نشریه تحقیقات علوم زراعی در مناطق خشک ـــــــ

مقدمه

زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) گیاهی است یک‌ساله از خانواده‌ی جعفری و ارتفاع آن برحسب شرایط محیطی از ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر متغیر است (Cronquist, 1981). این گیاه از لحاظ ارزش اقتصادی یکی از مهمترین گیاهان دارویی محسوب می‌شود.عصاره زیره سبز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی (Thippeswamy and Akhilender Naidu, 2005)، ضدباکتریایی (Srivastava, 1989) و ضدسرطانی (Sachin *et al.,* 2008; Aruna and Sivaramakrishnan, 1992) می‌باشد. اسانس این گیاه شامل ترکیباتی نظیر تانن، رزین، آلورن، سیمن، فلاندرن و کارون است. ماده اصلی تشکیل دهنده اسانس آلدهید کومینیک یا کومینول می‌باشد (Rezanezhad *et al.,* 2015).

تنش عبارت است از هر گونه تغییر در عوامل طبیعی نسبت به شرایط بهینه رشد گیاه که موجب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود. یکی از عوامل ایجاد تنش محیطی در گیاهان حضور فلزات سنگین در محیط رویش آن‌هاست که سبب تحریک سیستم دفاعی گیاهان می‌شوند (Hsieh *et al.,* 2002). از مهمترین عواملی که تنش اکسیداتیو را القا می نمایند، فلزات سنگین از قبیل کبالت، مس، نیکل، منگنز و نقره می باشند (Heller and Forkman, 1986). منگنز عنصر ضروری کم مصرفی است که از نظر وظایف بیوشیمیایی در گیاه شبیه منیزیم عمل می‌کند. هر دو یون منگنز و منیزیوم، ATP را با کمپلکس آنزیمی (فسفوکینازها و فسفو ترانسفرازها) پیوند می‌دهند، در حالی که پیوندی که توسط منگنز تشکیل می‌شود، با پیوندی که توسط منیزیم تشکیل می‌شود، کمی متفاوت است. دکربوکسیلازها و دهیدروژنازهای چرخه کربس نیز توسط منگنز فعال می‌شوند. تحقیقات نشان داده است فلزات از طریق ریشه از خاک جذب شده و به برگ منتقل می‌شوند. همچنین ممکن است به طور مستقیم از طریق برگ از هوا و یا بارش باران جذب گیاه شوند (Kord *et al.,* 2010). انباشت فلزات سنگین در خاک و گیاه اثرات منفی بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ساختاری گیاه گزاشته، سبب کاهش رشد، کلروز شدن، کاهش جذب مواد غذایی و نیز کاهش محصول، اختلال در متابولیسم گیاه و در گیاهان تثبیت کننده ازت، کاهش توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی می شوند (Guala *et al.,* 2010). در دسترس بودن فلزات علاوه بر غلظت کل آن، به فاکتورهای زیستی (مانند ترشحات ریشه و میکرواورگانیسم‌ها) و فیزیکو-شیمیایی خاک (مانند pH، رطوبت ماده آلی و نوع خاک) وابسته است (Manara, 2012). نوع واریته گیاه و نیز سن آن از عوامل موثر در جذب فلز در گیاهان می‌باشند. اغلب فلزات سنگین خاک در سطوح pH خنثی در دسترس هستند که در آن امکان جذب فلزات سنگین توسط گیاهان در خاک‌های جنگلی و کشاورزی فراهم می‌گردد (Guala *et al.,* 2010).

آلاینده های محیطی همچنین بر میزان ترکیبات فنلی گیاه تاثیر می‌گذارند (Michalak, 2006). ترکیبات فنلی جز ترکیباتی هستند که در تمام گیاهان شامل میوه‌جات، سبزیجات، غلات و غیره وجود دارند. این ترکیبات جز متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند (Taiz and Zeiger, 2002). به طور طبیعی بالغ بر ۸۰۰۰ ترکیب فنلی مختلف با تأثیرهایی از قبیل دخالت در ساخت دیواره‌ی سلولی، دخیل در مکانیسم دفاعی گیاه و دخیل در خصوصیات میوه مانند رنگ، عطر، طعم و مزه در گیاه وجود دارد. همچنین

ترکیبات فنلی به عنوان شاخص‌هایی برای مراحل فیزیولوژیکی در طول رشد میوه نیز در نظر گرفته می‌شوند (Macheix *et al.,* 1990). ترکیبات فنلی به عنوان سوبسترای آنزیم‌هایی مثل گایاکول پراکسیداز عمل می‌کنند. در این راستا گزارش شده است آنزیم گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی برای سم زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن استفاده می‌کند و یا به‌طور مستقیم با رادیکال‌های پراکسید هیدروژن وارد واکنش می‌شوند و به‌عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند. در هر دو حالت ذکر شده رادیکال‌های فنوکسیل تولید می‌شود که با اکسیداسیون آسکوربات احیا می‌شوند (Takahama and oniki, 1997). میزان متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی مانند فنول، فلاونوئید تام و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به عوامل متعددی از قبیل آب و هوا، گونه، روش استخراج و روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانی بستگی دارد (Kumar Gupta and Neelam., 2006).

فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و ضد التهاب آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Jamshid *et al.,* 2010). تنشهای محیطی با افزایش تولید انواع اکسیژن فعال و پروتئین‌ها DNA ، به بیومولکول‌های حیاتی نظیر لیپدها آسیب وارد می‌کنند. سلول‌های گیاهی جهت کاهش اثرات منفی انواع اکسیژن فعال تولید شده در سلول از سازوکارهای ویژه‌ای از جمله سیستمهای آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند. سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد، از جمله آنزیمها می‌توان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) را نام برد (Singh *et al.,* 1994). فعالیت این آنزیم‌ها از مهم‌ترین عوامل در مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی محسوب می‌شود. تحقیقات نشان داده است فلزات سنگین با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن موجب تنش اکسیداتیو و در نهایت تخریب لیپیدهای غشایی می‌گردند. سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی از جمله آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، یکی از مکانیسم‌های اصلی در سم زدایی فلزات سنگین در گیاهان می‌باشند (Liu *et al.,* 2006). در این مطالعه تأثیر محلولپاشی عنصر منگنز بر سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی (کاتالاز، گایاکل پر اکسیداز و آسکوربات) و غیر آنزیمی (فلاوونوئیدها و آنتوسیانین) زیره سبز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۴ انجام شد. بذرهای یک ژنوتیپ زراعی زیره سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد و در گلدان‌های حاوی خاک تقریباً سبک متشکل از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاه خاک و کود به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۲ شرایط کشت همراه با تیمار منگنز و بدون تیمار منگنز کشت شدند. پس از جوانه‌زنی جهت تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاه، تغذیه با محلول هوگلند انجام شد (Haogland and Arnon, 1950) به این صورت که پس از یک مرحله آبیاری با آب، مراحل بعدی با محلول هوگلند به میزان ۱۵ میلی‌متر در هر گلدان و تا رسیدن به مرحله گیاهچه‌ای در گیاه انجام شد. پس از رسیدن گیاه به مرحله گیاهچه‌ای (۲۱-۱۸ روزه)، منگنز با غلظت ۸۰ پی‌پی‌ام محلول‌پاشی گردید،

سپس بخش اندام هوایی گیاه در زمان‌های مختلف (شاهد، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) نمونه‌برداری شد و بررسی‌های آنزیمی و غیر آنزیمی روی نمونه‌ها انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیمی

تغییرات فعالیت متابولیت‌های آنزیمی شامل گایاکل پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز مورد مطالعه قرار گرفت. روش اندازه‌گیری آنتی اکسیدان‌ها در ابتدا با استخراج عصاره آنزیمی همراه بود، ۰/۲گرم از نمونه گیاهی وزن و سپس در هاون گذاشته شد و پس از اضافه شدن ۴ سی‌سی بافر ice-cold، در هاون کاملاً سائیده شدند تا به صورت همگن در آید. سپس از کاغذ صافی عبور داده شد و در ۱۶۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (AzevedoNeto *et al.*, 2006).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

میزان جذب عصاره حاصله در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. همچنین این کار پس از سپری شدن مدت زمان یک دقیقه نیز دوباره انجام شد و تغییرات جذب بدست آمده در زمان یک دقیقه به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $mM^{-1}cm^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی برحسب $m^{-1}mg^{-1}$ بیان شد (Beers and Sizer, 1952).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۹۰ نانومتر میزان جذب عصاره قرائت و پس از سپری شدن مدت زمان یک دقیقه نیز دوباره میزان جذب قرائت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش ($۲۶/۶ mM^{-1}cm^{-1}$) تقسیم شد و فعالیت آنزیمی بر حسب $m^{-1}mg^{-1}$ بیان شد (Nakano and Asada, 1981).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

میزان جذب عصاره حاصله در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. همچنین این کار پس از سپری شدن مدت زمان یک دقیقه نیز دوباره انجام شد، تغییرات جذب بدست آمده در زمان یک دقیقه به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $۲۶/۶ mM^{-1}cm^{-1}$ است، تقسیم شد و فعالیت آنزیمی برحسب $m^{-1}mg^{-1}$ بیان شد (Nakano and Asada, 1981).

