بررسی اثر مقدار اضافی عنصر روی (Zinc) بر القای تنش اکسیداتیو و تجمع برخی عناصر در گیاه نعناع سبز (*Mentha spicata* L.)

سعید زارع ده آبادی* و زهرا اسرار

کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: 86/2/12 تاریخ پذیرش: 87/10/14

چکیده

آلودگی خاکها با فلزات سنگین، از طریق فعالیتهای بشری در مناطق صنعتی، درحال حاضر به عنوان یکی از مهمترین تنشهای محیطی برای گیاهان محسوب می‌شود. این تحقیق به منظور مطالعه تأثیر غلظتهای مختلف عنصر روی بر القای تنش اکسیداتیو در گیاه نعناع سبز و تأثیر آن بر پاسخهای آنتی اکسیدانی و تجمع برخی عناصر ضروری در این گیاه انجام گرفت. گیاهان به مدت 16 هفته در اتاق رشد با شرایط کنترل شده و محلول غذایی حاوی غلظتهای متفاوت فلز روی کشت داده شدند. میزان وزن خشک یا بیوماس اندامهای مختلف، به عنوان مهمترین پاسخ گیاه در برابر تنش، در گیاهان تیمار شده با غلظتهای بالا روی کاهش معنی‌داری داشت. محتوای ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاه کنترل با افزایش غلظت روی در محلول غذایی افزایش نشان داد. افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و نیز افزایش محتوای آسکوربات کل در اثر تیمار عنصر روی می‌تواند دلیلی بر این فرضیه باشد که فلز روی سبب القای تنش اکسیداتیو در گیاه نعناع شده است. غلظتهای بالای روی در محلول غذایی موجب کاهش غلظت عناصر آهن و روی در اندام هوایی نسبت به ریشه، کاهش میزان جابجایی این عناصر و تجمع بالای آنها در ریشه گیاه گردید. بطور کلی شاید بتوان گفت، غلظتهای بحرانی روی با تحریک واکنشهای اکسیداتیو واختلال در عملکرد آهن باعث بروز برخی اثرات سمیت در گیاه نعناع شده است.

واژه های کلیدی: آسکوربیک اسید، تنش اکسیداتیو، فلاونوئیدها، روی، نعناع خوراکی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 09132572635، پست الکترونیک:Bioscholar_85@yahoo.com

مقدمه

عناصر معدنی ضروری گیاه که هر کدام دارای نقشهای فیزیولوژیکی مشخصی هستند، بر اساس غلظت نسبی آنها در بافتهای گیاهی به عناصر کم مصرف و پرمصرف تقسیم می‌شوند. از آنجایی که اغلب عناصر کم مصرف مانند روی، مس، کبالت و غیره جز فلزات سنگین نیز طبقه بندی می‌شوند.، زمانی که غلظت آنها در خاک و بافتهای گیاهی بالاتر از حد کفایت گیاه باشد به علت ایجاد مسمومیت رشد و عملکرد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در بسیاری از مناطق تحت کشت گیاهان آلودگی فلزات سنگین سبب ایجاد اثرات مخرب بر بیوسفر و اختلال در اکوسیستم‌های آبی و خشکی آنها شده است (6، 20 و 24). یکی از بارزترین اثرات این عناصر فلزی سنگین در گیاهان القای تنش اکسیداتیو و ایجاد رادیکالهای فعال اکسیژن می‌باشد. این رادیکالهای آزاد از طریق اختلال در ساختار غشاء و آسیب به ماکروملکولهای حیاتی گیاه مانند پروتئینها، لیپیدها، رنگیزه‌ها و اسیدهای نوکلئیک، خسارات اکسیداتیو فراوانی وارد نموده ومیزان رشد و راندمان گیاه را کاهش می‌دهند (4 و5). مقدار اضافی عنصر روی در محیط نیز باعث القای تنش اکسیداتیو در گیاهان شده و بسته به گونه‌ی گیاهی فعالیتهای متابولیکی آنرا تحت تأثیر قرار

Archive of SID
www.SID.ir

می‌دهد (6 و 22). با این وجود چکماک و مارشنر (Cakmak & Marschner) (1988) معتقدند، فلز روی در ناحیه کفایت خود از طریق محافظت پروتئینها و لیپیدهای غشایی در برابر رادیکالهای آزاد و سایر محصولات حاصل از واکنشهای احیایی درون سلولها سبب حفظ تمامیت غشای سلولها می‌شود و نیز به همراه مس بخش اصلی آنزیم سوپر اکسیددسموتاز به عنوان خورنده رادیکالهای آزاد را تشکیل می‌دهد (22). پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی از جمله واکنشهایی است که در حضور انواع رادیکالهای اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند (8، 9، 25 و 26.)گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو و غلبه بر این گونه‌های فعال سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی با سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی بکار می گیرند که می تواند در نابودی رادیکالهای آزاد اکسیژن به گیاه کمک کند. آنزیمهایی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، آسکوربیک پراکسیداز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز به همراه یکسری ترکیبات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی مانند آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها بخش عمده این سیستم دفاعی گیاه را تشکیل می‌دهند (11 و 20.) ترکیبات فنلی با فعالیت آنتی-اکسیدانی بالا مانند آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها نیز در این امر نقش بالایی داشته و میزان خسارات ناشی از آنرا کاهش می‌دهند (1، 17 و 20).

