مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوم، شماره اول، (پیاپی۳) بهار ۱۳۸۹، صفحه ۳۴-۲۵
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۹/۳۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۲/۰۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۲/۱۳

تغییرات بیوشیمیایی میزان ترپنوئیدهای موجود در اسانس گیاه دارویی نعناع سبز (*Mentha spicata* L.) در پاسخ به تیمار مقدار اضافی روی (Zn)

سعید زارع ده‌آبادی*، زهرا اسرار[1]، میترا مهربانی [2]
[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران
[2] مرکز تحقیقات فارماسوتیکس، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

چکیده

عنصر روی نقش‌های ساختاری و عملکردی فراوانی را در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاهان بر عهده دارد، ولی مقدار اضافی آن در خاک‌ها به عنوان فلز سنگین، یک فاکتور محدودکننده رشد برای گیاهان محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت بالای گیاه نعناع در زمینه‌های دارویی و صنعتی، در این تحقیق اثر غلظت‌های متفاوت روی بر این گیاه مطالعه شد. نمونه‌های گیاهی در اتاقک رشد با شرایط کاملاً استاندارد و تحت تیمار غلظت‌های مختلف عنصر روی تا رسیدن به مرحله گلدهی کامل نگهداری شدند. از دستگاه کلونجر به منظور استخراج اسانس و از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-Mass) برای شناسایی ترکیبات اسانس استفاده شد. در بررسی‌های بیوشیمیایی انجام شده در این تحقیق مشخص گردید، قسمت اعظم اسانس گیاه نعناع سبز را ترکیبات مونوترپنی تشکیل می‌دهند و سزکوئی ترپن‌ها درصد کمتری از مواد موجود در اسانس را به خود اختصاص می‌دهند. همچنین، مقایسه میزان ترکیبات ترپنی نشان داد، تیمار گیاه نعناع با عنصر روی موجب کاهش میزان مونوترپن‌های اکسیژنه موجود در اسانس شده، ولی مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه را افزایش داده است. مقدار کلی مونوترپن‌ها با افزایش کاربرد روی در محلول غذایی افزایش، ولی مقدار سزکوئی‌ترپن‌ها- اعم از اکسیژنه و هیدروکربنه- در همه نسبت‌های فلز روی کاهش یافت. به‌طور کلی، از نتایج به‌دست آمده چنین برمی‌آید که، مقدار مونوترپن‌های اکسیژنه در مقایسه با سزکوئی‌ترپن‌ها بیشتر تحت تاثیر تیمار عنصر روی قرار گرفته و کاهش آن چشمگیرتر است و این ممکن است به‌دلیل تغییرات بیوانرژتیک سلول‌های گیاه نعناع سبز در پاسخ به تنش فلز سنگین روی باشد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فرار، مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها، نعناع سبز، روی

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: biescholar_85@yahoo.com، شماره تماس: ۰۹۱۳۲۵۷۲۶۳۵

مقدمه

تولید و میزان مواد مؤثره گیاهان دارویی، به عنوان یک متغیر تحت تأثیر بسیاری از عوامل محیطی قرار می‌گیرد. کشف و دستیابی عوامل مؤثر در جهت افزایش خواص دارویی و میزان مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی، همواره مد نظر متخصصان صنایع داروسازی بوده است. از جمله این موارد می‌توان به نقش تغذیه و کودهای شیمیایی بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان اشاره کرد (نیاکان و همکاران، ۱۳۷۹). از آنجا که گیاه مورد استفاده در این تحقیق یک محصول کشاورزی مهم است که از نظر اسانس و ترکیبات دارویی حائز اهمیت است و از طرف دیگر، عنصر غذایی روی به عنوان کوفاکتور در فعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارد، در این پژوهش تأثیرات عنصر روی بر تغییرات میزان اسانس در گیاه نعناع سبز بررسی گردید.

نعناع از جمله گیاهانی است که به علت اهمیت اقتصادی و دارویی آن توجه بیشتر محققان را به خود جلب نموده تا از طریق شناخت عوامل مؤثر بر کمیت و کیفیت اسانس بازدهی این گیاه دارویی را افزایش دهند (زرگری، ۱۳۷۶). نعناع خوراکی (*Mentha spicata* L.) متعلق به خانواده (Lamiaceae (Labiateae، گیاهی است چند ساله، علفی، پایا، با ساقه‌های چهار گوش و برگ‌های متقابل و دندانه‌دارکه پوشیده از کرک و بدون دمبرگ هستند. گل‌ها به صورت سنبله‌های باریک و نوک‌دار، سیستم ریشه‌ای خزنده است و تکثیر گیاه معمولا از طریق ساقه‌های زیر زمینی یا ریزوم‌ها صورت می‌گیرد. گیاه نعناع در خاک‌های شنی اسیدی رشد بهتری داشته، شرایط نوری متوسط و رطوبت بالای خاک را ترجیح می‌دهد (امیدبیگی، ۱۳۷۶). بخش‌های هوایی گیاه، به خصوص برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار آن معطر بوده، مصارف صنعتی و دارویی فراوانی دارد (میرزا و همکاران، ۱۳۷۵). از اسانس این گیاه نیز در زمینه تهیه لوازم آرایشی، تهیه داروهای مسکن در درمان تب، سردرد، سرماخوردگی و غیره و در صنایع غذایی به عنوان طعم‌دهنده غذاها و شیرینی‌جات استفاده می‌شود (Diaz-Marota *et al*,. 2003).

