اثرات سمیت بورون بر رشد و پارامترهای بیوشیمیایی دانه رست های بزرک در شرایط کشت هیدروپونیک

مریم دهجی پور حیدرآبادی ۱
استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان

چکیده

سمیت بورون یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاهان در نواحی خشک و نیمه خشک است. لذا در این تحقیق اثرات سمیت بورون بر رشد، محتوای قند، پروتئین، ترکیبات فنلی و لیگنین در شرایط کشت هیدروپونیک بررسی شد. بدین منظور دانه‌رست‌های بزرک رشد یافته در محیط هوگلند برای دو هفته در معرض تیمار H_3BO_3 با غلظت های ۴۵ و ۴۵۰ میکرو مولار)به ترتیب به عنوان غلظت بهینه و سمیت (قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزایش بورون کاهش قند و پروتئین را موجب گردید. در حالیکه با افزایش غلظت بورون افزایش میزان ترکیبات فنلی و لیگنین در دیواره‌ی سلولی مشاهده شد. در نهایت این نتیجه حاصل شد که سمیت بورون از طریق کاهش سنتز قند و پروتئین و افزایش ترکیبات فنلی و لیگنین، کاهش رشد را در گیاهان موجب گردیده است.

واژه های کلیدی: سمیت بورون، ترکیبات فنلی، قند، لیگنین، بزرک

مقدمه

بورون یکی از عناصر ریزمغذی (Micronutrient) ضروری برای همه‌ی گیاهان عالی است. اصلی‌ترین نقش بورون در گیاهان تثبیت شبکه‌ی پکتینی دیواره‌ی سلولی از طریق تشکیل استرهای بورات با دنباله های آپیوز رامنوگالاکتورونان II است. تشکیل این کمپلکس برای ساختار و عمل دیواره سلولی ضروری است (Kobayashi *et al*. ۱۹۹۶). دسترسی به بورون در خاک و آب کشاورزی عامل تعیین‌کننده‌ی مهمی در تولید محصولات کشاورزی است. در نواحی خشک و نیمه خشک به علت کاهش بارندگی و عدم پدیده آبشویی تجمع بورون در خاک و سمیت آن دیده می شود (Tanaka and Fujiwara ۲۰۰۸). سمیت بورون آثار متفاوتی بر متابولیسم سلول، تقسیم سلولی ریشه، محتوای کلروفیل برگ، میزان فتوسنتز، سطوح لیگنین و سوبرین در گیاهان دارد (Nable *et al*., ۱۹۹۷). اگرچه اساس فیزیولوژیکی سمیت بورون ناشناخته است با توجه به توانایی بورون در باندشدن به ترکیباتی با دو گروه هیدروکسیل، تغییر در ساختار دیواره سلولی، تخریب متابولیکی از طریق باند شدن به NADPH، NADH، ATP و تخریب تقسیم سلولی و نمو به وسیله باند شدن به قند ریبوز به صورت آزاد یا داخل ملکول RNA از عوامل مطرح شده در سمیت بورن می‌باشند (Camacho-Cristobal *et al*. ۲۰۰۸). نتایج قناتی و همکاران نشان داد که سمیت بورون به افزایش محتوای لیگنین و ترکیبات فنلی باند شده به پکتین و تشکیل سوبرین در دیواره سلولی منجر می‌شود (Ghanati *et al*. ۲۰۰۵). همچنین مطالعات نشان داده است که سمیت بورون با آسیب ساختاری کلروپلاست، فتوسنتز و متابولیسم و انتقال قندها را کاهش می‌دهد (Simon *et al*. ۲۰۱۳). لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر سمیت بورون بر رشد، متابولیسم قندها، ترکیبات فنلی و لیگنین در گیاه بزرک به عنوان یک گیاه مدل جهت مطالعات بیوشیمیایی بود.

