نهمین کنفرانس ملی و اولین کنفرانس بین‌المللی فیزیولوژی گیاهی
9th National and 1st International Conference of Plant Physiology
۱۳-۱۱ بهمن ۱۴۰۴، دانشگاه گیلان

اثر سرب بر برخی صفات فیزیولوژیکی و متابولیت‌های ثانویه در گیاه کیسه‌کشیش (*Capsella bursa-pastoris*) در شرایط آبکشت

سیده پریسا مرتضوی[1] و احمد مهتدی *[2]
[1*] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج P.mortazavi1375@gmail.com
[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج

چکیده

به منظور ارزیابی اثر نیترات سرب بر گیاه کیسه‌کشیش (*Capsella bursa-pastoris*)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تنش سرب از منبع نیترات سرب در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار در شرایط آبکشت اعمال شد. نتایج نشان داد که سطوح کم سرب تا ۵۰ میکرومولار تأثیر منفی قابل‌توجهی بر صفات نداشت. با این‌حال، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیترات سرب، تجمع سرب در ریشه (۶۲۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک) و اندام هوایی (۱۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) افزایش یافت. غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیترات سرب سبب افزایش آنتوسیانین (۲۹۳ درصد) و فلاونوئید کل (۴۱ درصد) نسبت به شاهد شد. این تغییرات بیانگر فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی مانند سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و افزایش فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از حضور سرب است.

مقدمه

فعالیت‌های انسانی نظیر صنعتی‌شدن، توسعه کشاورزی و رشد بی‌رویه جمعیت و شهرنشینی، منجر به افزایش چشم‌گیر آلودگی‌های محیطی و فلزات سنگین شده است. سرب یکی از رایج‌ترین و خطرناک‌ترین فلزات سنگین است. دامنه طبیعی غلظت سرب در گیاهان از ۲/۰ تا ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک و حد بحرانی آن ۳۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک گزارش شده است (Collin *et al.*, 2022). این عنصر سمی بر فرآیندهای مختلف گیاهان، از جمله جوانه‌زنی، رشد ریشه و ساقه، و متابولیسم سلولی اثرات منفی دارد سرب معمولاً توسط ریشه جذب و در واکوئل‌های سلول آن تجمع و رسوب می‌کند، و از انتقال آن به اندام‌های هوایی تا حدی جلوگیری می‌شود (Fahr *et al.*, 2013).گیاهان برای مقابله با این تنش، سازوکارهایی چون اجتناب، تغییر الگوی رشد ریشه و ترشح ترکیبات دفاعی را به‌کار می‌گیرند. در این میان، متابولیت‌های ثانویه نقش کلیدی در محافظت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند (Mattosinhos *et al.*, 2022). گیاه کیسه‌کشیش (*Capsella bursa-pastoris*) یکی از گیاهان خانواده شب‌بو (Brassicaceae) است.

مواد و روش‌ها

الف- شرایط کشت و اعمال تنش سرب

به منظور بررسی رشد و انواع پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه کیسه‌کشیش تحت تنش نیترات سرب، آزمایشی گلدانی در اردیبهشت سال ۱۴۰۳ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه یاسوج در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. تنش سرب از منبع نیترات سرب ($Pb(NO_3)_2$) در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اعمال شد. بذر گیاه کیسه‌کشیش از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. واحدهای آزمایشی شامل گلدان‌هایی با قطر ۱۴ و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر بودند. گلدان‌ها توسط پرلیت که از قبل با دستگاه اتوکلاو ضدعفونی و سپس با آب مقطر شسته شده بودند، به نحوی پر شدند که سطح پرلیت هر گلدان تا دهانه آن پنج سانتی‌متر فاصله داشت. بذرها ابتدا با آب مقطر شستشو شدند. سپس با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد به مدت پنج دقیقه، ضدعفونی و سپس در گلدان کاشت شدند. در هر گلدان، ۱۵ عدد بذر با عمق حدود دو سانتی‌متر قرار گرفت. از مرحله کاشت تا جوانه‌زنی، آبیاری با آب مقطر و سپس با استفاده از محلول غذایی یک دوم هوگلند صورت گرفت. دو هفته بعد از استقرار بوته‌ها در گلدان، تنک شدند و هشت بوته در هر گلدان باقی ماند. در مرحله چهار برگی گیاهان، تیمارهای نیترات سرب به مدت سه هفته در محلول غذایی یک دوم هوگلند اعمال گردید. pH محلول غذایی با محلول دو میلی‌مولار بافر MESو با استفاده از KOH در محدوده pH برابر ۵/۵ ثابت نگه داشته شد. گیاهان در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۶ درجه سانتی‌گراد در شب و تناوب نوری ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگه‌داری شدند.

ب- اندازه‌گیری میزان سرب و متابولیت‌های ثانویه

برای اندازه‌گیری محتوای سرب ریشه و اندام هوایی ابتدا به منظور حذف سرب سطحی، ریشه گیاهان برداشت‌شده به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۲۰ میلی‌مولار Na_2EDTA قرار داده شد. سپس ۰/۱ گرم از بخش هوایی و ریشه گیاه خشک شده و پودرشده به لوله‌های آزمایش منتقل شدند و به آن‌ها سه میلی‌لیتر اسید نیتریک ۶۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت زیر هود نگهداری شدند. به مدت دو ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌جوش قرار داده شدند. پس از سرد شدن محلول در محیط آزمایشگاه، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن به آن اضافه شد و مجدد در حمام آب‌جوش به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت حجم نمونه‌ها با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار سرب موجود در ریشه و اندام هوایی گیاهان با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی مدل HITACHI-Z-2000اندازه‌گیری شد. مقدار فنل کل با روش فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری شد و میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. تعیین مقدار فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم صورت گرفت و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر با اسپکتروفتومترمدل philler scientific SU-6100اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های برگ از روش Wagner (1979)استفاده شد و میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید. محاسبات آماری با نرم افزارهای Spss و Excel انجام شد.

