فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٥٥٤-٥٤٤ (۱۳۸۹)

اثر غلظت‌های مختلف مس بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیب‌های فنلی در برگ و ریشه گیاه بارهنگ (*Plantago major* L.)

مه‌لقا قربانلی[1*]، آرین ساطعی[2] و سارا نصیری سوادکوهی[3]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، پست الکترونیک: ghorbanli@yahoo.com
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۹

چکیده

بارهنگ (*Plantago major* L.) گیاهی عموماً علفی، از خانواده Plantaginaceae است که دارای برگهایی با پهنک بزرگ واقع در سطح زمین است. این گیاه در منطقه وسیعی از دو قاره آسیا و اروپا و همچنین آفریقا و آمریکای شمالی می‌روید و دارای ترکیب‌های شیمیایی نظیر پلی‌ساکاریدها، لیپیدها، مشتقات کافئیک اسید، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، آسکوربیک اسید، بنزوئیک اسید، فرولیک اسید، گالاکتورونیک اسید و ... می‌باشد. در این مطالعه گیاه بارهنگ تحت شرایط گلدانی کشت و با محلول غذایی هوگلند تغذیه شد و بعد از رسیدن به مرحله سه برگی، مس به شکل $CuS0_4$ همراه با هوگلند در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بر گیاهان اعمال گردید. به‌طوری که قبل از ورود به مرحله زایشی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) و میزان ترکیب‌های فنلی در سطح برگ و ریشه گیاهان تحت تیمار بررسی گردید. در واقع هدف از تحقیق این بوده که غلظت‌های مختلف مس چه تأثیری بر آنتی‌اکسیدانهای آنزیمی و میزان ترکیب‌های فنلی در بارهنگ دارند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت مس، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در سطح ریشه و برگ کاهش یافت که این کاهش در سطح ریشه نسبت به شاهد در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بوده است. همچنین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز نیز در برگ و ریشه افزایش یافت که در سطح ریشه این افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار بود. بنابراین میزان ترکیب‌های فنلی نیز در ریشه افزایش یافت که این افزایش در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبوده، ولی در برگها کاهش را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بارهنگ (*Plantago major* L.)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ترکیب‌های فنلی، مس.

مقدمه

فلزات سنگین به‌عنوان فلزاتی با خواص فلزی (قابلیت چکش‌خواری، قابلیت هدایت، پایداری)، عدد اتمی بزرگتر از ۲۰ و وزن‌های بالاتر از $5g.cm^{-3}$ تعریف شده‌اند. تعدادی از آنها (Cu، Zn، Ni، Mo، Mn، Fe و Co) ریزمغذی‌های ضروری هستند که برای رشد طبیعی، در واکنش‌های ردوکسی، انتقال الکترون و دیگر فرایندهای مهم متابولیکی شرکت می‌کنند. فلزاتی که

Archive of SID
www.SID.ir

غیرضروری در نظر گرفته می‌شوند (Pb، Cd، Cr، Hg و ...) به‌طور عمده سمیت بالاتری برای گیاهان دارند (Sebastiani *et al.*, 2004).

ورود این آلاینده‌ها به محیط از طریق فعالیت‌های شهری، عملیات کشاورزی و صنعتی است (Clemens, 2001). فلزات سنگین مانع از فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تنفس، فتوسنتز، رشد طولی سلول، ارتباط آبی گیاه، متابولیسم نیتروژن و تغذیه معدنی می‌شوند (Zornoza *et al.*, 2002). بعضی از مکانیسم‌های خارجی که جذب فلزات را به وسیله ریشه محدود می‌کنند، می‌توانند به بردباری گیاهان در برابر تعدادی از فلزات سمی در خاک کمک کنند که یکی از این مکانیسم‌ها کی‌لیت کردن فلزات در ریزوسفر است که توسط لیگاندهائی نظیر فیتوکلاتین‌ها، متالوتیونین‌ها، امینواسیدها، اسیدهای آلی و همچنین مواد دیگری که از ریشه‌ها تراوش می‌شوند، صورت می‌گیرد. این لیگاندها کمپلکس لیگاند- فلز را در ریزوسفر تشکیل و سیالیت فلز را کاهش می‌دهند. همچنین بردباری به فلزات توسط عملکرد مایکوریزا (Mycorrhiza) نیز افزایش می‌یابد (Baranowska Morek, 2003).

