روش کمّی اندازه‌گیری ترکیبات سایدروفوری در ترشحات ریشه‌ای گیاه

ابراهیم شیرمحمدی، ناصرعلی اصغرزاده و شاهین اوستان

دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تبریز، دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه تبریز، استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه تبریز.

Ibrahim_13000@yahoo.com

مقدمه

یکی از واکنشهایی که گیاهان و ریزجانداران در شرایط کمبود آهن از خود نشان می‌دهند، ترشح برخی کی‌لیت‌کننده‌ها است که می‌توانند با آهن تشکیل کمپلکس دهند و آهن مورد نیاز خود را از این طریق جذب نمایند. برای اندازه‌گیری کمّی ترکیبات سایدروفوری روشهای مختلفی ارائه شده است که از جمله آنها، محلول سنجشگر کرم آزورول- اس[1] است. این روش اندازه‌گیری سایدروفور در محلول رویی محیطهای کشت مایع توسط Schwyn و Neilands (۱۹۸۷) استفاده شده است. روش دیگر توسط Hydon و همکاران (۱۹۷۳) ارائه شده که این روش برای اندازه‌گیری سایدروفور در مایعات داخلی بدن و ترکیبات پیچیده به کار گرفته شده است. در مورد جمع‌آوری ترشحات ریشه‌ای Shane و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد دادند محلول غذایی به مدت ۲ ساعت در تماس با ریشه گیاهان قرار گرفته سپس جمع‌آوری شود.

علیرغم کارهای انجام شده روشی برای اندازه‌گیری کمّی ترکیبات سایدرفوری در ترشحات ریشهٔ گیاهان گزارش نشده است. برای این منظور آزمایش تعدیل شده‌ای بر پایهٔ روش محلول سنجشگر کرم آزورول ـ اس صورت گرفت.

مواد و روشها

- تهیه محلول CAS

ابتدا ۶ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار HDTMA[2]، به داخل یک ارلن ۱۵۰ میلی‌لیتری ریخته و حجم آن با آب مقطر به ۷۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول آهن (یک میلی‌مولار $FeCl_3.6H_2O$ در۱۰میلی‌مولار HCl) در حال به هم زدن به محلول قبلی اضافه شد. سپس ۷/۵ میلی‌لیتر از محلول ۲ میلی‌مولار CAS به آرامی و همراه با هم زدن به محلول داخل ارلن اضافه گردید. رنگ محلول در این حالت بنفش است. سپس pH محلول با HCl یا NaOH ۰/۱ نرمال در ۵/۶ تنظیم شد و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید، رنگ محلول در این حالت متمایل به آبی است [۱].

- جمع‌آوری ترشحات ریشه‌ای

از آنجایی که فیتوسایدروفور به همراه سایر ترشحات ریشه‌ای به محیط ریزوسفر آزاد می‌شود، لذا ابتدا گیاه گندم در یک بستر عاری از عناصر فلزی ریزمغذی (Fe، Cu، Zn و Mn)؛ یعنی پرلیت اسیدشوئی شده با HCl یک مولار، کشت گردید. هدف این بود که ترشح ترکیبات سایدروفوری تحریک و افزایش یابد. برای جمع‌آوری ترشحات ابتدا بستر با آب مقطر شستشو داده شد تا تمام محلول غذایی از گلدان خارج شود و آب مقطر در تماس با ریشهٔ گیاه قرار گیرد. بعد از ۳ ساعت مجدداً این بستر با آب مقطر شستشو داده شد و ۲۵ میلی‌لیتر از محلول خروجی جمع‌آوری گردید.

---

[1] chrome azurol S assay solution

[2] hexadecyltrimethylammonium

- رسم نمودار استاندارد برای CAS در غلظت‌های مختلف DTPA[1]

ابتدا ۳ میلی‌لیتر از محلول کروم‌آزورول در داخل ۷ لوله آزمایش ریخته شد. سپس به آنها مقادیر صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌لیتر از محلول کی‌لیت‌کننده DTPA 5×10^{-6} مولار اضافه گردید و حجم آنها با آب مقطر به ۶ میلی‌لیتر رسانده شد (محلولهای استاندارد). هم‌زمان عصارهٔ جمع‌آوری شده از ریشه، ۱۰ برابر رقیق گردید و ۳ میلی‌لیتر از آن با ۳ میلی‌لیتر از محلول CAS مخلوط گردید. بعد از ۲۰ دقیقه مقدار جذب در طول موج ۶۸۷ نانومتر در محلولهای استاندارد و نمونهٔ عصارهٔ ریشه قرائت شد. سپس با رسم نمودار استاندارد، غلظت فیتوسایدروفور در عصارهٔ ریشه بر حسب معادل غلظت DTPA محاسبه گردید. مراحل فوق‌الذکر با غلظت‌های مختلف کی‌لیت‌کنندهٔ EDTA نیز انجام گرفت.

نتایج و بحث

ضریب تبیین (r^2) نمودار استاندارد خطی برازش داده شده به کمپلکسومتری با DTPA برابر ۰/۹۶ بود. با استفاده از نمودار فوق غلظت معادل ترکیبات سایدروفوری در عصارهٔ ریشه گندم در مرحلهٔ خوشه‌دهی $1/66\times10^{-5}$ میلی‌مولار DTPA بدست آمد.

وقتی از EDTA به جای DTPA استفاده گردید، با افزایش غلظت این کمپلکس‌کننده تغییر رنگ خیلی جزئی بود. ولی هنگامی که غلظت EDTA به یک غلظت معین رسید؛ تغییر رنگ شدیدی ظاهر گردید، بطوری که رنگ محلول کاملاً نارنجی شد. بنابراین نتیجه می‌شود که واکنش آهن با EDTA در حضور محلول CAS تنها در غلظت معینی از EDTA، کامل می‌شود و در غلظتهای پایین، این واکنش جزئی و ناقص خواهد بود. Schwyn و Neilands (۱۹۸۷) نیز گزارش کرده‌اند که تغییر رنگ کمپلکسومتری CAS با EDTA فقط در نزدیکی نقطه پایانی[2] تیتراسیون دیده می‌شود [۱].

چون ترکیبات کی‌لیت‌کننده تولید شده توسط گیاه، ترکیباتی مرکب هستند و حتی ساختار شیمیایی بعضی از آنها و نسبت کمپلکس شدن (استوکیومتری) بعضی از آنها با آهن برای ما مشخص نیست، لذا غلظت به دست آمده از معادله یاد شده برای فیتوسایدروفور بر حسب DTPA معادل در نظر گرفته شد.

همچنین به علت واکنش بعضی از عناصر فلزی با ترکیبات سایدروفوری و ایجاد اختلال در کمپلکسومتری، جمع‌آوری ترشحات ریشه‌ای بجای محلول غذایی از آب مقطر استفاده شد.

منابع

[1] Schwyn, B., Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160: 47- 56.

[2] Haydon, A. H., Davis, W. B., Arceneaux, J. E. L. Byers. B. R. 1973. Hydroxamate recognition during iron transport from hydroxamate iron chelates. J. Bacteriol. 115: 912-918.

[3] Shane, M.W., Vos, M. DE., Roock, S. Lambers, Lambers, H. 2003. Shoot P status regulates cluster- root growth and citrate exudation in lapinus albus grown with a divided root system. Plant Cell and Environment. 26: 265-273.

[1] diethylenetriminepentaacetic acid
[2] endpoint