نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال سیزدهم، شماره ۵۰، تابستان ۱۳۹۷ / صفحات: ۶۲-۵۳

اثرات دگرآسیبی پاراگزانتین بر برخی پارامترهای فیتوشیمیایی در گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.)

نسترن اسدی، سید مهدی رضوی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی،اردبیل،ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۱۷

چکیده

پاراگزانتین ترکیبی از گروه آلکالوئیدهای پوربنی و از متابولیتهای ثانویه گیاهی است که در برخی گیاهان از جمله چای سبز، قهوه و کاکائو تولید می‌گردد. در این پژوهش به بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف پاراگزانتین بر برخی از جنبه‌های فیتوشیمیایی گیاه کاهو (*Lactuca sativa* cv. Siahoo) به‌عنوان یک گیاه مدل پرداخته شد. به منظور نشان دادن اثرات پاراگزانتین بر میزان آمینو اسیدهای آزاد، قندهای محلول، آنتوسیانین، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها و ترکیبات فنلی آزمایش‌ها در قالب طرحی کاملاً تصادفی انجام شد. پس از کاشت گیاهان با شرایط یکسان در گلدان‌های حاوی پیت و تغذیه آنها با محلول غذایی هوگلند، تیمارهایی با غلظت‌های متفاوت (۱۰و۵۰ و۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پاراگزانتین، همراه با گروه شاهد و همگی در سه تکرار بر روی گیاهان اعمال گردید. پس از ۲۸ روز اعمال تیمار، گیاهان برای انجام آنالیزهای فیتوشیمیایی برداشت شدند. نتایج نشان داد در بالاترین غلظت پاراگزانتین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) میزان آنتوسیانینها، فلاونوئیدها، آلکالوئید کل، تانن، ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در غلظت فوق میزان آمینو اسیدها و قندهای محلول در گیاهان تیمار دیده نسبت به شاهد افزایش یافت. می‌توان نتیجه گیری کرد که ترکیب پاراگزانتین که می‌تواند در تفاله‌های چای و قهوه یا کاکائو موجود باشد در صورت استفاده به عنوان یک مکمل غذایی در کاشت گیاه کاهو، مواد موثره و نتیجتا خاصیت دارویی این سبزی پر مصرف را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آللوپاتی، آلکالوئید، متابولیت‌های ثانویه،آنتوسیانین، ترکیبات فنلی

مقدمه

پاراگزانتین از متابولیت‌های ثانویه گیاهی و از گروه آلکالوئیدهای پورینی است که در برخی گیاهان از جمله چای سبز، قهوه و کاکائو وجود دارد. این آلکالوئید با فرمول ساختمانی بسته $C_7H_8N_4O2$ همانند کافئین، تئوفیلین و تئوبرومین ساختار متیل گزانتینی دارد. اصولاً کافئین و دیگر مشتقات متیل گزانتین‌ها به‌طور گسترده در صنایع مختلف از جمله غذایی، دارویی، پزشکی و کشاورزی به کار برده می‌شوند (Zulak et al., 2006). از لحاظ شیمیایی، متیل‌گزانتین‌ها شامل یک مولکول گزانتین می‌باشند که در کافئین سه گروه متیل به شکل ۱و۳و۷ تری‌متیل‌گزانتین و در پاراگزانتین دو گروه متیل به شکل ۱و۷ دی‌متیل‌گزانتین در ساختار مربوطه وجود دارد (Lorist and Tops, 2003). دی متیل‌گزانتین‌ها یعنی تئوفیلین، تئوبرومین و پاراگزانتین از دمتیله شدن کافئین به وجود می‌آیند (Mazzafera et al., 1996).

