زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال پنجم، شماره هجدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۶۷-۸۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۲/۰۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۴/۳۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۵/۱۲

بررسی تغییرات میزان برخی متابولیت‌های گیاهچه شیرین‌بیان در تیمار اکسید مس و اکسید روی

راضیه سلطانی‌نژاد [۱]، رؤیا رضوی‌زاده [۱]* و حکیمه علومی [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۳۶۹۷ - ۱۹۳۹۵، تهران، ایران
[۲] گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

چکیده

گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی در ایران است که از متابولیت‌های ثانویه موجود در ریشه این گیاه در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود. با کاربرد فلزات سنگین به عنوان الیسیتور (عوامل محرک) می‌توان تولید متابولیت ثانویه در گیاه را افزایش داد. در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس و اکسید روی بر محتوای قندهای احیا کننده (به عنوان پیش‌ساز متابولیت‌های ثانویه)، پرولین، گلیسیریزین، ترکیبات فنلی کل، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها در گیاهچه شیرین‌بیان بررسی شد. همچنین، همبستگی بین محتوای این متابولیت‌ها در گیاهچه‌های تیمارشده با استفاده از آزمون پیرسون مطالعه شد. میزان قندهای احیا کننده در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید روی کاهش یافت، در حالی که میزان پرولین و گلیسیریزین درگیاهچه‌های تحت تیمارهای ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس و ۱ میکرومولار اکسید روی نسبت به گیاه شاهد افزایش یافت. محتوای ترکیبات فنلی کل نیز با افزایش غلظت اکسید مس افزایش یافت. بیشترین مقدار فلاونوئید، در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس مشاهده شد. محتوای آنتوسیانین‌ها در غلظت ۱ میکرومولار اکسید مس افزایش یافت. همچنین، محتوای تانن‌ها در گیاهچه‌های شیرین‌بیان در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید روی افزایش یافت. بر اساس نتایج به نظر می‌رسد که در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس، میزان گلیسیریزین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها به طور درخور توجهی افزایش می‌یابد در حالی که اکسید روی تأثیر درخور توجهی بر میزان این متابولیت‌ها نداشت.

واژه‌های کلیدی: اکسید روی، اکسید مس، ترکیبات فنلی، شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، گلیسیریزین

مقدمه

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) گیاهی از تیره باقلائیان (Fabaceae)، بومی شمال‌شرق اروپا و جنوب‌غرب آسیا از جمله ایران است. ریشه‌های این گیاه منابع با ارزشی از مواد شیمیایی مفید مانند متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها را دارند که در صنعت

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: razavi.roya@gmail.com، شماره تماس: ۰۳۳۱۲۷۲۷۱۲۱

داروسازی و صنایع غذایی کاربرد دارند (Irani *et al.*, 2010). مهم‌ترین ترکیبات آن گلیسیریزین و ترکیبات فنلی هستند (Shibata, 2000). قندهای احیا کننده می‌توانند در مسیر پنتوزفسفات‌اکسیداتیو سنتز به عنوان پیش‌سازهایی برای تولید متابولیت ثانویه در گیاهان استفاده شوند (Vincenzo *et al.*, 2005). آنزیم β-آمیرین‌سنتاز، آنزیم کلیدی برای سنتز ساپونین‌تری‌ترپنوئیدهاست. گلیسیریزین نوعی ساپونین‌تری‌ترپنوئید است که از طریق مسیر موالونیک اسید سنتز می‌شود (Shibuya *et al.*, 2009)، در حالی که ترکیبات فنلی از طریق مسیر شیکمیک اسید سنتز می‌شوند (Michalak, 2006).

فلزات سنگین گروهی از عناصر هستند که وزن مولکولی بالاتر از ۵ gcm^{-3} دارند. برخی از این فلزات ریزمغذی‌های ضروری برای رشد گیاه هستند که در واکنش های اکسایش-کاهش، انتقال الکترون و سایر فرآیندهای متابولیک مهم گیاه نقش دارند. این فلزات در غلظت بالا برای گیاه سمیّت ایجاد می‌کنند (Michalak, 2006). ورود این آلاینده‌ها به محیط از طریق فعالیت های شهری، عملیات کشاورزی و صنعتی است (Clemens, 2001). فلزات سنگین فرآیندهای فیزیولوژیک مانند: تنفس، فتوسنتز، طویل شدن سلول، روابط آبی گیاه، متابولیسم نیتروژن و تغذیه معدنی گیاه را مهار می‌کنند (Zornoza *et al.*, 2002). مس عنصری کم‌مصرف، اما ضروری برای تمام گیاهان عالی است (Patcikka *et al.*, 2002). این عنصر در سطح سلولی ترکیب ساختاری و کاتالیتیک بسیاری از آنزیم ها و پروتئین هایی است که در برخی از مسیرهای متابولیکی درگیر هستند (Pilon *et al.*, 2006). مس نقش‌های متابولیکی فراوانی در گیاه دارد و در فرآیندهای تنفس و فتوسنتز ایفای نقش می کند. زمانی که غلظت آن در خاک از سطح بسیار اندک (۵۰ میکرومولار) تجاوز کند به شدت سمّی می‌شود (Berglund *et al.*, 2000). روی نیز عنصری ضروری برای رشدونمو گیاهان بوده، در بسیاری از فرآیند های متابولیک گیاه نقش دارد. این فلز فعال کننده و کوفاکتور برخی از آنزیم های حیاتی گیاه از جمله: کربونیک‌انیدرازها، دهیدروژنازها، آلکالین‌فسفاتازها، فسفولیپازها و RNAپلی‌مرازها در متابولیسم پروتئین ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین است (Rion and Alloway, 2004).

گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد تولید متابولیت‌های ثانویه را می‌توان با کاربرد محرک‌های زیستی و غیر زیستی مثل فلزات سنگین افزایش داد در این راستا، Tumova و Polivkova (۲۰۰۶) افزایش مقدار فلاونوئید توسط فلزات نقره و کروم در گیاه *Ononis arvensis* را گزارش کردند. همچنین، Bota و Deliu (۲۰۱۱) افزایش مقدار فلاونوئید توسط فلز مس را در گیاه *Digitalis lanata* گزارش کردند. Diaz و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که استفاده از فلز مس در گیاه *Capsicum annum* L. به افزایش میزان ترکیبات فنلی در این گیاه منجر می‌شود. فلز روی باعث افزایش اسانس در گیاه *Matricaria chamomilla* شده است (Nasiri *et al.*, 2010). Shabani و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که تولید گلیسیریزین در گیاه شیرین‌بیان با استفاده از الیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در شرایط کشت در شیشه افزایش می‌یابد. همچنین،

Winida و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که متیل جاسمونات افزایش تولید گلیسیریزین در ریشه‌های مویین گیاه شیرین‌بیان را تحریک می‌کند.

گیاه شیرین‌بیان از گیاهان مهم دارویی ایران محسوب می‌شود که با تولید تری‌ترپن گلیسیریزین در ریشه‌های خود، از دیرباز توجه پژوهشگران را به خود معطوف داشته است و از آنجا که ویژگی‌های درمانی گیاهان دارویی اغلب ناشی از تجمع متابولیت‌های ثانویه در آنهاست، نیاز به پژوهش بیشتر برای شناسایی و بررسی مکانیسم‌های مؤثر بر افزایش تولید این مواد مؤثره وجود دارد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی عکس‌العمل گیاهچه‌های شیرین‌بیان در پاسخ به تنش‌های فلزات سنگین مس و روی در تولید گلیسیریزین و سایر متابولیت‌ها از جمله قندهای احیاکننده، پرولین، ترکیبات فنلی کل، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها و رسیدن به دانش بیشتری درباره مکانیسم‌های دفاعی و تغییرات فیزیولوژیک این گیاه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها پس از ضدعفونی شدن (۲۰ دقیقه در سولفوریک اسید ۱۰۰ درصد، سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل، ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد) در ظروف شیشه‌ای با ۳ تکرار حاوی محیط‌کشت جامد آگار ۰/۸ درصد و محلول غذایی هوگلند کامل تحت تیمارهای اکسید روی و اکسید مس در غلظت‌های صفر، ۱ و ۱۰ میکرومولار کشت شدند (در ظروف شیشه‌ای اتوکلاو شده) بذرهای کشت شده در شرایط طبیعی گلخانه و فتوپریود ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور با شدت نور ۱۴ کیلو لوکس نگهداری شد. دمای گلخانه در حدود ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتیگراد تنظیم شد. برای سنجش ترکیبات مورد نظر از گیاهچه‌های کامل (شامل اندام هوایی و ریشه) ۲۱ روزه حاصل از کشت بذرها استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای قندهای احیا کننده

میزان قندهای احیا کننده در گیاهچه با روش Nelson-Somogyi (۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۰۲ گرم بافت تر گیاهچه در ۱۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر ساییده شد. سپس، محتوای هاون به بشر کوچکی منتقل شد. به محض آن که به نقطه جوش رسید، حرارت قطع و محتوای بشر با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و عصاره گیاهی به دست آمد. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد، غلظت قندهای احیا کننده بر حسب میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوای پرولین

محتوای پرولین با روش Bates و همکاران(۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۰۱ گرم بافت تازه گیاهچه در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد ساییده و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل 2028R، شرکت Napco، ساخت آمریکا) شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر استیک اسید و ۱ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد آب گرم قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها در حمام آب یخ قرار گرفت و ۲ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه شد تا دو لایه مجزا تشکیل شود. از لایه رنگی بالایی که حاوی تولوئن و پرولین است برای سنجش استفاده شد و جذب با دستگاه

اسپکتروفتومتر (مدل Cary 50، شرکت Varian، ساخت استرالیا) در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری محتوای گلیسیریزین

برای سنجش میزان گلیسیریزین بر اساس روش تغییر یافته Jeffry و همکاران (۱۹۸۳) و Mukhopadhyay و Panja (۲۰۰۸) به ۰/۵ گرم بافت خشک گیاهچه شیرین‌بیان، ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر افزوده شد و محلول به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۵ بار اتوکلاو شد. پس از خنک شدن، به محلول حاصل قطره قطره سولفوریک اسید غلیظ ۹۵ درصد اضافه شد تا گلیسریزیک اسید به تدریج رسوب نماید. پس از جدا کردن محتویات فوقانی رسوب به منظور حذف باقیمانده اسید، به آن آب و اتانول به نسبت (۱ به ۱) اضافه و توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن آب و اتانول از بخش فوقانی، رسوب به دست آمده در آون در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک شد (Mukhopadhyay and Panja, 2008). سپس، به این ترکیب ۳ میلی‌لیتر متانول افزوده شد تا به شکل محلول در آید و شدت جذب در طول موج ۲۵۴ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-visible خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت گلیسریزین محاسبه شد. برای رسم منحنی استاندارد مقدار ۱۰ میلی‌گرم از پودر نمک آمونیوم گلیسریزیک‌اسید با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بنابراین، محلول استانداردی با غلظت یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر تهیه شد (Shabani *et al.*, 2009). سپس، از این محلول استانداردهایی با غلظت‌های ۱۰/۵، ۲۱، ۴۲، ۸۳ و ۱۶۷میلی‌گرم در لیتر تهیه شدند و شدت جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌های گیاهی در طول موج ۲۴۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد و منحنی جذب بر حسب غلظت رسم شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی مقدار ۰/۱گرم از بافت تازه گیاهچه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و با آب دوبار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-visible خوانده شد (Soland and Lima, 1999). برای محاسبه غلظت ترکیبات فنلی از منحنی استاندارد استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گالیک اسید تهیه شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های استاندارد در لوله آزمایش ریخته شد. سایر مراحل مشابه با نمونه‌های مجهول انجام شد. پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت ترکیبات فنلی نمونه‌ها تعیین شد.