با وجود اثرات مخرب عنصر روی، گونه های مختلف گیاهی در برابر آلودگی خاک با فلزات سنگین واکنشهای متفاوتی نشان می‌دهند و مطابق با این ناحیه مسمومیت یک عنصر فلزی سنگین در گیاهان مختلف بسته به میزان مقاومت آن گیاه متفاوت است. دراین تحقیق اثرات مقدار اضافی فلز روی در محلول غذایی بر تغییرات اکسیداتیو در گیاه نعناع، پاسخهای آنتی‌اکسیدانی این گیاه در برابر رادیکالهای آزاد اکسیژن و میزان تجمع برخی عناصر ضروری در اندامهای مختلف این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

نعناع خوراکی (*Mentha spicata* L.) گیاهی است چند-ساله، متعلق به خانواده نعناعیان (Labiatae) با سرشاخه-های معطر که مصارف صنعتی و دارویی فراوانی دارد. از اسانس این گیاه در زمینه تهیه لوازم آرایشی، تهیه انواع داروهای مسکن در درمان تب، سردرد، سرماخوردگی و غیره و در صنایع غذایی به عنوان طعم‌دهنده غذاها و شیرینی‌جات استفاده می‌شود (10.) هدف از انجام این تحقیق این بود که، اولاً کدامیک از غلظتهای عنصر روی برای گیاه نعناع سبز به عنوان ناحیه مسمومیت عنصر روی برای این گیاه محسوب می‌شود و ثانیاً بر اساس طبقه‌بندی بیکر و همکاران (Baker et al.) (1981) در زمینه مکانیسم‌های مقاومت گیاهان در برابر فلزات سنگین(7)گیاه نعناع برای تخفیف اثرات تنشی مخرب عنصر فلزی روی (Zn) چه مکانیسمی را به کار می‌گیرد؟

مواد و روشها

کشت گلدانی: به منظور از بین بردن مواد زاید، آلودگیهای احتمالی و عدم رشد بذرهای مزاحم، ورمیکولیت در انکوباتور به مدت 2 ساعت در 200 درجه سانتی گراد حرارت داده و چندین بار با آب مقطر شستشو گردید. ریزومهای نعناع خوراکی یا نعناع سبز (Mentha spicata L.) پس از چند بار شستشو با آب مقطر به گلدانهایی با ابعاد14×12 سانتیمتر حاوی ورمیکولیت فوق منتقل شدند. در هر گلدان 3 عدد ریزوم با طول 4 سانتیمتر قرار داده، گلدانها در اتاق رشد با شرایط کنترل شده تحت دوره نوری 16/8 ساعت (تاریکی/نور)، دوره دمایی 28/18 درجه سانتی گراد (شب/روز) و رطوبت نسبی 60-50 درصد نگهداری شدند. در طول دو هفته اول گلدانها با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند با pH تقریبی1± 5/7 آبیاری گردیدند. پس از دو هفته جهت تهیه محلولهایی با غلظتهای متفاوت روی (0، 5، 10، 20 و40 میکرومولار)، به محلول هوگلند با مقدار مناسب نمک سولفات روی اضافه گردیده و pH محلولها با استفاده از اسید سولفوریک

Archive of SID

www.SID.ir

و سود تنظیم شد. منظور از غلظت صفر به عنوان شاهد این است که در مقایسه با محلولهای تیمار هیچ یونی اضافه نشده است درحالی‌که، مقدار پایه فلز روی در همه محلولهای هوگلند وجود داشت. در فرآیند جذب در گیاهان عنصر روی رقابت اندکی با یون سولفات داشته و جذب آنرا کاهش می‌دهد و از طرفی یون سولفات در غلظتهای بکاربرده شده در این مطالعه برای گیاه سمیت ایجاد نمی کند در صورتی‌که، استفاده از اسید کلریدریک در بسیاری از موارد سبب ایجاد مسمومیت در گیاه می‌شود. بدین منظور در این تحقیق pH محلولها با استفاده از اسید سولفوریک و سود تنظیم شد. محلولها به صورت یک روز در میان به حجم 50 میلی لیتر به گلدانها اضافه و در فواصل بین تیمارها به منظور مرطوب نگه داشتن خاک و ممانعت از تجمع بیش از حد نمک در گلدان از آب مقطر استفاده می‌شد. پس از 16 هفته پارامترهای مورد نظر در نمونه های گیاهی مورد سنجش قرار گرفتند.

اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش این پارامتر غلظت مالون دآلدهید به عنوان محصول شاخص پراکسیداسیون اسیدهای چرب با استفاده از روش هیث و پاکر (Heath & Packer)(1968) اندازه گیری شد (13). برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی $mMcm^{-1}$ 155 استفاده شد.

اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی: تعیین مقدار آنتوسیانین ها بر اساس روش وانگر (Wanger)(1979) صورت گرفت (27). 0/1 گرم از برگ تازه گیاه را با 10 میلی لیتر متانول اسیدی سائیده و عصاره برای 24 ساعت در تاریکی قرار داده شد. پس از این 10 دقیقه در دور g 4000 عصاره را سانتریفیوژ نموده و جذب محلول روئی با استفاده از اسپکتوفتومتر ($S_2$100 Diod Array) در طول موج 550 نانومتر خوانده شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از ضریب خاموشی $mMcm^{-1}$ 3300 محاسبه گردید.