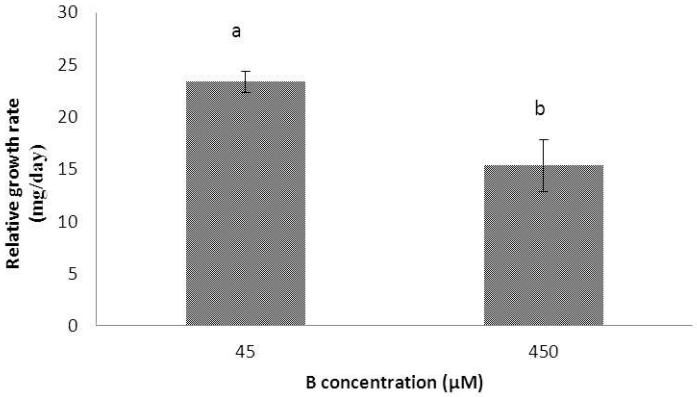
مواد و روش‌ها

جوانه زنی بذرهای گیاه بزرک (*Linum usitatissimum* L.) بعد از ضدعفونی نمودن سطحی آنها با سدیم هیپوکلریت و اتانول ۷۰%، در تاریکی و دمای C۲۲ انجام گردید. دانه رست های با طول یکسان ، انتخاب و به محلول هوگلند تغییر یافته شامل (برحسب میلی مولار): $Ca(NO_3)_2.4H_2O$، ۵/۲؛ KNO_3، ۵/۲؛ $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱؛ KH_2PO_4، ۵/۰؛ Fe-EDTA، ۰۳۲/۰؛ H_3BO_3، ۰۴۵/۰؛ $MnCl_2.4H_2O$، ۰۰۹۱/۰؛ $ZnCl_2$، ۰۰۰۷۶/۰؛ $CuCl_2.2H_2O$، ۰۰۰۳۱/۰؛ $NaMoO_4.2H_2O$، ۰۰۰۲۱/۰، با pH =۶ منتقل و پس از دو هفته رشد در این محیط در اتاقک های رشد با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، درجه حرارت C ۲۲، رطوبت نسبی ۶۰% و شدت نور ۲۱۰۷ $\mu mols\text{-}1m\text{-}$، با غلظت های مختلف بورون (۴۵ و ۴۵۰ میکرومولار به ترتیب به عنوان غلظت بهینه و سمیت) تیمار شدند. سپس نمونه ها جهت بررسی های بیوشیمیایی برداشت و به فریزر C۸۰- جهت بررسی های بعدی منتقل شدند. پس از استخراج دیواره سلولی، سنجش لیگنین و فنل های متصل به دیواره انجام گردید (Fecht-Christoffers *et al*. ۲۰۰۳). محتوای لیگنین دیواره سلولی با روش استیل برومید اندازه گیری شد. بدین منظور به ۶ میلی گرم پودر نرم شده دیواره، ۵/۲ میلی لیترمخلوط استیل برومید در اسید استیک (۲۵% w/w) حاوی ۱/۰ درصد پرکلریک اسید ۷۰% افزوده و درحمام آب گرم با دمای C ۷۰ به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته ودر فواصل ۱۰ دقیقه ای تکان داده شد. بعد از سرد نمودن نمونه ها در یخ، محتوای لوله ها به یک بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتر شامل پنج میلی لیتر هیدروکسید سدیم دو نرمال منتقل و با اسید استیک به حجم رسانده شد. میزان لیگنین با اندازه گیری جذب در nm۲۸۰ و با استفاده ازضریب جذب ویژه ۲۰ $L^{-1}cm^{-1}$ g