اندازه‌گیری فلاونوئیدها

برای سنجش میزان فلاونوئیدها مقدار ۰/۱گرم وزن تر گیاهچه در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵ درصد و استیک اسید گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) ساییده و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شد و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی در حمام آب‌گرم با دمای ۸۰ درجه

سانتیگراد حرارت داده شد. سپس، شدت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر از اتانول اسیدی به عنوان شاهد استفاده شد. مقایسه میزان این ترکیبات بر اساس شدت جذب خوانده شده در این طول موج‌ها انجام شد (Krizek *et al.*, 1988).

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین

برای سنجش میزان آنتوسیانین‌ها، ۰/۱ گرم برگ تر گیاهچه با دقت وزن شد و با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (الکل متیلیک ۹۹/۵ درصد و کلریدریک اسید خالص به نسبت ۹۹ به ۱) به خوبی ساییده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی دیگر به آن اضافه شد (حجم نهایی محلول با متانول اسیدی به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد). عصاره حاصل به لوله آزمایش درپیچ‌دار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و از محلول رویی برای خواندن شدت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-visible استفاده شد (Wanger, 1979). برای تعیین غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی معادل $۳۳۰۰۰\ mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد. برای محاسبه غلظت از رابطه $A=\varepsilon bc$ استفاده شد. در این رابطه: A = میزان جذب خوانده شده در طول موج ۵۵۰ نانومتر، ε= ضریب خاموشی، b = عرض کووت (۱ سانتی‌متر) و c = غلظت بر حسب میلی‌مولار است.

اندازه‌گیری میزان تانن

برای اندازه‌گیری محتوای تانن‌ها از روش Luthar و Kreft (۱۹۹۹) استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه گیاهچه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۵ میلی‌لیتر معرف وانیلین (وانیلین ۱ درصد، کلریدریک اسید ۸ درصد با نسبت ۵۰:۵۰ در متانول) حل و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس، شدت جذب هر نمونه در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج

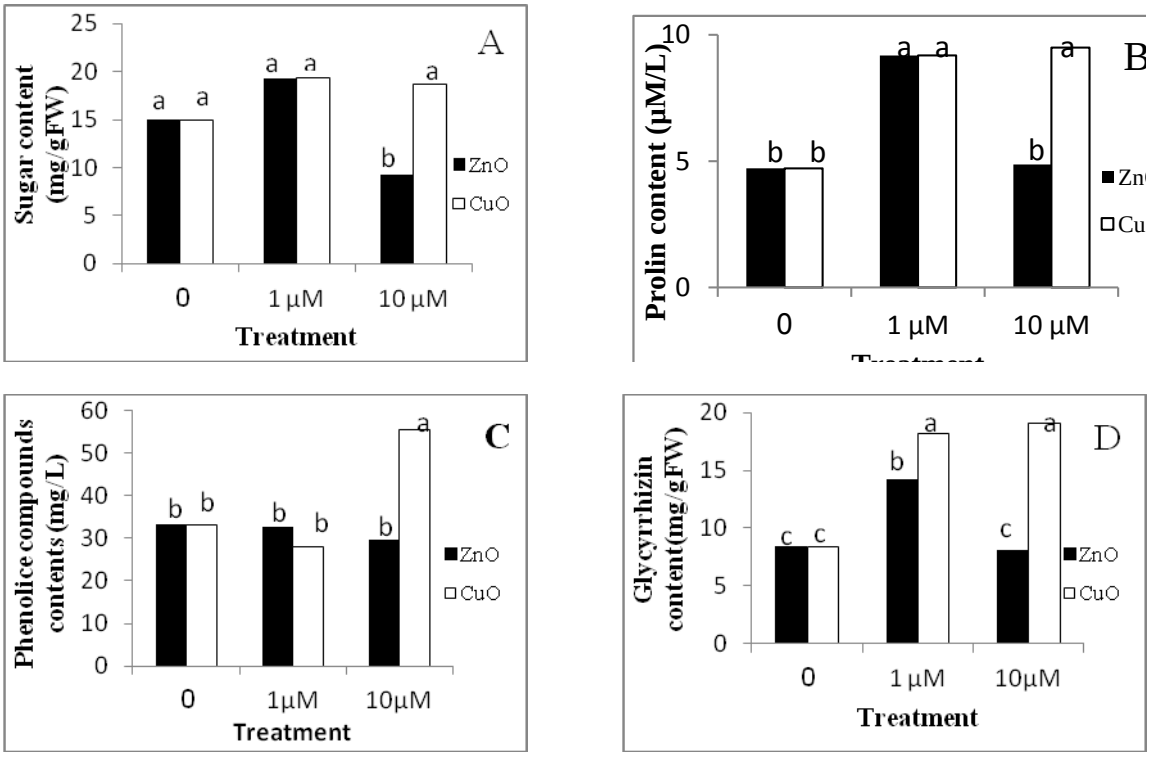
نتایج تجزیه واریانس حاصل از تأثیر اکسید روی و اکسید مس بر میزان متابولیت‌های گیاهچه‌های شیرین‌بیان نشان داد که میزان قندهای احیا کننده، پرولین، گلیسیریزین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و محتوای آنتوسیانین‌های گیاهچه‌ها تحت تأثیر تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۱).

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد میزان قندهای احیا کننده گیاهچه‌های تیمار شده با اکسید مس و اکسید روی در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید روی نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌داری داشته است (شکل ۱-A، جدول ۲). این در حالی است که محتوای پرولین و گلیسیریزین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس و ۱ میکرومولار اکسید روی نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داده است (به ترتیب شکل‌های ۱-B و ۱-D و جدول ۲). میزان ترکیبات فنلی کل گیاهچه‌ها در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید مس نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۱-C، جدول ۲). همچنین، میزان فلاونوئیدها در طول موج ۳۰۰ نانومتر و میزان آنتوسیانین‌ها در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری نشان

داد (به ترتیب شکل‌های ۲-B و ۲-D، جدول ۲). میزان تانن نیز در غلظت ۱ میکرومولار اکسید روی نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲-E، جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمار اکسید روی و اکسید مس بر میزان متابولیت‌های گیاهچه شیرین‌بیان. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است.* و ** به ترتیب در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار است.

