بررسی اثر مس بر رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه علف چشمه (*Nasturtium officinale*)

مرضیه تقی‌زاده[۱]، احمد مهتدی[۲]* و طهماسب آسمانه[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج

۲*- **نویسنده مسئول:** استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج (a.mohtadi@yu.ac.ir)

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۰۵

چکیده

آلودگی محیط‌زیست، ثمره جوامع صنعتی و صنعتی‌شدن اجتماعات بشری است. یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های خاک فلزات سنگین می‌باشد. مس یک ریزمغذی ضروری برای رشد گیاهان می‌باشد، ولی وقتی که غلظت مس در آب بیش از حد باشد، به‌عنوان یکی از سمی‌ترین فلزات سنگین برای موجودات زنده به حساب می‌آید. برخی از گیاهان به‌عنوان انباشته‌کننده مس معرفی شده‌اند. آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که گیاه علف چشمه توانایی تجمع بالای برخی فلزات سنگین را دارد. بر این اساس تأثیر سطوح مختلف سولفات مس (صفر، ٤، ٨، ١٢ و ١٦ میکرومولار) بر شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه *N. officinale* در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که در غلظت ٤ میکرومولار مس وزن تر و خشک اندام هوایی و هم‌چنین طول ساقه، سطح برگ و محتوای آب نسبی افزایش یافت، ولی در غلظت‌های بالاتر (٨، ١٢ و ١٦میکرومولار) این شاخص‌ها به میزان زیاد کاهش یافت. در غلظت ١٦ میکرومولار مس در محلول غذایی میانگین میزان مس ریشه و بخش هوایی به‌ترتیب ٤٢١٠ و ٥٥٨ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود. بر اساس نتایج حاصله بیشتر مس جذب شده در ریشه گیاه تجمع‌یافته بود. در مجموع می‌توان اظهار داشت که سولفات مس به‌طور معنی‌داری وزن‌تر و خشک اندام هوایی و ریشه و هم‌چنین طول ریشه، سطح برگ و طول ساقه را کاهش می‌دهد و میزان کلروفیل کل را افزایش می‌دهد، ولی اثر معنی‌داری بر میزان پروتئین، کربوهیدرات، آنتوسیانین و کاروتنوئید ندارد. به‌طورکلی حد آستانه این گیاه تا غلظت ٤ میکرومولار مس می‌باشد.

***کلید واژه‌ها*: شاخص‌های فیزیولوژیکی، رشد، مس، *Nasturtium officinale*.**

مقدمه

فلزات سنگین در سالیان اخیر به دلیل خصوصیات آلایندگی‌شان در خاک شدیداً مورد توجه قرار گرفته‌اند. این فلزات به‌طور طبیعی در خاک وجود دارند اما در اثر فعالیت‌های انسانی هم به خاک افزوده می‌شوند. در حقیقت فعالیت‌های انسانی ممکن است منجر به تجمع بیشتر فلزات سنگین در خاک شود (Yalcin *et al.*, 2007). این فلزات هم‌چنین از طریق آب، خاک و هوا به واسطه منابع مختلف طبیعی و مصنوعی به چرخه طبیعت وارد شده و اثرات کوتاه مدت و بلند مدت خطرناکی در آن‌ها ایجاد می‌کنند. بنابراین به‌عنوان یک مخاطره جدی در ادامه حیات موجودات زنده تلقی می‌شوند. فلزات سنگین از آلاینده‌های پایدار محیط‌زیست به شمار می‌آیند، چون نمی‌توانند مانند آلوده‌کننده‌های آلی از طریق شیمیایی یا فرآیندهای زیستی در طبیعت تجزیه شوند و یکی از نتایج مهم