محاسبه گردید (Iiyama and Wallis ۱۹۹۰). جهت استخراج فنل های متصل به دیواره، به mg۳۰ دیواره سلولی استخراج شده، اگزالات آمونیوم mM۲۰ اضافه و در دمای C۷۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از صاف نمودن محلول رویی به رسوب باقی مانده M۱/۰ NaOH، اضافه شد وپس ازقرار گرفتن به مدت یک شب تحت گاز N۲، محلول رویی صاف و به محلولهای قبلی اضافه شد. ترکیبات فنلی سه بار با اتیل استات استخراج و توسط جریانی از هوا خشک شدند. رسوب حاصل در متانول مطلق حل شد و و میزان فنل های متصل به دیواره با دستگاه HPLC مجهز به ستون (mm ۲۵۰ ×۴.۶) ODS -۸۰Ts در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از شیب خطی ۸۰-۳۰ درصد متانول حاوی استیک اسید ۱/۰ درصد با Flow rate ۵/۰ میلی لیتر در دقیقه به عنوان فازمتحرک استفاده شد (Wakabayashi *et al*. ۱۹۹۷). سنجش قندتام، مانوز و رامنوز با استفاده از روش فنل سولفوریک انجام گرفت (Dubois ۱۹۵۶). با استفاده از منحنی استاندارد محلول گلوکز، مانوز و رامنوز با غلظت‌های ۳۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقدار قند نمونه‌ها برحسب وزن تر محاسبه گردید. پروتئین محلول با استفاده از روش برادفورد (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovin Serum Albumin) با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان استاندارد محاسبه گردید (Bradford ۱۹۷۶). همچنین غلظت بورون با استفاده از دستگاه (ICP-MS Agilent ۷۵۰۰a; Agilent Technologies Japan Ltd., Hachioji, Tokyo, Japan) تعیین گردید. طرح آزمایش به صورت طرح کاملا" تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد.

نتایج و بحث

افزایش غلظت بورون در محیط کشت، به طور معنی داری رشد نسبی گیاه را کاهش داد (شکل ۱). از آنجاییکه انبساط پذیری دیواره سلولی عامل مهمی در رشد گیاهان به شمار می‌رود و انبساط دیواره‌ی سلولی توسط فشار ترگر ایجاد و با رفتار مکانیکی دیواره حمایت می‌شود، سفت و چوبی شدن دیواره، کاهش رشد را موجب می‌گردد (Jarvis and McCann ۲۰۰۰). چنانچه نتایج این تحقیق نشان داد با سمیت بورن، میزان ترکیبات فنلی و لیگنین دیواره‌ی سلولی افزایش یافت. افزایش این ترکیبات در دیواره‌ی سلولی، با کاهش انبساط‌پذیری دیواره، کاهش رشد گیاهان را موجب گردیده است .



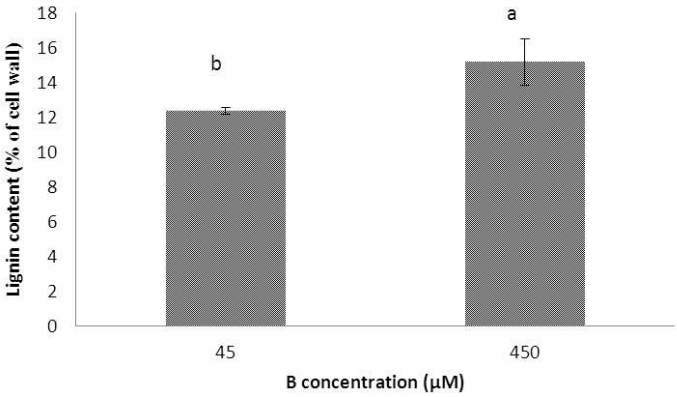
شکل ۱. سرعت رشد نسبی گیاه. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معني‌دار در سطح ۰۵/۰ بر اساس آزمون دانکن می باشد P.

B supply(M)	Wall bound phenolics (g/g wall per dry weight)						
	TA	GA	CA	HA	FA	Caf	Total
۴۵	±۴.۹۴۵ ۰.۱	۰.۰۱ ±۷.۰۱۲	۰.۲۴۵± ۰.۱	-	۱.۹۷۱± ۰.۱	-	۱۴.۱۷۳ b
۴۵۰	±۸.۶۴۶ ۰.۱	۰.۱ ±۷.۵۲۰	± ۱.۴۳۲ ۰.۱	۰.۷۹۴± ۰.۲	۲.۸۰۰± ۰.۲	۰.۰۰۰۰۲۶± ۰.۰۲	۲۱.۱۹۲ a

