

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری



دانشگاه ملایر

دانشکده علوم پایه - گروه زیست‌شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی (گرایش فیزیولوژی گیاهی)

بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی گیاهی اندام‌های مختلف

یونجه (*Medicago sativa* L.) طی مراحل مختلف رشد

به وسیله ی :

بدری اصطلامی

اساتید راهنما :

دکتر آرش بابایی

دکتر آتوسا علی احمدی

مهر ۱۳۹۲

به نام خدا

بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی گیاهی اندام‌های مختلف یونجه

(*Medicago sativa* L.) طی مراحل مختلف رشد

به وسیله‌ی:

بدری اصطلاحی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی

از فعالیت های لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست شناسی (گرایش فیزیولوژی گیاهی)

از دانشگاه ملایر

ارزیابی و تأیید شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: **نار**

دکتر آرش بابایی، استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه ملایر (استاد راهنما).....

دکتر آتوسا علی‌احمدی، استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهیدبهشتی (استاد راهنما).....

دکتر نیره اولنج، دکترای سیستماتیک گیاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ملایر (استاد داور).....

دکتر بهروز محمدپرست، استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه ملایر (استاد داور).....

دکتر مجید رستمی، استادیار گروه زراعت دانشگاه ملایر (نماینده تحصیلات تکمیلی).....

مهر ماه ۱۳۹۲

تقدیم به

خانوده عزیزم

به ویژه پدر و مادر دلسوزم، اسوه های همواره

پشتیان زندگیم

و همه کسانی که وجودشان دگر می وجودم است

حمد و سپاس خدای را؛

بر آنچه از وجود مبارکش به ما شناسانده و بر آنچه از شکرش به ما الهام فرموده و بر آن درهای دانش که به پروردگارش بر ما گشوده و بر اخلاص و ریزی در توحید و یگانگیش ما را رهنمون شده، چنان سپاسی که با آن در حلقهٔ پاسکزاران از بندگانش زندگی بگذرانیم و بر هر که به خشودی و بخشایش او پیشی جست، سبقت گیریم.

پاسکزاری می‌کنم از؛

خانواده عزیزم به خصوص پدر و مادر صبورم که در تمام مراحل زندگی همراه و پشتیبانم بوده و هستند، امیدوارم به ثمر رسیدن این پژوهش، جبرانی هر چند ناچیز باشد برای تمام زحمات بی‌دریغشان.

استاد راهنمای عزیزم، که در تمام مراحل این پژوهش همراه و راهنمایم بودند. از آقای دکتر بیانی و خانم

دکتر علی احمدی به خاطر تلاش‌های یکپارچه و راهنمایی دلسوزانه و صبورانه‌شان تشکر ویژه دارم؛ بی‌شک وجود

این دو عزیز سهم به سزایی در پیشبرد تحقیق حاضر داشته است.

تأمین استاد بزرگوارم در طول دوره تحصیل ارشد که علم و اخلاقشان الگوی راهم بوده و هست.

هم‌چنین از همکاری مسئولین و دوستان پژوهشگره گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی و همه

بزرگوارانی که به نوعی من را در به اتمام رساندن این پژوهش یاری رسانند، تشکر می‌کنم.

نام خانوادگی دانشجو: اصطلامی	نام: بدری
عنوان پایان نامه: بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی گیاهی اندام‌های مختلف یونجه (<i>Medicago sativa</i> L.) طی مراحل مختلف رشد	
اساتید راهنما: دکتر آرش بابایی - دکتر آتوسا علی احمدی استاد مشاور: -	
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: زیست شناسی گیاهی
فیزیولوژی	گرایش:
دانشگاه ملایر-گروه: زیست شناسی	تاریخ فارغ التحصیلی: مهر ۱۳۹۲
تعداد صفحات: ۹۸	
کلیدواژه: آنتی اکسیدان، فعالیت ضدباکتریایی، یونجه، آنتوسیانین، فنول کل، فلاونوئید	