غلظت عناصر میکرو و فلزات سنگین در خاک، یکی از معیارهای اساسی در تولید ترکیبات دارویی موجود در گیاهان تازه کشت شده است. این نشان‌دهنده این حقیقت است که، مقدار جذب و ورود آنها متناسب با غلظت بوده، در بیوسنتز ترکیبات دارویی تأثیر زیادی دارند (Weckx and Clijsters, 1997). عنصر روی (Zn) در مقدار کم به عنوان یک ریزمغذی ضروری برای رشد و نمو گیاهان بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش دارد. این فلز به عنوان فعال‌کننده و کوفاکتور برخی آنزیم‌های حیاتی گیاه از جمله کربونیک انیدرازها، دهیدروژنازها، آلکالین فسفاتازها، فسفولیپازها و RNA پلیمرازها در متابولیسم پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین به عنوان یک هورمون محرک رشد ایفای نقش می‌کند، در حالی که همین عنصر در غلظت‌های بالا به عنوان یک فلز سنگین، موجب اختلالات متابولیکی و در نهایت، بازدارندگی رشد در اکثر گونه‌های گیاهی می‌شود (Rout and Das, 2003).

فلزات سنگین اغلب در قالب آلاینده‌های محیطی، از جمله آلودگی‌های جوی مراکز صنعتی، استفاده افراطی از کودهای کشاورزی و فاضلاب‌های شهری و صنعتی به صورت برگشت‌ناپذیر وارد خاک می‌شوند (Rout and

(Das, 2003. گونه‌های مختلف گیاهی در برابر آلودگی خاک با فلزات سنگین واکنش‌های متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. برخی از گونه‌های گیاهی به مقدار معینی از فلزات سنگین در خاک مقاوم بوده، توانایی جذب و تثبیت آنها در بافت‌های درونی خود را دارند. گاه در برخی از گیاهان آثار مسمومیت چندان بارز نیست، ولی میزان محتوی فلزی موجود در گیاه سلامت انسان و یا دام‌هایی را که از آن تغذیه می‌کنند، به خطر می‌اندازد (Arduini *et al*., 1994).

پژوهش‌های بسیاری پیرامون مقدار و نوع ترکیبات اسانس موجود درگیاهان دارویی در پاسخ به عوامل محیطی مختلف صورت گرفته است. تأثیر زمان‌های مختلف برداشت بر محصول و ترکیبات اسانس نعناع سبز توسط Kizil و Toncer (۲۰۰۶) بررسی گردید. این محققان پیشنهاد کردند، بیشترین میزان رشد و اسانس‌دهی زمانی است که گیاه در مرحله گلدهی کامل باشد. در پژوهش، برخی محققان اثر نحوه خشک کردن بر کیفیت و کمیت اسانس گیاه نعناع سبز را بررسی نموده، دریافتند، خشک کردن به روش فریز درای (Freeze Drying) بازدهی بیشتری داشته، خسارت کمتری به ترکیبات موجود در اسانس وارد می‌کند (Diaz-Marota *et al*., 2003). با این وصف، در این روش میزان ترپن‌های اکسیژنه و سزکوئی‌ترپن‌ها کاهش می‌یابد. در این پژوهش نیز با توجه به نقش بالای عنصر روی در مسیرهای متابولیسمی سنتز ترکیبات دارویی در گیاه نعناع سبز (خوراکی)، تأثیر غلظت‌های مختلف عنصر روی بر تغییرات ترپنوئیدهای اسانس این گیاه بررسی گردید.