فلزات سنگین به روشهای زیر تنش اکسیداتیو را در سلولها و بافت‌های گیاه تحریک می‌کنند:

الف) انتقال مستقیم الکترونها در واکنش‌های تک‌الکترونی که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. در این حالت فلزات انتقالی نامیده می‌شوند (Fe، Cu، Mn و ...) که در اربیتال‌هایشان الکترون‌های جفت نشده دارند. به‌طوری که الکترون‌های منفرد را می‌پذیرند و انتقال مونوالکترون را به O_2 راه‌اندازی کرده و در کل تبدیل به ROS و پدیده اکسید و احیا می‌شوند. ب) فلزات مسیرهای متابولیکی را تخریب می‌کنند، به‌ویژه در غشاء تیلاکوئید، که منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شوند. ج) به‌علاوه، فلزات سنگین به‌طور عمده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (پراکسیدازها، کاتالازها و سوپراکسید دیسموتازها) را که مسئول سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد هستند غیرفعال می‌کنند. اگرچه ممکن است پراکسیداز به علت استرس فلزی فعال شود (Sahw *et al.*, 2004؛ Dietz *et al.*, 1999).

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌توانند با اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌های غشاء یا به وسیله افزایش سرعت پراکسیداسیون لیپید به غشاء آسیب برسانند (Liu *et al.*, 2004). برای مقابله با این آسیب‌های ایجاد شده توسط ROSها سلولهای گیاهی نیز دارای مکانیسم‌های دفاعی هستند: نخستین مکانیسم‌های دفاعی از ورود فلزات به داخل سلولها از طریق دفع یا اتصال فلز به دیواره سلولی و یا از طریق لیگاندها جلوگیری می‌کنند و دومین سیستم دفاعی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مثل کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز، سوپراکسید دیسموتاز و خانواده پراکسیدازها می‌باشند (Ajay Arora *et al.*, 2002). ترکیب‌های فنلی از مهمترین متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌باشند که دارای عمل آنتی‌اکسیدانی نیز هستند و این عملکردشان ناشی از تمایل زیاد آنها به کی‌لیت شدن با فلزات است (Jung *et al.*, 2003).

مس یک عنصر ضروری برای رشد گیاه است و در سطح سلولی یک ترکیب ساختاری و کاتالتیکی بسیاری از آنزیم‌ها و پروتئین‌هایی است که در بسیاری از مسیرهای متابولیکی درگیر هستند (Pilon *et al.*, 2006). با وجود

Archive of SID
www.SID.ir

این، زمانی که حضور آن در سلول‌ها افزایش یابد موجب بازدارندگی رشد شده و در فرایندهای مهم سلولی نظیر فتوسنتز و تنفس نیز دخالت می‌کند (Marschner, 1995؛ Prasad & Strzalka, 1999). دامنه طبیعی محتوای مس در بافت‌های گیاه 8-13ppm (Howeler, 1983)، 3-10ppm (Clarkson & Hanson , 1980) و 5-20ppm (Stevenson, 1986) گزارش شده، همچنین Nriagu (1979) 12ppm را به‌عنوان یک مقدار جهانی برای غلظت‌های مس در بیوماس گیاه و یک مقدار کمتری (۳/۵) را نیز برای گیاهان دریایی پیشنهاد کرده است.

بارهنگ با نام علمی *Plantago major* L. متعلق به خانواده Plantaginaceae می‌باشد. این گیاه در اطراف جاده‌ها و مناطقی با خاک‌های متراکم و همچنین در چمن‌زارها به‌عنوان یک علف هرز می‌روید. حدود ۲۶۰ گونه plantago در نواحی معتدل و در مناطق گرمسیری یافت شده‌اند (Van Der Art & Vulto, 1992).

هدف از این تحقیق، بررسی غلظت‌های مختلف مس بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) و محتوای ترکیب‌های فنلی در این گیاه می‌باشد.