چکیده

گیاهان با تنوع وسیع در ترکیبات شیمیایی، منبع احتمالی از عوامل ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی هستند. با توجه به گزارش‌هایی درباره حضور این ترکیبات در گیاه یونجه در این تحقیق به بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی این گیاه طی مراحل مختلف رشد و نیز در اندام‌های مختلف پرداخته شده است. علاوه بر این محتوای ترکیبات فنول و فلاونوئید کل و آنتوسیانین و رنگیزه‌های فتوسنتزی بررسی گردید. پس از کاشت بذر گیاه، نمونه برداری از اجزای گیاه طی مراحل مختلف رشد و عصاره گیری با روش خیساندن انجام شد. خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و هگزان‌ی در برابر دو باکتری گرم مثبت و دو باکتری گرم منفی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و MIC، هم‌چنین روش agar overlay در نمونه بذر بررسی شد، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی مطابق روش مهار رادیکال DPPH و BHT به عنوان استاندارد ارزیابی و نتایج به صورت IC₅₀ بیان شد. مطابق نتایج به دست آمده، عصاره پروتئینی بذر گیاه اثر قوی را در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. سایر عصاره‌ها دارای اثر ضعیف یا فاقد اثر در برابر باکتری‌های مورد بررسی بودند. بذر و گل گیاه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند. هم‌چنین بیش‌ترین محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین در گل و بالاترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ مشاهده شد.

فهرست مطالب شماره صفحه

فصل اول: مقدمه.....	۱
۱-۱- مقدمه.....	۲
فصل دوم: مرور منابع و پیشینه تحقیق.....	۶
۱-۲- کلیات گیاه یونجه.....	۷
۱-۱-۲- ویژگی های گیاه شناسی.....	۷
۲-۱-۲- منشا و پراکنش.....	۸
۳-۱-۲- ویژگی های کشت و بهره برداری.....	۸
۴-۱-۲- ویژگی های فیتو شیمیایی.....	۹
۵-۱-۲- ویژگی های فارماکولوژیکی.....	۱۱
۲-۲- فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهی.....	۱۱
۱-۲-۲- گونه های فعال اکسیژن و تنش اکسایشی.....	۱۱
۲-۲-۲- تعریف و اهمیت فعالیت آنتی اکسیدانی.....	۱۳
۳-۲-۲- روش های تشخیص فعالیت آنتی اکسیدانی.....	۱۴
۳-۲-۲- فعالیت ضدباکتریایی گیاهی.....	۱۶
۱-۳-۲- پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی.....	۱۷
۱-۱-۳-۲- عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی.....	۱۸
۲-۱-۳-۲- محل تجمع و تولید پپتیدهای گیاهی ضد میکروبی.....	۱۸
۳-۱-۳-۲- دسته بندی پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی.....	۱۹
۴-۲- عصاره های گیاهی.....	۲۱
۱-۴-۲- استخراج مایع - مایع.....	۲۱
۵-۲- ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها.....	۲۲
۱-۵-۲- نقش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها.....	۲۲
۶-۲- آنتوسیانین ها.....	۲۳
۱-۶-۲- ساختار و پراکنش آنتوسیانین ها در گیاه.....	۲۳
۲-۶-۲- عملکرد آنتوسیانین ها.....	۲۴
۷-۲- رنگیزه های فتوسنتزی.....	۲۵
۱-۷-۲- رنگیزه های کلروفیل.....	۲۵

