اثر فلز روی بر رشد و برخی از شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه نعناع خوراکی (*Mentha spicata* L.)

سعید زارع ده آبادی*[۱]، زهرا اسرار[۱] و میترا مهربانی[۲]

[۱] کرمان ، دانشگاه شهید باهنر ، دانشکده علوم ، گروه زیست شناسی

[۲] کرمان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی و علوم داروئی، گروه فارماکوگنوزی

تاریخ دریافت ۸۵/۵/۲۹ تاریخ پذیرش:۸۵/۱۲/۲۳

چکیده

روی (zinc) بعنوان یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان نقش ساختاری و عملکردی فراوانی در بسیاری از فرآیند های متابولیکی گیاهان بر عهده دارد، ولی مقدار اضافی آن بخصوص در خاکهای اسیدی یک فاکتور محدود کننده رشد برای گیاه محسوب می شود. در این تحقیق با توجه به اهمیت زیاد گیاه نعناع در زمینه های دارویی و صنعتی اثرغلظت های متفاوت روی بر این گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. گیاهان بمدت ۱۲ هفته در اتاق رشد با شرایط کنترل شده و محلول غذایی حاوی غلظتهای متفاوت فلز روی کشت داده شد. بر اساس نتایج شاخصهای رشد، میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و مقدار کاروتنوئیدها در تیمار ۵ و ۱۰ میکرومولار روی در مقایسه با گیاه کنترل افزایش و با بالا رفتن غلظت روی در محلول غذایی (۴۰µM و۲۰) به تدریج کاهش می یابد. محتوای آنتوسیانین برگ در غلظت ۵ میکرومولار نسبت به گیاه کنترل تفاوت معنی داری ندارد ولی با افزایش غلظت روی در محلول غذایی بخصوص در تیمار۴۰ میکرومولار به تدریج افزایش نشان می دهد. میزان مالون دآلدهید بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی تنها در تیمار بالای فلز روی اندکی افزایش نشان می دهد. مقدار پروتئین کل در برگها نیز با افزایش غلظت روی بطور معنی داری افزایش ولی در غلظتهای بالای این فلز اندکی از مقدار آنها کاسته می شود. بطور کلی فلز روی در غلظتهای پایین موجب تحریک رشد در گیاه نعناع می شود در حالی که غلظتهای بالای آن باعث بروز برخی اثرات سمی در این گیاه می گردد.

واژه های کلیدی: آنتوسیانین، کلروفیل، پروتئین، روی، نعناع خوراکی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۵۷۲۶۳۵، پست الکترونیک :bioscholar_85@yahoo.com

مقدمه

فلزات سنگین اغلب در قالب آلاینده های محیطی از جمله آلودگیهای جوی مراکز صنعتی، استفاده افراطی از کودهای کشاورزی و فاضلابهای شهری و صنعتی بصورت برگشت ناپذیر وارد خاک می شوند (۲٤). در بسیاری از خاکهای اسیدی سراسر دنیا و حدود نیمی از زمینهای زراعی که پتانسیل تولید غذا و مواد غذایی را دارند فلزات سنگین بعنوان عامل اصلی محدودیت رشد گیاهان می باشد (۱). مقدار روی بعنوان یک فلز سنگین در خاک به ترکیب سنگهای تشکیل دهنده خاک و شرایط هوازدگی آن بستگی دارد. این فلز با آنیونهای کلرید، فسفات، نیترات و سولفات ترکیب می شود. از مهمترین و رایج ترین شکل کمپلکس روی در خاک، سولفات و فسفات روی می باشند. روی برای انتقال به فاصله های دور در آوند های چوبی، یا با اسید آلی پیوند می یابد و یا بصورت کاتیون دو ظرفیتی آزاد ظاهر می شود. در شیره پرورده غلظت روی کمی بالا

Archive of SID

www.SID.ir

بوده و احتمالاً بصورت کمپلکس با مواد آلی با وزن ملکولی پایین وجود دارد (٤).

فلز روی(zinc) یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان بوده، در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش دارد. این فلز بعنوان فعال کننده و کوفاکتور برخی آنزیمهای حیاتی گیاه از جمله کربونیک انیدرازها، دهیدروژنازها، آلکالین فسفاتازها، فسفولیپازها و RNA پلیمرازها در متابولیسم پروتئینها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربیها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین بعنوان یک هورمون محرک رشد ایفای نقش می کند (٢٤). برخی از محققان معتقدند که فلز روی از طریق محافظت پروتئینها و لیپیدهای غشایی در برابر رادیکالهای آزاد و سایر محصولات حاصل از واکنشهای احیایی درون سلولی سبب حفظ تمامیت غشای سلولها می شود، بعلاوه این فلز بهمراه مس بخش اصلی آنزیم سوپر اکسید دسموتاز را بعنوان خورنده رادیکال های آزاد تشکیل می دهد (٢٤). همچون سایر فلزات سنگین هنگامی که فلز روی در خاک و در نهایت در بافتهای گیاهی تجمع می یابد بسته به گونه گیاهی موجب تغییر در برخی فرآیند های متابولیکی گیاه شده و از این طریق در رشد و نمو گیاهان اختلال ایجاد می کند (۳۰). گونه های مختلف گیاهی در برابر آلودگی خاک با فلزات سنگین واکنشهای متفاوتی نشان می دهند. برخی از گونه های گیاهی بمقدار معینی از فلزات سنگین در خاک مقاوم بوده، توانایی جذب و تثبیت آنها در بافتهای درونی خود را دارند. گاه در برخی از گیاهان آثار مسمومیت چندان بارز نیست ولی میزان محتوی فلزی موجود در گیاه سلامت انسان و یا دامهایی که از آن تغذیه می کنند را به خطر می اندازد (۹). بنابراین مطالعه اثر فلزات سنگین بر گیاهان از یک طرف برای شناسایی گیاهان مقاوم و استفاده از آنها در پاکسازی خاکهای آلوده (Phytoremediation) و از طرف دیگر بمنظور ایجاد ژنوتیپهای گیاهی مقاوم ضروری به نظر می رسد. بهمین منظور در این تحقیق اثر غلظتهای متفاوت فلز روی بر برخی از شاخصهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نعناع مورد بررسی قرار گرفت. نعناع خوراکی (*Mentha spicata* L.) متعلق به خانواده Lamiaceae (Labiateae)، گیاهی است چند ساله، علفی، پایا، با ساقه های چهار گوش و برگهای متقابل و دندانه دارکه پوشیده از کرک و بدون دمبرگ می باشند (۱۷). گلها بصورت سنبله های باریک و نوک دار، سیستم ریشه ای خزنده و تکثیر گیاه معمولاً از طریق ساقه های زیر زمینی یا ریزومها صورت می گیرد. این گیاه برای اولین بار درسال ۱٦۷۲ در منطقه ای از آمریکا کشت داده شد. در سال ۱۸۱۲ در شهر کوچکی در منطقه ماساچوست با نام آشفیلد بعنوان یک گیاه صنعتی و تجاری مورد استفاده قرار گرفت، و اسانس این گیاه بعنوان ترکیب دارویی به سایر کشورها صادر شد (۱۹). گیاه نعناع در خاکهای شنی اسیدی رشد بهتری داشته، شرایط نوری متوسط و رطوبت بالای خاک را ترجیح می دهد. بخشهای هوایی گیاه بخصوص برگها و سرشاخه های گلدار آن معطر بوده، مصارف صنعتی و دارویی فراوانی دارد (١٤). از اسانس این گیاه نیز در زمینه تهیه لوازم آرایشی، تهیه داروهای مسکن دردرمان تب، سردرد، سرماخوردگی و غیره و در صنایع غذایی بعنوان طعم دهنده غذاها و شیرینی جات استفاده می شود (۷ و ۱۳).