پایداری این فلزات، تجمع‌زیستی فلزات در زنجیره غذایی می‌باشد. مس یکی از فلزات ضروری برای رشد و توسعه طبیعی گیاهان می‌باشد، اگر چه به‌طور بالقوه سمی است و نقش کلیدی را در فتوسنتز و زنجیره انتقال الکترون تنفسی بازی می‌کند. مس یک کوفاکتور ضروری برای بسیاری از متالوپروتئین‌هاست. بنابراین کمبود مس می‌تواند عملکرد ضروری در متابولیسم گیاه را تغییر دهد. تحت شرایط فیزیولوژیکی مس به‌صورت Cu^{+}و Cu^{2+} وجود دارد. عمل یون مس به‌عنوان کوفاکتور در آنزیم‌هایی مانند Cu/ZnSOD، سیتوکروم c اکسیداز، آسکوربات اکسیداز، لاکاز و پلی‌فنول اکسیداز است (Yruela, 2005). گیاهان برای رشد و توسعه طبیعی نیاز به مس دارند و وقتی در دسترس نیست نشانه کمبود خاصی در برگ‌های جوان و اندام‌های بارور مشاهده می‌شود. از سوی دیگر مس در طی چند دهه در کشاورزی به‌عنوان یک عامل ضدقارچ بوده و نیز به‌طور گسترده‌ای در محیط به وسیله فعالیت‌های انسان که اغلب باعث آلودگی محیط است، رها می‌شود. مس اضافی به شدت سمی است و باعث ایجاد نشانه‌هایی مانند کلروز و نکروز و ممانعت از رشد ریشه و ساقه و رنگ پریدگی برگ می‌شود (Marschner, 2012). گیاهان بیش تجمع‌دهنده می‌توانند فلزات را در بخش‌های هوایی خود تا سطوح بالاتر از آن‌چه که در خاک وجود دارد تغلیظ کنند. تاکنون حدود ۴۵۰ رده گیاه خاک‌زی، متعلق به ۴۵ خانواده بیش تجمع‌دهنده فلزات سنگین مختلف شناسایی شده است (Rascio and Navari-Izzo, 2011). این گیاهان دارای مکانیسم‌های مختلفی برای سمیت‌زدایی فلزات سنگین از جمله حجره‌بندی سلولی و درون سلولی و پیوند فلز در سلول با پروتئین‌ها و لیگاندهای آلی می‌باشند (Hall, 2002). اخیراً علاقه رو به رشد به استفاده از ریشه‌های تجمع‌دهنده فلزی و ریزوم گیاهان آوندی آبزی یا نیمه‌آبزی برای حذف فلزات سنگین از جریان آب آلوده وجود دارد. علف چشمه (*Watercress*) یک گیاه آبزی خوراکی است که می‌تواند به سرعت رشد کند و نیتروژن را به بیش از نیاز رشد در خود ذخیره کند که می‌تواند یک گیاه ایده‌آل برای حذف نیتروژن از آبراه باشد. این گیاه با نام علمی رایج *Nasturtium officinale* گیاهی پایا از خانواده شب‌بو (چلیپاییان یا براسیکاسه) است و عمر مفید کوتاهی دارد که به‌صورت خام یا بخارپز مصرف می‌شود. گزارش شده که عناصر سمی را از آب و خاک تجمع می‌کند.

یکی از گونه‌های علف چشمه، *L. sativum* به‌عنوان یک سبزی و به خصوص توسط جامعه بومی در نیوزلند مصرف می‌شود (Robinson *et al.*, 2003). به‌طور متوسط ۲۹ $mg\ kg^{-1}$ و ۱۶ آرسنیک به‌ترتیب در برگ و ساقه *L. sativum* رشد یافته در رودخانه Wakato، نیوزلند، یافت شده است. با توجه به موارد اشاره شده و اینکه در زمینه اثر مس بر این گیاه مطالعه‌ای صورت نگرفته است لذا هدف از این پروژه بررسی اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه علف چشمه (*N. officinale*) در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گروه زیست‌شناسی دانشگاه یاسوج انجام شد. ابتدا نمونه‌های قلمه گیاه *N. officinale* در اوایل فروردین ۱۳۹۴ از رویشگاه‌های شهرستان چرام تهیه گردید. سپس قلمه‌ها در آب مقطر گذاشته شد تا ریشه‌دار شوند. قلمه‌های یکسان ایجاد شده به محیط کشت هیدروپونیک در گلدان‌های یک لیتری پلاستیکی با محلول غذایی تغییر یافته هوگلند منتقل شدند که ترکیب آن به‌صورت زیر بود:

3 mM KNO_3, 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 1 mM $NH_4H_2PO_4$, 0.50 mM $MgSO_4$, 20 µM Fe(Na)-EDTA, 1 µM KCl, 25 µM H_3BO_3, 2 µM $MnSO_4$, 2 µM $ZnSO_4$, 0.1 µM $CuSO_4$, 0.1 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$

گلدان‌ها در طرح آماری کاملاً تصادفی و در

اتاقک کشت با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در شب و تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. گیاهان ابتدا در محیط هیدروپونیک به مدت ۱۴ روز کشت شدند و هر هفته محلول غذایی آنها عوض می‌شد. اسیدیته محلول بر روی ۵/۵ تنظیم شد و با استفاده از محلول ۲ میلی‌مولار مورفولینو اتان سولفونیک اسید (MES) در محدوده ۵/۵ ثابت نگه داشته شد. بعد از دو هفته، با استفاده از نمک سولفات مس تیمار شدند. تیمارها شامل پنج غلظت سولفات مس (۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ میکرومولار) بوده و هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۴ گیاه بود. جهت اندازه‌گیری میزان مقاومت به مس براساس میزان رشد ریشه، قبل از شروع تیمار، ریشه‌ها با کربن فعال رنگ‌آمیزی شدند (Schat and Ten Bookum, 1992). بعد از ۶ روز تیمار، طول قسمت نوک ریشه که فاقد رنگ بود با استفاده از کاغذ شطرنجی اندازه‌گیری شد. طول ساقه در تیمارهای مختلف در پایان روز ۱۴ بعد از اعمال تیمار، پس از قطع از محل یقه اندازه‌گیری شد. پس از پایان تیمار، گیاهان برداشت شده و هر گیاه به بخش هوایی و ریشه تقسیم شد و با استفاده از ترازوی دیجیتالی مدل Te313s با دقت ۰۰۱/ گرم اندازه‌گیری شدند. اندام‌ها به‌صورت جدا در پاکت‌های کاغذی در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس وزن خشک آن‌ها تعیین گردید. درنهایت جمع داده‌ها به‌صورت میانگین برای هر گلدان محاسبه گردید. برای محاسبه متوسط مساحت برگ یک گیاه، از هر گلدان ۳ گیاه انتخاب شد. سپس طول و عرض برگ‌های هرکدام از گیاهان بر حسب سانتی‌متر در همدیگر و در ضریب ۰/۷ ضرب شدند و درنهایت میانگین مساحت برگ این سه گیاه بر حسب سانتی‌متر محاسبه گردید (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). به‌منظور اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ طبق روش Yamasaki and Dillenburg (۱۹۹۹) نمونه‌برداری از تمام گلدان‌ها در تیمارهای مختلف صورت گرفت، دیسک‌های برگی تهیه و وزن تر آن‌ها تعیین شد. این نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در تاریکی در آب مقطر قرار داده شدند. سپس وزن نمونه‌های برگی در حالت تورژسانس تعیین شد، در نهایت نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند و وزن خشک آنها تعیین شد. سپس با استفاده از فرمول زیر محتوای آب نسبی برگ بر حسب درصد محاسبه شد:

$$RWC= FW-DW/TW-DW\times100$$

در رابطه‌ی فوق FW وزن تر برگ، DW وزن خشک برگ و TW وزن برگ در حالت اشباع است.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل کل با استفاده از روش Arnon (۱۹۴۹) و کاروتنوئیدها با استفاده از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام پذیرفت.

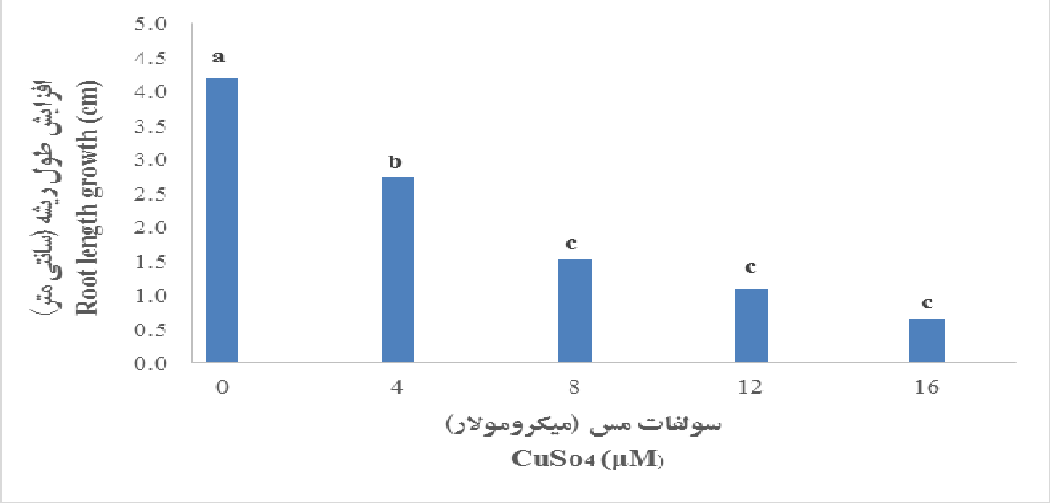
برای این منظور مقدار ۱۰ میلی‌گرم از برگ تازه گیاهان در لوله های مخصوص قرار داده شد و بخوبی ساییده گردید. سپس مقدار ۱ میلی لیتر استن ۸۰ درصد به آن اضافه شده و با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس میزان کلروفیل و کاروتنوئید در محلول رویی با استفاده از میزان جذب محلول در طول موج‌های مختلف با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و محاسبه شد. جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های اندام هوایی از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاهان را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی کاملاً سائیده وعصاره در لوله‌های آزمایش سر پیچدار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ توسط سانتریفیوژ مدل itd-2010 و جذب محلول بالایی با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل در نمونه‌های گیاهی از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده گردید. در این روش برای تعیین مقادیر پروتئین از منحنی استاندارد حاصل از غلظتهای معین پروتئین استفاده می‌گردد. برای استخراج عصاره ۰/۰۵گرم از ماده خشک گیاهی وزن گردید و ۴ سی‌سی از بافر تریس اسید کلریدریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۵۰۰ توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل itd-2010 سانتریفیوژ گردیدند و فاز بالایی جدا گردید که حاوی پروتئین کل است. برای اندازه‌گیری پروتئین به ۰/۱ سی‌سی عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ سی سی محلول برادفورد اضافه شد و به مدت ۲۰دقیقه ورتکس گردید و سپس جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت پرونئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش گردید. اندازه‌گیری کربوهیدرات با روش فنل سولفوریک اسید (Chapin and Kennedy, 1987) انجام گرفت. ۰/۱ گرم از ماده خشک اندام گیاهی (بخش هوایی) که کاملاً پودر شده در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته شد و پس از یک هفته از بخش روئی محلول ۱ میلی‌لیتر برداشته و با آب مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد: سپس به آن۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه و بعد از آن که خوب بهم زده شد، به آن ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ افزوده گردید. حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 درطول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده شد و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد. برای اندازه‌گیری میزان مس جذب شده از روش Ghasemi و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. پس از خشک شدن بخش هوایی و ریشه در آون، از هر نمونه ۰/۰۵ گرم برداشته و در لوله‌های ۱۰میلی‌لیتری ریخته شد و ۳ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۶۵ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت در زیر هود قرار داده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سرد شدن در دمای اتاق، ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن به آن اضافه شد و در حمام آب گرم دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بی‌رنگ شد. سپس با آب مقطر به حجم ۱۰میلی‌لیتر رسانده شد و مقادیر مس با استفاده از دستگاه طیف سنج جذب اتمی مدل Shimadzu AA6300 اندازه‌گیری شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها از Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیرغلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان طول ریشه