برای مطالعه میزان فلاونوئیدها از روش مقایسه جذبی استفاده گردید (14.) بر اساس این روش 0/1 گرم بافت تازه برگ را در 10 میلی لیتر اتانول اسیدی سائیده و عصاره حاصل به مدت 10 دقیقه در 4000g سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی جدا و به مدت 10 دقیقه در بن ماری با دمای 80 درجه قرار گرفت. در نهایت جذب محلول به دست آمده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Visible در طول موجهای 270، 300، 330 و 550 نانومتر خوانده شد.

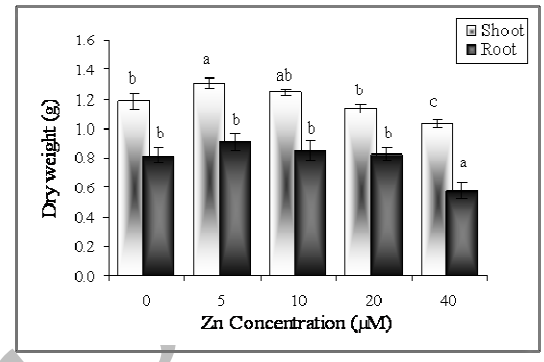
اندازه گیری محتوای آسکوربات، دهیدروآسکوربات و آسکوربات کل: از روش ام سی دی پینکو و همکاران جهت سنجش این ترکیبات استفاده شد (16). مطابق با این روش ۰/۵گرم بافت تازه در 10 میلی لیتر اسید متافسفریک 5 درصد سائیده و به مدت ۱۵ دقیقه در g 10000 سانتریفیوژ گردید. برای اندازه‌گیری اسید آسکوربیک و دهیدرو آسکوربات مقدار 300 میکرولیتر از عصاره سانتریفیوژ شده در لوله آزمایش ریخته شده و محلولهای مورد نیاز به آن اضافه گردید. برای رسم منحنی استاندارد غلظتهای 25، 50، 100، 200، 400 و 800 میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید خالص تهیه شد. مجموع مقدار آسکوربات و دهیدروآسکوربات به عنوان آسکوربات کل در نظر گرفته شد.

اندازه گیری غلظت یونهای آهن، روی و منیزیوم در اندام های هوایی و ریشه: جهت سنجش این یونها از روش جذب اتمی استفاده گردید (28). 0/5 گرم از نمونه گیاهی خشک (اندام هوایی و ریشه) در 10 میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ حل و سوسپانسیون حاصل 24 ساعت در دمای 70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محلولها با آب دیونیز به حجم رسیده و مقدار جذب آنها با دستگاه جذب اتمی (Varian SpertrAA-220) خوانده شد. در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد مربوط به یونها مقدار آنها تعیین گردید.

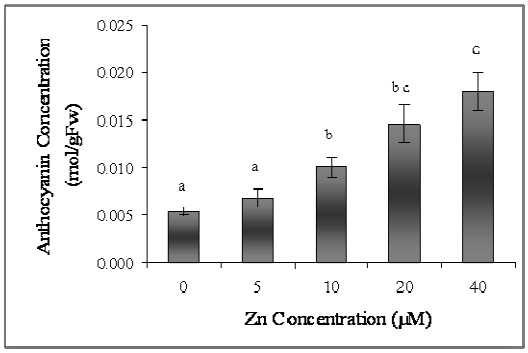
Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز آماری: این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، آزمون ANOVA و نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام پذیرفت.



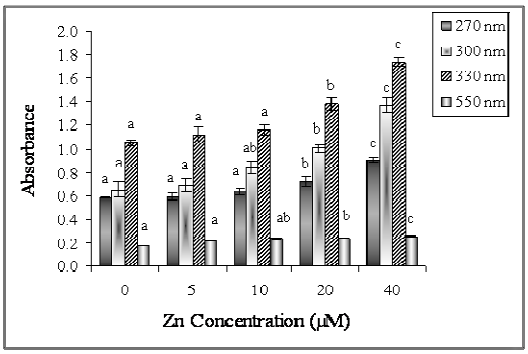
شکل1- اثر فلز روی بر تغییرات وزن خشک (DW) اندام هوائی و ریشه در گیاه *M. spicata* ($p<0.05$). بر اساس آزمون دانکن و MSTAT-C حروف متفاوت بر روی ستونهای یک فاکتور (a, b, c, d) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح معنی داری $\alpha= 0.05$ می باشند.



شکل2- تغییر محتوای آنتوسیانین های برگ در گیاه نعناع تحت تیمار غلظتهای مختلف فلز روی ($p<0.05$).

نتایج

تغییرات میزان بیوماس (وزن خشک اندام هوایی و ریشه)، به عنوان مهمترین پاسخ گیاهان در برابر تنشهای محیطی از جمله مسمومیت عناصر فلزی سنگین، در شکل 1 نشان داده شده است. در نمونه‌های تیمار شده با روی از غلظت 10 میکرومولار روی به بعد میزان بیوماس به تدریج کاهش داشت ولی این شاخص در غلظت 5 میکرومولار روی اندکی افزایش نشان می‌دهد که در مورد وزن خشک اندام هوایی این افزایش کاملاً معنی‌دار است. اثرات فلز سنگین روی بر میزان ترکیبات فنلی در شکل2 و3 نشان داده شده است.