مواد وروش‌ها

کشت گلدانی

برای اطمینان از یکسان بودن شرایط گیاه اولیه همه ریزوم‌ها از یک گیاه مادری جدا شدند. بستر کشت ورمیکولیت برای کشت گلدانی گیاهان انتخاب گردید. ریزوم‌های نعناع سبز (اسپرمینت) پس از شستشو با آب مقطر به گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴×۱۲ سانتی‌متر حاوی ورمیکولیت منتقل شدند. در هر گلدان ۴ عدد ریزوم با طول ۴ سانتی‌متر قرار گرفته، گلدان‌ها در اتاق رشد با شرایط کنترل شده تحت دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/نور)، دوره دمایی ۲۸/۱۸ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و رطوبت نسبی ۶۰-۵۰ درصد نگهداری شدند. در طول دو هفته اول گلدان‌ها با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند با pH تقریبی ۱± ۵/۷ آبیاری گردیدند. سپس برای تهیه محلول‌های تیمار (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار)، بسته به تیمار مورد نظر از استوک‌های تهیه شده برای روی (Zn) به مقدار مناسب به محلول غذایی پایه اضافه نموده، هفته‌ای ۲ مرتبه استفاده گردید. تیمار صفر از روی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. منظور از غلظت صفر به عنوان شاهد، این است که در مقایسه با محلول‌های تیمار هیچ یونی اضافه نشده است، در حالی که، مقدار پایه فلز روی در هوگلند در همه محلول‌ها وجود دارد. در فواصل بین تیمارها به منظور مرطوب نگه داشتن بستر خاک و ممانعت از تجمع بیش از حد نمک در گلدان‌ها از آب مقطر استفاده می‌گردید. پس از ۲۰ هفته پارامترهای مورد نظر در نمونه‌های گیاهی مورد سنجش قرار گرفتند.

اسانس‌گیری و شناسایی ترکیبات فرار گیاه

در این تحقیق، برای مطالعه دقیق ترکیبات اسانس نعناع از نمونه گیاهی تازه استفاده گردید. از دستگاه کلونجر (Clevenger) مدل BP جدید با سوپاپ اضافی مطابق با روش تقطیر با آب برای استخراج اسانس استفاده شد (امیدبیگی، ۱۳۷۶). برای شناسایی ترکیبات موجود در اسانس گیاه، اجزای متشکله اسانس گیاه به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Shimadzu-QP5050 متصل به طیف سنج جرمی مدل Shimadzu-QP5050 بررسی شدند. در تجزیه اسانس توسط دستگاه GC-Mass به دلیل شباهت طیف جرمی بسیاری از ترکیبات ترپنی موجود در اسانس و همچنین در اثر مشابهت بسیار ساختمانی و شکست‌های متنوع و بازآیی بعد از یونیزاسیون، استفاده تنها از طیف جرمی برای شناسایی هر یک از اجزای اسانس دقت کافی را نخواهد داشت. به همین دلیل، برای افزایش دقت در شناسایی ترکیبات همراه با طیف جرمی از ارزش بازداری نسبی (اندیس کواتس) جهت صحه گذاشتن بر شناسایی توسط طیف جرمی استفاده شد. اندیس کواتس یا بازداری برای هیدروکربن نرمال، ۱۰۰ برابر عدد اتم کربن آن است و به ستون و یا شرایط مورد استفاده در آنالیز بستگی ندارد. با استفاده از رابطهٔ زیر می‌توان اندیس بازداری یا عدد کواتس هر یک از اجزای جدا شده را محاسبه نمود:

$$RI_x = 100i\frac{\log(t_s)_x - \log(t_s)_z}{\log(t_s)_{(z+i)} - \log(t_s)_z} + 100z$$

(x = ضریب بازداری جسم مورد نظر، (ts)x = زمان بازداری جسم مورد نظر بر حسب ثانیه، (ts)z = زمان بازداری آلکان قبل از جسم مورد نظر برحسب ثانیه، (ts)z+i = زمان بازداری آلکان بعد از جسم مورد نظر برحسب ثانیه، i = تفاوت تعداد کربن دو آلکان پشت سرهم (معمولاً یک است)، z = تعداد کربن آلکان قبل از جسم مورد نظر)