شکل (۱) اثر غلظت‌های ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ میکرومولار سولفات مس را بر افزایش طول ریشه نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت سولفات مس، طول ریشه در گیاه *N. officinale* کاهش پیدا می‌کند. در سطح صفر که شاهد آزمایش می‌باشد بیشترین میزان طول ریشه در گیاه مشاهده می‌شود. با افزایش میزان سولفات مس طول ریشه کاهش معنی‌داری پیدا کرد. با توجه به شکل (۱)، گیاه *N. officinale* در سطح ۱۶ میکرومولار سولفات مس مقاومت کمتری را نسبت به سطوح دیگر نشان داد و طول ریشه کاهش معنی‌داری پیدا نمود. نتایج این بخش از تحقیق، کاهش شاخص مقاومت (طول ریشه) با افزایش غلظت فلز در محیط کشت را نشان می‌دهد. مطالعات نشان داده است که فلزات سنگین با مهار تقسیم میتوزی سبب مهار رشد ریشه به‌عنوان اندام اصلی جذب مواد می‌شوند (Shulan *et al.*, 2010). میزان رشد ریشه یک گیاه به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم مقاومت گیاه نسبت به غلظت‌های مختلف یک فلز سنگین می‌باشد (Archambault and Winterhalder, 1995).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان طول ریشه (سانتی‌متر) در گیاه *N. officinale*
حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P\leq 0.05$)

Fig. 1. Effect of different levels of copper sulfate on root length growth (cm) in *N. officinale* ($P\leq 0.05$)

از آنجا که ریشه به‌طور ویژه‌ای به حضور فلزات سمی حساس می‌باشد، طول ریشه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین معیارهای اثرات سمیت فلزات بر گیاهان معرفی شده است (Baker and Walker, 1990). تأثیر سمیت مس روی ریخت شناسی ریشه مشابه سمیت آلومینیوم، رشد، تکثیر سلول‌ها و تعداد تارهای کشنده را کاهش می‌دهد (Sheldon and Menzies, 2005). در گیاه *Chlorella vulgaris* تیمار شده با مس، کاهش رشد مربوط به مهار تقسیم سلولی بوده است. از طرفی بعضی دلایل نشان می‌دهد که افزایش فعالیت پراکسیداز آپوپلاستی در اثر فلز سنگین اتصال گلیکو پروتئین‌های غنی از هیدروکسی پرولین را با اسیدهای فنولی افزایش می‌دهد. این فرآیند ضخامت دیواره ثانویه سلول را زیاد کرده که بر رشد سلول و طویل شدن ریشه تأثیر منفی دارد (Wang and Yang, 2005).

تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر سطح برگ

همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود میزان سطح برگ در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش یافته است و تفاوت معنی‌دار از نظر سطح برگ در تیمارهای مختلف وجود دارد. بیشترین و کمترین سطح برگ در گیاه به‌ترتیب به تیمارهای صفر و ۱۶ میکرومولار تعلق دارد. به‌طورکلی با افزایش غلظت مس میزان سطح برگ کاهش می‌یابد. فلزات سنگین خسارات قابل رویتی مانند کلروزیس و نکروزیس در برگ‌های گیاهان به وجود می‌آورند (Liu *et al.*, 2008). تصور می‌شود که اتصال cu^{2+} به صورت مستقیم یا با جایگزینی قسمتی از ca^{2+} دیواره سلول، انعطاف‌پذیری آن را کاهش داده در نتیجه موجب کاهش رشد برگ در حضور مس اضافی می‌شود (Sosse *et al.*, 2004). کاهش معنی‌دار سطح برگ تحت تنش مس در مطالعه حاضر با نتایج حاصل از بررسی اثر فلز سنگین مس بر روی گسترش برگی ذرت و *Empetrum nigrum* مطابقت دارد (Monni *et al.*, 2000). کاهش پتاسیم تحت تنش مس اضافی موجب کاهش پتانسیل اسمزی سلول و در نتیجه کاهش توسعه سلول‌های برگ در خیار (Sosse *et al.*, 2004) شده است.