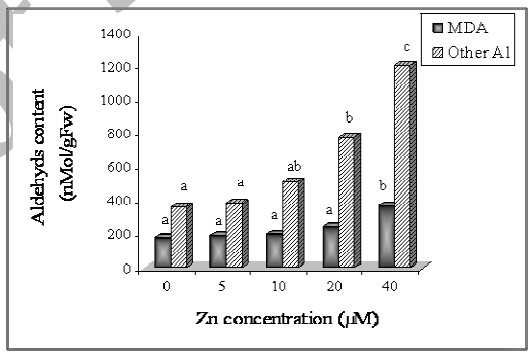


شکل3- تأثیر غلظتهای مختلف روی (Zn) بر میزان جذب برخی از فلاونوئیدها در برگ گیاه نعناع ($P<0.05$). نتایج بر اساس میزان جذب گزارش شده است.

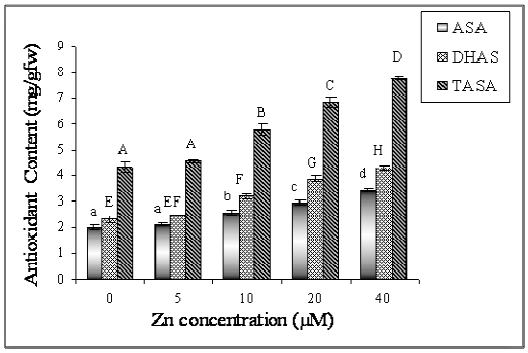
در این تحقیق محتوای ترکیبات فنلی آنتی اکسیدان مانند آنتوسیانین ها و فلاونوئیدها در برگ با افزایش غلظت روی در محلول غذایی بخصوص در تیمار40 میکرومولار افزایش نشان داد. میزان سنتز ترکیبات غیرفعال کننده تیوباربیتوریک اسید مانند مالون دآلدهید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و آلدهیدهایی چون پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و غیره به ویژه در تیمار بالای فلز روی در مقایسه با گیاه کنترل افزایش معنی‌داری داشتند (شکل 4). این نتایج حاکی از این مطلب است که فلز روی موجب القای تنش اکسیداتیو و در نتیجه تولید بیشتر گونه های فعال اکسیژن در گیاه نعناع شده است. مطابق با نمودار شکل 6 کاربرد روی در سطوح مختلف موجب افزایش تجمع این فلز در بخشهای ریشه ای در مقایسه با گیاه کنترل شده است، این درحالی است که در غلظتهای بالای روی میزان تجمع این فلز در اندامهای هوایی افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. میزان عنصر آهن در اندام هوایی با میزان غلظت روی در محلول غذایی

Archive of SID
www.SID.ir

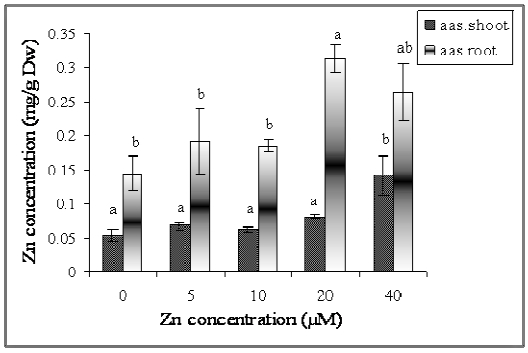
همبستگی منفی نشان می‌دهد ولی بالعکس، در ریشه همبستگی این دو فاکتور مثبت می‌باشد (شکل 7). همانطور که در شکل 8 نشان داده شده، افزایش غلظت فلز روی تأثیر معنی داری بر مقدار یون منیزیم در ریشه و اندامهای هوایی گیاه نعناع نداشته است. اثرات فلز سنگین روی بر محتوای آسکوربیک اسید، دهیدروآسکوربیک اسید و آسکوربات کل در نمودار شکل 5 نشان داده شده است. بر اساس نتایج میزان آسکوربات کل در اندامهای هوایی گیاه نعناع در معرض روی در غلظت 5 میکرومولار تفاوت معنی‌داری با گیاه کنترل نشان نمی‌دهد، درحالیکه سمیت روی در غلظتهای بالا (20 و 40 میکرومولار) محتوای این ترکیبات آنتی اکسیدان را به طور معنی‌داری افزایش داده است.



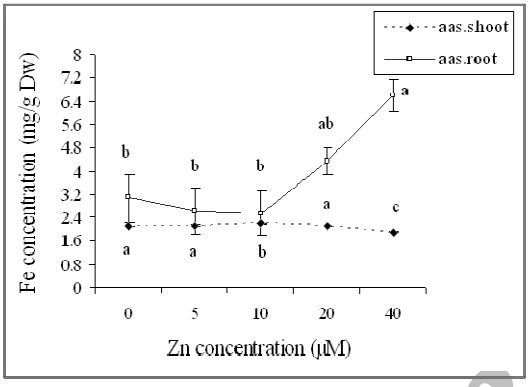
شکل4- تغییرات محتوای مالون دآلدهید و سایر آلدهیدها در برگهای گیاه نعناع تحت تیمار فلز روی (P<0.05).



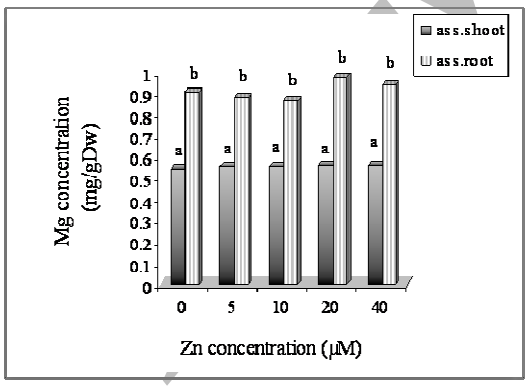
شکل5- تأثیر غلظتهای مختلف روی بر میزان آسکوربیک اسید، دهیدروآسکوربیک اسید و آسکوربات کل در برگ گیاه نعناع (P<0.05). ASC=آسکوربات، DHA=دهیدروآسکوربات، TASC= آسکوربات کل.