بررسی فعالیت متابولیت‌های ثانویه (غیر آنزیمی)

فعالیت متابولیت‌های غیر آنزیمی این گیاه که شامل شامل محتوای فلاوونوئیدی و آنتوسیانین است، مورد مطالعه قرار گرفت.

سنجش محتوای فلاوونوئیدی

جهت اندازه‌گیری محتوای فلاوونوئیدی از روش (Krizek *et al.*, 1998) استفاده شد، میزان جذب عصاره توسط اسپکتروفتومتر (Varian, Carry50) در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ با ضریب خاموشی $x=3300mM^{-1}.cm^{-1}$ مورد استفاده قرار گرفت و بر حسب $\mu M/gf_w$ گزارش گردید.

سنجش محتوای آنتوسیانین

اندازه‌گیری آنتوسیانین با استفاده از روش (Krizek *et al.*, 1993) انجام شد. میزان جذب

نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده و از ضریب خاموشی $x=3300mM^{-1}.cm^{-1}$ استفاده شد و بر حسب $\mu M/gf_w$ گزارش شد. پس از اندازه‌گیری غلظت‌های مختلف، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها (روش دانکن) با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای ۵ فاکتور بررسی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله اثر تیمار برای کلیه فاکتورهای مورد بررسی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

آنزیم کاتالاز

با توجه به جدول ۲، اثر تیمار منگنز بر فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه شاهد و زمان‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود. فعالیت این آنزیم در نمونه شاهد بسیار کمتر از فعالیت آن در نمونه‌های تیمار شده با منگنز در زمان‌های مختلف بود. در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش افزایش فعالیت آنزیمی کاتالاز تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد داشت، که این افزایش فعالیت نشان دهنده‌ی تأثیر منگنز بر افزودن فعالیت آنزیمی کاتالاز در زمان اول نسبت به نمونه‌ی شاهد بود. در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش نیز میزان فعالیت آنزیم کاتالاز رو به افزایش بود و میانگین فعالیت آن نسبت به زمان اول سیر صعودی نشان داد، اما در ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش، فعالیت آنزیم کاتالاز روند کاهشی نشان داد و در زمان ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم کاتالاز به طور معنی‌داری نسبت به زمان سوم کاهش یافت. در نتیجه بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش ($۰/۰۱۳۵\ m^{-1}mg^{-1}$) مشاهده شد که افزایش ۱۲۵ درصدی نسبت به میزان شاهد داشت.

آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز در نمونه‌ی شاهد و زمان‌های مختلف تفاوت نشان داد (جدول ۲). در نمونه شاهد میزان فعالیت این آنزیم کمتر از زمان‌های مورد مطالعه بود. در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش فعالیت آنزیمی افزایش شدید و معنی‌داری داشت. در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از اعمال تنش میزان فعالیت آنزیم گایاکل پر

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس متابولیت‌های مورد مطالعه

Table 1- Analysis of variance of studied metabolites

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean Square				
		آنزیم کاتالاز Catalase ($m^{-1}mg^{-1}$)	آنزیم گایاکل پراکسیداز Guaiacol Peroxidase ($m^{-1}mg^{-1}$)	آنزیم آسکوربات Ascorbate Peroxidase ($m^{-1}mg^{-1}$)	آنتوسیانین Anthocyanin ($\mu M/gf_w$)	محتوی فلاوونوئید Flavonoids Amounts ($\mu M/gf_w$)
تیمار Treatment	4	0/005**	0/0009**	0/00006**	0/07**	0/01**
خطا Error	10	0/0001	0/00005	0/000001	0/0008	0/0005
ضریب تغییرات C.V%	-	0/81	4/41	2/55	0/28	0/11

** : اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

** Significantly different in 1%

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در گیاه زیره سبز

Table 2. Comparison of the studied traits in cum plant

زمان (ساعت) Time	آنزیم کاتالاز Catalase ($m^{-1}mg^{-1}$)	آنزیم گایاکل پراکسیداز Guaiacol Peroxidase ($m^{-1}mg^{-1}$)	آنزیم آسکوربات Ascorbate Peroxidase ($m^{-1}mg^{-1}$)	آنتوسیانین Anthocyanin ($\mu M/gf_w$)	محتوی فلاوونوئید Flavonoids Amounts ($\mu M/gf_w$)
Contorol	0.006 e	0.0019 e	0.0135 e	0.0421 d	0.7377 d
24	0.0125 c	0.0035 a	0.0185 d	0.0451 c	0.7378 c
48	0.0135 a	0.0025 b	0.0424 a	0.0544 a	0.9110 a
72	0.0128 b	0.0024 c	0.0306 c	0.0455 b	0.7754 b
96	0.0074 d	0.0021 d	0.0397 b	0.0379 e	0.5142 e