همانطور که در نتایج مشاهده گردید محتوای کل ترکیبات فنلی متصل به دیواره و لیگنین، با افزایش غلظت بورون نسبت به شاهد از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱، شکل ۲). سخت شدن دیواره‌ی سلولی در نتیجه‌ی اتصال عرضی ترکیباتی مانند لیگنین و منومرهای فنلی با کاهش انعطاف‌پذیری دیواره‌ی سلولی همراه است. بنابراین با سخت شدن دیواره‌ی سلولی، رشد گیاه کاهش می‌یابد (Passardi *et al*. ۲۰۰۴).

جدول ۱- تأثیر بورون بر میزان فنل های متصل به دیواره. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معني‌دار در سطح P ۰۵/۰ بر اساس آزمون دانکن می باشد.

TA, Tanic acid; GA, Galic acid; CA, Cinamic acid; HA, Hydroxy benzoic acid; FA, Ferulic acid; Caf, Caffeic acid



شکل ۲. مقدار لیگنین دیواره سلولی. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) .بر اساس آزمون دانکن می باشد P است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معني‌دار در سطح ۰۵/۰

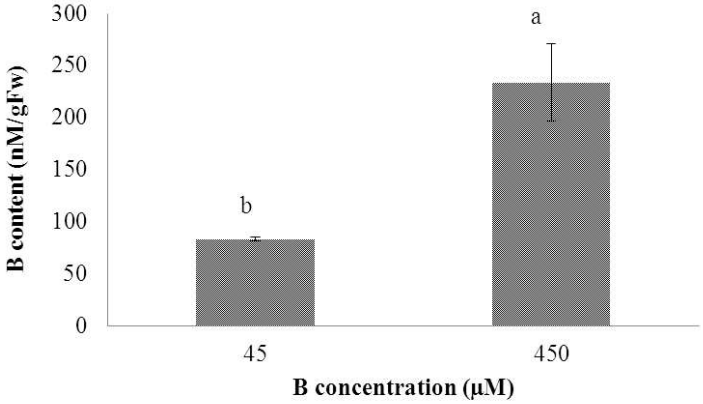
چنانچه در جدول ۲ نشان داده شده است سمیت بورون کاهش قندکل، مانوز، رامنوز و پروتئین را در گیاه موجب شد (جدول ۲). مطالعات انجام شده نشان داده است که سمیت بورون کاهش قندهای محلول را در بخش‌های مختلف گیاه جاتروفا موجب می‌گردد و با کاهش میزان مواد فتوسنتزی کاهش رشد گیاه را به دنبال خواهد داشت (Simon et al. ۲۰۱۳). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که سمیت بورون با ایجاد آسیب اکسیداتیو هموستازی سلول را ناپایدار و کاهش رشد را در گیاه ذرت به دنبال خواهد داشت (Esim et al., ۲۰۱۳).

جدول۲- تأثیر بورون بر میزان قند کل، مانوز، رامنوز و پروتئین محلول. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف .بر اساس آزمون دانکن می باشد P استاندارد است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معني‌دار در سطح ۰۵/۰

B supply(M)	Total sugar (g/gFW)	Rhamnose (g/gFW)	Mannose (g/gFW)	Soluble protein (mg/gFW)
۴۵	۲۱۱۶.۹ ±۳۲.۸ [a]	۱۲۸۲.۵ [a] ±۲۸.۱	۱۷۶۶. ±۸.۱۲ [a] ۲	۲۷.۸ [a] ± ۰.۴