شکل6- تأثیر تیمار فلز روی بر میزان غلظت روی (Zn) در قسمت های مختلف گیاه نعناع (P<0.05).



شکل7- تأثیر تیمار فلز روی بر محتوای آهن (Fe) در قسمت های مختلف گیاه نعناع (P<0.05).



شکل8- تأثیر تیمار فلز روی بر محتوای منیزیوم (Mg) در قسمت های مختلف گیاه نعناع (P<0.05).

بحث

علیرغم نقش بسیار مهم روی در ساختار و راه اندازی بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاه، مشابه با سایر عناصر

Archive of SID
www.SID.ir

سنگین تمرکز بالای آن در خاک و در گیاه سبب بروز برخی علایم ناشی از تنش و عدم رشد طبیعی گیاهان می-شود (22، 23 و 24) مهار رشد و کاهش بیوماس یکی از عمومی‌ترین نشانه‌های مسمومیت گیاهان با فلز روی می-باشد. بر اساس گزارش وان آسچه (Van Assche)(1986) دوزهای بالای فلز روی از طریق تخریب ساختار میتوکندریایی در سلولها سبب مهار بسیاری از فعالیتهای متابولیکی در گیاه می‌شود (21 و 24). تجمع بالای فلز روی در سیتوزول سلول گیاهی نیز از طریق اختلال در عملکرد طبیعی سلول و مهار فرآیند تنفس و واکنشهای انرژی خواه مرتبط با رشد سلول می‌تواند سبب کاهش رشد و نمو ایده‌آل و افت بیوماس کل گیاه شود (6 و 8) علاوه‌براین گزارش شده است، یونهای فلزی سنگین پس از ورود به گیاه تا زمان القای تشکیل فیتوکلاتین‌ها در اثر فیتوکلاتین سنتتاز در سیتوزول سلولها باقی می‌مانند و این تجمع بالای فلز در سیتوزول باعث مهار برخی از فرآیندهای متابولیسمی می‌شود (1)

اثرات Zn بر تجمع برخی عناصر ضروری در گیاه نعناع: عنصر 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 گیاه می‌شود. واکنش متقابل میان فلز روی و آهن در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (19، 20، 22، 23 و 24) آمبلر و همکاران (Ambler et al)(1970) نشان دادند، روی سبب مهار انتقال آهن از ریشه به اندامهای هوایی و القای کلروزگی در گیاه می‌شود (3.) نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز نشان می‌دهد، افزایش روی در محلول غذایی منجر به کاهش سطح آهن در اندامهای هوایی و تجمع آن در ریشه گیاه نعناع شده است. تأثیر منفی افزایش فلز روی بر کاهش جذب آهن در گیاه *Mentha arvensis* نیز توسط میسرا و رامانی (Misra and Ramani)(1991) مورد مطالعه قرار گرفته است. این محققین چنین پیشنهاد کردند که سمیت روی سبب القای علائم کمبود آهن در گیاه نعناع می شود (19.) واکنش متقابل فلز روی (Zn) با سایر مواد مغذی گیاه مانند منیزیم، منگنز، فسفر، کلسیم و مس نیز توسط بسیاری محققین مورد بررسی قرار گرفته است (19، 20، 22، 23 و 24) بر اساس گزارش وایت (White) (1976) افزایش سطح روی در خاک موجب تسریع میزان جابجایی منگنز از ریشه به بخشهای هوایی و ایجاد کلروزگی در برگها می‌شود. به اعتقاد او دو فلز روی و منگنز مانع عملکرد آهن در برگ در جهت سنتز کلروفیل می شوند (28.)

در این تحقیق مطابق با نمودار شکل 6، در غلظتهای پایین روی تجمع این فلز در بخشهای هوایی گیاه تغییر معنی-داری نداشته است، درحالی که تجمع این فلز در بخشهای ریشه‌ای گیاه نعناع با بالا رفتن غلظت روی به تدریج افزایش نشان می‌دهد. این نتایج شاید بتواند دلیلی براین فرضیه باشد که گیاه نعناع از طریق کاهش انتقال فلز روی از ریشه به اندامهای هوایی میزان سمیت این فلز را تخفیف داده است. بنابراین بر اساس این تئوری می‌توان چنین پیشنهاد کرد که، گیاه نعناع مطابق با طبقه بندی بیکر و همکاران بر اساس مکانیسم‌های مقاومت گیاهان در برابر تنش فلزات سنگین در دسته گیاهان تحمل‌کننده با استراتژی منع‌کنندگی یا اجتناب (Exclude or Avoidance) قرار می‌گیرد، بدین صورت که این گیاه تا یک سطح بحرانی از غلظت فلز از تجمع آن در اندامهای هوایی جلوگیری نموده و آنرا در ریشه نگه می‌دارد، ولی در مافوق این غلظت بحرانی میزان تجمع فلز در اندام های هوایی نیز افزایش پیدا می‌کند (7).