*نویسنده مسئول: razavi694@gmail.com

امروزه پاراگزانتین به همراه کافئین که از پیش‌سازهای آن محسوب می‌شود در خاک کشتزارهای چای به‌طور گسترده یافت می‌گردد از طرف دیگر به‌دلیل استفاده انبوه و جهانی از محصولاتی همچون چای و قهوه به‌عنوان نوشیدنی‌های رایج و کاکائو در صنایع غذایی، امروزه این ترکیب و ترکیباتی شبیه به آن همچون کافئین و تئوفیلین از طریق فاضلاب‌های شهری وارد اکوسیستم‌های آبی و سپس زراعی می‌شود. در سال‌های اخیر پاراگزانتین به‌عنوان یکی از آلاینده‌های زیست محیطی در اکوسیستم‌های آبی و حتی زراعی مطرح می‌باشد (Rodríguez-Gil et al., 2018). دی متیل گزانتینهای مشتق شده از کافئین دارای خواص دارویی فراوان از جمله خواص ضدآسم، خواص ضد التهابی، ضد سرطان و آنتی اکسیدانهای قوی هستند (Smith, 2002). در بسیاری از عارضه‌های تخریب عصبی از جمله بیماریهای آلزایمر، پارکینسون و ایسکمی، متیل گزانتین‌ها اثرات حفاظت عصبی اعمال می‌کنند (Horrigan et al., 2005). کافئین در مقایسه با دی متیل گزانتین‌های دیگر از جمله تئوفیلین، پاراگزانتین و تئوبرومین به علت داشتن یک گروه متیل اضافی دارای اثرات فیزیولوژیکی قوی تری می‌باشد. این ترکیب به همراه کافئین موجب برخی آسیبها و تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بر روی ارگانیسم‌های زنده از جمله گیاهان، جانوران و حتی انسان می‌گردد (Sasamoto et al., 2015 ; Benowitz et al., 1995). در گیاهان پاراگزانتین و دیگر مشتقات کافئین به‌عنوان ترکیبات دگرآسیب (آللوکمیکال) به حساب می‌آیند. به عبارت دیگر، ترکیبات مذکور از گیاه میزبان تولید و از جوانه‌زنی بذر، رشد و نمو گیاهچه و یا فعالیت فیزیولوژیک عادی گیاهان مجاور ممانعت می‌نمایند (Peneva, 2007). همچنین این ترکیبات به‌عنوان دفاع شیمیایی اندام‌های علفی گیاهان بر علیه حشرات و جانوران علفخوار و نیز میکروارگانیسم‌های بیماریزا ایفای نقش می‌نماید (Fredholm, 2011). از طرف دیگر، این ترکیبات با جمع آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون مولکولهای زیستی حیاتی سلول پیشگیری کرده و مانع بروز تنش اکسیداتیو و یا تخفیف اثرات آن در سلول‌های گیاهی می‌شوند. اگرچه این ترکیبات در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، اما تنش‌های محیطی موجب تغییر افزایشی در مقدار آن‌هامی گردد (McDonald et al., 2001; Kamal, 2011).

کاهو (*Lactuca sativa* L.) سبزی برگی شکل متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد ارقام مختلف کاهو به دلیل داشتن ترکیبات موثره فراوان که عمدتاً از ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی هستند واجد قابلیت آنتی اکسیدانی قوی بوده و بسیاری از خواص دارویی این گیاه نیز به‌دلیل وجود این ترکیبات می‌باشد.

Viacara و همکاران (۲۰۱٤) عملکرد فیتوکمیکال‌ها را در عصاره آبی و اتانولی کاهو مورد بررسی قرار دادند و ارزیابی آنها نشان داد که کاهو منبع مهمی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی که در مهار پیشرفت استرس اکسیداتیو موثر بوده و ترکیبات مسئول این ظرفیت آنتی اکسیداتیو، ترکیبات فنولی موجود در عصاره بوده است (Mampolo et al., 2016). همچنین Tiveron و (۲۰۱۲) فعالیت آنتی اکسیدانی سبزیجات برزیلی (از جمله کاهو) و ارتباط آن را با ترکیبات فنلی مورد بررسی قرار دادند. Harsha و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که عصاره آبی و اتانولی کاهو فعالیت مهار رادیکال آزاد بالایی را ارائه می‌کند. عصاره مذکور قادر به حفاظت بیو ماکرومولکول‌ها نظیر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین و لیپیدها می‌باشد و ارزیابی آنها نشان داد که احتمالاً ترکیبات فنولیک موجود در عصاره مسئول این ظرفیت آنتی اکسیداتیو بوده باشد. بسیاری از محقیقین نشان

دادند که کاهو می‌تواند به عنوان یک منبع مورد توجه و کم هزینه از آنتی اکسیدان‌های طبیعی به منظور کاربرد آن در مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد (Wijngaard et al., 2009).