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیرمعنی‌دار بین آن‌هاست

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$)

اکسیداز نسبت به زمان اول سیر نزولی داشت و به طور معنی‌داری کاهش یافت. به طوری که در ۹۶ ساعت بعد میزان فعالیت آنزیمی نسبت به زمان‌های اول، دوم و سوم به کمترین مقدار رسید. فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بیشتری‌ن مقدار (۰/۰۰۳۵ $m^{-1}mg^{-1}$) افزایش ۸۸/۲۴ برابر نسبت به میزان شاهد و در نمونه‌ی شاهد کمترین مقدار (۰/۰۰۱۹ $m^{-1}mg^{-1}$) را نشان داد.

آنزیم آسکوربات

فعالیت آنزیم آسکوربات در نمونه‌ی شاهد از فعالیت آن در نمونه‌های تیمار شده با عنصر منگنز در زمان‌های متفاوت، کمتر بود (جدول ۲). در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش فعالیت این آنزیم نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. و در ۴۸ ساعت بعد فعالیت آنزیم آسکوربات بیشتر شد به طوری که بین زمان اول و زمان دوم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. فعالیت این آنزیم در ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش مجدد کاهش پیدا کرد. اما در ۹۶ ساعت بر خلاف سایر آنزیم‌های مورد مطالعه، فعالیت آنزیم آسکوربات افزایش داشت، در واقع زمان چهارم دارای فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به زمان سوم بود. در نتیجه این آنزیم کمترین میزان فعالیت خود را در نمونه شاهد به مقدار (۰/۰۱۵۳ $m^{-1}mg^{-1}$) و بیشترین میزان فعالیت خود را در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش (۰/۰۴۲۴ $m^{-1}mg^{-1}$) با افزایش ۱۷۷/۱۲ درصدی نسبت به میزان شاهد نشان داد.

سیستم دفاعی غیر آنزیمی

فعالیت آنتوسیانین

با توجه به جدول ۲ فعالیت آنتوسیانین در نمونه شاهد نسبت به۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، کمتر بود. در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش نسبت به زمان اول باز هم میزان آنتوسیانین افزایش داشت و به بیشترین مقدار رسید. اما در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت میزان فعالیت آن سیر نزولی داشت و کاهش یافت، به طوری‌که در زمان چهارم میزان فعالیت آنتوسیانین به کمترین مقدار رسید. در نتیجه بیشترین میزان فعالیت آنتوسیانین در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش (۰/۰۵۴۴ μM/gFw) و کمترین میزان آن، در ۹۶ ساعت پس از اعمال تنش (۰/۰۳۷۹ μM/gFw) مشاهده شد. لذا فعالیت آنتوسیانین در ۴۸ ساعت

پس از اعمال تنش ۴۳/۵۳ درصد نسبت به میزان شاهد افزایش داشت.

ترکیبات فلاونوئیدی

میزان ترکیبات فلاوونوئیدی در نمونه شاهد و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش متفاوت بود (جدول ۲)، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش فقط مقداری بسیار کمی به میزان ترکیبات فلاوونوئیدی افزوده شد. در ۴۸ ساعت بعد میزان ترکیبات فلاوونوئیدی به‌طور چشم‌گیری افزایش یافت و در زمان ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از اعمال تنش میزان این ترکیبات مجدداً کاهش یافت. لذا بیشترین و کمترین مقدار ترکیبات فلاوونوئیدی، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از اعمال تنش به ترتیب به مقدار (۰/۹۱۱۰ µM/gFw) و (۰/۵۱۴۲ µM/gFw) مشاهده شد که در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش ۷۷/۱۶ درصد نسبت به میزان شاهد افزایش نشان داد. شرایط تنش گیاه از جمله فلزات سنگین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تاثیر گذار است (Rezanezhad *et al.,* 2015). فلزهای سنگین، فلزهایی با چگالی بیشتر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب تعریف می‌شوند، در این میان ۵۳ عنصر از ۹۰ عنصر موجود در طبیعت فلزهای سنگین هستند (Hasan *et al.,* 2009). در میان فلزهای سنگین برخی از آن‌ها اهمیت زیستی (بیولوژیک) دارند که از آن‌ها ۱۷ عنصر سنگین با توجه به حلالیتشان در اکوسیستم برای یاخته‌های زنده قابل دسترس بوده و اهمیت زیستی بالایی دارند (Nies, 1999). از بین این فلزها آهن، مولیبدن و منگنز به عنوان ریز مغذی برای گیاه مهم هستند (Michalak, 2006). از سوی دیگر روی، نیکل، مس، کبالت، وانادیم و کروم از نظر سوخت و سازی عناصری با اهمیت زیستی متوسط هستند (Schutzenduble and polle, 2001). ولی ارسنیک، جیوه، کادمیم، سرب و بیسموت، از دسته ریزمغذی‌های ضروری برای موجود زنده نبوده و برای گیاهان و ریزموجودها سمی هستند (Peralta-videa *et al.,* 2009; Michalak, 2006).