تأثیر عنصر روی بر ایجاد تنش اکسیداتیو و پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی در گیاه نعناع: یکی از مهمترین مکانیسم‌های بروز سمیت در بافتهای گیاهی در حضور فلزات سنگین این است که، انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست سلولها دچار اختلال شده و این منجر به تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو در

Archive of SID

www.SID.ir

گیاه می‌شود (4، 5، 7 و 18) کاپوس (Kappus)(1985) معتقد است، اگر فلز روی در غلظت بالا منجر به سمیت در بافتهای گیاهی می‌شود بدین دلیل است که این ترکیب از طریق مهار فرآیند انتقال الکترون فتوسنتزی، به عنوان یک تولید کننده فعال رادیکالهای اکسیژن در سلول گیاهی عمل می‌کند (6.) روی به طور غیرمستقیم نیز از طریق کاهش میزان جذب و جابجایی آهن در گیاه واکنشهای اکسیداتیو را راه اندازی می‌کند، چون که یون آهن به عنوان گروه پروستتیک هموپروتئین هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دسموتاز در نابودی رادیکالهای آزاد اکسیژن درگیاه نقش دارد (21 و 24). گونه‌های فعال اکسیژن با ماکروملکولهای حیاتی سلول مانند لیپیدها، پروتئینها، اسیدهای نوکلئیک و سایر ترکیبات واکنش و اعمال طبیعی سلول را مختل می‌کنند (2، 4 و 5).

یکی از اختلالات ناشی از رادیکالهای فعال در گیاهان اثر آنها بر لیپیدهای غشایی و تغییر وضعیت تمامیت غشاهای سلولی می‌باشد. 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 می‌شوند (8 و 9). علاوه براین بر اساس گزارش تریپاسی (Tripathi)(2006)، روی فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز به عنوان مهمترین آنزیم مسیر پراکسیداسیون را افزایش داده و از این طریق نیز فرآیند پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را تحریک می کند (26). مقدار مالون دآلدهید و سایر آلدهیدها که در بافتها تحت شرایط تنش بوجود می آیند به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشند. در این تحقیق میزان مالون دآلدهید وسایر آلدهیدهای سلولی مانند پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال در غلظت کم فلز روی تفاوت معنی‌داری با گیاه کنترل نشان نمی‌دهند ولی غلظتهای سمی این فلز محتوای این ترکیبات و در نهایت پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی را افزایش داده است. این نتیجه مؤید این مطلب است که، سیستم آنتی اکسیدانی گیاه نعناع در غلظت پایین فلز روی توانایی از بین بردن رادیکالهای آزاد را داشته و مانع از خسارات اکسیداتیو به گیاه شده است درحالی که، تجمع بالای گونه های فعال اکسیژن در غلظتهای بالای روی بر سیستم آنتی اکسیدانی گیاه غلبه کرده و پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی را افزایش داده است. نتایج بدست آمده در مورد ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه نیز این فرضیه را تأیید می کند. افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در نعناع در غلظت بالای روی نشان دهنده القای تنش اکسیداتیو دراثر این فلز سنگین می باشد.

تغییر محتوای ترکیبات آنتی اکسیدانی نعناع در پاسخ به سمیت روی: گونه های مختلف گیاهی مکانیسم های دفاعی متعددی را برای کنترل و خنثی کردن رادیکالهای آزاد ناشی از تنش اکسیداتیو به کار می‌گیرند. آنها سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی با سازوکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی دارند. سیستم دفاعی غیرآنزیمی در گیاهان سنتز برخی ترکیبات آنتی اکسیدان مانند آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، توکوفرول ها، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها را القا می‌کند. این ترکیبات آنتی اکسیدان با رادیکالهای واکنش پذیر واکنش داده و با دادن الکترون به این رادیکالها، آنها را به فرم پایدار خود تبدیل می‌کنند (5، 11 و 20).

فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها از مهمترین ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکالهای آزاد را از بین می برند بلکه از تولید بیشتر آنها در گیاه نیز جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلولها و در نتیجه جمع آوری آنها از سایر بخشها می‌شوند (1 و 17). در این تحقیق با افزایش فلز روی میزان آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها افزایش یافته و این ترکیبات به عنوان سیستم محافظتی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو از افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها حتی تا غلظت 20 میکرومولار روی جلوگیری کرده اند، در حالی که غلظت بالاتر این فلز متابولیسم را مختل کرده و

Archive of SID

www.SID.ir

میزان رادیکالها را به حدی افزایش داده که بر سیستم آنتی اکسیدانی گیاه غلبه و پراکسیداسیون لیپیدها را در غشای سلول افزایش می‌دهد. افزایش در مقدار این رادیکالها در حدی است که حتی بالا رفتن مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با قدرت آنتی اکسیدانی بالا نیز قادر به خنثی نمودن اثر آنها نبوده و سبب خسارت به فرآیندهای متابولیسمی گیاه گردیده است (شکل 1، 2 و 3).