تاکنون اثرات دگرآسیبی و سمیت پاراگزانتین و دیگر گزانتین‌ها مثل کافئین در مهار جوانه‌زنی و تکثیر سلولی برخی گیاهان همچون کاهو، چاودار و گزانتیوم به اثبات رسیده است (Chou and Waller,1980; Peneva, 2007). اما مکانسیم تأثیر ماده این مواد خصوصاً از دیدگاه فیتوشیمایی تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این تحقیق سعی بر این است که اثرات پاراگزانتین از جنبه فیتوشیمیایی بر روی گیاه کاهو مورد ارزیابی قرار گیرد. گیاهی که به‌عنوان گیاه مدل در مطالعات آللوپاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار گیاهان: بذرکاهو واریته سیاهو (*Lactuca sativa* cv. Siahoo) مورد استفاده در این پژوهش از شرکت فلات ایران تهیه شد و همچنین پاراگزانتین و سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده از شرکت سیگما تهیه گردید. این پژوهش شامل مراحل کشت و بررسی آزمایشگاهی بود در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. کشت گیاهان و مراحل مختلف پژوهش مربوط به آنها در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. ابتدا بذرها توسط محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و بعد سه مرتبه توسط آب مقطر شسته شدند. بذرها بعد از سترون سازی، به منظور تولید دانه رست در داخل ظروف پتری قرار گرفتند در داخل هر ظرف پتری ۲۰ عدد بذر روی کاغذ صافی قرار داده شد و پنج میلی‌لیتر از محلول پاراگزانتین با غلظت معین به آن اضافه گردید. بعد از هفت روز دانه رست‌های گروه شاهد و تیمار شده با غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به گلدانهای حاوی پیت منتقل شده و در داخل ژرمیناتور به‌مدت ۲۸ روز تحت روشنایی ٦۰۰۰ لوکس که با لامپ مهتابی تأمین می‌شد، رشد داده شدند. گیاهان گروه شاهد روزانه با محلول غذایی هوگلند و گیاهان گروه تیمار علاوه بر محلول هوگلند با پاراگزانتین به مقدار ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای هر گلدان آبیاری گردیدند. گیاهان تا رسیدن به مرحله هفت برگی (٤ هفته) رشد داده شده و سپس برای انجام آنالیزهای فیتوشیمیایی برداشت شدند.

سنجش محتوای تام فنلی (فنل کل): این اندازه‌گیری بر اساس روش فولین - سیوکالتو به صورت زیر انجام شد. یک دهم گرم از بافت برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹٦ درصد عصاره گیری و عصاره به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس به محلول حاصل یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵درصد، نیم میلی‌لیتر فولین پنجاه درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم پنج درصد اضافه شد. شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیبهای فنلی از منحنی استاندارد گالیگ اسید استفاده شد (Seevers and Daly, 1970).

سنجش میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل با روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد. یک دهم گرم از نمونه‌های گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد به نیم میلی‌لیتر از عصاره حاصل، آب مقطر اضافه شد تا حجم پنج میلی‌لیتر به دست آید. سپس به محلول حاصل سه دهم میلی‌لیتر NaNO2 پنج درصد و پس از پنج دقیقه، ۰/٦ میلی‌لیتر AlCl3 ده درصد اضافه گردید. در نهایت دو میلی‌لیتر NaOH یک مولار دو میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری

شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده منحنی استاندارد کوئرستین به‌دست آمد (Change, 2002).

سنجش آلکالوئید کل: برای سنجش آلکالوئید کل نیم گرم نمونه برگ تر در متانول هشتاد درصد درهاون هموژنیزه شد. مقدار۳۰۰ میکرولیتر از این هموژنیزه با ۱۰۰ میکرولیتر از معرف دراگندروف مخلوط و در ۷۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانترفیوژ گردد. رسوب جمع‌آوری شده در یک میلی‌لیتر یدورسدیم ۲/٤٥ حل شود. یک حجم ۱۰ میکرولیتر از تیوپ برداشته و ۱۰ میلی‌لیتر یدور سدیم چهل و نه صدم مولار به آن اضافه شود جذب در ٤٦٧ نانومتر قرائت گردد. منحنی استاندارد با استفاده از یک آلکالوئید مثلا پاپاورین هیدروکلراید یا کافئین تهیه گردید (Sreevidya and Mehrotra, 2003).

سنجش میزان آنتوسیانین‌ها: برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌ها از روش Wagner در سال ۱۹۷۹ استفاده شد. یک دهم گرم از بافت برگ درهاون چینی با ده میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) به‌طور کامل ساییده و عصاره حاصل در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به‌مدت ٢٤ در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس به مدت ده دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه سانترفیوژ گردید و سپس جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت، ضریب خاموشی (ϵ)۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول در نظر گرفته شد. برای محاسبه غلظت از فرمول $A= \epsilon bc$ استفاده گردید (A: جذب خوانده شده b: عرض کووت c: غلظت محلول مورد نظر).

سنجش تانن: یرای سنجش تانن یک میلی‌لیتر از عصاره متانول گیاه که برای سنجش فنول استفاده شد با ۱۰۰ میلی گرم پلی وینیل پیرولین (PVPP)، بعد از نگهداری در چهار درجه سانتی گراد به مدت پانزده دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانترفیوژ گردید. محلول رویی برداشته شده و جذب آن در ۷٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت ترکیبهای تانن از منحنی استاندارد گالیگ اسید استفاده شد (Jone and Mangan, 1977).