مواد و روشها

بذرهای بارهنگ از منطقه سوادکوه واقع در سمت جنوبی استان مازندران جمع‌آوری و به مدت دو ماه در محیط کشت هیدروپونیک رشد کردند؛ بذرها ابتدا با آب مقطر آبیاری و بعد از جوانه‌زنی تا رسیدن به مرحله سه برگی در فواصل زمانی مناسب با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند و بعد به مدت ۲ هفته تحت تیمارهای مس به صورت $CuSO_4$ با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار قرار گرفتند و پس از برداشت، سنجش‌های بیوشیمیایی بر روی آنها انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

استخراج آنزیم از بافت برگ انجام شد (Koroi, 1989) و همگن‌ها به طریق زیر مورد مطالعه قرار گرفتند:

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار (pH= ۵) با ۰/٤ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین ۰/۰۱ مولار (محلول در الکل ۵۰ درجه) را مخلوط نموده و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه می‌گردد. جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب دقیقه بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH= ٦/٨) با ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ را مخلوط کرده و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه می‌گردد. جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب دقیقه بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Chance & Maehly, 1995).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ٦)، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، H_2O_2 ۰/۱ میلی‌مولار و آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار را مخلوط کرده و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه می‌گردد. جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به

Archive of SID

www.SID.ir

وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب دقیقه بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Nakano & Asada, 1981).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH= ٦/٨) با ۰/٤ میلی‌مولار پیروگالول ۰/۲ مولار را مخلوط کرده و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه می‌گردد. جذب نوری در طول موج ٤۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب دقیقه بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Manoranjan & Dina Bandhu, 1976).

سنجش ترکیب‌های فنلی

برای سنجش ترکیب‌های فنلی به روش زیر عمل شد:

توزین ۰/۱ گرم از بخش تر گیاه؛ قرار دادن نمونه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ و جوشاندن نمونه در اتانول به مدت ۱۵ دقیقه در صورت تبخیر شدن الکل، افزودن مقدار مناسب الکل و همگن‌سازی نمونه؛ سانتریفوژ نمونه در ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه؛ جدا نمودن محلول رویی و رساندن به حجم ۵ میلی‌لیتر توسط اتانول ۸۰٪؛ برداشتن ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق و افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر فولن رقیق شده (۱:۳) و ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع (با افزودن کربنات سدیم محلول آبی‌رنگ می‌شود)؛ ثابت نگهداشتن لوله به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی؛ سانتریفوژ نمودن نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با ٤۰۰۰rpm؛ جدا کردن محلول رویی از نمونه سانتریفوژ شده و خواندن جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از شاهد مناسب (۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪+ ۲/۵ میلی‌لیتر فولن رقیق شده+ ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع). بنابراین برای یافتن غلظت ترکیب‌های فنلی (C) از کاتکول با تراکم‌های مختلف استفاده گردید. به نحوی که پس از ترسیم منحنی، معادله C= (b.ABS)+a مشخص و مقدار این ترکیب‌ها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید (Matta & Giai, 1969):

$$M = \frac{C \times 0.05}{W}$$

روشهای آماری

کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار مستقل انجام گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS، تجزیه واریانس (Anova) یک عاملی به کمک آزمون دانکن انجام شد و نمودارهای مربوطه به کمک نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج

تجزیه واریانس بدست آمده از سنجش فعالیت آنزیم‌ها نشان داد که با افزایش غلظت مس، کاتالاز در سطح برگ و ریشه کاهش یافت که این کاهش در هر دو سطح (برگ و ریشه در سطح ۰/۰۵) نسبت به شاهد معنی‌دار بوده و بیشترین فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد و کمترین فعالیت در تیمار ۷۰۰ میکرومولار مس مشاهده شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز نیز در سطح برگ و ریشه کاهش معنی‌داری را با افزایش غلظت مس نسبت به شاهد نشان داده، به طوری که در سطح ریشه و برگ بیشترین مقدار آسکوربات پراکسیداز در گیاهان شاهد و کمترین مقدار آن در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار مس مشاهده شد و در مقایسه بین تیمارها نیز سیر نزولی فعالیت این آنریم همگام با افزایش غلظت مس مشاهده شد. فعالیت پراکسیداز در برگ تغییرات معنی‌داری نشان نداد و در سطح ریشه نیز کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در تیمار

Archive of SID
www.SID.ir

۱۰۰۰ میکرومولار مس نسبت به تیمار ۵۰۰ میکرومولار مس و شاهد مشاهده شد. بنابراین فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازی برگ در تیمارهای مختلف مس تغییرات معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداد، اما در مقایسه بین تیمارها افزایش فعالیت این آنزیم تنها در تیمار ۷۰۰ میکرومولار مس نسبت به تیمارهای ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مس معنی‌دار است. بدین ترتیب، فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازی ریشه در تیمارهای ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولارمس افزایش معنی‌دار و در تیمار ۳۰۰ میکرومولار مس کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. در مقایسه بین تیمارها نیز از تیمار مس ۳۰۰ میکرومولار تا تیمار مس ۱۰۰۰ میکرومولار روند صعودی و معنی‌دار فعالیت آنزیم مشاهده شد.