آنالیز آماری

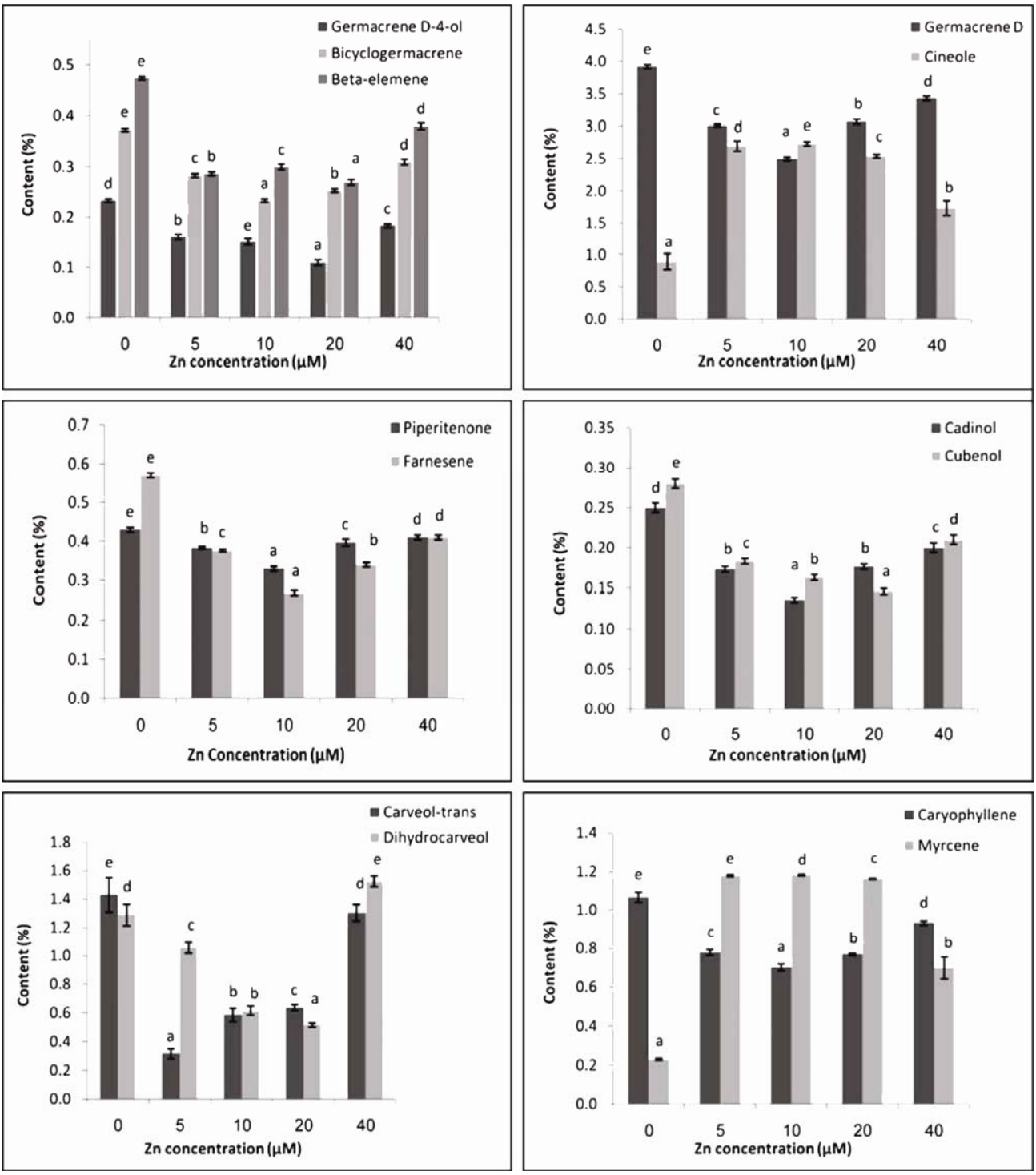
این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، آزمون ANOVA و نرم‌افزار MSTAT-C صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج

تغییرات میزان ترکیبات اسانس در نسبت‌های مختلف روی

از آنالیز اسانس در دستگاه GC-Mass حدوداً ۲۴ ترکیب شناسایی گردید که از میان آنها به ترتیب کارون، لیمونن و ژرماکرن، کاروئول و کاریوفیلن، مهمترین و فراوانترین اعضای تشکیل‌دهنده اسانس بودند (جدول ۱). مقدار ژرماکرن در اسانس با افزایش غلظت روی رو به کاهش رفت. بیشترین مقدار این ترکیب در گیاه شاهد و کمترین مقدار آن در غلظت ۲۰ میکرومولار روی مشاهده شد. بر اساس نتایج، بیشترین مقدار کاریوفیلن در گیاه شاهد با ۱/۰۹ درصد و کمترین مقدار آن در تیمار ۱۰ میکرومولار روی با ۰/۶۷ درصد بود. مقدار ۱و۸- سینئول در گیاهان تیمارشده با روی در مقایسه با گیاه شاهد افزایش نشان داد. کمترین مقدار آن در گیاه شاهد با ۰/۷۱ درصد و بیشترین مقدار آن در غلظت ۱۰ میکرومولار روی با ۲/۷۳ درصد بود. ترکیب میرسن در تیمار پایین روی رو به افزایش رفت، ولی در غلظت ۴۰ میکرومولار از مقدار آن کاسته شد. بیشترین مقدار این ترکیب در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار روی بود. مقدار کاروئول و دهیدروکاروئول در اسانس با افزایش غلظت روی در

محلول آبیاری کاهش یافت، به طوری‌که بیشترین مقدار این ترکیبات درگیاه شاهد به ترتیب با ۱/۷۸ و ۱/۴۳ درصد وکمترین مقدارآنها درتیمار ۲۰ میکرومولار به ترتیب با ۰/۵۸ و ۰/۵۲ درصد بود (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه ترکیبات موجود در اسانس برگ و سرشاخه‌های گل‌دار گیاه نعناع سبز تحت تیمار غلظت‌های مختلف عنصر روی ($p<0.05$)

جدول ۱- مقایسه ترکیبات اسانس گیاه *M. spicata* در نسبت‌های مختلف عنصر روی (Zn)

(زمان بازداری: RT، اندیس کواتس استاندارد: KI، اندیس کواتس به دست آمده: RI)