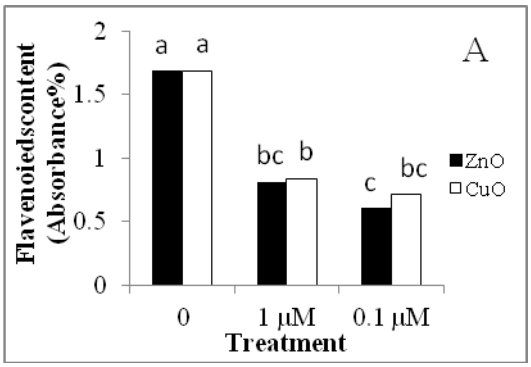
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
میزان قند احیا کننده ($mgg^{-1}FW$)	۴	۵۵/۹۷۹**
میزان پرولین (μML^{-1})	۴	۱۸/۴۵۹**
میزان گلیسریزین ($mgg^{-1}FW$)	۴	۸۰/۸۱۹**
شدت جذب فلاونوئیدها (۲۷۰nm)	۴	۰/۵۵۷**
شدت جذب فلاونوئیدها (۳۰۰nm)	۴	۰/۰۶۳**
شدت جذب فلاونوئیدها (۳۳۰nm)	۴	۰/۰۲۶**
میزان ترکیبات فنلی (mg/L)	۴	۱۸۴/۰۱۹**
میزان آنتوسیانین‌ها (nM)	۴	۰/۰۰۷**
میزان تانن‌ها (A%)	۴	۰/۰۰۵**

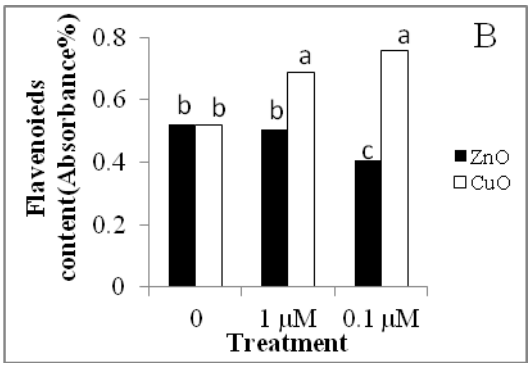


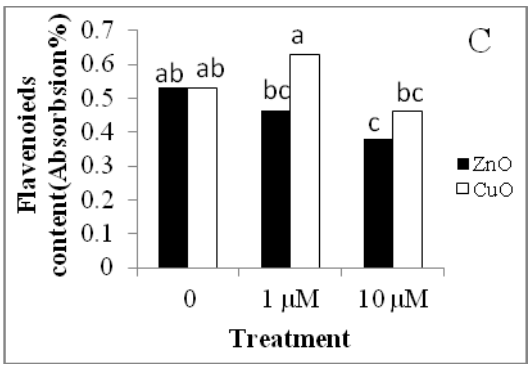
شکل ۱- اثر اکسید روی و اکسید مس بر محتوای قند احیا کننده. A) پرولین، B) ترکیبات فنلی، C) گلیسریزین، D) در گیاهچه شیرین‌بیان. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

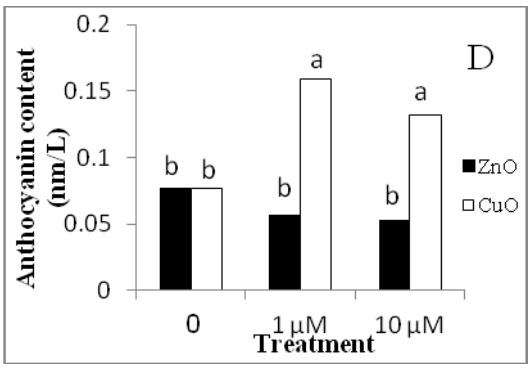
جدول ۲- تأثیر اکسید روی و اکسید مس بر میزان متابولیت‌های گیاهچه شیرین‌بیان. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

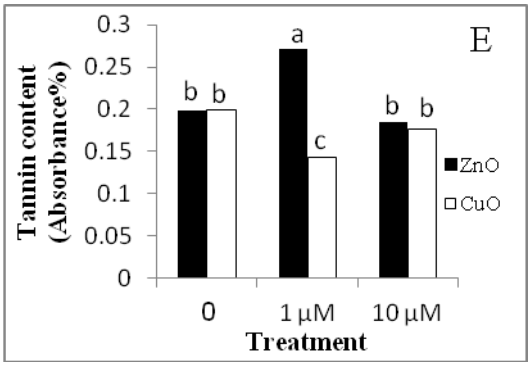
تیمار		میزان قند احیا کننده ($mgg^{-1}FW$)	میزان پرولین (μML^{-1})	میزان گلیسیریزین ($mgg^{-1}FW$)	میزان ترکیبات فنلی (mg/L)	شدت جذب فلاونوئیدها ۲۷۰nm	۳۰۰nm	۳۳۰nm	میزان آنتوسیانین‌ها (nM)	میزان تانن‌ها (A%)
شاهد		۱۵/۰۱±۱/۱۷^{a}	۴/۷۱±۰/۱۷^{b}	۸/۴۱±۱/۳۲^{c}	۵۲/۲۸±۲/۴۲^{b}	۱/۶۸±۰/۱۰^{a}	۰/۵۲±۰/۰۲^{b}	۰/۵۳±۰/۰۵^{ab}	۰/۰۷±۰/۰۰۲^{b}	۰/۱۹±۰۰۰^{b}
اکسید مس	۱ µM	۱۹/۲۳ ±۱/۱۷ ^{a}	۹/۱۸±۰/۴۴ ^{a}	۱۸/۱۶±۰/۹۳^{a}	۱۲/۰۸±۰/۵۷^{b}	۰/۸۶±۰/۰۵^{b}	۰/۶۹±۰/۰۱^{a}	۰/۶۳±۰/۰۰۶^{a}	۰/۱۵±۰/۰۱۹^{a}	۰/۱۹±۰/۲۳^{b}
	۱۰ µM	۱۸/۷۳±۱/۰۱^{a}	۹/۱۸±۰/۴۴ ^{a}	۱۹/۰۳±۰/۱۵ ^{a}	۳۱/۱۰±۰/۲۳^{a}	۰/۷۱±۰/۰۵^{bc}	۰/۷۶±۰/۰۲^{a}	۰/۴۶±۰/۰۳^{bc}	۰/۱۳±۰/۰۲۱^{a}	۰/۱۴±۰/۰۰۳^{c}
اکسید روی	۱ µM	۱۹/۳۲±۰۰^{a}	۴/۷۱±۰/۱۷^{b}	۱۴/۲۷±۰/۶۱^{b}	۱۴/۸۸±۲/۱۹^{b}	۰/۸۰±۰/۰۴^{bc}	۰/۵۰±۰/۰۲^{b}	۰/۴۶±۰/۰۱^{bc}	۰/۰۵±۰/۰۱۱^{b}	۰/۲۷±۰/۰۲۳^{a}
	۱۰ µM	۹/۳۱±۲/۳۷^{b}	۹/۱۸±۰/۴۴ ^{a}	۸/۱۲±۱/۲۹^{c}	۱۳/۰۸±۱/۱۵^{b}	۰/۶۱±۰/۰۴^{c}	۰/۴۰±۰/۰۳^{c}	۰/۳۸±۰/۰۳^{c}	۰/۰۵±۰/۰۰۸^{b}	۰/۱۸±۰/۰۰۳^{b}