۲۶	رنگیزه‌های کاروتنوئید.....
۲۸	پیشینه تحقیق.....
۳۲	فصل سوم: مواد و روش‌ها.....
۳۳	۱-۳- عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی.....
۳۳	۱-۱-۳- آماده‌سازی نمونه گیاهی مورد استفاده.....
۳۳	۱-۱-۳- کاشت بذرها و تهیه نمونه اندام هوایی و زمینی.....
۳۳	۲-۱-۳- آماده‌سازی حلال‌های آلی.....
۳۴	۳-۱-۳- عصاره‌گیری.....
۳۴	۱-۳-۱-۳- عصاره‌های متانولی و هگزانی.....
۳۵	۲-۳- بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آلی نمونه گیاهی.....
۳۵	۱-۲-۳- آماده‌سازی سویه‌های میکروبی مورد استفاده.....
۳۵	۲-۲-۳- تهیه محلول‌های ذخیره از عصاره‌ها.....
۳۵	۳-۲-۳- تعیین MIC برای باکتری‌ها.....
۳۵	۱-۳-۲-۳- تعریف کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد.....
۳۷	۲-۳-۲-۳- کنترل کیفی آزمایش‌های تعیین MIC.....
۳۷	۴-۲-۳- دیسک دیفیوژن و انتشار از چاهک و بذر.....
۳۸	۳-۳- بررسی نیمرخ پروتئینی و اثر ضدباکتریایی نمونه‌های مایع رویی بذر.....
۳۸	۱-۳-۳- آماده‌سازی نمونه‌های بذر در حال رویش.....
۳۸	۲-۳-۳- تعیین غلظت پروتئین مایع رویی بذرها.....
۳۹	۳-۳-۳- الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی به روش Denaturing.....
۳۹	۱-۳-۳-۳- SDS-PAGE.....
۴۰	۲-۳-۳-۳- رنگ‌آمیزی ژل‌ها.....
۴۲	۴-۳-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی به روش Agar overlay.....
۴۲	۱-۴-۳-۳- تثبیت پروتئین بر روی ژل و شستشوی ژل‌های تثبیت شده.....
۴۲	۲-۴-۳-۳- اضافه کردن باکتری مورد بررسی.....
۴۳	۳-۴-۳-۳- کنترل کیفی آزمایشات Agar overlay.....
۴۳	۴-۳- بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آلی نمونه گیاهی.....
۴۳	۱-۴-۳- مواد و وسایل لازم جهت انجام سنجش.....

۴۴	۳-۴-۲- روش انجام سنجش.....
۴۶	۳-۵-۱- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل (تست آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی).....
۴۶	۳-۵-۱- مواد و وسایل مورد استفاده.....
۴۶	۳-۵-۲- روش انجام سنجش.....
۴۶	۳-۵-۲-۱- تهیه عصاره.....
۴۶	۳-۵-۲-۲- تهیه محلول گالیک اسید.....
۴۷	۳-۵-۲-۳- تهیه محلول سدیم بیکربنات ۷ درصد.....
۴۷	۳-۵-۲-۴- ترتیب افزودن مواد.....
۴۷	۳-۵-۲-۵- نقش مواد فوق در روش فولین.....
۴۸	۳-۶-۱- سنجش رنگیزه‌های گیاهی.....
۴۸	۳-۶-۱- استخراج و اندازه‌گیری آنتوسیانین کل.....
۴۸	۳-۶-۱-۱- مواد و وسایل لازم.....
۴۸	۳-۶-۱-۲- روش انجام سنجش.....
۴۸	۳-۶-۲- استخراج و اندازه‌گیری فلاونوئید کل.....
۴۸	۳-۶-۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز.....
۴۹	۳-۶-۲-۲- روش انجام سنجش.....
۴۹	۳-۶-۳- سنجش رنگیزه‌های فتوستتزی.....
۴۹	۳-۶-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز.....
۴۹	۳-۶-۳-۲- روش انجام سنجش.....
۵۰	فصل چهارم: نتایج و بحث.....
۵۱	۴-۱- یافته‌ها و نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدباکتریایی.....
۵۱	۴-۱-۱- نتایج حاصل از تعیین MIC.....
۵۳	۴-۱-۲- دیسک دیفیوژن و انتشار از چاهک.....
۵۴	۴-۱-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی و تعیین غلظت پروتئین مایع رویی بذرها.....
۵۴	۴-۱-۳-۱- تعیین غلظت پروتئین.....
۵۶	۴-۱-۳-۲- SDS-PAGE.....
۵۷	۴-۱-۳-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی به روش Agar overlay.....
۵۹	۴-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهی.....