مواد و روشها

بمنظور از بین بردن مواد زاید، آلودگیهای احتمالی و عدم رشد بذرهای مزاحم، ورمیکولیت در انکوباتور بمدت ۲ ساعت در ۲۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده و چندین بار با آب مقطر شسته شد. ریزومهای نعناع خوراکی (Spearmint) پس از چندین بار شستشو با آب مقطر به گلدانهایی با ابعاد ١٤×١٢ سانتی متر حاوی ورمیکولیت فوق منتقل شد، و در هر گلدان ۳ عدد ریزوم با طول ٤ سانتی متر قرار داده شد. گلدانها در اتاق رشد با شرایط کنترل شده تحت دوره نوری ١٦/٨ ساعته (تاریکی/نور) ،

Archive of SID
www.SID.ir

دوره دمایی ۲۸/۱۸ درجه سانتی گراد (شب/روز) و رطوبت نسبی ٦۰-۵۰ درصد نگهداری، و در دو هفته اول گلدان ها با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند با pH تقریبی ۱±۵/۷ آبیاری شد.

پس از دو هفته جهت تهیه محلولهایی با غلظتهای متفاوت روی (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکرومولار)، به محلول هوگلند با مقدار مناسب نمک سولفات روی ($ZnSO_4$) اضافه شد. منظور از غلظت صفر بعنوان شاهد این است که در مقایسه با محلول تیمار هیچ یونی اضافه نشده است در حالیکه، مقدار پایه فلز روی در هوگلند در همه محلولها وجود دارد. در فرآیند جذب گیاهان یون سولفات با روی رقابت اندکی داشته و میزان سمیت آن پایین است در صورتیکه، استفاده از اسید کلریدریک در برخی موارد سبب ایجاد مسمومیت در گیاه می شود. بدین منظور در این تحقیق pH محلولها با استفاده از اسید سولفوریک و سود تنظیم شد. محلولها بصورت یک روز در میان به حجم ۱۰۰ میلی لیتر به گلدانها اضافه و در فواصل بین تیمارها بمنظور مرطوب نگه داشتن خاک و ممانعت از تجمع بیش از حد نمک در گلدان از آب مقطر استفاده گردید. پس از ۱۲ هفته شاخصهای مورد نظر در نمونه های گیاهی مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش شاخص های رشد گیاه: برای تعیین سطح برگ از روش ساده کپی کاغذی استفاده شد، بدین صورت که از هر گلدان چند برگ انتخاب و بر روی کاغذ قرار داده و از آنها کپی کاغذی تهیه گردید. سپس کپی برگهای مورد نظر نیز توزین و با رابطه تناسبی سطح برگ بر اساس وزن آنها نسبت به وزن یک سانتی متر مربع از کاغذ مشابه محاسبه شد. طول اندام هوایی و طول ریشه از قسمت یقه تا نوک گیاه و طول میانگره های دوم و سوم با خط کش میلی متری اندازه گیری شد.

اندازه گیری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید: محاسبه غلظت کلروفیل و کاروتنوئید ها (کاروتن و گزانتوفیل) در برگهای گیاه با استفاده از روش لیچتن و تالر (۱۹۹٤) انجام شد (۲۰). مطابق با این روش ۰/۱ گرم از بافت تر برگ وزن شده و رنگریزه ها با استون ۸۰ درصد استخراج شد، پس از صاف کردن نمونه ها با کاغذ صافی واتمن جذب در طول موجهای ٦٦۳/۲، ٦٤٦/۸ و ٤۷۰ نانو متر با اسپکتو فتومتر Unico2100 مدل A0509089 خوانده و مقدار کلروفیل a، b و مقدار کاروتنوئید ها با استفاده از فرمول های زیر بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

$$Ca = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$$

$$Cb = 21.50\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$$

$$Ct = Ca + Cb$$

$$Cx+c = (1000\ A_{470} - 1.82\ Ca - 85.02\ Cb)/198$$

در معادله های فوق A جذب خوانده شده در طول موج مورد نظر و Ca، Cb و Cx+c بر حسب میلی گرم در لیتر بترتیب غلظت کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها شامل کاروتن و گزانتوفیل می باشند.

اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش این شاخص غلظت مالون دآلدهید (MDA) بعنوان محصول شاخص واکنش پراکسیداسیون اسیدهای چرب با استفاده از روش Heath & Packer (1968) اندازه گیری شد (۱٦). طبق این روش ۰/۱ گرم برگ در ٤ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد کاملاً سائیده، و عصاره حاصل بمدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شد، سپس به ۱ میلی لیتر از محلول روئی ٤ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیو باربیتوریک اسید (TBA) اضافه گردید. این مخلوط بمدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد قرار داده شد. ماده مورد نظر برای جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر ماده قرمز رنگ MDA-TBA بود و جذب سایر رنگریزه های غیر اختصاصی در ٦۰۰ نانومتر از این مقدار کم شد. برای محاسبه غلظت MDA از فرمول A=εbc استفاده شد که درآن مقدارε یا ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ $mMcm^{-1}$، A مقدار جذب، b

Archive of SID

www.SID.ir

عرض سلول اندازه گیری و c مقدار ترکیب بر حسب مول در گرم برگ تر گیاه می باشد.

اندازه گیری میزان آنتوسیانینها: تعیین مقدار آنتوسیانینها بر اساس روش Wanger (1979) صورت گرفت (۳۲). ۰/۱ گرم از برگ تازه گیاه را با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی سائیده و عصاره برای ٢٤ ساعت در تاریکی قرار داده شد. پس از این بمدت ۱۰ دقیقه در دور g ٤۰۰۰ عصاره را سانتریفیوژ نموده و جذب محلول روئی با استفاده از اسپکتوفتومتر Unico2100 مدل A0509089 در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول A=εbc بدست آمد که در آن مقدارε یا ضریب خاموشی معادل $mMcm^{-1}$ ۳۳۰۰، A مقدار جذب، b عرض سلول اندازه گیری برابر با ۱ سانتی متر و c مقدار آنتوسیانین بر حسب مول بر گرم وزن تر گیاه می باشد.

سنجش میزان پروتئین کل به روش لوری (Lowry): اساس کار در این روش بر هیدرولیز پروتئینها و واکنش اسیدهای آمینه با معرف فولن و ایجاد کمپلکسهای رنگی می باشد (۲۱). ابتدا معرفهای لازم برای سنجش آماده شد:

معرف A- ۱۰۰ گرم از کربنات سدیم خشک را به محلول ۰/۵ نرمال سود اضافه و حجم محلول به ۱ لیتر رسید.

معرف B- ۱ گرم سولفات مس آبدار در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شد.

معرف C- ۲ گرم تارتارات پتاسیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل گردید.

معرف D- ۰/۵ میلی لیتر از معرف A، ۰/۷۵ میلی لیتر از معرف B و ۰/۷۵ میلی لیتر از معرف C با هم مخلوط شدند.

معرف E- محلول فولین فنل به نسبت ۹ به ۱ با آب ساخته شد.

برای تهیه عصاره مورد نظر ۰/۰۵ گرم از نمونه تازه گیاه را با ٤ میلی لیتر بافر فسفات ساییده و محلول بمدت ۱۵ دقیقه در g۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. ۱ میلی لیتر از محلول روئی در هر نمونه را برداشته، به تمام نمونه ها ٤ میلی لیتر از معرف D اضافه شد. لوله ها بمدت ۱۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. پس از آن به هر کدام از لوله ها ۱/۵ میلی لیتر معرف E اضافه گردید. لوله ها بمدت ۰/۵ ساعت در تاریکی و نهایتا جذب آنها با اسپکتوفتومتر Unico2100 مدل A0509089 در طول موج ٦٦۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت پروتئین کل در نمونه بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه گردید.

برای رسم منحنی استاندارد غلظتهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ٦۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر از آلبومین گاوی ساخته، کلیه مراحل مانند نمونه های مجهول روی آنها صورت گرفت. منحنی جذب بر اساس غلظت استاندارد رسم و با استفاده از معادله بدست آمده مقدار پروتئین ها محاسبه گردید.

آنالیز آماری: این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار آماریSPSS v.9، آزمون ANOVA و نرم افزار MSTAT-C انجام شد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

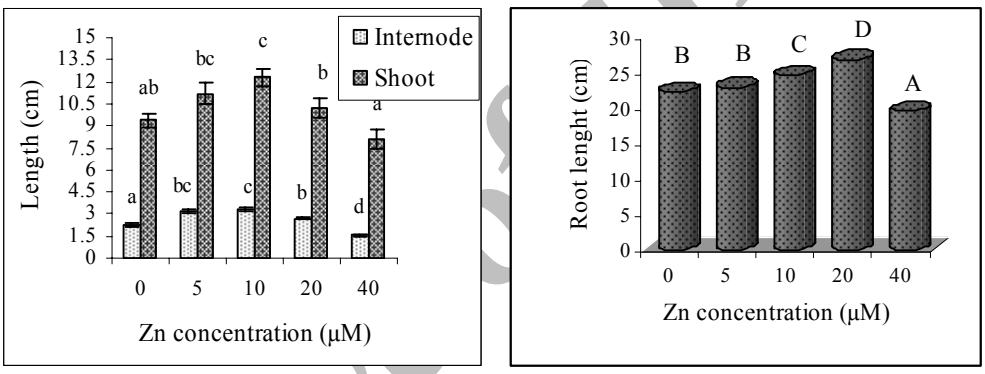
نتایج

اثر فلز روی بر شاخصهای رشد گیاه در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس این وضعیت طول میانگره و طول اندام هوائی در گیاه نعناع تا غلظت ۱۰ میکرومولار روی افزایش و با بالا رفتن روی در محلول غذائی به تدریج کاهش می یابد. در مورد ریشه این افزایش تا غلظت ۲۰ میکرومولار روی ادامه دارد (شکل۱و٦). وزن خشک ساقه