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

شکل (۳ و ۴) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت مس وزن خشک اندام هوایی و ریشه کاهش پیدا می‌کند. در غلظت صفر که شاهد آزمایش می‌باشد، بیشترین مقدار مشاهده می‌شود و کمترین مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه مربوط به غلظت ۱۶میکرو مولار می‌باشد. تفاوت

معنی‌داری از نظر وزن خشک اندام هوایی و ریشه میان تیمارهای مختلف وجود دارد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان داد که میزان تولید زیست‌توده در حضور مس کاهش یافته است. کاهش زیست‌توده تحت تأثیر مس و نیکل در گیاه *Empetrum nigrum* گزارش شده است. به علاوه کاهش زیست‌توده تحت تأثیر مس در این مطالعه با نتایج حاصل از بررسی اثر مس در گیاه بوزیدان هم‌سویی دارد (Serida *et al.*, 2008). کاهش زیست‌توده تحت تأثیر عناصر سنگین نشان‌دهنده کاهش و اختلال در سنتز پروتئین‌ها و هم‌چنین کاهش فعالیت دستگاه فتوسنتزی می‌باشد. در خصوص کاهش رشد مشاهده شده در گزارش‌های متعددی بیان شده که غلظت زیاد مس در محلول غذایی موجب کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی *Bentgrass*، ذرت، آفتابگردان و هم‌چنین کاهش رشد ریشه و ساقه در گیاه علفی *Chloris gayana* شده است (Chaffai *et al.*, 2005؛ Faust and Christians, 2000؛ Sheldon and Menzies, 2005).

شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان سطح برگ (سانتی‌متر مربع) در گیاه *N. officinale*
حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$)

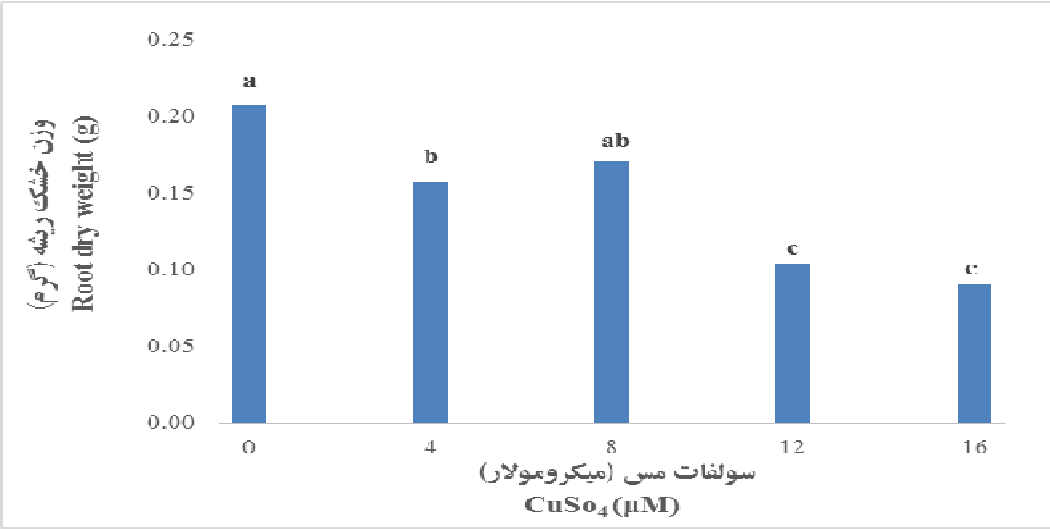
Fig. 2. Effect of different levels of copper sulfate on leaf area (cm^2) in *N. officinale* ($P \leq 0.05$)

شکل ۳-تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان وزن خشک اندام هوایی (گرم) در گیاه *N. officinale*
حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$)

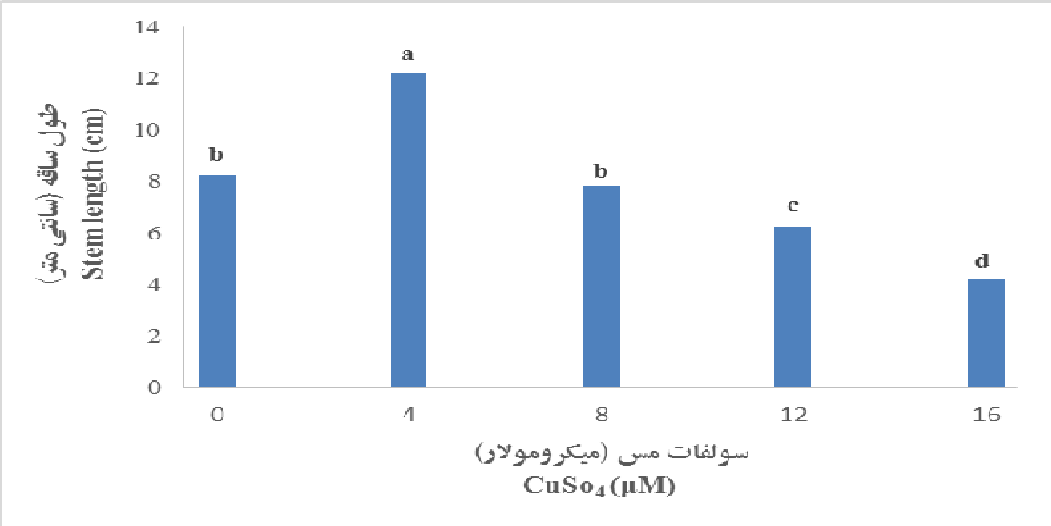
Fig. 3. Effect of different levels of copper sulfate on shoot dry weight (g) in *N. officinale* ($P \leq 0.05$)