شکل ۲- اثر اکسید روی و اکسید مس بر شدت جذب فلاونوئیدها در طول موج ۲۷۰ نانومتر (A)، ۳۰۰نانومتر (B)، ۳۳۰ نانومتر (C)، آنتوسیانین‌ها (D) و تانن‌ها (E) در گیاهچه شیرین‌بیان. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

نتایج حاصل از مطالعه همبستگی متغیرها بر اساس آزمون پیرسون در گیاهچه‌های تیمار شده با اکسید مس، بین محتوای گلیسیریزین و میزان فلاونوئیدها در طول موج ۲۷۰ نانومتر همبستگی منفی و معنی‌داری (۰/۹۹۹*-) نشان داد (جدول ۳). در گیاهچه‌های تیمار شده با اکسید روی بین محتوای ترکیبات فنلی با میزان فلاونوئیدها در طول موج ۳۰۰ نانومتر همبستگی مثبت و معنی‌داری (۰/۹۹۹*) مشاهده شد. همچنین، بین محتوای آنتوسیانین‌ها با میزان فلاونوئیدها در طول موج ۲۷۰ نانومتر نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری (۰/۹۹۸*) وجود داشت (جدول ۴).

جدول ۳- همبستگی شاخص‌های اندازه‌گیری شده گیاهچه شیرین‌بیان در تیمار با اکسید مس. * و ** به ترتیب در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار است.

تیمار		میزان قند احیا کننده ($mgg^{-1}FW$)	میزان پرولین (μML^{-1})	میزان گلیسیریزین ($mgg^{-1}FW$)	میزان ترکیبات فنلی (mg/L)	شدت جذب فلاونوئیدها ۲۷۰nm	شدت جذب فلاونوئیدها ۳۰۰nm	شدت جذب فلاونوئیدها ۳۳۰nm	میزان آنتوسیانین‌ها (nM)	میزان تانن‌ها (A%)
میزان قند احیا کننده ($mgg^{-1}FW$)		۱	۰/۵۵۵							
میزان پرولین (μML^{-1})		۰/۳۸۳	۱							
میزان گلیسیریزین ($mgg^{-1}FW$)		۰/۹۸۰	۰/۸۹۳**	۱						
میزان ترکیبات فنلی (mg/L)		۰/۲۳۸	-۰/۳۸۱	۰/۴۲۶	۱					
شدت جذب فلاونوئیدها	۲۷۰nm	-۰/۹۷۰	-۰/۸۷۰*	-۰/۹۹۹*	-۰/۴۶۷	۱				
	۳۰۰nm	۰/۹۱۶	۰/۷۷۷*	۰/۹۷۷	۰/۶۰۸	-۰/۹۸۶	۱			
	۳۳۰nm	۰/۲۲۶	۰/۰۰۳	۰/۰۲۸	-۰/۰۸۹۳	۰/۰۱۹	-۰/۱۸۵	۱		
میزان آنتوسیانین‌ها (nM)		۰/۹۷۹	۰/۷۳۴*	۰/۹۱۹	۰/۰۳۵	-۰/۹۰۰	۰/۸۱۵	۰/۴۱۹	۱	
میزان تانن‌ها (A%)		-۰/۸۶۲	-۰/۶۹۶*	-۰/۷۴۵	۰/۲۸۷	۰/۷۱۳	-۰/۶۸۶	-۰/۶۸۸	-۰/۹۴۷	۱

جدول ۴- همبستگی شاخص‌های اندازه‌گیری شده گیاهچه شیرین‌بیان در تیمار با اکسید روی. * و ** به ترتیب در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار است.

تیمار		میزان قند احیا کننده ($mgg^{-1}FW$)	میزان پرولین (μML^{-1})	میزان گلیسیریزین ($mgg^{-1}FW$)	میزان ترکیبات فنلی (mg/L)	شدت جذب فلاونوئیدها ۲۷۰nm	شدت جذب فلاونوئیدها ۳۰۰nm	شدت جذب فلاونوئیدها ۳۳۰nm	میزان آنتوسیانین‌ها (nM)	میزان تانن‌ها (A%)
میزان قند احیا کننده ($mgg^{-1}FW$)		۱	۰/۶۹۵*							
میزان پرولین (μML^{-1})		۰/۶۹۵*	۱							
میزان گلیسیریزین ($mgg^{-1}FW$)		۰/۸۴۷	۰/۸۷۵**	۱						
میزان ترکیبات فنلی (mg/L)		۰/۸۱۶	۰/۱۳۴	۰/۳۴۸	۱					
شدت جذب فلاونوئیدها	۲۷۰nm	۰/۲۴۹	-۰/۳۵۶	-۰/۳۰۴	۰/۷۶۳	۱				
	۳۰۰nm	۰/۸۳۷	۰/۳۴۷	۰/۴۱۸	۰/۹۹۹*	۰/۷۳۸	۱			
	۳۳۰nm	۰/۶۱۸	۰/۱۰۱	۰/۱۰۶	۰/۹۵۹	۰/۹۱۵	۰/۹۴۸	۱		
میزان آنتوسیانین‌ها (nM)		۰/۱۹۵	-۰/۲۷۵	-۰/۳۵۶	۰/۷۲۶	۰/۹۹۸*	۰/۷۰۰	۰/۸۹۲	۱	
میزان تانن‌ها (A%)		۰/۸۹۶	۰/۸۵۹**	۰/۹۹۵	۰/۴۷۴	-۰/۲۰۸	۰/۵۰۶	۰/۲۰۴	-۰/۲۶۱	۱