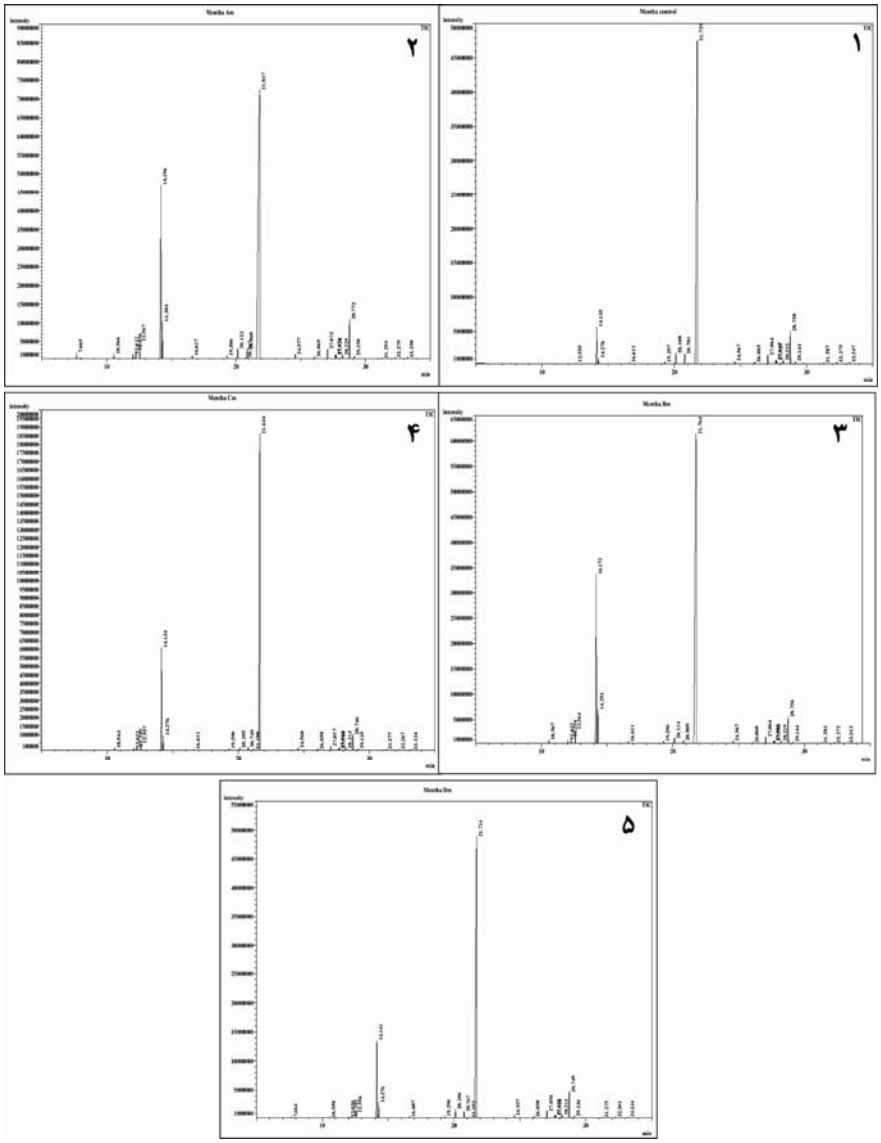
Compound	Retention Index (DB5 column)	Zinc concentration in treatments											
		0 µM		5 µM		10 µM		20 µM		40 µM			
HEXENOL<3Z->	859	a	0.0025±0.00250	c	0.5025±0.00250	a	0.0075±0.00479	a	0.0025±0.00250	b	0.2150±0.00250		
PINENE<ALPHA->	939	a	0.0075±0.00479	d	0.3925±0.00250	c	0.3775±0.00629	e	0.5025±0.00629	b	0.2100±0.00010		
SABINENE	975	a	0.0025±0.00250	c	0.4125±0.00250	d	0.4275±0.00479	e	0.4450±0.00289	b	0.2600±0.00010		
PINENE<BETA->	979	a	0.0025±0.00250	e	0.6425±0.00250	c	0.6475±0.00479	d	0.7325±0.00479	b	0.4125±0.00250		
MYRCENE	991	a	0.2150±0.00500	d	1.1775±0.00250	d	1.1700±0.00577	c	1.1600±0.00577	b	0.8025±0.00250		
LIMONENE	1029	a	3.9375±0.00250	e	17.5075±0.00250	c	16.7750±0.00500	d	17.1700±0.0001	b	10.1375±0.00250		
CINEOLE <1,8->	1031	a	0.7075±0.00250	d	2.6875±0.00250	e	2.7225±0.00479	c	2.5475±0.04922	b	1.9875±0.00250		
LINALOOL	1097	b	0.2475±0.00250	d	0.2675±0.00250	c	0.2625±0.00629	a	0.2125±0.00408	c	0.2575±0.00250		
BORNEOL	1169	b	0.3025±0.00250	c	0.3125±0.00250	d	0.3175±0.00629	a	0.2800±0.00408	c	0.3125±0.00250		
DIHYDROCARVEOL<NEO->	1194	d	1.4325±0.00250	c	0.9925±0.00250	b	0.5975±0.00479	a	0.5200±0.00408	e	1.4525±0.00250		
CARVEOL <TRANS->	1217	e	1.7825±0.00250	a	0.2625±0.00250	b	0.5775±0.00408	c	0.6025±0.00250	d	1.2325±0.00250		
CARVEOL <CIS->	1229	a	0.0025±0.00250	d	1.0325±0.00250	a	0.0075±0.00479	c	0.2825±0.00250	b	0.2225±0.00250		
CARVONE	1243	e	82.7075±0.00250	a	67.4075±0.00250	c	70.7225±0.00479	b	69.21500±0.0050	d	75.2150±0.00500		
PIPERITENONE	1343	e	0.4275±0.00250	b	0.3875±0.00250	a	0.3325±0.00629	c	0.4000±0.0001	c	0.4000±0.0001		
ELEMENE<BETA->	1391	e	0.4775±0.00250	b	0.2875±0.00250	c	0.2925±0.00479	a	0.2675±0.00250	d	0.3875±0.00250		
CARYOPHYLLENE<E->	1419	e	1.0875±0.00250	c	0.7975±0.00250	a	0.6725±0.00629	b	0.7575±0.00250	d	0.9525±0.00250		
FARNESENE<(Z)-BETA->	1433	e	0.5725±0.00250	c	0.3725±0.00250	a	0.2675±0.00629	b	0.3325±0.00250	d	0.4025±0.00250		
MUUROLA-3,5-DIENE<CIS->	1450	e	0.4625±0.00250	b	0.3725±0.00250	a	0.3675±0.00479	d	0.4225±0.00250	c	0.4125±0.00250		
MURROLA-4(14),5-DIENE<CIS->	1467	e	0.5125±0.00250	b	0.3625±0.00250	a	0.2975±0.00629	c	0.4075±0.00479	d	0.4300±0.00408		
GERMACRENE D	1485	e	3.9725±0.00250	c	3.0125±0.00250	a	2.4650±0.00289	b	3.0500±0.0500	d	3.3925±0.00250		
BICYCLOGERMACRENE	1500	e	0.3775±0.00250	c	0.2875±0.00250	a	0.2325±0.00479	b	0.2525±0.00500	d	0.3050±0.00500		
GERMACRENE D-4-OL	1576	d	0.2375±0.00250	b	0.1625±0.00250	b	0.1600±0.00408	a	0.1075±0.00250	c	0.1775±0.00250		
CUBENOL<1,10-DI-EPI->	1619	e	0.2750±0.00289	c	0.1850±0.00500	b	0.1600±0.00707	a	0.1475±0.00250	d	0.2125±0.00750		
CADINOL<ALPHA->	1654	d	0.2475±0.00250	b	0.1750±0.00500	a	0.1400±0.00408	b	0.1825±0.00250	c	0.2100±0.00010		