طول ساقه

شکل (۵) نشان می‌دهد که میزان رشد طولی در ساقه با افزایش غلظت مس در گیاه *N.officinale* کاهش یافته است. بیشترین طول ساقه در غلظت ۴ میکرومولار و کمترین آن در غلظت ۱۶ میکرومولار مشاهده می‌شود. این کاهش در تیمارهای ۱۲ و ۱۶ نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بوده است. افزایش طول ساقه در غلظت ۴ میکرومولار به این دلیل است که مس جزء عناصر ریز مغذی ضروری می‌باشد و در غلظت پایین محرک بوده و در غلظت‌های بالاتر باعث کاهش رشد می‌شود.



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان وزن خشک ریشه (گرم) در گیاه *N. officinale*
حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P≤ 0.05)
Fig. 4. Effect of different levels of copper sulfate on root dry weight (g) in *N. officinale* (P≤ 0.05)



شکل ٥- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان طول ساقه (سانتی‌متر) در گیاه *N. officinale*
حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P≤ 0.05)
Fig. 5. Effect of different levels of copper sulfate on stem length (cm) in *N. officinale* (P≤ 0.05)

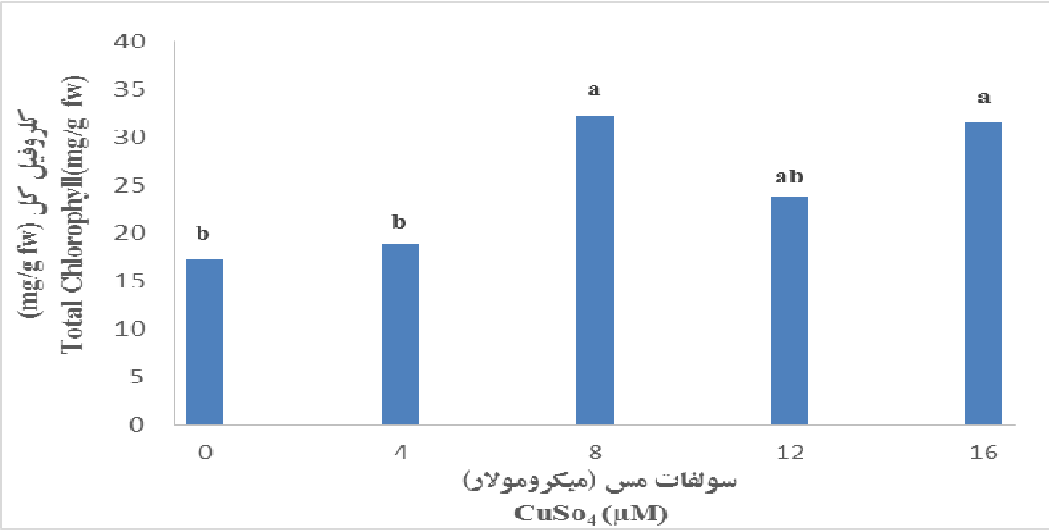
تحقیقات متعدد نشان داده است که وقتی گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین قرار می‌گیرند، وزن تر و خشک و طول بخش هوایی و ریشه در آن‌ها کاهش می‌یابد. هم‌چنین Ouzounidou و همکاران (۱۹۹۵) پیشنهادکرد که ممانعت فلزات سنگین روی طول ساقه و ریشه و سطح برگ می‌تواند عمدتاً به علت تقسیم غیرمعمول سلول باشد و ممکن است به ممانعت فلزات از فرآیندهای فتوسنتزی و تنفس در سیستم ساقه و سنتز پروتئین در ریشه بستگی داشته باشد و یا به علت کاهش تقسیم سلول و رشد آن باشد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

در گیاه *N. officinale* با افزایش غلظت سولفات مس میزان کلروفیل کل افزایش می‌یابد به جز در غلظت ۱۲ میکرومولار که این میزان تا اندازه‌ای کاهش یافته است (شکل ۶). افزایش میزان کاروتنوئیدها در غلظت‌های مختلف سولفات مس معنی‌دار نبود. عوامل ایجادکننده تنش اکسیداتیو، مانند تنش فلزات سنگین ممکن است محتوای کلروفیل را به‌وسیله برهم‌زدن تعادل در بازگشت پروتئین های کمپلکس سیستم نوری کاهش دهند (Laspina *et al.*, 2005). تنش طولانی مدت مس موجب تخریب کلروفیل در گیاه چاودار شده است (Ali and Alqurainy, 2006). مس تشکیل کلروفیل را متوقف کرده و موجب افزایش تخریب کاروتنوئیدها در برگ‌های جو شده است (Luna *et al.*, 1994). در این تحقیق در محدوده غلظت مورد بررسی سولفات مس، کاهش در میان رنگیزه‌های فتوسنتزی مشاهده نشد که ممکن است نوعی پاسخ سازشی گیاه جهت افزایش کارایی فتوسنتز باشد که بتواند جبرانی برای کاهش سطح برگ باشد.