به‌طور کلی تحت تنش مس، میزان ترکیب‌های فنلی در سطح برگ در تیمارهای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مس نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. به‌طوری که در مقایسه بین تیمارها نیز افزایش ترکیب‌های فنلی در تیمارهای ۱۰۰ و ۷۰۰ میکرومولار مس نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار بود. در سطح ریشه میزان این ترکیب‌ها در تیمارهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مس افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و سایر تیمارها نشان داد. همان‌طور که در این جدول مشخص شده بیشترین محتوای ترکیب‌های فنلی در سطح برگ مربوط به تیمار ۷۰۰ میکرومولار مس و کمترین محتوای آنها مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار مس می‌باشد. در سطح ریشه نیز بیشترین محتوای این ترکیب‌ها در تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس و کمترین مقدار آنها در تیمار ۷۰۰ میکرومولار مس مشاهده شد (جدول ۱).

بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تغییرات حاصل از فعالیت پراکسیدازی برگ معنی‌دار نیست و در سطح ریشه نیز کاهش فعالیت این آنزیم تنها در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار مس نسبت به تیمار ۵۰۰ میکرومولار مس و شاهد معنی‌دار است. فعالیت کاتالازی برگ و ریشه در تمامی تیمارهای مس کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. به‌طوری که فعالیت آسکوربات پراکسیدازی نیز در سطح برگ و ریشه همزمان با افزایش غلظت مس کاهش یافت و این سیر نزولی در تمامی تیمارهای مس نسبت به شاهد معنی‌دار است که این امر ممکن است به حفظ سطوح آسکوربات کمک کند. فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازی در سطح برگ و ریشه با افزایش غلظت مس با بی‌نظمی افزایش یافت که این تغییرات افزایشی در سطح ریشه در تیمارهای ۵۰۰، ۷۰۰ و۱۰۰۰ میکرومولار مس نسبت به شاهد معنی‌دار بود و در سطح برگ این تغییرات در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود، اما در بین تیمارها تنها افزایش معنی‌دار در تیمار ۷۰۰ میکرومولار مس نسبت به تیمار ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مس مشاهده شد. به‌طور کلی مس می‌تواند تغییرات زیادی در سلول‌های گیاهی به‌شرح زیر ایجاد کند:

۱) می‌تواند به گروههای سولفیدریل پروتئینها یا آنزیم‌های غشاء متصل شود (Jouili & El Feriani, 2003).

۲) سرعت پراکسیداسیون لیپید را افزایش می‌دهد (Teissire & Guy, 2000).

۳) جذب سایر عناصر ضروری را مختل می‌کند (Xiong *et al.*, 2006).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف مس بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای ترکیب‌های فنلی