۴۵۰	۲۲۷.۶^{b} ± ۱۷۱۱.۶	۹۹۵.۷^{b} ± ۶.۵	۱۳۸۵.۴^{b} ±۸.۰	۲۴.۲^{b} ± ۰.۲

براساس نتایج به دست آمده، ارتباط مستقیمی بین مقدار بورون جذب شده توسط گیاه با میزان بورون موجود در محیط رشد گیاه دیده شد. به طوریکه با افزایش غلظت بورون در محیط مقدارجذب آن توسط گیاه نیز افزایش نشان داد (شکل ۳).
در نهایت نتایج این تحقیق نشان داد با توجه به نقش بورون در فتوسنتز، متابولیسم ترکیبات فنلی و سنتز لیگنین به نظر می‌رسد سمیت بورون از طرفی با افزایش میزان فنل‌های متصل به دیواره و لیگنین و از سوی دیگر با کاهش میزان قند و پروتئین به دلیل اثرات منفی آن بر کاهش فتوسنتز و ماده سازی، کاهش رشد را در گیاه موجب گردیده است.



شکل ۳. مقدار جذب بورون توسط گیاه. داده‌ها میانگین حداقل ۳ تکرار مستقل ± انحراف استاندارد (میله‌های عمودی) .بر اساس آزمون دانکن می باشد P است. حروف غیریکسان، معرف تفاوت معني‌دار در سطح ۰۵/۰

منابع

Bradford M. M. ۱۹۷۶. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye bindig. Analytical Biochemistry, ۷۲: ۲۴۸-۲۵۴.

Dubois M. ۱۹۵۶. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Annual chemistry, ۲۸: ۳۵۰-۳۵۶.

Esim N., Tiryaki D., Karadagoglu O. and Atici O. ۲۰۱۳. Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots. Toxicol Ind Health, ۲۹:۸۰۰-۸۰۵

Fecht-Christoffers M. M., Maier P. and Horst W. J. ۲۰۰۳. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. Physiologia Plantarum, ۱۱۷: ۲۳۷-۲۴۴.

Ghanati F., Morita A and Yokota H. ۲۰۰۵. Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron. Plant Science, ۱۶۸: ۳۹۷-۴۰۵.

Iiyama K. and Wallis A.F.A. ۱۹۹۰. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. Journal of the science of food and agriculture, ۵۱: ۱۴۵-۱۶۱.

Jarvis M.C. and McCann M.C. ۲۰۰۰. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: Concepts and methodology. Plant Physiology and Biochemistry, ۳۸: ۱—۱۳.

Kobayashi M., Ohno K. and Matoh T. ۱۹۹۷. Boron nutrition of cultured Tobacco BY-۲ cells. II. Characterization of the boron-polysaccharide complex. Plant Cell and Physiology, ۳۸: ۶۷۶-۶۸۳.

Nable O.R., Ba uelos G.S.and Paull J.G. ۱۹۹۷. Boron toxicity. Plant and Soil, ۱۹۳:۱۸۱-۱۹۸.

Passardi F., Penel C and Dunand C. ۲۰۰۴. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends in Plant Science, ۹: ۵۳۴-۵۴۰.

Simon I., Diaz-Lopez L., Gimeno V., Nieves M., Pereira W. E., Martinez V., Lidon V. and Garcia-Sanchez F. ۲۰۱۳. Effects of boron excess in nutrient solution on growth, mineral nutrition, and physiological parameters of *Jatropha curcas* seedlings. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, ۱۷۶: ۱۶۵-۱۷۴.

Tanaka M. and Fujiwara T. ۲۰۰۸. Physiological roles and transport mechanisms of boron :perspectives from plants. Pflugers Arch - European Journal of Physiology, ۴۵۶: ۶۷۱-۶۷۷.

Abstract

Boron toxicity is the most important limiting factor for plant growth and development in arid and semiarid conditions.So, in this research the effects of boron toxicity on growth, sugar content, protein content, phenolic compounds and lignin in Hydroponic culture were investigated. For this aim, the flax seeds grown in Hoagland's solution were treated with ۴۵ and ۴۵۰ M H_3BO_3 (as normal and excess concentration respectively) for two weeks. The results showed that increased boron supply decreased growth, sugar and protein content but increased wall bound phenolic compounds and lignin content. Regard to these results it was concluded that boron toxicity decreased growth by reducing carbohydrate and protein biosynthesis and increasing in phenolic compounds and lignin content.