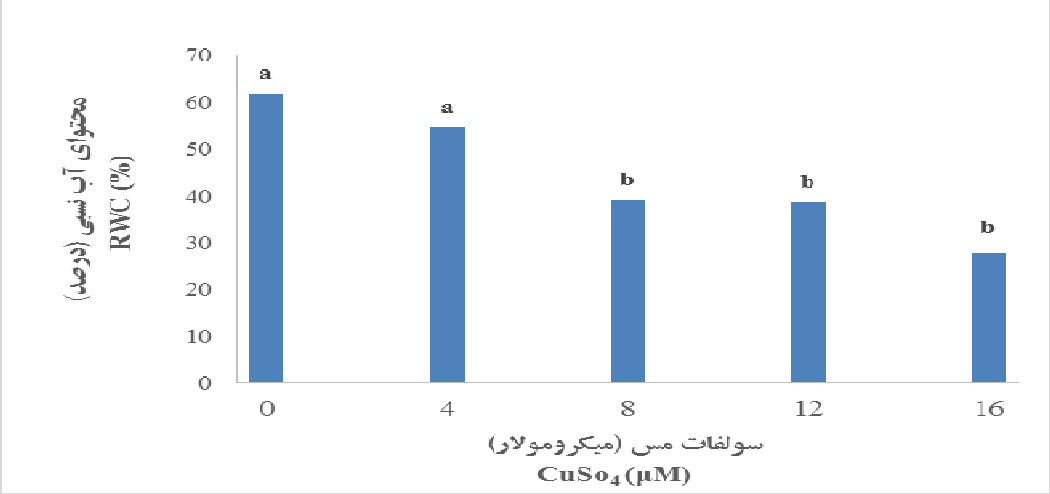
محتوای آب نسبی(RWC)

شکل (۷) نشان می‌دهد با افزایش غلظت سولفات مس از صفر (نمونه شاهد) تا ۱۶ میکرومولار محتوای آب نسبی در گیاه *N. officinale* کاهش می‌یابد. کاهش محتوای آب نسبی در غلظت‌های ۸، ۱۲ و ۱۶ میکرومولار سولفات مس نسبت به محتوای آب نسبی در نمونه شاهد معنی‌دار بوده است. تقریباً هر فرآیند گیاهی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم تحت تأثیر محتوی آب گیاه بوده و می‌توان آب را یک عامل اساسی در تنظیم رشد گیاه محسوب نمود.



شکل ٦- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گیاه *N. officinale* حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$)

Fig. 6. Effect of different levels of copper sulfate on total chlorophyll (mg/g fw) in *N. officinale* ($P \leq 0.05$)



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر محتوای آب نسبی (درصد) در گیاه *N. officinale*
حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد (P≤ 0.05)
Fig. 7. Effect of different levels of copper sulfate on RWC (%) in *N. officinale* (P≤ 0.05)