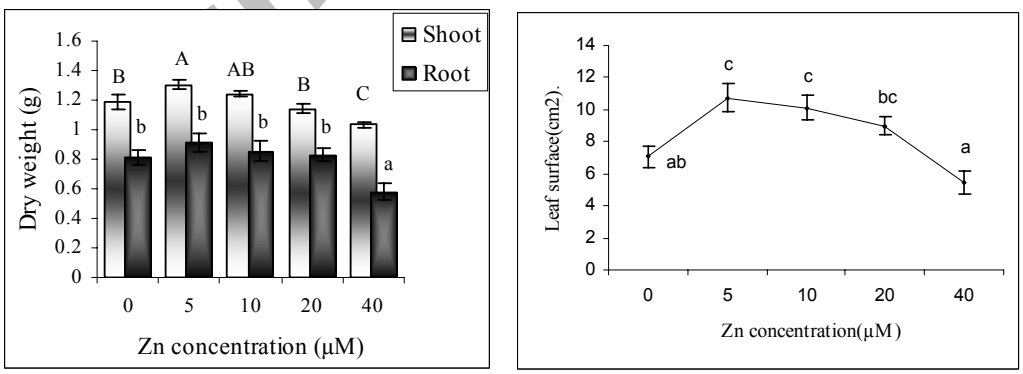
Archive of SID

www.SID.ir

و ریشه و سطح برگ در نمونه های تیمار شده با روی به تدریج کاهش یافته ولی این شاخصها در غلظت ۵ میکرومولار روی اندکی افزایش نشان می دهند که در مورد وزن خشک ساقه و سطح برگ این افزایش معنی دار است (شکل۲). تغییرات محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای برگ دراثر تیمار روی در شکل ۳ نشان داده شده است. مطابق با نمودار میزان کلروفیلa، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتن و گزانتوفیل) در غلظت ۵ میکرومولار روی افزایش و در بقیه تیمارها کاهش نشان می دهد، در حالی که مقدار کلروفیل b در نمونه های تیمار و شاهد تفاوت معنی داری بروز نمی دهد. همانطور که در شکل ٤ نشان داده شده است محتوای آنتوسیانین برگ در غلظت ۵ میکرومولار نسبت به گیاه کنترل تفاوت معنی داری نداشته ولی با افزایش غلظت روی در محلول غذایی بخصوص در تیمار٤٠ میکرومولار به تدریج افزایش می یابد. میزان مالون دآلدهید نیز بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی تنها در تیمار بالای فلز روی اندکی افزایش نشان می دهد و در بقیه تیمارها چندان تغییری نمی کند. مقدار پروتئین کل در برگهای نعناع با افزایش غلظت فلز سنگین روی بطور معنی داری افزایش نشان می دهد ولی در غلظتهای بالای این فلز اندکی از مقدار آنها کاسته می شود (شکل۵).

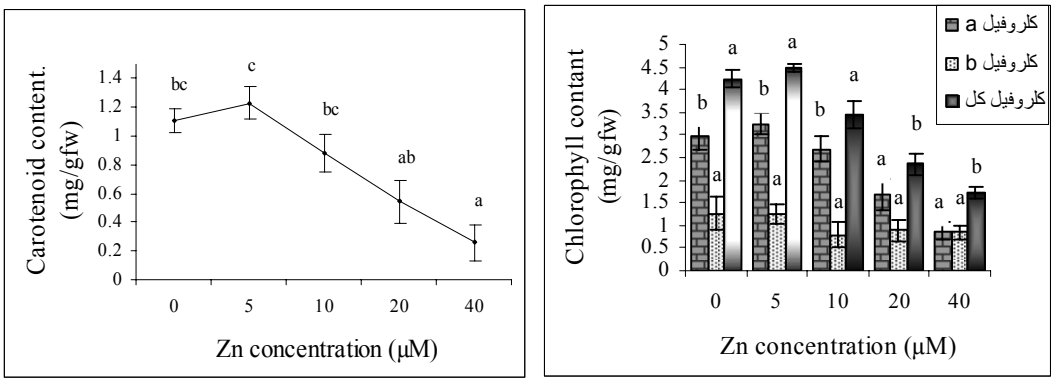


شکل۱. میانگین (±SE) طول ریشه، طول اندام هوائی و طول میانگره در گیاه نعناع (*M. spicata*) تحت تیمار فلز روی ($p<0.05$). هر عدد میانگین سه نمونه در سه تکرار می باشد. بر اساس آزمون دانکن و MSTAT-C حروف متفاوت در روی ستونهای مربوط به یک فاکتور (a, b, c, d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $\alpha= 0.05$ است.

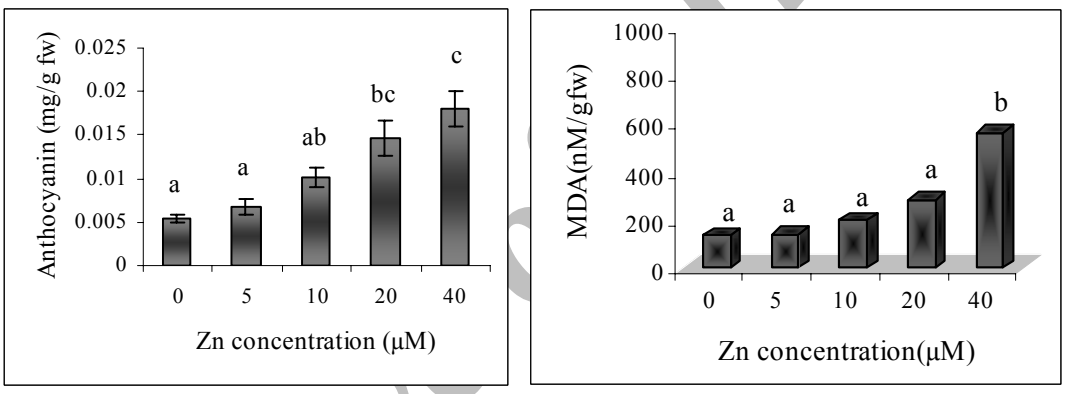


شکل۲. اثر فلز روی بر وزن خشک (DW) اندام هوائی، ریشه و سطح برگ در گیاه *M. spicata* ($p<0.05$). بر اساس آزمون دانکن و MSTAT-C حروف متفاوت در روی ستونهای مربوط به یک فاکتور (a, b, c, d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $\alpha= 0.05$ است.

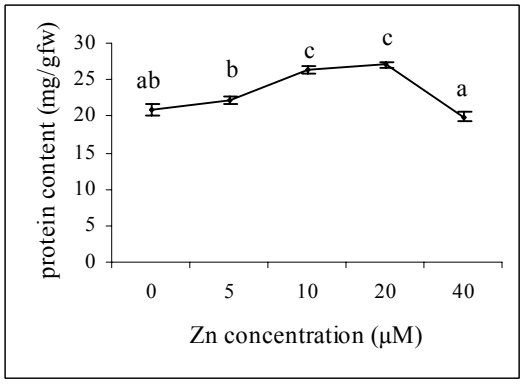
www.SID.ir



شکل۳. اثر روی بر محتوای کلروفیل/کاروتنوئید برگ گیاه نعناع ($p<0.05$). بر اساس آزمون دانکن و MSTAT-C حروف متفاوت در روی ستونهای مربوط به یک فاکتور (a, b, c, d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $\alpha= 0.05$ است.