بحث

نتایج حاصل از تأثیر اکسید روی و اکسید مس بر میزان قند گیاهچه شیرین‌بیان نشان داد که میزان قند در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید روی نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری داشته است، در حالی که محتوای پرولین در تیمار ۱۰ میکرومولار اکسید روی در مقایسه با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین، محتوای گلیسیریزین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در این تیمار نسبت با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. قندهای احیا کننده می‌توانند در مسیر پنتوزفسفات‌اکسیداتیو سنتز و به عنوان پیش‌سازهایی برای تولید متابولیت ثانویه در گیاهان استفاده شوند (Vincenzo *et al*., 2005). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، به نظر می‌رسد قندهای احیا کننده در مسیر تولید این متابولیت‌ها وارد نشده‌اند. قند ترکیبی است که طی فتوسنتز تشکیل می‌شود. مهار فتوسنتز طی تنش فلزات سنگین در گیاهان عالی گزارش شده است. Kumar و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که میزان قند گیاه گندم، در غلظت‌های ۱۵۰، ۲۸۰ و ۶۰۰ ppm فلزات روی و مس با افزایش غلظت، کاهش می‌یابد. کاهش میزان قند گیاهچه‌های تیمار شده با اکسید روی ممکن است به علت کاهش سنتز یا انحراف از مسیر سنتز قندها به فرآیندهای سنتز متابولیت‌های دیگر باشد (Preeti and Tripathi, 2011).

در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید روی میزان پرولین نسبت به گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در حالی که میزان پرولین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس و ۱ میکرومولار اکسید روی نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. پرولین طی واکنش‌های کاهشی از گلوتامات سنتز می‌شود. پیرولین -۵-کربوکسیلات (P5C) و پرولین به عنوان تنظیم کننده‌های متابولیک شناخته شده‌اند و همانند جفت ردوکس عمل می‌کنند (Kalidas and Mark, 2004). کاهش P5C در سیتوزول، افزایش $NADP^+$ را فراهم می‌کند که به فعال شدن چرخه پنتوزفسفات‌اکسیداتیو منجر می‌شود. رابطه محکمی بین چرخه پنتوزفسفات‌اکسیداتیو با سنتز قند و پرولین در گیاهان وجود دارد (Kalidas and Mark, 2004). افزایش پرولین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس و ۱ میکرومولار اکسید روی باعث تحریک چرخه پنتوزفسفات‌اکسیداتیو می‌شود و در نهایت، به تولید متابولیت ثانویه در گیاهچه شیرین بیان منجر می‌شود. در گیاهان انباشته شدن پرولین آزاد در پاسخ به تنش فلزات سنگین مشاهده شده است (Rastgoo and Alemzadeh, 2011؛ Zengin and Munzurogiu, 2005). القا انباشته شدن پرولین در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی ممکن است به علت افزایش سنتز از نو آن یا کاهش در تخریب پرولین باشد (Kasai *et al*., 1998).

میزان گلیسیریزین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس و ۱ میکرومولار اکسید روی نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. گزارش‌های متعددی مبنی بر تولید گلیسریزین با به کارگیری الیسیتورهای مختلف در گیاه شیرین‌بیان وجود دارد برای مثال، Winida و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که میزان گلیسیریزین در گیاه شیرین‌بیان در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات افزایش می‌یابد. علت افزایش گلیسیریزین به افزایش بیان ژن

آنزیم β-آمیرین سنتاز نسبت داده شده است. همچنین، Shabani و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کرده‌اند که متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید باعث افزایش گلیسیریزین در گیاه شیرین‌بیان می‌شود. متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید به عنوان مولکول‌های سیگنال در تولید متابولیت ثانویه عمل می‌کنند. در پاسخ به این مولکول‌های سیگنال مکانیسم دفاعی پیچیده مانند سنتز متابولیت‌های ثانویه توسط گیاه فعال می‌شود. این پاسخ‌های دفاعی از طریق شناسایی محرک توسط گیرنده‌های مستقر در غشا پلاسمایی فعال می‌شوند و پیام‌آوران ثانویه را تشکیل می‌دهند که در نتیجه بیان ژن‌ها یا فعالیت آنزیم‌هایی که در سنتز متابولیت‌های ثانویه دخالت دارند را افزایش می‌دهند. می‌توان احتمال داد که در پژوهش حاضر نیز فلز مس و روی به عنوان محرک، بیان ژن یا فعالیت آنزیم β-آمیرین سنتاز را افزایش داده که پس از آن به افزایش تولید گلیسیریزین در گیاهچه شیرین‌بیان منجر شده است.

میزان ترکیبات فنلی کل گیاهچه‌ها در غلظت ۱۰ میکرومولار اکسید مس نسبت به گیاه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در گیاهچه‌های تیمار شده با اکسید روی با افزایش محتوای ترکیبات فنلی کل میزان فلاونوئیدها نیز افزایش می‌یابد. افزایش متابولیسم فنیل پروپانوئید و میزان ترکیبات فنلی می‌تواند در اثر عوامل محیطی متفاوت و شرایط تنش باشد (Sakihama *et al.*, 2002). همچنین، گزارش شده است که افزایش میزان ترکیبات فنلی می‌تواند به علت عملکرد حفاظتی این ترکیبات در مقابل تنش فلزات سنگین توسط کلاته کردن فلزات و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن (Lavid *et al.*, 2002) یا به علت افزایش فعالیت آنزیم‌هایی باشد که در متابولیسم این ترکیبات دخالت دارند (Michalak, 2006). تحریک بیوسنتز ترکیبات فنلی در گندم در پاسخ به نیکل و در پاسخ به آلومینیوم نیز مشاهده شده است (Diaz *et al.*, 2001). در پژوهش حاضر چنان که Winkel-Shirley (۲۰۰۲) نیز در گیاه ذرت گزارش نمودند می‌توان احتمال داد که فلز مس با تحریک بیان ژن‌های درگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه به افزایش تولید ترکیبات فنلی در گیاهچه شیرین‌بیان منجر شده است.

فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که تولید آنها در تنش‌های محیطی با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) افزایش می‌یابد (Myung-Min *et al.*, 2009). فلاونوئیدها به عنوان جاروب کننده‌های رادیکال آزاد هستند و همچنین قادرند بسته به ساختار مولکولی خود به عنوان کلاتورهای فلزی عمل کنند (Soczynska-Kordala *et al.*, 2001). در این پژوهش، میزان فلاونوئیدها در طول موج ۳۰۰ نانومتر در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس افزایش معنی‌داری داشت. افزایش مقدار فلاونوئیدها توسط فلزات نقره و کروم در گیاه *Ononis arvensis* (Tumova and Polivkova, 2006) و نیز توسط فلز مس در گیاه *Digitalis lanata* گزارش شده است (Bota and Deliu, 2011). فلاونوئیدها دارای گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل هستند که قادرند به طور اختصاصی به عناصر سنگین پیوند بر قرار کنند (Jung *et al.*, 2003).

آنتوسیانین‌ها از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکال‌های آزاد را

از بین می‌برند، بلکه از تولید بیشتر آنها در گیاه جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول‌ها و در نتیجه جمع‌آوری آنها از سایر بخش‌ها می‌شوند (Tripathi *et al*., 2006). در پژوهش حاضر، میزان آنتوسیانین‌ها در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس افزایش یافت. در گیاهچه‌های تیمار شده با اکسید روی، علاوه بر افزایش محتوای آنتوسیانین‌ها میزان فلاونوئیدها در طول موج ۲۷۰ نانومتر افزایش یافت. همچنین، میزان تانن‌ها در تیمار ۱ میکرومولار اکسید روی افزایش یافت. بیشتر مطالعات اخیر نشان داده است که آنتوسیانین‌ها در پاسخ به انواع تنش، از جمله تنش فلزات سنگین، سنتز شده‌اند (Hale *et al*., 2001). Kalantari و Oloumi (۲۰۰۵) گزارش کردند که کادمیوم در غلظت‌های بالا باعث افزایش آنتوسیانین در گیاه کلزا شده است. Marrs و Walbot (۱۹۹۷) بیان کردند که کادمیوم می‌تواند سنتز آنزیم گلوتاتیون-S-ترانسفراز (GST) را تحریک و به تولید آنتوسیانین منجر شود. GST، آنزیم کلیدی در مرحله نهایی بیوسنتز آنتوسیانین است (Schreder *et al*., 2003). همچنین، گزارش شده است که مولیبدن باعث افزایش میزان آنتوسیانین در گیاه کلزا می‌شود (Kutchan, 1995). با توجه به مطالعات یاد شده می‌توان احتمال داد که در پژوهش حاضر نیز فلز مس با تحریک بیان ژن‌های درگیر در تولید متابولیت ثانویه از جمله GST به افزایش تولید آنتوسیانین منجر شده باشد. شایان ذکر است که برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیاز به مطالعات دقیق از جمله بررسی تأثیر فلزات مس و روی بر میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه شیرین‌بیان است. تانن‌ها از جمله ترکیبات فنلی موجود در گیاه هستند که دارای عمل آنتی‌اکسیدانی نیز هست. گیاهان غنی از تانن نظیر چای که به زیادی منگنز مقاوم هستند، توسط کلاته شدن مستقیم فلز منگنز با ترکیبات فنلی در برابر مقدار زیاد آن محافظت می‌شوند. کلاته شدن مستقیم یا اتصال با پلی‌فنل‌ها در گیاهان تیره Nympheace که در تنش با فلزات سنگین کادمیوم، سرب و جیوه قرار گرفتند نیز گزارش شده است (Lavid *et al*., 2002).

جمع‌بندی

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که تیماردهی گیاهچه‌های شیرین‌بیان با غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار اکسید مس می‌تواند میزان گلیسیریزین، ترکیبات فنلی کل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها را در این گیاهان افزایش دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت و همکاری دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان و مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Berglund, H., Quartacci, M. F. and Liljenberg, C. (2000) Changes in plasma-membrane lipid composition: a strategy for acclimation to copper stress. Journal

Bates, L., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Biochemical Society Transactions 28: 905-908.

Bota, C. and Deliu, C. (2011) The effect of copper sulphate on the production of flavonoids in *Digitalis lanata* cell cultures. Farmacia 59: 113-118.

Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-486.

Diaz, A., 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.

Hale, K. L., McGrath, S. P., Lombi, E., Stack, S. M., Terry, N., Pickering, I. J., George, E. A. and Pilon-Smits, E. A. H. (2001) Molybdenum sequestration in *Brassica* species. a role for anthocyanins? Plant Physiology 126: 351-358.

Irani, M., Sarmadi, M., Bernard, F., Ebrahimipour and Shaker Bazarnov, H. (2010) Leaves antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* L.. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 9: 425-428.

Jeffry, H. W., Michael, M. J., Robert, A. and Martin, J. R. (1983) High performance liquid chromatographic determination of glycyrrhizin in licorice products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 31: 387-389.

Jung, C. H., Maeder, V., Funk, F. and Frey, B. (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.

Kalantari, M. K. and Oloumi, H. (2005) Study the effects of $CdCl_2$ on lipid peroxidation and antioxidation compounds content in *Brassica Napus*. Iranian Journal of Science and Technology 29: 201-208.

Kalidas, S. and Mark, W. (2004) A model for the role of the proline-linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 13: 1-24.

Kasai, Y. Kato, M. Aoyama, J. Hyodo, H. (1998) Ethylene production and increase in 1-amino-cyclopropane-1- carboxylate oxidase activity during senescence of broccoli florets. Acta Horticulturae 464: 153-157.