سنجش آمینواسیدهای آزاد: برای سنجش غلظت کل آمینواسیدهای آزاد، نمونه‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=٦/٨)همگن و استخراج شده و بعد از سانترفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰g، بر روی نمونه‌های شناور معرف نین هیدرین اضافه گردید و ۷-٤ دقیقه در حمام آب با دمای ۱۰۰-۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن در حمام آب، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومکتر قرائت شد. از غلظت‌های مختلف گلیسین برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید (Wagner, 1979).

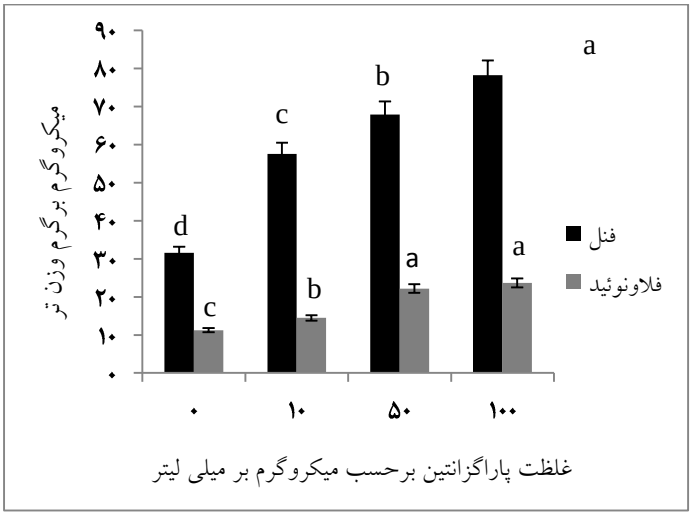
آنالیز قندهای محلول با استفاده از معرف آنترون: در این روش یک دهم بافت برگی با پنج میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت عصاره الکلی به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰g سانترفیوژ گردید در نهایت عصاره الکلی با در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شده سپس یک میلی‌لیتر از هر نمونه در یک لوله آزمایش ریخته شد یک میلی لیتر معرف آنترون به آن اضافه گردید و بعد از مخلوط شدن به مدت ۱۷ دقیقه در بن ماری۹۰ سلسیوس قرار گرفت و پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ٦۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد و نتایج بر حسب میلی گرم برگرم وزن تر ارایه گردید (Sadasivam and Manickam, 1992).

آنالیز آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. کلیه آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام گرفت و نمودارها با کمک نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ رسم شد.