شکل٤. تغییر محتوای آنتوسیانینهای برگ و مقدار مالون دآلدهید بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در گیاه نعناع تحت تیمار غلظتهای مختلف فلز روی ($p<0.05$). بر اساس آزمون دانکن و MSTAT-C حروف متفاوت در روی ستونهای مربوط به یک فاکتور (a, b, c, d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $\alpha= 0.05$ است.



شکل۵. اثر فلز روی بر محتوای پروتئین کل در برگهای گیاه نعناع ($p<0.05$). بر اساس آزمون دانکن و MSTAT-C حروف متفاوت در روی ستونهای مربوط به یک فاکتور (a, b, c, d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $\alpha= 0.05$ است.

Archive of SID
www.SID.ir

شکل٦. اثر غلظتهای مختلف فلز روی بر رشد طولی ریشه گیاه نعناع. در هر دو شکل بالا از سمت چپ به راست غلظت فلز روی افزایش یافته است. نمونه اول از سمت چپ گیاه کنترل و نمونه اول از راست بالاترین غلظت روی را دریافت کرده است.

بحث و نتیجه گیری

شرایط مورد استفاده برای رشد نعناع در این تحقیق بمنظور بدست آوردن غلظت بهینه فلز روی برای رشد مناسب گیاه و مطالعه میزان تطابق این گیاه دارویی در معرض غلظتهای بالای فلز روی است. از نتایج بدست آمده چنین بر می آید که، عنصر روی در غلظتهای کم سبب تحریک رشد در گیاه نعناع می شود. ارتباط میان افزایش در شاخصهای رشد گیاه (سطح برگ، طول میانگره و طول اندام هوایی) با میزان فلز روی (Zn) را از یک سو می توان به نقش این فلز در بیوسنتز اکسین بعنوان یک هورمون محرک رشد در گیاه نسبت داد، زیرا فلز روی به احتمال زیاد بعنوان کوفاکتور بسیاری از آنزیمها در بیو سنتز اسید آمینه تریپتوفان بعنوان پیش ماده سنتز اکسین و یا در تبدیل اسید آمینه تریپتوفان به ایندول استیک اسید نقش دارد (٤). اکسین محرک طویل شدن سلولها در ساقه و کولئوپتیل می باشد. بر اساس تئوری رشد اسیدی این هورمون از طریق انتقال پروتئینها به دیواره، کاهش pH در غشای سلولها و تغییر در کلسیم سیتوزولی سبب افزایش انعطاف پذیری دیواره سلولها و تحریک رشد می شود (۲). از طرفی اکسین ممکن است ساختن و رسوب مواد پلی ساکاریدی و پروتئینی مورد نیاز برای ظرفیت نرم شوندگی دیواره را افزایش می دهد (٦). بنابراین افزایش روی در حد مناسب سبب افزایش اکسین در گیاه و در نتیجه تحریک رشد گیاه می شود. نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز مؤید این مطلب است، بدین صورت که طول اندام هوایی، طول ریشه و سطح برگها در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار روی افزایش می یابد. از سوی دیگر گزارش شده است که، Zn در غلظتهای کم از طریق فعالسازی آنزیمهای مربوط به فرآیند تکثیر و طویل شدگی سلولها نیز می تواند سبب تحریک رشد در گیاه شود (٢٤). این فلز همچنین از طریق دخالت در متابولیسم نیتروژن، نشاسته و چربیها در گیاه و تأمین بیشتر نیتروژن بعنوان یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان فرآیند رشد را در آنها تسریع می نماید (۱۸). مطالعات Stoyanova & Doncheva (2002) بر روی گیاه ذرت نشان داد که، غلظت کم فلز روی با افزایش میزان نیتروژن در ریشه ها و ساقه ها موجب افزایش رشد این اندامها می شود (۳۰). نقش روی در متابولیسم DNA و RNA و سنتز پروتئینها نیز گزارش شده است و اخیراً یک رده جدید از ملکولهای پروتئین وابسته به روی بنام متالوپروتئینها شناخته شده که در رپلیکاسیون DNA، نسخه برداری و در نتیجه تنظیم بیان ژن دخالت دارد (٢٤). در یک مطالعه مشابه، Alam و همکارانش در سال ۲۰۰۱ اثرات روی و فسفر بر وضعیت رشد گیاه برنج را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که استفاده از روی در غلظت پایین موجب افزایش طول ریشه، ساقه و وزن تر و خشک در این اندامها می شود (۱۰). افزایش رشد بر اثر روی در گیاهان دیگر نیز توسط برخی محققان گزارش شده است (٤).

همانطورکه در نمودار شکل ۳ نشان داده شده است، غلظتهای ۵ و ۱۰ میکرومولار روی موجب افزایش

Archive of SID
www.SID.ir

مختصری در میزان کلروفیل و کاروتنوئید می شود. این افزایش می تواند حاکی از نقش عملکردی این فلز در فعالسازی پروتئین سنتتازهای مسیر بیوسنتز کلروفیل و نیز برخی از آنزیمهای آنتی اکسیدان مانند آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در مسیر حفاظت از تخریب کلروفیل توسط رادیکالهای فعال اکسیژن باشد. برخی مطالعات نیز چنین پیشنهاد کرده اند که، فلز روی در راه اندازی برخی از آنزیمهای مسیر بیوسنتز کلروفیل نقش اساسی دارد (٤).