تغییرات مقدار ترپن‌های موجود در اسانس در پاسخ به تیمار روی

مقایسه میزان ترکیبات ترپنی موجود در اسانس در نسبت‌های مختلف روی نشان می‌دهد، تیمار گیاه با عنصر روی موجب کاهش میزان مونوترپن‌های اکسیژنه موجود در اسانس شده، ولی مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه موجود در اسانس را افزایش می‌دهد؛ بدین صورت که، مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه از ۴/۱۴ درصد در گیاه شاهد به ۲۰/۰۱ درصد در نسبت ۴۰ میکرومولار روی افزایش یافته، ولی مقدار مونوترپن‌های اکسیژنه از ۸۷/۶۱ درصد در گیاه شاهد به مقدار ۷۴/۱۱ درصد در تیمار ۴۰ میکرومولار کاهش نشان داده است. این در حالی است که، مقدار کل مونوترپن‌ها با افزایش کاربرد روی در محلول غذایی به طور غیر معنی‌داری افزایش داشته است. مقدار کلی سزکوئی‌ترپن‌ها- اعم از هیدروکربنه و اکسیژنه- در همه نسبت‌های فلز روی کاهش نشان داده است (جدول ۲ و شکل ۲).

جدول ۲- مقایسه مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها در اسانس گیاه نعناع تحت تیمار روی (درصد ترکیبات)

Compounds of essential oil	Zinc concentration in treatments				
	0 µM	5 µM	10 µM	20 µM	40 µM
Hydrocarbonate Monoterpenes	4.14	20.13	19.39	11.55	20.01
Oxygenate Monoterpenes	87.61	73.85	75.54	81.08	74.11
Total Monoterpenes	91.75	93.98	94.93	92.63	94.12
Hydrocarbonate Sesquiterpenes	3.11	2.19	1.9	2.58	2.18
Oxygenate Sesquiterpenes	5.12	3.83	3.17	4.31	3.7
Total Sesquiterpenes	8.23	6.02	5.07	6.89	5.88