بر اساس نمودار شکل 5 میزان آسکوربات کل در اندامهای هوایی گیاه نعناع در معرض روی در غلظت 5 میکرومولار تفاوت معنی داری با گیاه کنترل نشان نمی دهد. این درحالی است که، سمیت روی در غلظتهای بالا (20 و 40 میکرومولار) محتوای این ترکیبات آنتی اکسیدانی را به طور معنی‌داری افزایش داده است. آسکوربات یک احیاکننده قوی برای رادیکالهای آزاد محسوب می‌شود که می‌تواند به طور مستقیم، بدون واسطه آنزیم یا با واسطه آنزیم رادیکالهای آزاد را از بین ببرد. نقش غیر مستقیم آسکوربیک اسید به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان، احیای توکوفرول می‌باشد. این ترکیب به عنوان یک آنتی اکسیدان متصل به غشا بوده و رادیکالهای پراکسید و اکسیژن یکتایی را از بین می‌برد (1 و 17). در چرخه آسکوربات– گلوتاتیون، آسکوربیک اسید با رادیکالهایی مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن یا رادیکال توکوفروکسیل واکنش داده و با احیای آنها دهیدروآسکوربات را بوجود می آورد. این ترکیبات دوباره با واسطه چند آنزیم به آسکوربات تبدیل می شوند (12، 15، 18، 21 و 25). کائویی و همکاران (Chaoui et al.)(1997) گزارش کرده اند، تیمار فلز سنگین روی میزان فعالیت آنزیمهای آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز را افزایش می‌دهد. این سه آنزیم از مهمترین آنزیمهای چرخه آسکوربات–گلوتاتیون بوده و فعالیت این چرخه را افزایش می دهند (9). در گیاهانی که در معرض تنش اکسیداتیو قرار می گیرند نابود کردن رادیکالهای پراکسید هیدروژن به عنوان مهمترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز محسوب می‌شود. این آنزیم از سوبسترای آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند (4، 5 و 12). افزایش محتوای آسکوربات کل در این تحقیق بیانگر این مطلب است که، در شرایط حضور فلز سنگین روی آنزیم های چرخه آسکوربات– گلوتاتیون در گیاه نعناع تخریب نشده و این چرخه همچنان به فعالیت خود ادامه می دهد، بنابراین موجب سمیت زدایی گونه های فعال اکسیژن می شود. به هرحال، زمانی که تولید گونه های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه بیشتر باشد خسارت آنتی اکسیدانی به گیاه حتمی است (17 و 20).

دسته دیگری از ترکیبات آنتی اکسیدانی محلول در سلولهای گیاهی کاروتنوئیدها می باشند. این ترکیبات نیز از مسیر غیرآنزیمی در جهت تخفیف خسارات اکسیداتیو به گیاه عمل می‌کنند. کاروتنوئیدها تتراترپن های 40 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 (1 و 8). فلزات سنگین با مقدار معینی به عنوان عوامل تنش زای محیطی سبب القای تنش اکسیداتیو و سنتز بیشتر کاروتنوئیدها در گیاهان تحت تنش می شوند، درحالی که غلظتهای بالای این فلزات از طریق تخریب و بهم ریختگی ساختار کاروتنوئیدها مقدار آنها در گیاه را کاهش می‌دهد (8). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز این امر را تأیید می‌کنند.

بطور کلی بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان چنین نتیجه‌گیری کرد که گیاه نعناع در غلظتهای کم فلز روی با القای سنتز ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند آنتوسیانین ها، فلاونوئید ها و آسکوربیک اسید، بر رادیکالهای آزاد اکسیژن ایجاد شده در اثر القای تنش اکسیداتیو غلبه می نماید، درحالی که با افزایش غلظت فلز سنگین روی میزان این رادیکالهای فعال به حدی افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

پیدا کرده که بر سیستم آنتی اکسیدانی گیاه غلبه نموده و موجب خسارات اکسیداتیوی از جمله کاهش بیوماس گیاه و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلولها شده است.

موضوعی که در اینجا می‌تواند سوال انگیز باشد این است که شاید این اثرات سمیت مربوط به یون سولفات (SO_4) موجود در سولفات روی باشد نه یونهای روی (Zn). همانگونه که قبلاً نیز اشاره گردید از آنجا که گوگرد (سولفور) به عنوان یک عنصر ضروری پرمصرف برای گیاهان محسوب می‌شود، حتی تا غلظتهای در حد میلی-مولار نیز وارد ناحیه مسمومیت (Toxic Zone) خود نمی شود و تغییرات اندک غلظت آن در قسمتهای مختلف به گیاه آسیب نمی رساند (تایز و زایگر، 1386). بنابراین غلظتهای بکاربرده شده یون سولفات در این مطالعه (نهایت تا 40 میکرومولار) برای گیاه نعناع سمیت ایجاد نمی‌کند و همه اثرات سمیت را می توان به روی نسبت داد. از طرف دیگر یون روی نیز از طریق افزایش سختی آب سمیت سولفات را کاهش می‌دهد و حتی در برخی از مطالعات از آن برای کاهش سمیت سولفات استفاده می‌کنند. با این حال به دلیل نقشهای ساختاری و عملکردی فراوان گوگرد در بسیاری از فرآیندهای متابولیسمی و بیوشیمیایی گیاهان تغییرات غلظت آن در محیط رشد بر روی گیاه بدون تأثیر نخواهد بود. در بررسی برخی نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز این موضوع می تواند مدنظر قرار بگیرد. برای مثال مطابق با نتایج این پژوهش، محتوای آسکوربات و دهیدروآسکوربات درگیاهان تیمارشده با غلظتهای بالای سولفات روی افزایش داشته است و پرواضح است که گوگرد نقش ساختاری مهمی در ترکیب گلوتاتیون به عنوان پیش ساخت اصلی آسکوربات و دهیدروآسکوربات در گیاه دارا می باشد و می تواند در زمینه پاسخ به اثرات سمیت عنصر روی به گیاه کمک نماید. بنابراین بررسی جامع تر این قسمت از موضوع به مطالعات وسیع تر در آینده موکول می گردد.