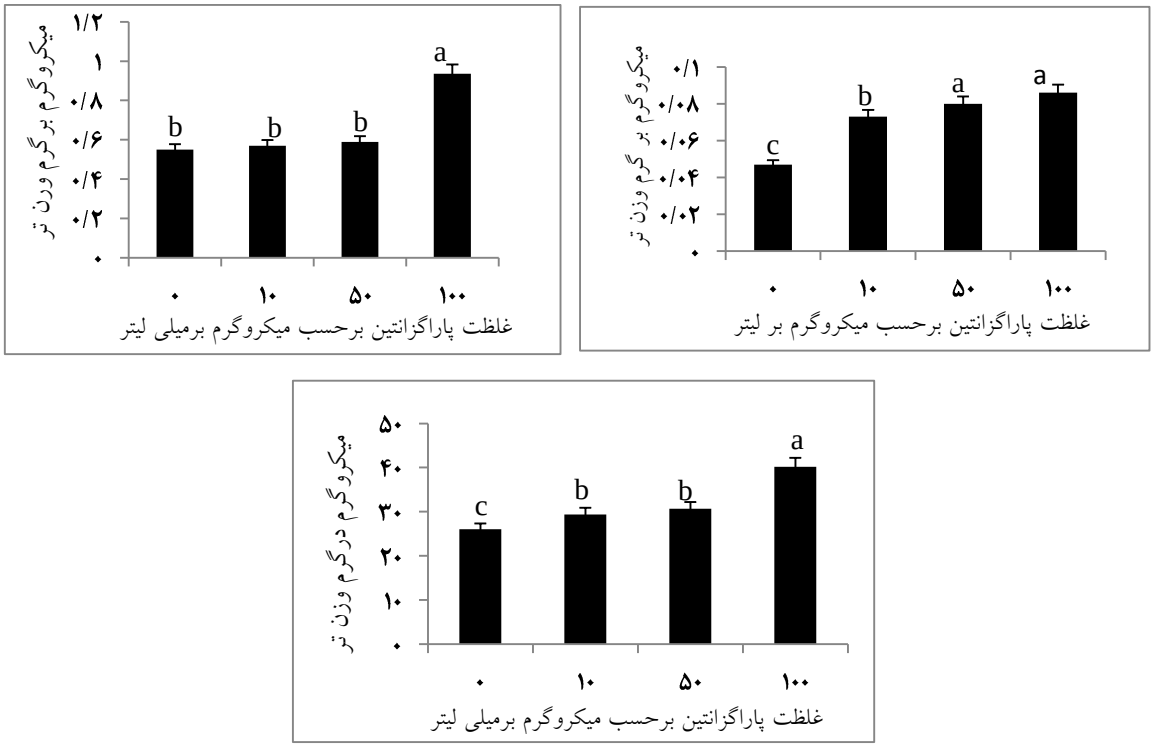
نتایج

مقایسه آماری نتایج نشان داد که میزان فنول کل و فلاونوئید کل با افزایش غلظت پاراگزانتین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند. نتایج حاصل از بررسی ترکیبات فنلی معادل گالیگ اسید موجود در عصاره‌ها نشان داد، مقدار ترکیبات فنلی در تیمارهای بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاراگزانتین بیش از ۱۰۰ درصد افزایش نشان می دهد. نتایج مربوط به این آزمون در شکل یک نشان داده شده است. هم چنین میزان فلاونوئید کل نیز تحت تیمار ۱۰، ۵۰ و۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۲۸/۷، ۹۷/۳ و ۱۱۰/٦ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است.



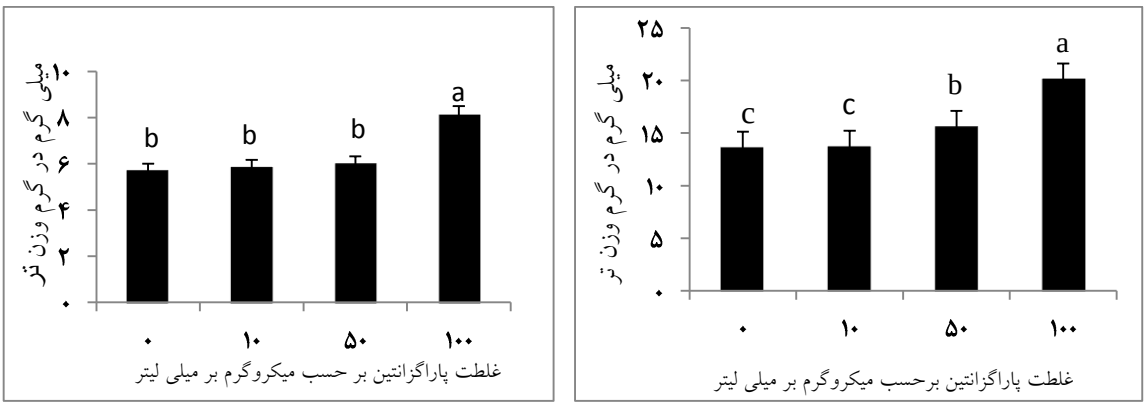
شکل۱: تغییرات میزان فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی، تحت تیمار غلظت‌های مختلف پاراگزانتین

نتایج مربوط به سنجش محتوی آنتوسیانین‌ها، تانن و آلکالوئیدی در گیاه کاهو تحت تیمار پاراگزانتین در شکل ۲ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد میزان آلکالوئید کل تحت تیمار ۱۰، ۵۰ و۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد به‌ترتیب ۲/٦، ۷ و ۷/۱ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است. از نظر آماری این افزایش در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پاراگزانتین نسبت به شاهد معنی‌دار بود. همچنین مشخص شد که مقدار آنتوسانین کل در اندام هوایی با افزایش غلظت پاراگزانتین افزایش معنی دار نسبت به گروه شاهد داشته است. به‌طوری‌که در ۱۰، ۵۰ و۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد به‌ترتیب ۵۵/۳۱، ۷۰/۲ و ۸۲/۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد. از طرف دیگر محتوی تانن کل در گیاه کاهو تحت تیمار پاراگزانتین افزایش معنی داری در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۱۲/۸،۱۷/۷و ٥٤/۳ درصد نسبت به شاهد داشته است.



شکل ۲: تغییرات میزان آلکالوئیدها، آنتوسیانین و تانن‌ها، تحت تیمار غلظت‌های مختلف پاراگزانتین.