۶۶.....	۳-۴- نتایج حاصل از بررسی میزان ترکیبات فنولی کل
۶۸.....	۴-۴- یافته‌های حاصل از بررسی میزان رنگیزه‌های گیاهی
۶۸.....	۴-۴-۱- بررسی میزان آنتوسیانین کل
۷۰.....	۴-۴-۲- بررسی میزان ترکیبات فلاونوئید کل
۷۱.....	۴-۴-۳- بررسی رنگیزه‌های فتوستتزی
۷۶.....	فهرست منابع و مآخذ

شماره صفحه	فهرست جداول
۱۰	جدول ۱-۱-۲- ترکیبات موجود در ساقه گیاه بالغ و نابالغ آلفالفا
۲۷	جدول ۱-۷-۲- توزیع رنگیزه‌های فتوسنتزی در موجودات زنده
	جدول ۱-۳-۳- روش تهیه بافرهای مورد نیاز برای ساختن ژل حاوی
۴۱	پلی‌آکریل آمید SDS
	جدول ۱-۱-۴- نتایج MIC مربوط به عصاره‌های متانولی و هگزانلی
۵۲	اندام هوایی و گل گیاه
	جدول ۲-۱-۴- نتایج MIC مربوط به عصاره‌های متانولی و هگزانلی
۵۲	اندام زمینی و بذر گیاه
	جدول ۱-۴-۴- مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی طی مراحل مختلف رشد بر حسب
۷۳	میلی‌گرم در گرم وزن تر

فهرست شکل‌ها و نمودارها شماره صفحه

- شکل ۱-۱-۲- اندام‌های مختلف یونجه..... ۸
- شکل ۱-۲-۲- اساس روش سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال DPPH..... ۱۵
- شکل ۱-۶-۲- ساختار آنتوسیانیدین‌های اصلی..... ۲۴
- شکل ۱-۷-۲- طیف جذبی کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها..... ۲۶
- شکل ۱-۴-۳- طرح شماتیک پلیت ۹۶ خانه در سنجش DPPH..... ۴۵
- شکل ۱-۱-۴- نیمرخ پروتئینی نمونه‌های مایع رویی بذر..... ۵۶
- شکل ۲-۱-۴- نیمرخ پروتئینی نمونه‌های مایع رویی بذر..... ۵۷
- شکل ۳-۱-۴- اثر ضدباکتریایی بذر به روش Agar overlay..... ۵۷
- نمودار ۱-۱-۴- منحنی استاندارد پروتئین با روش بردفورد و BSA..... ۵۵
- نمودار ۲-۱-۴- مقادیر غلظت پروتئین نمونه‌های مایع رویی بذر..... ۵۵
- نمودار ۱-۲-۴- منحنی استاندارد BHT..... ۵۹
- نمودار ۲-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام هوایی ۲ ماه اول..... ۵۹
- نمودار ۳-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام هوایی ۲ ماه دوم..... ۶۰
- نمودار ۴-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام هوایی سال دوم قبل از گل‌دهی..... ۶۰
- نمودار ۵-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام هوایی سال دوم پس از گل‌دهی..... ۶۱
- نمودار ۶-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی گل..... ۶۱
- نمودار ۷-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام زمینی ۲ ماه اول..... ۶۲
- نمودار ۸-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام زمینی ۲ ماه دوم..... ۶۲
- نمودار ۹-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام زمینی سال دوم قبل از گل‌دهی..... ۶۳
- نمودار ۱۰-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی اندام زمینی پس از گل‌دهی..... ۶۳
- نمودار ۱۱-۲-۴- اثر آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی بذر..... ۶۴