تیمارها / OD ($min^{-1}.g^{-1}.Fw$)	o	Cu 100µM	Cu 300µM	Cu 500µM	Cu 700µM	Cu1000µM
فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ	۲/۷۱۷ ±۰/۰۱۵ a	۲/٦۷۰ ±۰/۰۱۰ b	۲/٥٦۹ ±۰/۰۱۱ d	۲/٦۱۱ ±۰/۰۰٥ c	۲/٥۱ ±۰/۰۰٦ e	۲/٥۲٥ ±۰/۰۰۷ e
فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه	۲/۸٦۷۰ ±/۰۰٤ a	۲/۸٤۱ ±۰/۰۰٦ b	۲/۸۳۹ ±۰/۰۰۳ bc	۲/۸۳٤ ±۰/۰۰٤ bc	۲/۸۲۳ ±۰/۰۰۲ d	۲/۸۳۳ ±۰/۰۰٤ c
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ	۲/۸۸۰ ±۰/۰۰٥ a	۲/۸۲۷ ±۰/۰۰٥ b	۲/۸۱٥ ±۰/۰۰۷ bc	۲/۸۰۲ ±۰/۰۱۰ c	۲/۷٦۸ ±۰/۰۰٤ d	۲/۷٦٥ ±۰/۰۱۱ d
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه	۲/٦٥۸ ±۰/۰۰۲ a	۲/٦۲٥ ±۰/۰۰۲ b	۲/٦۰۷ ±۰/۰۱٦ c	۲/٤۷۸ ±۰/۰۰٥ d	۲/٤۷۰ ±۰/۰۰۹ d	۲/٤٥۳ ±۰/۰۰٦ e
فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه	۰/۰٤۹ ±۰/۰۰٥ a	۰/۰٤٥ ±۰/۰۰۷ ab	۰/۰٤۲ ±۰/۰۰۲ ab	۰/۰٥ ±۰/۰۰۱ a	۰/۰٤۳ ±۰/۰۰۲ ab	۰/۰۳۳ ±۰/۰۰٤ b
فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ	۰/۲۸۲۳ ±۰/۰۰٤٥ a	۰/۲۷۷ ±۰/۰۰٦ a	۰/۲۷٥۳ ±۰/۰۰٤ a	۰/۲۷۹٦ ±۰/۰۰۲ a	۰/۲۷٦٦ ±۰/۰۰٤ a	۰/۲۸۲ ±۰/۰۰۱ a
فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در برگ	۰/۱٥۱ ±۰/۰۰۳٥ ab	۰/۱۳۹ ±۰/۰۰۱ ab	۰/۱۲۸ ±۰/۰۰٤ b	۰/۱٤٤ ±۰/۰۰٥ ab	۰/۲ ±۰/۰۰۸ a	۰/۱٦۳ ±۰/۰۰٥ b
فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در ریشه	۰/۳٤۹ ±۰/۰۰٥ c	۰/۳٥٤ ±۰/۰۰٦ bc	۰/۳۲٤ ±۰/۰۰۲ d	۰/۳٦ ±۰/۰۰۲ b	۰/۳٦۸ ±۰/۰۰۳ a	۰/۳۷٤ ±۰/۰۰۲ a
محتوای ترکیب‌های فنلی در برگ	۲٦/۹۸ ±۰/٤۱٥ a	۲٦/۱٦ ±۳/٥۷٦ a	۱۷/٥۹ ±۱/٥۸٥ b	۱۳/٦۰ ±۰/۹۰٥ c	۲۷/٥۷ ±۰/۸۳۱ a	۱۰/۲۸ ±۱/٦٦٥ d
محتوای ترکیب‌های فنلی در ریشه	۳۸/۷۸ ±۱/٤٦۰ b	٥٥/۷۳ ±٥/٦۷٤ a	٤۷/۲۱ ±۳/۸٥۹ a	۳٦/۷۰ ±٥/۳۰٦	۳۳/٥۸ ±۳/٦۳٥ b	٤۸/۹۲ ±٦/۲۲۹ a

Archive of SID
www.SID.ir

٤) بر سنتز کلروفیل و انتقال الکترون تأثیر می‌گذارد و همچنین اثر سمی بر واکنش‌های اولیه فتوسنتز دارد (Yruela, 2005).

۵) به‌عنوان یک فلز فعال ردوکسی می‌تواند تشکیل رادیکالهای آزاد و ROS را از طریق اکنش‌های Haber-Weiss و Fenton کاتالیز کند (Schutzendubel & Polle, 2002).

تحقیقات زیادی نشان داده که فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و CAT تحت تنش مس افزایش می‌یابد (Srivastava *et al.*, 2006؛ Rama & Prasad, 1988؛ Li *et al.*, 2006). در حالی که گزارش‌های دیگر حکایت از آن دارد که افزایش مس نه تنها فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش نمی‌دهد بلکه موجب بازدارندگی فعالیت آنها نیز می‌شود (Chaoui & Ferjani, 2005؛ Palma *et al.*, 1987). Gao و همکاران (۲۰۰۸) ضمن بررسی اثر مس بر گیاه *Jatropha curcas* L. ابراز داشتند که فعالیت پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس هیچ تغییری نشان ندادند، در حالی‌که فعالیت این آنزیم در تیمار ٤۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار مس افزایش یافت، اما در گیاه بارهنگ فعالیت پراکسیدازی ریشه حتی در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار مس نیز کاهش یافت. Wang و همکاران (۲۰۰٤) که اثر مس را بر گیاه *Brassica junica* بررسی کردند به این نتیجه رسیدند که مس فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را کاهش داده در حالی که فعالیت کاتالاز را افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از فعالیت Ying و همکاران (۲۰۰۹) نشان می‌دهد که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در دو کولتیوار *Chinensis campestris* به نام Erqing و Wutacia که تحت تیمار مس در محیط هوگلند قرار گرفتند به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین در پژوهش حاضر نیز کاهش فعالیت این آنزیم مشاهده شد و فعالیت پراکسیداز در Erqing کاهش، اما در Wutacia به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش نقش مهمی را در بردباری به مس در این گونه بازی می‌کند. همچنین کاهش فعالیت کاتالازی و پراکسیدازی در گیاهان *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah *et al.*, 1992؛ Chaoui *et al.*, 1997)، *Phaseolus aureus* (Shaw, 1995)، *Helianthus annaus* (Gallego *et al.*, 1996) و در *Secale cereale* (Streb *et al.*, 1993) که در معرض فلزات سنگین نظیر کادمیوم و جیوه و دیگر یون‌های فلزی قرار گرفتند، مشاهده شد که با نتایج بدست آمده از این تحقیق نیز همخوانی دارد.

