0/1 میلی‌لیتر بود و ۰/۲ میلی لیتر آسکوربیک اسید ۵ میلی مول در حمام یخ مخلوط شد و بلافاصله با ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی اضافه شد و جذب محلول‌های به دست آمده توسط غلظت‌های متفاوت از آب اکسیژنه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. به این ترتیب که جذب اولیه بلافاصله بعد از افزودن عصاره‌ی گیاهی و جذب ثانویه تا دو دقیقه پس از آن به فواصل ۱۰ ثانیه قرائت شد. تا زمان واکنش (زمانی که پس از گذشت فواصل هر ۱۰ ثانیه یک بار میزان جذب نوری ثابت شود(Moradi et al., 2018).

سنجش فعالیت ویژه ی آنزیم پلی فنل اکسیداز

۲/۵میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=6/8 و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالل[4] ۰/۰۲ مولار،۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به ترتیب به یک لوله‌ی آزمایش در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد اضافه شده و تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر بررسی شد(Moradi et al., 2018).

۱۲-۲-سنجش فعالیت ویژه ی آنزیم پروتئاز

۲ میلی‌لیتر کازئین[5] هیدرولیز شده 1%با pH=6 و ۰/۴ عصاره‌ی آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه بر رو ی هیتر نگه داری و سپس برای توقف واکنش ۰/۴ میلی لیتر تری کلرواستیک[6] ۴۰ ٪به آن اضافه شد و جذب آن در ۲۸۰ نانومتر بررسی شد(Moradi et al., 2018).

۱۳-۲-سنجش میزان پر اکسید هیدروژن

۱-رسم منحنی استاندارد

محلول‌های استاندارد در غلظت‌های بین ۱۰-۲ میلی‌مولار تهیه گردید و۰/۵ میلی‌لیتر از هر غلظت با ۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و ۱ میلی لیتر KI یک مولار ترکیب شد و میزان جذب نوری محلول با استفاده ازاسپکتروفوتومتر UV-VIS در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه گیری شد.

[4] . Pirogalol
[5] .Casein
[6] .Tri – chloroacetic acid

Abstract

Catechin with chemical name of flavane-3 ol is a compound from flavnoid group. It is considerably produced in some plants such as green tea. Some reprorts implied to allelopathic potential of the cmpound. In this investigation, allelopathic response of catechin on lettuce, as a model plant, was evaluated. The results indicated that the compound tend to reduction in lettuce growth parameters such as roots and aerial parts dry - wet weights and lenthghts. On the other hand, after catechin treatment a significant increase was observed in antioxidant enzymes activities. The results indicated that a certain changes was seen in electrophoretic pattern of proteins bands in the lettuce catechin treated plants. Some new protein bands were seen in the treated plants. The HPLC analyses showed that after catechin treatment, a considerable rise in catechin level was obvious in the treated plants. The increase fall to primary level after many days indicated catechin metabolism in the lettuce plants.In conclusion, it was depicted from the results that catechin exhibited an inhibitoty effects on lettuce plants and can be regarded as an allelpathic substance may be used for synthesis a bioherbicide.

Key words: Catechin. Lettuce, allelopathy, physiology, biochemistry.

\

University of Mohaghegh Ardabili

Final Report of Research Project

Title

The investigation of allelopathic effects of catechin from physiological and biochemical aspects

Researcher
Seyed Mehdi Razavi

Department of Bilogy

Faculty of Sciences

This Research Project Has Been Financially Supported by the Office of Vice Chancellor for Research

Spring 2019