علی رغم نقش بسیار مهم روی در ساختار و راه اندازی بسیاری از فرآیند های متابولیکی گیاه، مشابه با سایر فلزات سنگین تمرکز بالای این فلز در خاک و در گیاه سبب بروز برخی علایم ناشی از تنش و عدم رشد طبیعی گیاهان می شود. مهار رشد یکی از عمومی ترین نشانه های مسمومیت گیاهان با فلز روی می باشد. بر اساس گزارشات، مقادیر بالای فلز روی سبب مهار بسیاری از فعالیتهای متابولیکی در گیاهان می شود (٢٦). Malea و همکاران (١٩٩٥) نیز با مطالعه اثرات روی بر مرگ و میر سلولهای برگ *Halophyla stipulecea* به این نتیجه رسیدند که، این فلز در غلظت بالا موجب نکروز سلولهای اپیدرمی و مزوفیلی برگ و مهار رشد سطحی برگها در این گیاه می شود (٢٢). گزارشهایی نیز وجود دارد که یونهای فلزی سنگین پس از ورود به گیاه تا زمان القای تشکیل فیتوکلاتین ها در اثر فیتوکلاتین سنتتاز در سیتوزول سلولها باقی می مانند و این تجمع بالای فلز در سیتوزول باعث مهار رشد برگها می شود (٣). کاهش میزان سطح برگ در گیاهان تیمار شده با غلظتهای بالای روی (٢٠ و ٤٠ میکرومولار) در این تحقیق نیز ممکن است بدلیل تجمع فلز در برگ باشد. علاوه بر این گزارش شده است گیاهانی که در معرض غلظتهای بالای فلز روی قرار می گیرند ساختار میتوکندریایی در آنها تخریب شده و در نتیجه فرآیندهای انرژی خواه مرتبط با رشد سلول در آنها دچار اختلال می شود (٢٦).

فلز روی از طریق تأثیر بر میزان جذب و جابجایی عناصر ضروری و نیز اثر بر میزان فعالیت برخی از آنزیمها در جایگاه عملکردشان موجب اختلال در متابولیسم گیاهان می شود. برخی از محققین معتقدند که مهار رشد گیاهان در اثر غلظتهای بالای فلز روی ممکن است بدلیل رقابت این فلز با فسفر در گیاه باشد (٢٦). اثر منفی افزایش فلز روی بر کاهش جذب آهن نیز در گیاه *Mentha arvensis* در سال ١٩٩٩ توسط چند محقق مورد مطالعه قرار گرفته است. آنها چنین پیشنهاد کردند که سمیت روی سبب القای علائم کمبود آهن در گیاه نعناع می شود (٢٣). همچنین اثر متقابل Zn و Fe در گیاه ذرت توسط Rosen و همکاران (١٩٧٧) گزارش شده است (٢٥). اثرات متقابل فلز روی با سایر مواد مغذی گیاه مانند منگنز، منیزیوم، کلسیم و مس نیز توسط بسیاری از محققین مورد بررسی قرار گرفته است (٢٦و٢٤،١٨،١١). علاوه بر این بر اساس گزارش White (1976) افزایش سطح روی در خاک موجب تسریع میزان جابجایی منگنز از ریشه به بخشهای هوایی و ایجاد کلروز در برگها می شود. به اعتقاد او دو فلز روی و منگنز مانع عملکرد آهن در برگ در جهت سنتز کلروفیل می شوند (٣١). مهمترین نقش آهن در بیوسنتز کلروفیل کنترل تشکیل گاما-آمینولوولینیک اسید بعنوان پیش ساز مشترک بیوسنتز کلروفیل و گروه هم می باشد. علاوه بر این یون آهن برای تشکیل پروتوکلروفیلید از Mg-پروتوپورفیرین در مسیر سنتز کلروفیل ضروری است (٤). تغییرات میزان آهن، منگنز و فسفر در بخشهای مختلف گیاهی در اثر فلز سنگین روی می تواند در توجیه کاهش رشد طولی و سطح برگ گیاه نعناع مفید باشد. روی از طریق اتصال با لیگاندهای سولفات و اکسیژن در غشای سلولهای گیاهی تجمع یافته و در نتیجه مانع رشد طولی سلولها و کاهش رشد سطحی برگها می شود. تجمع بالای فلز روی در سیتوزول سلولهای گیاهی در اثر غلظت بالای روی در گیاه نیز از طریق اختلال در عملکرد طبیعی سلولها و مهار فرآیند تنفس و واکنشهای انرژی خواه مرتبط با رشد سلول

Archive of SID

www.SID.ir

می تواند سبب کاهش رشد و نمو ایده آل گیاهان شود (۱۱و۱۲). کاهش محتوی کلروفیلی برگ بعنوان یک اثر عمومی سمیت فلزات سنگین در گیاهان شناخته شده است. این امر به دلیل اثر مستقیم این فلزات بر فرآیند بیوسنتز کلروفیل، القای تشکیل رادیکالهای آزاد اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه تخریب ساختمانهای فتوسنتزی از جمله کلروفیل صورت می گیرد. در ضمن فلز روی از طریق جلوگیری از انتقال یکسری عناصر ضروری مانند آهن و منیزیوم به کلروپلاست سلولهای گیاهی در عملکرد این عناصر طی مسیر بیوسنتز کلروفیل در گیاه اختلال ایجاد می کند (۲٦). گارتی و همکاران (۱۹۹۲) اثرات فلز روی و تغییرات PH بر تخریب و کاهش کلروفیل در گلسنگها را مورد مطالعه قرار داده و مشاهده کردند که این فلز در غلظت زیاد خود سبب کاهش کلروفیل در گلسنگها می شود (۱۵).

یکی از مکانیسمهای بروز سمیت در بافتهای گیاهی در حضور فلزات سنگین از جمله روی، تشویق تولید رادیکالهای آزاد و ایجاد تنش اکسیداتیو می باشد (۲۸). گونه های فعال اکسیژن قادرند با ماکروملکولهای حیاتی مانند لیپیدها، پروتئینها، اسیدهای نوکلئیک و سایر ترکیبات سلولی واکنش داده و اعمال طبیعی سلولها را مختل کنند. فلز روی بطور غیر مستقیم نیز از طریق کاهش میزان جذب و جابجایی آهن در گیاه واکنش های اکسیداتیو را راه اندازی می کند. یون آهن بعنوان گروه پروستتیک هموپروتئینهایی مانند کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دسموتاز در نابودی رادیکالهای آزاد اکسیژن درگیاه نقش دارد (٤). یکی از اختلالات ناشی از القای تنش اکسیداتیو در گیاهان اثر بر لیپیدهای غشایی و تغییر وضعیت تمامیت غشاهای سلولی می باشد. رادیکالهای آزاد اکسیژن با اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء واکنشهای زنجیره ای پراکسیداسیون را تحریک و منجر به تخریب اسیدهای چرب می شوند (۵). مقدار مالون دآلدهید (MDA) که در بافتها تحت شرایط تنش بوجود می آید بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها شناخته شده است.