نتایج بدست آمده همچنین نشان داد که ترکیب پاراگزانتین باعث افزایش معنی‌داری در تجمع قندهای محلول در گیاه کاهو گردیده است. به‌طوری که در غلظت ۱۰، ۵۰ و۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پاراگزانتین به‌ترتیب ۰/۷، ۱٤/۷۹ و ٤۷/۷ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار نشان می‌دهد. میزان آمینو اسیدهای آزاد کل تحت تأثیر پاراگزانتین در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۲/٦، ۵/۲ و ٤۱/٤ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش داشت (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات مقدار کربوهیدرات محلول و آمینو اسیدهای آزاد، تحت تیمار غلظت‌های مختلف پاراگزانتین

بحث

مطالعات قبلی تاکنون نشان داده است که که ترکیب پاراگزانتین به همراه دیگر ترکیبات گرانتینی مثل کافیین به عنوان یک عامل تنش‌زای نسبتاً قوی عمل کرده و جوانه‌زنی بذر در گیاه کاهو و برخی گیاهان دیگر همچون چاودار و گزانتیوم را مهار می‌نماید (Chou and Waller,1980; Peneva, 2007). همچنین مشخص شده است که در محیط کشت مصنوعی ترکیب پاراگزانتین از تکثیر سلولی پروتوپلاست‌های جدا شده از گیاه کاهو ممانعت می نماید. بنابراین نقش این ترکیب به عنوان یک ترکیب آللوکمیکال و تنش زا به اثبات رسیده است (Sasamoto et al., 20017). تنش ایجاد شده در اثر ترکیب پاراگزانتین به عنوان یک تنش آللوکمیکال نوعی تنش زیستی محسوب می‌شود. اصولاً افزایش تراز متابولیت‌های ثانویه خصوصا ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها به دنبال تنش‌های محیطی فرایندی متداول در گیاهان می‌باشد.

با قرار گرفتن گیاه کاهو در مقابل غلظت‌های رو به بالا پاراگزانتین، افزایشی در میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و اجزای تشکیل دهنده سیستم غیرآنزیمی مشاهده شد. ترکیبات فنلی در سیستم دفاع غیرآنزیمی در درجه اول اهمیت قرار گرفتند پس از آنها فلاونوئیدها و تانها در درجه دوم و آلکالوئیدها و آنتوسیانین‌ها در درجه سوم اهمیت قرار گرفتند. بررسیهای قبلی نشان داده است که ارقام مختلف کاهو به‌دلیل داشتن ترکیبات موثره فراوان که عمدتاً از ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی هستند از جمله کرستین، کامپفرول، ایزورامنتین و... واجد قابلیت آنتی اکسیدانی قوی بوده و بسیاری از خواص دارویی این گیاه نیز به دلیل وجود این ترکیبات می‌باشد (Mampolo et al., 2016). بر اساس مطالعات انجام گرفته توسط Sampietro و همکاران (۲۰۰۹)، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی منجر به تحمل بیشتر به تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. اساسا تنش اکسیداتیو یک تنش ثانویه معمول در انواع مختلف تنش‌های محیطی در گیاهان است. با توجه به مشاهدات Candan و همکاران (۲۰۰۷) بالابودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصاره می‌باشد. شواهد موجود ارتباط مثبتی بین ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از گیاهان را نشان می‌دهد. این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی عمل کرده و رادیکال‌های آزاد خصوصاً گونه‌های فعال اکسیژن را که در شرایط تنش تولید شده و منجر به آسیبهای جدی به ساختار غشاهای سلولی و آنزیم‌ها و سایر ماکرو مولکولهای حیاتی می‌شوند حذف می‌نمایند. تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو به دنبال تنش‌های آللوکمیکال قبلاً در گیاه کاهو تحت تأثیر سایر ترکیبات دگرآسیب همچون کومارین، گزانتوتوکسین و غیره نیز به اثبات رسیده است (Razavi et al., 2017a; Razavi et al., 2017b). اصولاً انباشتگی ترکیبات فنلی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، موجب کاهش رشد در خودگیاه میزبان شده و ازطرف دیگر اثرات مهاری و دگرآسیبی گیاه در قبال گیاهان هدف را نیز افزایش می‌دهد. گزارشات زیادی مبنی بر افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه خصوصا فنول‌ها در گیاهان مختلف به دنبال تنش آللوکمیکال و دیگر تنش‌ها همچون خشکی و شوری وجود دارد. اثرات دگرآسیبی گیاه اکالیپتوس بر رشد علف‌های هرز پیرامون آن وابسته به تجمع انواع ترکیبات فنلی در این گیاه می‌باشد (EI-Rokiek and Eid, 2009). از طرف دیگر گزارشات حاکی از آن است که حضور آللوکمیکالها در عصاره آبی برگهای اکالیپتوس منجر به افزایش ترکیبات فنلی در گیاه سورگوم و لوبیا می‌گردد (Djanaguiraman et al., 2005). حضور

ترکیبات آللوکمیکال همچنین در عصاره آبی برگ‌های شنبلیله منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در گیاهچه‌های کاهو گردید (Omezzine et al., 2014). گرچه اطلاعات اندکی در مورد ارتباط آللوکمیکال‌ها و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان وجود دارد اما مطالعات که قبلاً انجام شده نشان داد که ترکیبات فنلی تا حدودی می‌توانند از آسیب‌های ایجاد شده توسط تنش آللوکمیکال‌ها بکاهند (Herrig et al., 2002).