با این حال غلظت بالای همه‌ی فلزها منجر به مهار رشد و نشانه‌های سمیت می‌شود (Schutzenduble and polle, 2001; Narula *et al.,* 2005). غلظت بالای فلزهای سنگین باعث ایجاد تنش اکسایشی در گیاه شده که از تاثیر زیان بار این تنش در گیاهان تولید رادیکال‌های مختلف اکسیژن واکنش‌گر است که به طور معمول با ایجاد آسیب‌های غشایی، فرایندهای یاخته‌ای مختلفی مانند رشد، فتوسنتز و غیره را دچار اختلال می‌کند (Sytar *et al.,* 2013). عناصر سنگین که الکترون‌های جفت شده در اوربیتال‌های خود دارند، بنابراین احتمال انتقال تک الکترون به اکسیژن را افزایش داده و به طور کلی تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر و بروز اکسایش را افزایش می‌دهند (Michalak, 2006). این عناصر مسیرهای سوخت و سازی را به‌ویژه در غشاء تیلاکوئیدی مختل کرده و منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن واکنش‌گر می‌شوند (Sytar *et al.,* 2013). تعادل بین تولید و پالایش اکسیژن واکنش‌گر (ROS) ممکن است بوسیله تنش‌های غیر زیستی متفاوتی مثل فلزهای سنگین بر هم بخورد. به هم خوردن تعادل منجر به افزایش ناگهانی سطح درون یاخته‌ای ROS شده که می‌تواند عامل اصلی آسیب به ساختار یاخته‌ای و تولید مالون دی آلدئید در نتیجه اکسایش لیپیدهای غشایی باشد (Sytar *et al.,* 2013). مطالعات نتایج متفاوتی را در مورد تاثیر تنش فلزات سنگین بر فعالیت آنزیم‌ها گزارش نموده‌اند. مشابه با نتایج

این پژوهش در مطالعه‌ای که روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز) در ریشه کاج اسکاتلندی تحت تنش کادمیم، انجام شد، مشاهده گردید که در ابتدا فعالیت این آنزیم‌ها مهار و سپس با افزایش غلظت کادمیوم، فعالیت آن‌ها بعد از چند ساعت افزایش و پس از مدتی دوباره کاهش یافت. در این راستا بیان شده است این تغییرات می‌تواند بعلت اتصال فلز به گروه‌های تیول آنزیم‌های حاوی تیول (کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز) و در نتیجه غیر فعال شدن آنزیم و مهار سیستم‌های درگیر در حذف هیدروژن پراکسیداز باشد (Schutzendubel *et al.,* 2001). Kubo و همکاران (۱۹۹۹) در پژوهشی بر روی گیاه آرابیدوپسیس مشاهده کردند که در بسیاری از تنش‌های محیطی فعالیت کاتالاز تاثیر معنی‌داری نداشت، اما فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به تنش‌های محیطی افزایش و تعدادی نیز کاهش نشان داد. در بررسی اثر سمیت مس بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه گوجه فرنگی، مشاهده شد که میزان فعالیت این آنزیم‌ها افزایش چشمگیری می‌یابد که احتمالا به عنوان پاسخ اولیه در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط مس می‌باشد (Martins and Mourato, 2006) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. Kubo و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند علت تفاوت در میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، وابسته به آستانه فعالیت آنزیم، میزان تنش و بافت مورد مطالعه می‌باشد. به دلیل دیگر وابستگی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، به سطحی از تنش می‌باشد که باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. همچنین به اندامی که در آن گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود نیز بستگی دارد (Kubo *et al.,* 1999). افزایش آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در چندین گیاه اتوتروف تحت تیمار با کادمیم، روی، سرب و آهن گزارش شده است (Pereira *et al.,* 2002; Foroozesh *et al.,* 2012; Prasad *et al.,* 1999; Rucinska *et al.,* 1999) که با نتایج اصل از این تحقیق که تحت تاثیر تنش منگنز فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان افزایش یافته است مطابقت دارد. آنزیم پراکسیداز در شرایط طبیعی و دفاع در برابر تنش های زیستی مسئول تخریب پراکسید هیدروژن است (Gill and Tuteja, 2010). دیده شده که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPOX)، در کاج نوئل *Picea abies* L. تحت تنش کادمیوم در آغاز افزایش نشان می دهد و ادامه تیمار با کادمیم باعث کاهش در فعالیت این آنزیم می‌شود (Radotic *et al.,* 2000) که نتایج این پژوهش نتایج حاصل از این تحقیق را تأیید می نماید. میزان متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی مانند فنول، فلاونوئید تام و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به عوامل متعددی از قبیل آب و هوا، گونه، روش استخراج و روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانی بستگی دارد (Kumar Gupta and Neelam., 2006). فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و ضد التهاب آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Jamshid *et al.,* 2010). در تمامی گیاهان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد. فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی با وزن مولکولی پائین می‌باشند که اسکلت پایه ساختار آنها از ۳ حلقه بنزنی و یک گروه هیدروکسیل