نمودار ۴-۲-۱۲- مقایسه مقادیر غلظت مهار ۵۰ درصدی DPPH

- ۶۴..... نمونه استاندارد و نمونه‌های مورد بررسی
- ۶۷..... نمودار ۴-۳-۱- منحنی استاندارد گالیک اسید
- نمودار ۴-۳-۲- مقادیر فنول کل عصاره متانولی اندام زمینی و هوایی گیاه طی
- ۶۷..... مراحل مختلف رشد
- ۶۸..... نمودار ۴-۴-۱- مقادیر آنتوسیانین کل اندام زمینی طی مراحل مختلف رشد گیاه
- ۶۹..... نمودار ۴-۴-۲- مقادیر آنتوسیانین کل اندام هوایی طی مراحل مختلف رشد گیاه
- نمودار ۴-۴-۳- مقایسه محتوای آنتوسیانین اندام زمینی و هوایی طی مراحل
- ۶۹..... مختلف رشد گیاه
- نمودار ۴-۴-۴- مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی کل اندام هوایی و زمینی طی
- ۷۰..... مراحل مختلف رشد گیاه
- نمودار ۴-۴-۵- مقایسه محتوای کاروتنوئید طی مراحل مختلف رشد اندام‌های
- ۷۴..... گیاه بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر
- نمودار ۴-۴-۶- مقایسه محتوای کلروفیل (a+b) طی مراحل مختلف رشد
- ۷۴..... اندام‌های گیاه بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر

فصل اول

مقدمہ

۱-۱- مقدمه

استفاده از گیاهان به عنوان عوامل دارویی و درمانی و مقوی از دوران ما قبل تاریخ آغاز شده و تا به امروز ادامه دارد [۳۹]. امروزه به علت بسیاری از مزیت‌های اکولوژیکی، اقتصادی و علمی استراتژی‌های مهمی جهت تولید ترکیبات فعال زیستی برای صنایع دارویی و غذایی به کار برده می‌شوند. ترکیبات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدان مورد نیاز هر دو صنعت مذکور است [۳۲]. گیاهان ترکیبات آلی بسیاری را تولید می‌کنند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی هستند. این ترکیبات در اجزای مختلف گیاه هم‌چون ساقه، ریشه، برگ، تنه، گل یا میوه و بذر یافت شده‌اند و شامل آلین/آلیسین^۱ و ایزوتیوسیانات‌ها^۲، رنگیزه‌های گیاهی، آنزیم‌های هیدرولیتیک، پروتئین‌ها، اسانس‌ها^۳ و فیتوالکسین‌ها^۴ یا ترکیبات فنولی می‌شوند. برخی گزارش‌ها، بذرها را به عنوان منابعی با کاربرد دارویی معرفی کرده‌اند. بسیاری از ترکیبات شیمیایی هم‌چون آلکالوئیدها، لکتین‌ها و ترکیبات فنولی مثل لاکتون‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها در بذر یا پوشش بذرها وجود دارند که احتمالاً در حفاظت بذرها از تجزیه میکروبی موثر هستند تا زمانی که شرایط برای جوانه زنی مساعد شود. بسیاری از این ترکیبات به شکل گیاه کامل یا عصاره گیاهی جهت کاربردهای غذایی و دارویی در انسان استفاده می‌شوند [۸].

در سیستم‌های زنده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مثل رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن به عنوان محصولات فرعی متابولیسم

^۱ Alliin/allicions

^۲ Isothiosyanates

^۳ Essential oils

^۴ Phytoalexins

^۵ Reactive Oxygen Species

طبیعی در اجزای سلولی مختلف تولید می‌شوند [۴۸]، که بیان بسیاری از ژن‌ها و متعاقب آن کنترل بسیاری از فرآیندها مثل رشد و نمو، چرخه سلولی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، دفاع علیه پاتوژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. تحمیل تنش زیستی یا غیرزیستی می‌تواند باعث افزایش بیش از حد انواع اکسیژن فعال و آسیب به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA و نهایتاً منجر به تنش اکسایشی^۱ شود [۶۶]. ثابت شده است تنش اکسایشی از عوامل اصلی در اکسیدکردن مواد غذایی و کاهش ارزش غذایی و در نهایت القای بسیاری از بیماری‌ها مثل دیابت ملیتوس^۲، پارکینسون، آترواسکلروز^۳، بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری‌های دوره پیری است.