نتایج حاصل از این تحقیق حکایت از آن دارد که مس موجب کاهش محتوای فنلی برگ شده است، هر چند که این کاهش منجر به کاهش فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازی برگ نشده است و در سطح ریشه نیز کاهش معنی‌دار محتوای این ترکیب‌ها در تیمارهای ۵۰۰ و ۷۰۰ میکرومولار مس نسبت به سایر تیمارهای مس معنی‌دار است.

همه گیاهان انواع مختلفی از متابولیتهای ثانویه را تولید می‌کنند. یکی از مهمترین گروه‌های این متابولیتها ترکیب‌های فنلی هستند. این ترکیب‌ها به وسیله حداقل یک حلقه آروماتیک (C6) که حامل یک یا تعداد بیشتری از گروههای هیدروکسیل است مشخص می‌شوند. آنها به‌طور عمده از سینامیک اسید، که از فنیل آلانین به وسیله عملکرد L- فنیل آلانین آمونیالیاز تشکیل شده، سنتز می‌شوند (Dixon & Pavia, 1995). اهمیت این مسیر می‌تواند توسط این حقیقت تأیید شود که در شرایط رشد نرمال ۲۰٪ از کربن توسط گیاهان از طریق این مسیر سنتز

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود (Diaz *et al.*, 2001). تحریک بیوسنتز ترکیب‌های فنلی در گندم در پاسخ به سمیت نیکل (Diaz *et al.*, 2001) و در ذرت در پاسخ به آلومینیوم (Winkel-Shirley, 2002) مشاهده شده است. به‌طوری که تجمع ترکیب‌های فنلی محلول و نامحلول در گیاه *Phaseolus vulgaris* که در معرض کادمیوم قرار گرفته بود، دیده شده است و همچنین برگهای *Phyllantus tenellus* بعد از اسپری شدن با سولفات مس، حاوی ترکیب‌های فنلی بیشتری نسبت به گیاهان شاهد بودند (Diaz *et al.*, 2001). البته نتایج فوق کاملاً مغایر با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر می‌باشد، زیرا در گیاه بارهنگ کاهش محتوای ترکیب‌های فنلی تحت تیمارهای مس مشاهده شد. از این رو ترکیب‌های فنلی دارای عمل آنتی اکسیدانی نیز می‌باشند و این عملکردشان ناشی از تمایل زیاد آنها به کی‌لیت شدن با فلزات است. همچنین آنها دارای گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل هستند که قادرند آهن و مس را محصور کنند (Jung *et al.*, 2003). گیاهان غنی از تانن نظیر چای که به زیادی منگنز بردبار هستند، توسط کی‌لیت شدن این فلزات با ترکیب‌های فنلی در برابر زیادی آن محافظت می‌شوند. همچنین کی‌لیت شدن با پلی‌فنل‌ها، در گیاه نیلوفر آبی و حضور فلزات Cr، Pb و Hg نیز مشاهده شده است (Lavid, 2001). بنابراین طبق نظریه Morgan و همکاران (۱۹۹۷) این توانایی کی‌لیت‌کنندگی ترکیب‌های فنلی احتمالاً مربوط به ویژگی هسته‌دوستی بالای حلقه‌های آروماتیک نسبت به گروه‌های کی‌لیت‌کننده خاص در بین مولکول است. در مقابل، بررسی دانه‌رست‌های Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) تحت تیمارهای مس و نیکل نشان داد زمانی که دانه‌رست‌ها در معرض سطوح بالای مس یا ترکیبی از مس و نیکل قرار گرفتند، میزان ترکیب‌های فنلی آنها کاهش یافت (Roitto *et al.*, 2005)، که با داده‌های حاصل از پژوهش حاضر در بارهنگ مطابقت دارد. البته با توجه به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و همچنین ترکیب‌های فنلی در گیاه بارهنگ به نظر می‌رسد که این گیاه نسبت به غلظت‌های بکار رفته مس حساس نباشد.