تشکیل شده است. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که فلاونوئیدها ملکول‌های چند نقشی می‌باشند و صفات مفید زیادی را برای سازگاری به گیاه تولیدکننده آن‌ها می‌بخشند. عصاره نعناع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بالایی دارد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را نشان می‌دهد (Swetie *et al.,* 2007). تنشهای محیطی با افزایش تولید انواع اکسیژن فعال و پروتئین‌ها DNA، به بیومولکول‌های حیاتی نظیر لیپدها آسیب وارد می‌کنند. سلول های گیاهی جهت کاهش اثرات منفی انواع اکسیژن فعال تولید شده در سلول از سازوکارهای ویژه‌ای از جمله سیستمهای آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند. فلاونوئیدها از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در تنش‌های محیطی با افزایش فعالیت آنزیم PAL تولید آن‌ها افزاش می‌یابد (Myung-M *et al.,* 2009) که نتایج این مطالعه را تایید می نماید. مطالعات انجام شده نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را به عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (Razali *et al.,* 2008; Vogt, 2010).

گیاهان به طور طبیعی دستگاه فتوسنتزی خود را از آسیب ناشی از جذب نور مازاد به وسیله کاهش جذب فوتون و یا افزایش توان اتلاف انرژی جذب شده حفاظت می‌کنند. برای این کار گیاهان راه‌کارهای مختلفی را نشان می‌دهند که از جمله آنها می‌توان به تغییرات مورفولوژیکی و ساختاری، انباشتگی رنگدانه‌های غیر فتوسنتزی مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (Edreva, 2005)، عملکرد چرخه گزانتوفیل (Muller *et al.,* 2001) و مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (Mittler, 2002) اشاره کرد. تحقیقات نشان داده است که وجود نقص در هر یک از مسیرهای آنتی‌اکسیدان، موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه آسیب اکسیداتیو شده و عملکرد فیزیولوژیکی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Zimmermann and Zentgraf, 2005). در حالت کلی، القاء سنتز آنتوسیانین‌ها در بافت‌های گیاهی تحت تنش های مختلف گزارش شده است (Steyn *et al.,* 2002) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. آنتوسیانین در پاسخ به تعدادی تنش ها از جمله تنش عنصر سنگین افزایش می‌یابد، این احتمال وجود دارد که این ترکیب به عنوان یک ناقل فلز سنگین به واکوئل عمل کند. همچنین کادمیوم می‌تواند سنتز آنزیم گلوتاتیون-s-ترانسفراز (GST) (Gluthathion-S-transferase) که آنزیم کلیدی در آخرین مرحله بیوسنتز آنتوسیانین است را تحریک کند و از این طریق موجب افزایش سنتز آنتوسیانین شود. افزایش در مقدار انتوسیانین به گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند و سبب از بین بردن رادیکال آزاد اکسیژن می‌شود. نتایج مشابه در گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی (Seprdouli and Moustakas, 2012) و در گیاه انگور تحت شرایط دمایی پایین (Romero *et al.,* 2008) مشاهده شدند. نتایج نشان داد که افزایش میزان آنتوسیانین در بافت گیاه، پیری را می‌تواند به تاخیر اندازد (Mansouri, 2012). در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که تنش منگنز محتوی فلاوونوئید کل و آنتوسیانین و فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی و غیر آنزیمی در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش مشاهده شد. از مجموع نتایج

چنین استنباط شد که افزایش محتوی فلاوونوئید و آنتوسیانین، بعد از اعمال تنش، نتیجه اعمال تنش اکسیداتیو حاصل از جذب عنصر منگنز و فعال شدن سیستم آنتی اکسیدان گیاه می‌باشد.