گیاهان در مقابله با تنشهای ایجاد شده در اثر فلزات سنگین یک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی با سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی دارند که می تواند رادیکالهای آزاد اکسیژن را از بین ببرد. سیستم دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان شامل ترکیبات آنتی اکسیدان مانند آنتوسیانینها، کاروتنوئیدها، توکوفرولها، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنلی می باشد. فلاونوئیدهای آنتوسیانینی از مهمترین این ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکالهای آزاد را از بین می برند بلکه از تولید بیشتر آنها در گیاه نیز جلوگیری می کنند. آنتوسیانینها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلولها و در نتیجه جمع آوری آنها از سایر بخشها می شوند (۳). در تحقیق حاضر با افزایش فلز روی میزان آنتوسیانینها افزایش یافته و این ترکیبات بعنوان سیستم محافظتی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو از افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها حتی تا غلظت ۲۰ میکرومولار روی جلوگیری کرده اند، در حالی که غلظت بالاتر این فلز متابولیسم را مختل کرده و میزان رادیکالها را به حدی افزایش می دهد که بر سیستم آنتی اکسیدانی گیاه غلبه و پراکسیداسیون لیپیدها را در غشای سلولها افزایش می دهد (شکل٤). کاروتنوئیدها نیز تتراترپن های ٤۰ کربنه ای هستند که در پلاست بافتهای گیاهی حضور داشته و در استرسهای محیطی محرک تنش اکسیداتیو در گیاه، حفاظت از بافتهای فتوسنتزی بخصوص کلروفیلها را بر عهده دارند (۸). فلزات سنگین در یک مقدار معین بعنوان عوامل تنش زای محیطی سبب القای تنش اکسیداتیو و سنتز بیشتر کاروتنوئید در گیاهان می شوند، در حالیکه غلظتهای بالای این فلزات از طریق تخریب و بهم ریختگی ساختار کاروتنوئیدها مقدار آن را در گیاه کاهش می دهند (۳و ۱۲).

Archive of SID

www.SID.ir

روی بعنوان کوفاکتور آنزیم RNA پلیمراز نقش اساسی در سنتز پروتئینها دارد. اثر اصلی روی در افزایش متابولیسم پروتئینها اثر آن در ثبات و عملکرد مواد ژنتیکی می باشد (۲٤). قرار گرفتن گیاه در معرض تنش های محیطی مانند حرارت بالا، شوری، خشکی و فلزات سنگین باعث می شود که گیاه شروع به سنتز پروتئینهایی بنام پروتئینهای شوک گرمایی (HSPs) کند که به آنها پروتئینهای تنشی نیز گفته می شود (۲۷).

Stresty & Madhava Rao (1999) با مطالعه سلولهای ریشه گیاهان مسموم شده با روی دریافتند که در این سلولها سیتوپلاسم ساختار خود را از دست داده، اکثر اندامکها از بین رفته، واکوئلهای سلولی گسترش و تعداد هستکها درون هسته در پاسخ به روی افزایش می یابد و این موجب سنتز بیشتر یکسری پروتئینهای مقاوم در برابر فلزات سنگین در گیاه می شود (۲۹). افزایش در پروتئین کل گیاه در پاسخ به روی شاید با مهار خسارت به پروتئینهای غشاهای سلولی نقش حفاظتی مهمی را برای گیاه داشته باشد. سنتز فیتوکلاتینها در حضور غلظت کم فلز روی نیزممکن است از دلایل دیگر افزایش محتوای پروتئین کل در گیاه باشد. روی با پروتئینهای کلات کننده تشکیل کمپلکس داده و میزان سمیت آن تخفیف می یابد (۳ و ۲٦). کاهش مختصر میزان پروتئینها در غلظتهای بالای یون روی می تواند بعلت کاهش در سنتز برخی از پروتئینها و یا افزایش فعالیت برخی از آنزیمهای پروتئولیتیک در اثر القای تنش اکسیداتیو در گیاه باشد. رادیکالهای فعال ناشی از تنش اکسیداتیو نیز ممکن است به پروتئینها حمله برده و در آمینواسیدها تغییراتی ایجاد نمایند و یا سبب قطعه قطعه شدن زنجیره پپتیدی و اجتماع محصولات واکنش اتصال متقاطع بین قطعات شوند و از این طریق بار الکتریکی را تغییر داده و حساسیت به آنزیمهای پروتئولیز را افزایش دهند (۸). بطور کلی می توان چنین نتیجه گیری کرد که فلز روی بعنوان یک میکروالمنت ضروری در غلظت کم تا حدودی سبب تحریک رشد در گیاه نعناع می شود، در حالیکه غلظتهای بالا و بحرانی این فلز در خاک با القای تنش اکسیداتیو سبب مسمومیت و کاهش رشد در این گیاه دارویی می شود.

منابع

۱. بسرا، آ. اس. بسرا، آر. ک. ۱۳۷۹. مکانیسمهای مقاومت گیاهان به تنشهای محیطی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد: ۳۲٦- ۲۹۵

۲. تایز و زایگر. ۱۳۷۹. مترجم: محمد کافی، اسکندر زند، بهنام کامکار، حمیدرضا شریفی و مرتضی گلدانی. فیزیولوژی گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۳. علومی، حکیمه. ۱۳۸۲. بررسی اثر کادمیوم بر برخی از شاخصهای رشد و القاء تنش اکسیداتیو در گیاه کلزا(*Brasics napus* L.). پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه کرمان.

٤. قربانلی، مه لقا. بابالار، مصباح. ۱۳۸۲. تغذیه معدنی گیاهان. انتشارات دانشگاه تربیت معلم تهران.

۵. ملک احمدی، فاطمه. ۱۳۸٤. اثر تیمارهای مختلف تنش غرقابی بر برخی از شاخصهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و القای تنش اکسیداتیو در گیاه فلفل (*Capsicum annum* L.). پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه کرمان.