نتایج و بحث

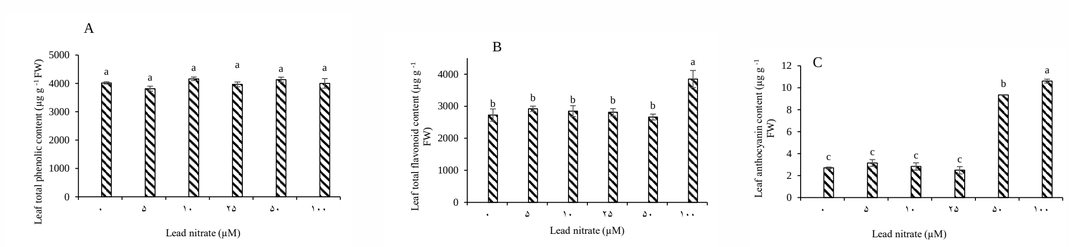
اثر نیترات سرب بر محتوای سرب ریشه، اندام هوایی و نسبت سرب اندام هوایی به سرب ریشه گیاه کیسه‌کشیش در شرایط آبکشت، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. در گیاه کیسه‌کشیش به‌تدریج با افزایش غلظت نیترات سرب، محتوای سرب در ریشه افزایش یافت

مقایسه میانگین اثر نیترات سرب بر محتوای سرب اندام هوایی گیاه کیسه‌کشیش، نشان داد با افزایش در سطوح تنش نیترات سرب، میزان سرب اندام هوایی تا غلظت ۱۰ میکرومولار مانند شاهد بود و هیچ‌گونه تجمعی در اندام هوایی صورت نگرفت و پس از آن، از غلظت ۲۵ میکرومولار به تدریج میزان سرب در اندام هوایی گیاه کیسه‌کشیش افزایش یافت.

نکته قابل توجه در این پژوهش این بود که در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میکرومولار نیترات سرب، از انتقال سرب به اندام هوایی به شدت ممانعت می‌شود و تا غلظت ۵۰ میکرومولار نیترات سرب نیز میزان سرب تجمع‌یافته در اندام هوایی بسیار ناچیز است.

مقایسه میانگین اثر تنش نیترات سرب بر نسبت محتوای سرب اندام هوایی به ریشه (فاکتور انتقال) نشان داد به‌طور کلی تا سطح ۱۰ میکرومولار سرب این نسبت صفر بود و سپس در سطح ۲۵ میکرومولار افزایش یافت که با سطح ۵۰ میکرومولار (۰۰۷۲/۰) در یک گروه آماری قرار گرفت و در سطح ۱۰۰ میکرومولار (۰۲۴/۰) بیشترین این نسبت حاصل گردید.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس میانگین داده‌ها نشان داد که اثر نیترات سرب بر محتوای فنل کل برگ معنی دار نبود ولی بر محتوای فلاونوئید کل برگ در سطح احتمال یک درصد در گیاه کیسه‌کشیش معنی‌دار است و میزان فلاونوئید کل گیاه کیسه‌کشیش با افزایش غلظت نیترات سرب افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که آنتوسیانین در برگ‌های گیاه کیسه‌کشیش با افزایش غلظت‌های مختلف نیترات سرب، افزایش یافت.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر نیترات سرب بر محتوای فنل کل برگ (A)، محتوای فلاونوئید برگ (B) و محتوای آنتوسیانین برگ (C) گیاه کیسه‌کشیش. میانگین‌ها با حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد است. بارها، نشان‌دهنده خطای استاندارد هستند.

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها از جمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که نقش کلیدی در سازوکارهای دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از جمله تنش فلزات سنگین ایفا می‌کنند. این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قادرند از طریق مهار گونه‌های فعال اکسیژن و کلاته‌کردن یون‌های فلزی، اثرات مخرب تنش اکسیداتیو را کاهش دهند (Chen *et al.*, 2022).

با اندازه‌گیری میزان انباشتگی سرب در ریشه و اندام هوایی گیاه کیسه‌کشیش مشخص شد که با افزایش سطوح سرب، محتوای سرب ریشه در گیاه افزایش پیدا کرده است و از انتقال سرب به اندام هوایی به شدت ممانعت شد. تنش سرب، محتوای آنتوسیانین برگ را افزایش داد. با توجه به نتایج این پژوهش، بررسی اثر سایر فلزات سنگین بر ویژگی‌های فیزیولوژیک این گیاه می‌تواند در شناسایی ظرفیت تحمل آن مفید باشد.

منابع

Chen, D., Mubeen, B., Hasnain, A., Rizwan, M., Adrees, M., Naqvi, S.A., Iqbal, S., Kamran, M., El-Sabrout, A.M., Elansary, H.O., Mahmoud, E.A., Alaklabi, A., Sathish, M., and Din, G.M. (2022). Role of promising secondary metabolites to confer resistance against environmental stresses in crop plants: current scenario and future perspectives. Frontiers in Plant Science, 13: 881032. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881032.

Collin, S., Baskar, A., Geevarghese, D.M., Vellala, S.A., Bahubali, P., Choudhary, R., Lvov, V., Tovar, G.I., Senatov, F., Koppala S., and Swaminappan, S. (2022). Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review. Journal of Hazardous Materials Letters, 3: 100064. https://doi.org/10.1016/j.hazl.2022.100064.

Fahr, M., Laplaze, L., Bendaou, N., Hocher, V., El Mzibri, M., Bogusz, D., and Smouni, A. (2013). Effect of lead on root growth. Frontiers in Plant Science, 4: 47559. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00175.