نتیجه گیری

در اثر تنش منگنز محتوی فلاوونوئید کل، آنتوسیانین و فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان نسبت به گروه شاهد افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی و غیر آنزیمی در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش مشاهده شد. آنزیم گایاکول پروکسیداز در ۲۴ ساعت اول بیشترین میزان فعالیت آنزیمی و در ۹۶ ساعت بعد از اعمال تنش منگنز کمترین میزان فعالیت را نشان داد. با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، منگنز به دلیل القا تنش اکسیداتیو و افزایش رادیکال آزاد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه زیره سبز می‌شود.

REFERENCES

Aruna, K. and Sivaramakrishnan, V.M. 1992 .Anticarcinogenic effects of some Indian plant products. *Food Chem Toxicol*. 30(11): 953-956.

AzvedoNeto, A.D., Prico, J.T., Eneas-Filho, J., Braga de Abreu, C.E. and Gomes-Filho. E. 2006. Effect of salt stress on anti-oxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt- tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environment Express Botany*. 56:235-241.

Beers, R.F. and Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biogical Chemistry*. 195: 133-140.

Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Flowering Plants. Columbia University Press, NY, p. 1262.

Edreva, A. 2005. The importance of nonphotosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106(2): 135-146.

Foroozesh, P., Bahmani, R., Pazouki, A., asgharzadeh, A. and rahimdabbagh, S. 2012. Effect of cadmium stress on antioxidant enzymes activity in different bean genotypes. ARPN *Journal of Agricultural and Biological Science*. 7(5): 351-356.

Gill, S.S and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(12): 909-930.

Guala, S.D., Vega, F.A. and Covelo, E.F. 2010. The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. *Ecological Modelling*. 221(8):1148-1152.

Haogland, D.R. and Arnon, O.I. 1950. The water culture method of growing plant without soil. *Calif Agriculture Express.* 347:1-32.

Hasan, S.A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S. and Ahmad, A. 2009. Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *Journal of environmental physiology*. 30(2): 165-174.

Heller, W. and Forkmann, G. 1986. Biosynthesis of flavonoids, in The Flavonoid Advances in Research, Harborne, J.B., Ed. Chapman and Hall, London, p. 499.

Hsieh, T.H. Lee, T.T. Charge, Y. Y. and Chan, M.T. 2002 .How to define resistance to water deficit stress? *Plant physiology*, 130: 618-626.

Jamshidi, M., Ahmadi, H.R., Rezazadeh, S.H., Fathi, F. and Mazanderani, M. 2010. Study on phenolicd and anioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. *Medic Plan.* 9(34) 177-183.

Kord, B., Mataji, A. and Babaie, S. 2010. Pine

(Pinus eldarica Medw.) needles as indicator for heavy metals pollution. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7(1):79-84.

Krizek, D.T., Britz, S.J. and mire cki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solaruv-a and UV-B radiation on growth of CV, new red Fire Lettuce. *Physiology Plant*. 103: 1-7.

Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. 1999.Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*. 112(3): 279-290.

Kumar Gupta, A., and Neelam, M. 2006. Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of chamomile capitula in paracetamol intoxicated albino rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(1): 17-20.

Macheix, J.J., Fleurient, A. and Billot, J. 1990. Phenolic compounds in fruit processing. In *Fruit Phenolic*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 295–342.

Manara, A. 2012. Plant responses to heavy metal toxicity. In: *Plants and heavy metals*. Springer, pp 27-53.

Mansouri, H. 2012 .Salicylic acid and sodium nitroprusside improve postharvest life of chrysanthemums scientia. *Journal of Horticulturae*. 145: 29-33.

Michalak, A. 2006**.** Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15(4): 523-530.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7(9): 405-410.

Muller, P., Li, X.P. and Niyogi, K. 2001. Non- photochemical quenching a response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125(4): 1558-1566.

Myung-M, H., Trick, H.N. and Rajasheka, E.B. 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*. 166:180-191.

Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen Peroxids is scavenged loyascorbate–specific Peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22(5): 867-880.

Narula, A., Kumar, S. and Srivastava, P.S. 2005. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. *Plant Cell Reports*. 24(4): 250-254.

Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51(6): 730-750.

Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G. and Gardea-Torresdey, J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 41(8-9): 1665-1677.

Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in Crotalaria juncea. *Plant and Soil*. 239(1): 123-132.

Prasad, K.V., Saradhi, P.P. and Sharmila, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea. *Environmental and Exprimental Botany*. 42(1): 1-10.

Radotic, K., Ducic, T. and Mutavdic, D. 2000. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Exprimental Botany*. 44(2): 105-113.