شکل ۲- طیف GC-Mass اسانس گیاه نعناع (*M. spicata*) در نمونه شاهد (۱)، نمونه تیمار ۵ میکرومولار روی (۲)، نمونه تیمار ۱۰ میکرومولار روی (۳)، نمونه تیمار ۲۰ میکرومولار روی (۴)، نمونه تیمار ۴۰ میکرومولار روی (۵)

نتیجه‌گیری و بحث

شرایط استفاده شده برای رشد نعناع در این تحقیق به منظور به دست آوردن غلظت بهینه فلز روی برای رشد مناسب گیاه و مطالعه میزان تطابق این گیاه دارویی در معرض غلظت‌های بالای فلز روی بود. کارون با نام کامل ۲-متیل ۵- متیل اتیل ۲- سیکلوهگزان به عنوان یک مونوترپن اکسیژن‌دار حلقوی فراوانترین و مهمترین ترکیب موجود در اسانس گیاه اسپرمینت است (Akhila *et al.*, 2001).

در بررسی‌های انجام شده در این پژوهش مشخص گردید که قسمت اعظم اسانس گیاه نعناع سبز را ترکیبات مونوترپنی تشکیل می‌دهند و سزکوئی‌ترپن‌ها درصد کمتری از مواد موجود در اسانس را به خود اختصاص می‌دهند (جدول ۲). بر اساس گزارش‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها کمتر از ۲ درصد از مواد مؤثره اسانس نعناع را تشکیل می‌دهند، در حالی که، مونوترپن‌ها بیش از ۹۸ درصد از این ترکیبات را شامل می‌شوند (Croteau *et al.*, 1972). نتایج تحقیق حاضر نشان داد، میزان ترکیبات مونوترپنی اسانس در مقایسه با ترکیبات سزکوئی‌ترپنی به میزان بیشتری در اثر تیمار روی کاهش یافته است.

مطالعه پیرامون انباشتگی مواد مؤثره اسانس تحت شرایط کاهش اکسیژن و نیز بازدارنده متابولیکی نشان داده است که بخشی از مسیر بیوسنتز ترکیبات اسانس یک فرآیند غیرهوازی بوده که در سازش با محدودیت اکسیژن رخ می‌دهد (Croteau *et al.*, 1972). در بررسی تریکوم‌های غده‌ای ترشح‌کننده اسانس در نعناع، یک نوع سازگاری از نظر تماس با اتمسفر دیده می‌شود. بنابراین، بیوسنتز ترکیبات ترپنی در مرحله‌ای از مسیر به انرژی حاصل از فرآیند تخمیر نیاز دارد و کاهش در عملکرد میتوکندری و محدودیت فتوسنتز بر اثر برخی از تنش‌های محیطی، از جمله حضور فلزات سنگین در خاک منجر به کاهش انرژی در دسترس گیاه و تغییر در مسیرهای بیوسنتز این ترکیبات فرار می‌شود (Dudareva *et al.*, 2004). گزارش شده است، جایگاه بیوسنتز مونوترپن‌ها در مقایسه با سزکوئی‌ترپن‌ها بر اثر تنش بیشتر دچار کاهش انرژی شده، خسارت بیشتری می‌بیند (Turner and Croteau, 2004).

این موضوع به طور دقیق به اثبات رسیده است که، تنش فلز سنگین روی منجر به تخریب ساختار میتوکندری و راندمان فتوسنتز و در نتیجه کاهش محتوای انرژی در گیاهان می‌شود (Bonnet *et al.*, 2000). فلز روی از طریق تأثیر بر میزان جذب و جابه‌جایی عناصر ضروری و نیز اثر بر میزان فعالیت برخی از آنزیم‌ها در جایگاه عملکردشان موجب اختلال در متابولیسم گیاهان می‌شود. دستگاه فتوسنتزی در دو بخش فتوشیمیایی و تثبیت کربن در مقابل فلزات سنگین آسیب‌پذیر است. در مورد بخش نوری فتوسیستم II نسبت فتوسیستم I آسیب‌پذیرتر است. مکانیسم اثر تخریبی فلز روی بر دستگاه فتوسنتزی به صورت جانشینی فلز سنگین در ساختار کلروفیل است که به صورت Zn-Chls در می‌آید. فلز روی به جای منیزیم در ساختار کلروفیل قرار می‌گیرد. در نتیجه عملکرد صحیح آنتن کمپلکس جمع‌آوری‌کننده نور (LHCs) دچار اختلال می‌شود. جایگزینی عنصر روی به جای منیزیم اجازه باند شدن کلروفیل را به لیگاندهای مهم نمی‌دهد و در نتیجه، ساختار فضایی مناسب کمپلکس کلروفیل- پروتئین ایجاد نمی‌شود (Rout and Das, 2003). دلیل دیگر اینکه کلروفیل تغییر یافته Zn-Chls در حالت تحریک شده، الکترونی بسیار ناپایدار است و به سرعت به حالت آرامش می‌رسد؛ به طوری که در محیط آزمایشگاهی فلورسانس

انجام نیافته، درشرایط طبیعی هم نمی‌تواند الکترون‌هایی به مرکز واکنش بفرستد و فتوسنتز مهار می‌شود (Candan and Tarhan, 2003).