٦. نوگل، جی. ری. فریتز، جرج. ژ. ۱۳۷٤. اصول فیزیولوژی گیاهی. ترجمه: دکتر مهرداد لاهوتی- رحیم رحیم زاده. انتشارات آستان قدس رضوی.

7. Diaz Marota, M.C. Perez-Coello, M.S. Gonzalez vinas, M.A. Cabezudo, M.D. 2003. Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicuta* L.). J. Agric. *Food chem.* 51: 1265-1269.

8. TripathiBN., Mehta SK., Amar A. Gaur JP. 2006. Oxidative stress in Scenedemus sp. During short and long-term exposure to Cu and Zn. Chemosphere 62: 538-544.

9. Arduini I., Godbold D. A. Onnis, A. 1994. Cadmium and Copper change root growth and

Archive of SID
www.SID.ir

morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedling. *Physiologia plantarum*. 92: 675–680.

10. Alam, S. M. Khan, M. A. Ali, M. Anseri, R. 2001. Effect of different levels of Zinc and Phosphorous on seedling growth, chlorophyll and peroxidase contents of Rice. *Biological sciences*. 1(2): 49–51.
11. Bonnet, M. Camares, O. Veisseire, P. 2000. Effect of Zinc and influence of *Acremonium Lolli* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzymeactivity of ryegrass. *Expremental Botany*. 51: 945–953.
12. Candan, N. Tarhan, L. 2003. Change in chlorophyll–carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn–stressed *Mentha pulegium*. *Turk Journal Chem*. 27: 21 – 30.
13. Choudhury, R. P. Kumar, A. Gary, A. N. 2006. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behavior, pharmaceutical and biochemical analysis. PBA: 5715.
14. Diaz Marota, M. C. Perez-Coello, M. S. Gonzalez Vinas, M. A. Cabezudo, M. D. 2003. Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Agricultural Food chem. J*. 51: 1265–1269.
15. Garty, J. Karary, Y. Harel, J. 1992. Effect of low PH, heavy metal and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei*. *Environ Exp Botany* 32: 229-241.
16. Heath, R. L. Pacher, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetic and stochiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophisics*. 125: 189–190.
17. Jackson, D. Bergeron, K. 2004. Spearmint (*Mentha spicata*). Medicinal herb uses and pictures gallery. 1-3.
18. Khan, M. U. Qasim, M. Jamil, M. 2002. Effect of different levels of Zinc on the extractable Zinc content of soil and chemical composition of Rice. *Asian journal of plant science*. 1: 20–21.
19. Lewis, K. 1998. Peppermint and spearmint, the oxford review: 1-6.
20. Lichtenthaler, K. H. 1994. Chlorophyll and carotenoids pigments of photosynthetic biomembrances. Methods in Enzymology. 148: 350–382.
21. Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Farr, A. L. Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265–275.
22. Malea, P. Kevrekidis, T. Haritonidis, S. 1995. The short term uptake of zinc and cell mortality of the sea grass *Halophylla stipulecea*. Israel *J. Plant science*. 43: 21-30.
23. Pavlikova, D. Pavlikova, M. Szakova, J. Vasikova, S. Tlustos, P. Balik J. 2002. The effect of Cadmium and Zinc contents in plants on Fe binding into organic substances of Spinach biomass. *Rostelinna Vyroba*. 48(12): 531–535
24. Rion, B. Alloway, J. 2004. Fundamental aspects of Zinc in soils and plants. International Zinc Association 1-128.
25. Rosen, J. A. Pike, C. S. Golden, M. L. 1977. Zinc, iron and chlorophyll metabolism in Zinc toxic *Corn*. *Plant physiology*. 59: 1085–1087.
26. Rout, G. R. Das, P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism; Zinc, *Agronomy and soil science*. 23: 3–11.
27. Sanita di Toppi, L., Gabrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41: 105–130.
28. Shahsavan Behboodi, B. Samadi, L. 2002. Morphological study of cadmium-induced changes on root apex of *Allium ceda*, 3: 11-22.
29. Stresty, T. V. S. Madhava Rao, K. V. 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of *pigeonpia. Environmental and Experimental Botany*. 41: 3–13.
30. Stoyanova, Z. Doncheva, S. 2002. The effect of Zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant, *Plant physiology*. 14(2): 111–116.
31. White, R. E. 1976. Studies on the mineral ion absorption by plants. The interaction of aluminum phosphate and pH on the growth of *Medicago sativa. Plant and soil*. 46: 195–208.
32. Wanger, G. J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. *Plant Physiology*. 64: 88-93.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of zinc on growth and some physiological and biochemical parameters of spearmint (*Mentha spicata* L.)

Zare Dehabadi, S.[1] Asrar, Z.[1] , and Mehrabani, M.[2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of Iran**

[2] **Department of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University, Kerman, I.R. of Iran**

Abstract

Zinc as heavy metal plays an important role in many biochemical functions of plants. However, excess amount of zinc is one of the most important growth limiting factors in acid soils. In the present study, effects of various concentrations of zinc on the growth, chlorophyll content, lipid peroxidation, total protein and anthocyanin pigments of *Mentha spicata* (spearmint) were studied. The plants were grown in green house over a period 12 weeks in nutrient solution containing zinc concentration varying between 0-40 µM as sulfate ($ZnSO_4$). The growth parameters showed statistically similar overall increase for the range 5-10 µM Zn compare to control. Chlorophyll and total carotenoids showed difference in various doses of zinc. Chlorophyll a, total chlorophyll and carotenoids reduced gradually with increasing zinc concentration. Chlorophyll b showed no significant differences compare to control. Anthocyanin contents increased gradually with increase of Zn concentration but showed no significant differences between control and 5µM of zinc. Lipid peroxidation (MDA) was increased only in the highest concentration of zinc. The total protein was increased significantly by excess concentration of zinc but in doses 40 µM of this metal decreased. It was concluded that zinc at low concentration induces the growth of *M. spicata* but starts some toxic effects at high accumulation.

Key words: Anthocyanin, Chlorophyll, Protein, *Mentha spicata*, Zinc

Archive of SID

www.SID.ir