Krizek, D. T., Antonjuk, V. P. and Mirecki, R. M. (1988) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum 103: 1-7.

Kumar, V., Awasthi, G. and Chauchan, P. K. (2012) Cu and Zn tolerance and responses of the biochemical and Physiochemical system of wheat. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 8: 203-213.

Kutchan, T. M. (1995) Anthocyanin biosynthesis (*maize* and *Arabidopsis* genes) secondary metabolite derivatives. Plant Cell 7: 1059-1070.

Lavid, N. S., Yarden, O. and Tel-Or, E. (2002) The involvement of polyphenols and peroxidase acitivities in heavy metal accumulation by epidermal glands of waterlily (*Nymphaeceaea*). Planta 212: 323-328.

Luthar, Z. and Kreft, I. (1999) Influence of temperature on tannin content in different ripening phases of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. Fagopyrum 16: 61-65.

Marrs, K. A. and Walbot, V. (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. Plant Physiology 113: 93-102.

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

Mukhopadhyay, M. and Panja, P. (2008) A novel process for extractoion of naturals weetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. International Journal of Separation and Purification Technology 63: 539-545.

Myung-Min, 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.

Nasiri, Y., Salmasi, S., Nasrullahzadeh, Z., Najafi, N. and Ghassemi-Golezani, K. (2010) Effects of foliar application of micronutrients (Fe and Zn) on flower yield and essential oil of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Journal of Medicinal Plants Research 4: 1733-1737.

Nelson-Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195: 19-29.

Patcikka, E., Kairavuo, M., Sersen, F., Aro, E. M. and Tyystjarvi, E. (2002) Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition *in vivo* by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. Plant Physiology 129: 1359-1367.

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.

Preeti, P. and Tripathi, A. K. (2011) Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* (Roxb.) benth seedlings. International Journal of Environmental Sciences 1: 1009-1018.

Rastgoo, L. and Alemzadeh, A. (2011) Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. Australian Journal of Crop Science 5: 375-383.

Rion, B. J. and Alloway, J. (2004) Fundamental aspects of zinc in soils and plants. International Zinc Association 23: 1-128.

Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., Yamasaki, H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology 17: 67-80.

Schreder, P., Fischer, C., Debus, R. and Wenzel, A. (2003) Reaction of detoxification mechanism in suspension cultured spruce cells (*picea abies* L.) to heavy metals in pure mixture and in soil elutes. Environmental Science and Pollution Research 10: 225-234.

Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asghari, G. and Emami, J. (2009) Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonote and salicylic acid. Russian Journal of Plant Physiology 56: 621-694.

Shibata, S. (2000) A drug over the millennia and pharmacognosy: chemistry pharmacology of licorice. Pharmaceutical Society of Japan 120: 849-862.

Shibuya, M., Katsube, Y., Otsuka, M., Zhang, H., Tansakul, P., Xiang, T. and Ebizuka, Y. (2009) Identification of a product specific B-amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology Biochemistry 47: 26-30

Soczynska-Kordala, M., Bakowska, A., Oszmianski, J. and Gabrielska, J. (2001) Metal ion flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. Cellular and Molecular Biology Letters 6: 277-281.

Soland, S. F. and Lima, S. K. (1999) Phenolics and cold toleranc of *Brassica napus*. Plant Agriculture 1: 1-5.

Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. and Gaur, J. P. (2006) Oxidative stress in *scenedemus* sp. during short and long-term exposure to Cu and Zn. Chemosphere 62: 538-544.

Tumova, L. and Polivkova, D. (2006) Effect of AgNO3 on the production of flavonoids by the culture of Ononis arvensis L. *in vitro*. Ceska Slovenska Farmacie 55: 186-188.

Vincenzo, L., Angela, C., Claudia, R., Irene, M. F., Veronica, M. T. L., Vito, L. and Nunzi, C. (2005) Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. Environmental and Experimental Botany 65: 54-62.

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.

Winida, W., Hiroyuki, T., Yukihiro, S. and Waraporn, P. (2011) Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza infata* hairy roots cultures. Journal of Biosciences 66: 423-428.

Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology 5: 218-223.

Zengin, F. K. and Munzurogiu, O. (2005) Effects of some heavy metals on content of chlorophyl, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47: 157-164.

Zornoza, P. V., Estebane, F., Pascual, R. and Carpena, R. (2002) Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. Plant Physiology and Biochemistry 40: 1003-1009.

A study on changes of some metabolites of *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings treated with copper oxide and zinc oxide

Razieh Soltaninejad [1], Roya Razavizadeh [1]* and Hakimeh Oloumi [2]

[1] Biology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran
[2] Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Abstract

Glycyrrhiza glabra L. (Licorice) is one of the oldest medicinal plants in Iran and secondary metabolites present in the plant root is used in food and pharmaceutical industries. With the use of heavy metals as elicitors, plant secondary metabolite production can be increased. In this study, the effects of the concentrations of 1 and 10 µM of zinc oxide and copper oxide on the contents of reducing sugars (as precursor of secondary metabolites), proline, glycyrrhizin, total phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins in *Glycyrrhiza glabra* seedlings were investigated. Also, the correlation between the content of these metabolites in the treated seedlings was examined using Pearson's test. The amount of reducing sugars at concentration of 10 µM zinc oxide was decreased. Whereas, the amounts of proline and glycyrrhizin under treatment 1 and 10 µM copper oxide and 1 µM zinc oxide compared with the control plants was increased. The content of total phenolic compounds was increased with increasing concentrations of copper oxide. The highest amount of flavonoids was observed at concentrations of 1 and 10 µM copper oxide. Anthocyanin content was increased in concentration of 1 µM copper oxide. Also, the tannin content of the *Glycyrrhiza glabra* seedlings at concentrations of 10 µM zinc oxide was increased. Based on the result it seemed that at concentrations of 1 and 10 µM copper oxide the amount of glycyrrhizin, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins were significantly increased, whereas, zinc oxide had no significant impact on the levels of these metabolites.

Key words: Zinc oxide, Copper oxide, Phenolic compounds, Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), Glycyrrhizin

* Corresponding Author: razavi.roya@gmail.com