در خصوص افزایش میزان آلکالوئیدها نیز می‌توان پیشنهاداتی مطرح کرد. این افزایش می‌تواند نتیجه مستقیم تیمار پاراگزانتین و تجمع آن در بافت‌های گیاه کاهو باشد. همچنین می‌توان گفت پاراگزانتین می‌تواند به‌عنوان منبع نیتروژن در گیاه عمل کرده و بیوسنتز آلکالوئیدها را تشدید نماید. شاید هم بیوسنتز و افزایش تراکم آلکالوئیدها نتیجه تنش آللوکمیکال و مکانیسمی در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از آن باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پاراگزانتین تأثیر معنی‌داری بر افزایش میزان تجمع کربوهیدرات و آمینو اسیدها در بافت سبز برگ‌های گیاه کاهو دارد. در طی تنش، تجمع ترکیبات آلی از جمله اسیدهای آمینه و همچنین قندهای محلول در اندام‌های گیاهی مشاهده می‌شود. این افزایش به منظور بالا بردن فشار اسمزی در اندام گیاهی و جلوگیری از هدر رفت آب بافت گیاهی است. در واقع تجمع ترکیبات آلی و نیز آمینواسیدها می‌تواند تا حدی بر بهبود سیستمهای مقاومتی گیاهان در شرایط تنش موثر باشد (Munns, 2002). قندهای محلول نیز از محافظت کننده‌های اسمزی هستند که افزایش آنها در تنش‌های دیگر (خشکی، سرما و شوری) نیز گزارش شده است. تحقیقات مختلفی در این زمینه، افزایش قندهای محلول و اسیدهای آمینه آزاد را در گیاهان تحت تنش نشان داده‌اند برای مثال، طبق نتایج گزارش شده از تحقیقاتی که بر روی تفاله زیتون انجام شده مشخص شد، تفاله حاصل از روغن کشی زیتون با داشتن ترکیبات فنل منبع غنی از آللوکمیکالها بوده و اثرات آللوپاتیک بر گیاهان مجاور دارد. در این تحقیق تفاله حاصل از روغن کشی زیتون باعث افزایش میزان قندهای محلول و اسیدهای آمینه آزاد در گیاهچه‌های تحت تیمار گندم شده است (Vafaei et al., 2015).

نتیجه‌گیری نهایی

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که ترکیب پاراگزانتین که می‌تواند در تفاله‌های چای و قهوه یا کاکائو موجود باشد در صورت استفاده به عنوان یک مکمل غذایی در کاشت گیاه کاهو، مواد موثره خصوصا ترکیبات فنولی این گیاه را افزایش داده و نتیجتا خاصیت دارویی این سبزی پر مصرف را ارتقا دهد.

References

Benowitz, N.L., Jacob, P., Mayan, H. and Denaro, C. (1995). Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 58 (58): 684–691.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. H. and Akpulat, A. (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* sub sp. Millefolium Afa. (Asteraceae) Ethnophama. 87(2): 215-22.

Change, Y.L. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity(VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal Agricultural Food Chemistry. 50(13): 3713-3717.

Chou, C.H. and Waller, G.R. (1980). Possible allelopathic constituents of*Coffea arabica.* Journal of Chemical Ecology. 6(3): 643–654.

Djanaguiraman, M., Vaidyanathan, R., Annine Sheeba, J., Durga Devi, D. and

Bangarusamy, U. (2005). Physiological response of Ecualyptus globule leaf leachate on seedling physiology of rise, sorghum and blackgram. International Journal of Agricultural and Biology. 7(1):35-38.

EI-Rokiek, KG. and Eid, R.A. (2009). Allelophatic effect of *Ecualyptus citriodora* on amaryllis and associated grassy weed. Planta Daninha. 27:887-899.

Fredholm, B.B. (2011). Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology 200. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. PP.11-26.

Harsha, S.N., Anilakumar, K.R. and Mithila, M.V. (2013). Antioxidant properties of *Lactuca sativa* leaf extract involved in the protection of biomolecules. Biomedicine and Preventive Nutrition. 3(4): 367-373.

Herrig, V., Delourdes, M., Ferrarese, M.D.L., Suzuki, L.S., Rodrigues, J.D. and Ferrarese, O. (2002). Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents and allelochemicals inhibited growth of soybean. Biological Research. 35(1):59-66.

Horrigan, L.A., Kelly, J.P. and Connor, T.J. (2005). Caffeine and its major metabolite paraxanthine suppress human lymphocyte function. Iranian Journal of Medical Science. 174(1): 26-42.