آنتی‌اکسیدان‌ها مواد حیاتی هستند که دارای توانایی حفاظت بدن در برابر آسیب‌های ناشی از تنش اکسایشی القا شده با رادیکال‌های آزاد هستند و به همین دلیل آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از پیامدهای مضر تنش اکسایشی در انسان به کار می‌روند [۳۲]. بالابردن تنوع غذایی استراتژی خوبی جهت حفاظت بدن انسان از مشکلات سلامتی مرتبط با تنش اکسایشی است [۸].

از سویی استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی ضد میکروبی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت در اکثر باکتری‌ها گردیده است. مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها روزبه‌روز در حال افزایش است که این مسئله باعث شده است تا مسئولان به فکر جایگزین کردن عوامل ضد میکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کم‌تر به جای مواد ضد میکروبی دارای اثر کم‌تر و عوارض ناخواسته بیش‌تر باشند. گیاهان را می‌توان به عنوان منابعی از مواد شیمیایی بالقوه و مفید دانست که تنها بخشی از آن‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. در سال‌های اخیر توجه زیادی به کشف عوامل ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی، وجود دارد.

^۱ Oxidative stress

^۲ Diabetes mellitus

^۳ Atherosclerosis

گیاهان با انواع مختلفی از اجزای شیمیایی به عنوان منبع جایگزین مؤثرتر از عوامل ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مصنوعی در نظر گرفته می‌شوند و گزارش شده است که این کاربرد حداقل اثرات جانبی را دارد [۳۲].

نظر به این که گیاهان دارویی در کشور ما پراکندگی وسیعی دارند، مطالعات روی این گیاهان از نظر خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها زمینه مناسبی را فراهم می‌کند که از نتایج این بررسی‌ها جهت مصارف دارویی و غذایی استفاده نمود. از جمله این گیاهان که می‌تواند به این منظور به کار رود، یونجه است [۳].

یونجه (*Medicago sativa* L.) گیاهی علفی و چند ساله از تیره بقولات (Fabaceae)، با نام‌های انگلیسی alfalfa و Lucerne است. محتوی مواد شیمیایی گیاهی متنوعی هم‌چون آلکالوئیدها، آمینواسیدها و آنزیم‌های ضروری، فیتواسترول‌ها^۱، فیتواسترول‌ها^۲، فلاون‌ها^۳، فلاونوئیدها، مواد معدنی، ساپونین، ویتامین‌ها است [۳۹]. این گیاه به علت غنی بودن از ویتامین‌ها و فیتواسترول‌ها به عنوان افزودنی غذایی در چند کشور توسعه یافته استفاده می‌شود [۱۸]. یونجه با محدوده وسیعی از عرض‌های جغرافیایی سازگار است و به طور وسیعی در سرتاسر جهان کشت می‌شود [۷۱]، در ایران یونجه رایج‌ترین محصول زراعی رشد یافته است. [۱۵].

اجزای مختلف این گیاه مثل اندام هوایی و بذر از جنبه‌های مختلف از جمله توانایی در مقاومت به تنش‌های محیطی به ویژه شوری و خشکی جهت کاربردهای کشاورزی و دامی و نیز اثر در درمان برخی از بیماری‌های ناشی از تنش اکسایشی بررسی شده است. با این وجود با توجه به گزارش‌هایی مبنی بر وجود طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی مؤثر در گیاه یونجه، و از آن جا که گیاه یونجه در محدوده جغرافیایی وسیعی رشد می‌یابد و کشت آن آسان و کم هزینه است، ضروری است حداقل پتانسیل بالقوه این گیاه شناسایی و برای توسعه عوامل جدید که فعالیت بیولوژیکی خوبی دارند، بهره‌برداری شود. [۱۵، ۲۹، ۷۵]. در این تحقیق به بررسی خواص ضدباکتریایی بر روی