Razali, N., Razab, R., Mat Junit, S. and Abdulaziz, A. 2008. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry*. 111: 38–44.

Rezanezhad, F., Gholipour, Z., Oloumi, H. and Manochehri Kalantari, K.H. 2015. Structural reaction of leaves of two species of pine (Pinus nigra and P. eldarica) to heavy metals. *Journal of Plant Research*, Acceptance

of Printing.

Romero, I., Sanchez-Ballesta, M. T., Maldonado, R., Escribano, M. I. and Merodio, C. 2008. Anthocyanin, antioxidant activity and stress-induced gene expression in high CO2-treated table grapes stored at low temperature. *Journal of Plant Physiology*. 165: 522-530.

Rucinska, R., Waplak, S. and Gwźdz, E. A. 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemisty*. 37(3): 187-194.

Sachin, B.S., Sharma, S.C., Sethi, S., Tasduq, S.A. and Tikoo, M.K. 2007. Herbal modulation ofdrug bioavailability: enhancement of rifampicin levels in plasma by herbal products and a flavonoid glycoside derived from cymum. *Phytother Res.* 21(2): 157-163.

Schutzendubel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrizatio. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. and Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology.* 127(3): 887-898.

Singh, K.B., Malhotra, R.S., Halila, M.H., Halila, M.H., Kinghts E.J. and Verma, M.M. 1994. Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 73:137-149.

Sperdouli, I. and Moustakas, M. 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. *Journal of Plant Physiology.* 169: 577-585.

Srivastava, K.C. 1989. Extracts from two frequently consumed spices–cum (Cumum cymum) and turmeric (Curcuma longa)—inhibit platelet aggregation and alter eicosanoid biosynthesis inhuman blood platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 37:57–64.

Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M. and Jacobs, G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*. 155(3): 349-361.

Swetie, R., Raesh, C.H. and Arun, S. 2007. Antioxidant potential of mt (*Mentha spicata* L.) in radiation processed lamb meat. *Food Chemistry*. 100(2): 451-458.

Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzaka, K. and Prasad, M.N.V. 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35(4): 985-999.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. Plant Physiology, 3rd edition. p. 690.

Takahama, U. and Oniki, T. 1997. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum*. 101 (4):845-852.

Thippeswamy, N.B. and Akhilender Naidu, K. 2005. Antioxidant potency of cum varieties (cumblack cum and bitter cum) on antioxidant systems. *Eur Food Res Technol.* 220(5-6): 472-476.

Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosyntesis. *Molecular Plant*. 3: 2-20.

Zimmermann, P. and Zentgraf, U. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 10(3): 515-534.

Survey on enzymatic activation rate and secondary metabolites of cum (*Cuminum cyminum*) under manganese stress

Leila Fahmideh[1]*, Najibeh Mahmoodi[2]

1- Assistant Professor of Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran
2- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran

*Corresponding Author Email: *l.fahmideh@uoz.ac.ir*

Receive: Febuary 4, 2017; Revise: June 26, 2017; Accept: September 16, 2017

ABSTRACT

Secondary metabolites are a diverse group of molecules that help to compatibility of plants especially in face of stress. Flavonoids and anthocyanins are parts of these compounds. In this study, effect of manganese (concentration of 80 ppm) on enzymatic and non-enzymatic activity rates of cum, 18-21 days after germination, was measured at 4 different times of 0 (control), 24, 48, 72 and 92 hours after stress applying. All of the experiments were performed with 3 independent replications and completely randomized design. Analysis of variance and comparison of means were done using SAS after measurement of different concentrations. Due to manganese stress, content of total flavonoid and anthocyanin and activity of some antioxidant enzymes increased significantly compared to control, as the most enzymatic and non-enzymatic activity rates were observed 48 hours after stress applying. Guaiacol peroxides enzyme showed the most and the least activity rates 24 hours (88.24% higher than control) and 96 hours after stress, respectively. Total results showed that increased flavonoid and anthocyanin after stress applying were consequences of oxidative stress originating from manganese absorption and activation of plant antioxidant system.

Keywords: *Antioxidant; Cum; Micronutrient; Secondary metabolites*

How to cite this article
Fahmideh L, Mahmodi N, Moslemi H. Survey on Enzymatic Activation Rate and Secondary Metabolites of Cum (Cumum cymum) under Manganese Stress. J Crop Sci Res Arid Reg, 2017; 1(2):191-203. DOI: 10.22034/csrar.01.02.06

COPYRIGHTS
Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the CSRAR Journal.
The content of this article is distributed under CSRAR open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0) License. For more information, please visit http://cropscience.uoz.ac.ir/?lang=en.