Jone, WT. and Mangan, J.L. (1977). Complexes of the condensed tannins of sainfoin *(Onobrychis viciifolia)* with fraction1 leaf protein and with submaxillary mycoprotein and their reversal by polyethylene glycol and pH. Journal of the Science of Food and Agriculture Banner. 28(2): 126-136.

Kamal, J. (2011). Quantification of alkaloids, phenols and flavonoids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). African. Journal of Biotechnology. 10(16): 3149-3151.

Lorist, M.M. and Tops M. (2003). Caffeine, fatigue, and cognition. Brain Cognitive. 53(1): 82–94.

Mampolo, B.V., Maboho, M.M., Soundy, P. and Sivakumar, D. (2016). Phytochemicals and Overall Quality of Leafy Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Varieties Grown in Closed Hydroponic System. Journal of Food Quality. 39(6): 805-815.

Mazzafera, P., Olsson, O. and Sandberg, G. (1996). Degradation of caffeine and related methyl xanthines by Serratia marcescens isolated from soil under coffee cultivation. Microbial Ecology. 31(2):199-207.

McDonald, S., Prenzler, PD., Autolovich, M. and Robards K.B.(2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry. 73(1): 73-84.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25, 239-250.

Omezzine, F., Ladhari, A. and Haouala, R. (2014). Physiological and biochemical mechanisms of extracts of diploid and mixoploid *Trigonella foenum-graecum* L. South African Journal of Botany. 93(2014): 167-178.

Peneva, A. (2007). Allelopathic Effect of Seed Extracts and Powder of Coffee (*Coffea Arabica* L.) on Common Cocklebur (*Xanthium strumarium* L**.**). Bulgarian Journal of Agricultural Science. 13 (1): 205-211.

Proestos, C. and M. Komaitis. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT. 41: 652–659.

Razavi, S.M., Ghorbani, Z. and Hosseinzadeh, H. (2017). Investigation on effects of Xantothoxin as an allochemical on some Physiological and biochimical aspects of Lettuce. Journal of Plant Researches. 30(3): 672-682.

Razavi, S.M., Rouhi, F. and Hossenzadeh, H. (2017). Investigation effects of chalcone on lettuce from some Physiological and biochemical aspects**.** Journal of Plant Process and Function. 6(21): 291-300.

Rodríguez-Gil, J.L., Cáceres, N., Dafouz, R. and Valcárcel, Y. (2018). Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distributions and probabilistic risk assessment. Science of The Total Environment. 612(1):1058-1071.

Sadasivam, S. and Manickam, A. (1992). Biochemical Methods for Agricultural

Sciences, Wiley Eastern Ltd., New Delhi, pp.184-185.

Sampietro, D.A., Catalan, A.N. and Vattuone, **M.A. (2009).** Isolation, identification and characterization of allelochemicals natural products. CRC Press. London.

Sasamoto, H., Fujii, Y. and Ashihara, H. (2015). Effect of purine alkaloids on the proliferation of lettuce cells derived from protoplasts. Natural Product Communication. 10(5):751-762.

Seevers, P.M. and Daly, J.M. (1970). Studies on Wheat stem rust resistance controlled at the Sr6 locus. I. The role of phenolic compounds. Phytopathology. 60 (9): 1322-1328.

Smith, A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. Food Chemistry and Toxicology. 40(2002): 1243–55.

Sreevidya, N. and Mehrotra, S. (2003). Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Material. Mehrotra Journal of AOAC International. 86(6): 1-4.

Tiveron, A.P., Melo, P.S., Bergamaschi, K.B., Vieira, T.M.F.S., Regitano-d'Arce, M.A.B. and Alencar, S.M. (2012). Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. International Journal of Molecular Sciences. 13(7): 8943-8957.

Vafaei, M., Seyyed nejad, M., Gilani, A, and Saboora, A. (2015). A study on allelopathic effect of olive pomace (*Olea europaea* L.) on some biochemical characteristic of three seedling wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Iranian Journal of Plant Biology. 28(2): 445-458.

Viacava, G.E., Roura, S.I. and Ag¨uero, M.V. (2015). Optimization of critical parameters during antioxidants extraction from butterhead lettuce to simultaneously enhance polyphenols and antioxidant activity. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 146(1): 47-54.

Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology. 64(1): 88-93.

Wijngaard, H.H., Rößle, C. and Brunton, N. (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry. 116(1): 202–207.

Zulak, K.G., Liscome, D.K., Ashihara, H. and Facchini, P.J. (2006). Alkaloids. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), Plant Secondary Metabolites: Occurrence Structure, and Role in the Human Diet. Blackwell, Oxford, pp. 102–136.