منابع مورد استفاده

- Ajay Arora, R., Sairam, K. and Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidativ system in plants. Plant Physiology, 82: 10-25.
- Baranowska-Morek, A., 2003. Roslinne mechanizmy tolerancji na toksyczne dzialanie metali ciezkich. Kosmos, 52: 283-298.
- Chance, B. and Maehly, C., 1995. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology, 11: 755-764.
- Chaoui, A. and Ferjani, E.E., 2005. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. Plant Biology and Pathology, 328: 23-31.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H. and Elferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science, 127: 139-147.
- Clarkson, D.T. and Hanson, G.B., 1980. Themineral nutrition of higher plants. Annual Review of Plant Physiology, 31: 239-298.
- Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta, 212(4): 475-486.
- Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F. and Merino, F., 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant Science, 161: 179-188.
- Dietz, K.J., Baier, M. and Kramer, U., 1999. Free radicals and active oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. 73-97, In: Prasada, M.N.V. and Hagemeyer, J. (Eds.), Heavy Metal Stress in Plants, from Molecule to Ecosystems. Springer, Berlin, 462p.
- Dixon, R. and Pavia, N.L., 1995. Stress-induced phenyl propanoid metabolism. Plant Cell, 7(7): 907-919.

Archive of SID
www.SID.ir

- Gao, S., Yan, R., Cao, M., Yang, W., Wang, S. and Chen, F., 2008. Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. Plant Soil and Environment, 54 (3): 117-122.
- Gallego, S.M., Benavides, M.D. and Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science, 121: 151-159.
- Howeler, R.H., 1983. Analisis del tejido vegetal en al diagnostico de problemas nutricionales algunos cultivos tropicales. Centro internacional de agricultura tropical, Cali, Colombia. 28p.
- Jouili, H. and El Feriani, E., 2003. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. Comptes Rendus Biologies, 326: 639-644.
- Jung, C.H., Maeder, V., Funk, F., Frey, B., Sticher, H. and Froserd, E., 2003. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. Plant and Soil, 252: 301-312.
- Koroi, S.A.A., 1989. Gelek trophers tische and spectral photometris chon under change zomein fiussder temperature and structure peroxidase isoenzyme. Physiology in Vegetable, 20: 15-22.
- Lavid, N., Schwartz, A., Yarden, O. and Tel-Or, E., 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase acitivities in heavy metal accumulation by epidermal glands of waterlily (Nymphaeceaea). Planta, 212: 323-331.
- Liu, J., Xiong, Z.T., Li, T.Y., and Huang, H., 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from copper contaminated and non-contaminated sites. Environmental and Experimental Botany, 52: 43-51.
- Li, M., Hu, C.W., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z.M. and Liu, Z.L., 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). Chemosphere, 62: 565-572.
- Morgan, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., Abian, J. and Becana, M., 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. Free Radical Biology and Medicine, 22(5): 861-870.
- Manoranjan, K. and Dina Bandhu, M., 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activity during rice leaf senescence. Plant Biochemistry and Enzymology, 57: 315-319.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Acadamic press, London, 889p.
- Matta, A.G. and Giai, I., 1969. Accumulation of phenol in tomato is affected by different forms of *Fusarium oxysporum*. Planta, 50: 512-513.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide in sacavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant cell and Environment, 20: 1193-1198.
- Nriagu, J.O., 1979. The global copper cycle. 1-17, In: Nriagua, J.O. (Ed.), Copper in the Environment. Plant I: Ecological Cycling. John Wiley and Sons, New York, 381p.
- Palma, J.M., Gomez, M., Yanez, J. and Del Rio, L.A., 1987. Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper-tolerant pea plants. Plant Physiology, 85: 570-574.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Gogolin, K.A. and Ye, H., 2006. Copper cofactor delivery in plant cells. Current Opinion in Plant Biology, 9: 256-263.
- Prasad, M.N.V. and Strzalka, K., 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. 117-138, In: Prasad, M.N.V. and Hagemeyer, J., (Eds.), Heavy Metal Stress in Plants, from Molecule to Ecosystems. Springer Publication, Berlin, 462p.
- Roitto, M., Rautio, P., Julkunen-Tiitto, R., Kukkola, E. and Huttunen, S., 2005. Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings exposed to nickel and copper. Environmental Pollution, 137: 603-609.
- Rama, D.S. and Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Science, 138(2): 157-165.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S. and Gupta, D.K., 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in Hydrilla verticillata (L.f.) Royle. Aquatic Toxicology, 80: 405-415.
- Sahw, B.P., Saha, S.K. and Mishru, R.K., 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. 84-126, In: Presad, M.N.V. (Ed.), Heavy Metal Stress in Plant: from Biomolecules to Ecosystems, Second ed., Springer, Berlin, 462p.
- Sebastiani, L., Scebba, F. and Tongetti, R., 2004. Heavy metal accumulation and growth response in poplar clones eridano (*populus deltoide*×maximowiczii) and I-214 (P.×euramericana) exposed to industrial waste. Environmental and Experimental Botany, 52: 79-88.
- Shaw, B.P., 1995. Effect of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedling of *Phaseolus aureus*. Biology of Plants, 37: 587-596.