بنابراین، کاهش بیشتر ترکیبات مونوترپنی به ویژه مونوترپن‌های اکسیژنه نسبت به سزکوئی ترپن‌ها در این تحقیق ممکن است به دلیل تغییرات بیوانرژتیک سلول در پاسخ به فلزسنگین روی باشد و به نظر می‌رسد یکی از دلایل اختلاف در مقدار و نوع برخی از مواد مؤثره در اسانس گیاه مورد آزمایش مربوط به اختلاف جایگاه‌های بیوسنتزی ترکیبات ازنظر بهره‌گیری از اکسیژن و منابع انرژی باشد. به طورکلی، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مقدار کلی مونوترپن‌های اکسیژنه درمقایسه با سزکوئی‌ترپن‌ها بیشتر تحت تأثیر عنصر روی قرار گرفته، کاهش آنها چشمگیرتر است.

منابع

امیدبیگی، ر. (۱۳۷۶) رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات طراحان نشر، تهران، ایران.

زرگری، ع. (۱۳۷۶) گیاهان دارویی. جلد پنجم. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران.

میرزا، م.، سفیدکن، ف. و احمدی، ل. (۱۳۷۵) اسانس‌های طبیعی؛ استخراج، شناسایی کمی و کیفی و کاربرد آنها، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ایران.

نیاکان، م.، خاوری‌نژاد، ر. و رضایی، م. ب. (۱۳۷۹) بررسی اثر کودهای ازت، فسفر و پتاس بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه نعناع (*Menthe piperata* L.). پایان‌نامه دکتری زیست‌شناسی، علوم گیاهی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج ، ایران.

Akhila, A., Banthorpe, D. V. and Rowan, M. G. (2001) Biosynthesis of carvone in *Mentha spicata*. Phytochemistry 19: 1433-1437.

Arduini, I., Godbold, D. A. and Onnis, A. (1994) Cadmium and Copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedling. Physiologia Plantarum 92: 675–680.

Bonnet, M., Camares, O. and Veisseire, P. (2000) Effects of zinc and influence of acremonium lolii on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*lolium perenne* L. cv Apollo) Experimental Botany 51: 945-953.

Candan, N. and Tarhan, L. (2003) Change in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn–stressed *Mentha pulegium*. Turkish Journal of Chemistry 27: 21-30.

Croteau, R., Burbott, A. J. and Lommis, W. D. (1972) Biosynthesis of mono and sesquiterpenes in peppermint from glucose-C_{14} and CO_2. Photochemistry 11: 2459-2462.

Diaz-Marota, M. C., Perez-Coello, M. S., Gonzalez-Vinas, M. A. and Cabezudo, M. D. (2003) Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). Agricultural and Food Chemistry 51: 1265-1269.

Dudareva, N., Picheresky, E. and Gershenzon, J. (2004) Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiology 134: 1893-1902.

Kizil, S. and Tonçer, O. (2006) Influence of different harvest times on the yield and oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L. var. spicata). Food Agricultural Environment 4: 135-137.

Rout, G. R. and Das, P. (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism; Zinc. Agronomy Journal 23: 3-11.

Turner, G. W. and Croteau, R. (2004) Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*: Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. Plant Physiology 136: 4215-4227.

Weckx, J. E. J. and Clijsters, H. M. M. (1997) Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of phaseolus vulgaris. Plant Physiology 35: 405-410.

Biochemical changes in terpenoid compounds of *Mentha spicata* essential oils in response to excess zinc supply

[*] Saeid Zare Dehabadi, [1] Zahra Asrar and [2] Mitra Mehrabani

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran
[2] Pharmaceutics Research Center, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Iran

Abstract

Zinc plays an important role in many structural and biochemical functions in plants. However, excess amount of this element as heavy metal is one of the limiting factors for plants. Spearmints were grown in green house at nutrient solution containing different concentration of zinc until the flowering stage. The essential oils from fresh spearmint samples were isolated by water distillation (clevenger) and analyzed by gas chromatograph-mass spectrophotometer (GC-Mass). In this research, results indicated that, monoterpenes were major parts of essential oils in *M. spicata* and low percent of these compounds were sesquiterpenes. In comparative investigation, content of oxygenate monoterpenes decreased with employing zinc in nutrient solution but, hydrocarbonate monoterpene contents of essence were increased. Total monoterpene contents of essence increased significantly by zinc treatment. However, with increasing Zn concentration, sesquiterpene contents such as hydocarbonates and oxygenates reduced gradually. It was concluded that, total oxygenate monoterpenes were more affected by Zn treatment and its reduction was remarkable. This could be due to bioenergetical changes in plant cells in response to heavy metal stress.

Key words: Essential oil, Monoterpenes, Sesquiterpenes, *Mentha spicata*, Zinc

* Corresponding Author: bioscholar_85@yahoo.com