^۱ Phytosterols

^۲ Phytoestrogens

^۳ Flavones

دو باکتری گرم مثبت و دو باکتری گرم منفی، و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی طبق روش DPPH و سنجش تعدادی از ترکیبات موجود در گیاه یونجه مثل رنگیزه‌های فتوستتزی و آنتوسیانین^۱ و ترکیبات فنولی کل^۲ پرداخته شده است. از زمانی که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی گیاهان و عصاره‌های طبیعی توسط طیف وسیعی از روش‌ها شناسایی شده‌اند، این مساله که کدام یک از این ترکیبات دارای بازده بیش‌تری هستند، مطرح شده است. از آنجایی که رویکرد تحقیقات قبلی به مراحل مختلف رشد و اندام‌های این گیاه به طور جداگانه و بدون اعمال تنش نبوده است، در حالی که هر یک از اجزا و مراحل در وجود و میزان ترکیبات موثر آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی می‌تواند متغیر باشد، در این تحقیق پتانسیل بالقوه اندام‌های مختلف طی مراحل قبل و پس از گلدهی این گیاه در نظر گرفته شد، علاوه بر این، تاثیر احتمالی محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین کل در خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه و وجود پپتیدهای ضدباکتریایی در بذر هم بررسی شد. بنابراین انتظار می‌رود نتایج حاصل، اندام و مرحله‌ای از رشد گیاه یونجه را که دارای قوی‌ترین اثر است به عنوان منبع طبیعی و ذاتی عوامل ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی معرفی کند تا در صورت بهره‌برداری دارویی، غذایی و حتی دامی، بهترین بازده حاصل شود. امید بر آن است تحقیق حاضر جهت اهداف مذکور مفید و موثر واقع شود.

^۱ Anthocyanins

^۲ Total phenol

فصل دوم

مرور منابع و پیشینه تحقیق

۲-۱- کلیات گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

جنس *Medicago* (Fabaceae, Faboideae) شامل ۸۳ گونه مختلف است که معروفترین آن‌ها یونجه معمولی با نام علمی *Medicago sativa* L. (syn. *M. media*) (Pers.) است و آلفالفا^۱، لوسرن^۲، گیاه بوفالو^۳، پدر همه غذاها (Al-fal-fa)، داروی ارغوانی^۴، مدیکاگو نیز نامیده می‌شود [۶، ۲۸].

۲-۱-۱- ویژگی‌های گیاه شناسی

این گیاه، گیاهی چند ساله، دارای ۳۰ سانتی‌متر یا بیش‌تر طول، راست ریشه با چند متر طول، ساقه‌های راست یا بالارونده، برگ‌های ۳ برگچه‌ای، برگچه‌ها به شکل تخم مرغ وارونه و کشیده و تخم‌مرغی یا خطی، دارای ۴۵-۱۰ میلی‌متر طول و ۱۰-۳ میلی‌متر عرض و بدون کرک، گل آذین خوشه‌ای، خوشه‌ها تخم‌مرغی یا گرد و دارای ۲/۵-۱ سانتی‌متر طول و ۲-۱ سانتی‌متر عرض، دارای ۴۰-۵ گل، گل‌ها زیگومورف کوچک پروانه آسا و آبی تا ارغوانی، ساقه گل باریک و بلند، محکم و بدون کرک، کاسه گل لوله‌ای با دندانه‌های نوک تیز، جام گل دارای حدود ۱ سانتی‌متر طول و ۵ گلبرگ، ۱۰ پرچمی (۹ عدد یک لوله تشکیل می‌دهد و یکی آزاد است)، تخمدان فوقانی تک برچه‌ای و تک حفره‌ای، دارای میوه نیام (غلاف)، تعداد ۶ تا ۸ عدد بذر در هر غلاف، بذرهای زرد یا قهوه‌ای رنگ، تخم‌مرغی، کلیوی و یا قلبی شکل است [۲۸، ۲۴].

^۱ Alfalfa

^۲ Lucerne

^۳ Buffalo herb

^۴ Purple medic