Archive of SID

www.SID.ir

- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K. and Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germination seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*). Physiologia Plantarum, 85: 85-89.
- Stevenson, F.J., 1986. Cycle of soil-Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfure, micronutrients. John Wiley & Sons, New York, 380p.
- Schutzendubel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metalinduced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany, 53: 1351-1365.
- Streb, P., Michael-Kanuf, A. and Feierabend, G., 1993. Preferential photoinactive of catalase and photo inhibition of photosystem II are commomearly symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. Physiologia Plantarum, 88: 590-598.
- Teisseire, H. and Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Science, 153: 65-72.
- Van Der Art, P.G.M. and Vulto, G.C. 1992. General biology of plantago, biogeography and human effects. Ecological Studies, 89: 5-6.
- Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology, 5(3): 218-230.
- Wang, S.H., Yang, Z.M., Yang, H., Lu, B., Li, S.Q. and Lu, Y.P., 2004. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica junicea* L. Botanical Bulletin of Academina Sinica, 45: 203-212.
- Xiong, Z.T., Liu, C. and Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in Brasica pekinensis Rupr. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64: 273-280.
- Ying, L., Yuping, S., Gongium, S., Gianjum, W. and Xilin, H., 2009. Response of antioxidant activity to excess copper in two cultivars of *Brassica campestris* Spp. chinensis makino. Journal of Plant Physiology, 31: 155-162.
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17: 145-156.
- Zornoza, P., Vazquez, S., Esteban, E., Fernandez-Pascual, M. and Carpena, R., 2002. Cadmium-stress in nodulated whit lupin: strategies to avoid toxicity. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 1003-1009.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of various concentrations of copper on antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in leave and root of *Plantago major* L.

M. Ghorbanli[1*], A. Sateei[2] and S. Nasiri Savadkohi[3]

1*- Corresponding author, Department of Biology, Islamic Azad University of Gorgan, Iran,
E-mail: ghorbanli@yahoo.com
2- Department of Biology, Islamic Azad University of Gorgan, Iran
3- Msc Student, Islamic Azad University of Gorgan, Iran

Received: December 2009 Revised: April 2010 Accepted: April 2010

Abstract

Plantago species generally are grassy plants that belong to Plantaginaceae, with large lamina on the ground surfaces. *Plantago major* L. grows widely in Asia, Europea, Africa, and North American and contains chemical compounds such as polysaccharides, lipids, coffeic acid derivatives, flavonoids, terpenoids, ascorbic acid, benzoic acid, ferrolic acid, galactoronic acid and so on. In this study, *Plantago major* L. plants were cultured in several pots irrigated with hougland solutions and after 20 days, during 3 leaves stage, irrigation was continued with hougland solutions containing different concentrations of $CuSO_4$, 0 (control), 100, 300, 500, 700 and 100µM. Antioxidant enzymes activities (catalase, peroxidase, poly phenol oxidase, ascorbate peroxidase) and phenolics content in leaves and roots were measured. The aim of the study was the effect of copper concentrations on antioxidant enzymes and phenolic compounds content in *plantago major* L. The result shows that by increasing concentration of copper in the medium, activity of catalse, ascorbate peroxidase and peroxidase in the root and leaves decreased significantly (0.05) in comparison with control. Polyphenol oxidase enzyme activity in roots and leaves increased, that was only significant in roots. Phenolics content increase in roots that was not significant but the decrease in leaves was significant.

Key words: *Plantago major* L., antioxidant enzyme, phenolic compound, copper.

Archive of SID

www.SID.ir