منابع

1. علومی، حکیمه. منوچهری کلانتری، خسرو. 1382. بررسی اثر کادمیوم بر برخی از پارامتر های رشد و القاء تنش اکسیداتیو در گیاه کلزا (*Brasics napus* L.). پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید باهنرکرمان.
2. Alia Prasad, K. V. S. K., Pardha Saradhi, P. 1995. Effect of zinc on free radical and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*. Phytochemistry 39: 45–47.
3. Ambler, J. E., Brown, J. C., Gauch, H. G. 1970. Effect of zinc on translocation of iron in soybean plants. *Plant Physiol* 46: 320–323.
4. Asada, K., Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D. J., Osmond, C. J., Artzen, C. J. (Eds.), Photoinhibition: Topics in Photosynthesis. *Elsevier*, Amsterdam, pp. 227–287.
5. Asada, K. 1984. Chloroplast: formation of active oxygen and its scavenging. Meth Enzymol 105: 422–429.
6. Bonnet, M., Camares, O., Veisseire, P. 2000. Effect of Zinc and influence of *Acremonium Lolli* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity of ryegrass. *Expremental botany* 51: 945–953.
7. Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Hajar, A. S. M. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in british polulations of metallophyte *Thlaspi caerulescens* J and C presl. *New phytol* 172: 83-92.
8. Candan, N., Tarhan, L. 2003. Change in chlorophyll–carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn–stressed *Mentha pulegium*. *Turk J. Chem* 27: 21–30.
9. Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., Elferjani, E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effect on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139–147.
10. Choudhury, R. P., kumar, A., Gary, A. N. 2006. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for

Archive of SID
www.SID.ir

essential, trace and toxic elements and its antioxidant behavior, pharmaceutical and biochemical analysis. PBA: 5715.

11. Devos, C. H. R., Schat, H. 1991. Free radical and heavy metal tolerance. In: Rozema, J., Verkleij, J. A. C. (Eds.), Ecological Responses to Environmental Stresses. Kluwer Academic Pub. Pp: 1–30.
12. Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant* 100: 241–254.
13. Heath, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetic and stochiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of biochemistry and biophisics* 125: 189–190.
14. Krizek, D. T., Britz, S. J., Mirecki, R. M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of c. v. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum* 103: 1-7.
15. Madhava, k. v., Sresty, T. V. S. 2000. Antioxidant parameters in the seedling of pigeonpia (*Cajanus cajan* L. millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant science* 157: 113-128.
16. MC. De pinto, F. D., Gara, L. de. 1999. The redox state of ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-Z cells. *Protoplasma* 209: 90-97.
17. Nasibi, F., M-Kalantari, K. H. 2005. The effects of UV-a, UV-b and UV-c on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica Napus*. *Iranian Journal of Science & Technology* 29: 39-48.
18. Pandey, N., Singh, A. K., Pathak, G. C., Sharma, C. P. 2002. Effect of zinc on antioxidant response in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Indian J Exp Biol* 40: 954-956.
19. 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
20. Prasad, M. N. V., Strzatka, K. (Eds.). 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Pub, Dordrecht. Pp: 432.
21. Prasad, K. V. S. K., Paradha Saradhi, P., Sharmila, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* 42: 1–10.
22. Rion, B., Alloway, J. 2004. Fundamental aspects of Zinc in soils and plants. International Zinc Association. 1-128.
23. Rosen, J. A., Pike, C. S., Golden, M. L. 1977. Zinc, iron and chlorophyll metabolism in Zinc toxic *Corn*. *Plant physiol* 59: 1085–1087.
24. Rout, G. R., Das, P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism; Zinc. *Agronomie* 23; 3–11.
25. Sanjib, K. P., Shuvasish, C. 2005. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Braz, J. Plant physiol* 17: 191-197.
26. Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A., Gaur, J. P. 2006. Oxidative stress in *Scenedemus* sp. During short and long-term exposure to Cu and Zn. *Chemosphere* 62: 538-544.
27. 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.
28. White, R. E. 1976. Studies on the mineral ion absorption by plants: The interaction of aluminium phosphate and pH on the growth of *Medicago sativa*. *Plant and soil* 46: 195–208.

Archive of SID

www.SID.ir

Study on the effects of zinc stress on induction of oxidative stress and concentration of mineral element in spearmint (*Mentha spicata* L.)

Zare Dehabadi S. & Asrar Z.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

As a result of human activities, heavy metal pollution has become one of the most serious environmental problems today. The present work was carried out to study oxidative changes, antioxidanic responses and metal accumulation in spearmint (*Mentha spicata* L.) at various concentrations of zinc. The plants remained in a controlled environment for 16 weeks in nutrient solutions contained different concentration of zinc. As most important responses of plants to environmental stresses, dry weight or biomass of treated plant with high concentration of zinc decreased significantly. Under Zn treatments, phenolic compounds such as flavonoids and anthocyanins were increased significantly in comparison with control plants. This study showed that Zn as heavy metal induced oxidative stress as evidenced by an increase in lipid peroxidation)malondialdehyde and other aldehydes(and total ascorbate content. High levels of Zn decreased the shoot to root ratios and translocation of Zn and Fe, which caused accumulation of these metals in root. According to this investigation, it can be concluded that zinc started some toxic effects at high accumulation due to induce oxidative stress and disordered Fe functions in spearmint plant cells.

Keywords: *Ascorbic acid*" *oxidative stress*" *flavonoids*" *Mentha spicata*" *Zinc*

Archive of SID

www.SID.ir