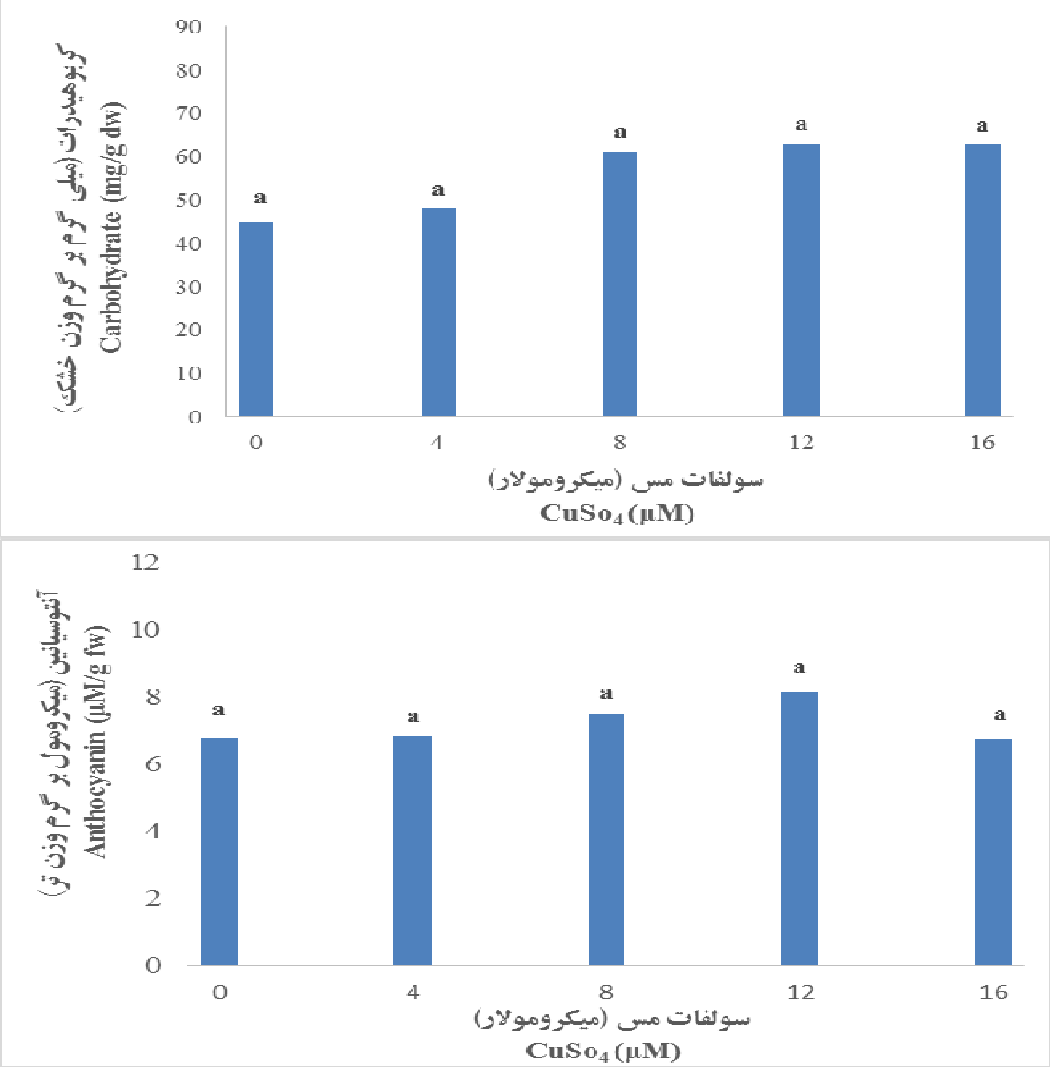
در تحقیق حاضر، محتوی آب نسبی برگ‌ها تحت تأثیر سمیت مس کاهش یافته است. مس از جذب پتاسیم جلوگیری می‌کند و نیز سمیت مس باعث نشت K^+ از سلول می‌شود (Sosse *et al.*, 2004). به این ترتیب میزان مهم‌ترین یونی که در تورژسانس و گسترش سلول‌های برگ نقش دارد، تحت تأثیر سمیت مس کاهش می‌یابد. افزایش مقاومت روزنه‌ای و به دنبال آن کاهش تعرق و در نتیجه کاهش جذب و انتقال آب و نیز کاهش کشسانی دیواره سلول از علل مهم کاهش محتوی آب نسبی برگ‌ها است (Khaveri Nejad *et al.*, 2010).

پروتئین

با افزایش غلظت سولفات مس از صفر تا ۱۶ میکرومولار میزان پروتئین در گیاه *N. officinale* تغییر معنی‌دار نکرده است. بنابراین، تیمارهای متفاوت سولفات مس تأثیری بر میزان سنتز پروتئین نداشته است. تنش‌های اکسیداتیو مختلف ممکن است میزان ROS را بالا ببرند که باعث ایجاد آسیب جدی به ماکرو مولکول‌های آلی مانند پروتئین‌ها می‌شود.

کربوهیدرات و آنتوسیانین

همان‌طور که در شکل (۸) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سولفات مس از صفر(شاهد) تا ۱۶ میکرو مولار میزان کربوهیدرات‌ها و آنتوسیانین‌ها تغییر معنی‌دار نکرده است. نتایج حاصل از تحقیق ما نشان می‌دهد که میزان قندهای احیاءکننده تحت تأثیر سمیت مس فزایش یافته است، ولی این افزایش معنی‌دار نبوده است. افزایش قندها می تواند در اثر انباشتگی آن‌ها باشد. میزان تولید قندها با آب نسبی رابطه معکوس دارد که نشان می دهد هرچه محتوای آب نسبی پایین باشد، امکان تولید قندها افزایش پیدا می‌کند. علت افزایش قندها برای بالابردن مقاومت گیاه به دلیل تنظیم فشار اسمزی سلول‌ها می‌باشد. به‌علاوه تصور می‌شود با افزایش قندها، گیاه بتواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد (Khaveri Nejad *et al.*, 2010). مقادیر آنتوسیانین‌ها به‌عنوان گروه مهمی از ترکیبات فلاونوئیدی در هیچ یک از تیمارها تغییر معنی‌داری نداشته است. اگرچه این رنگیزه‌ها برای رشد و بقا گیاهان نظیر رنگیزه‌های فتوسنتزی ضروری نیستند ولی حساسیت آن‌ها می‌تواند یک شاخص تلقی شود. از میان سیستم‌های غیرآنزیمی دفاع، ترکیب‌های فنلی و به خصوص آنتوسیانین‌ها در گیاهانی که در معرض غلظت‌های زیاد فلزات سنگین هستند، بسیار فعال بوده و باعث حفظ گیاه در مقابل سمیت می‌شوند. (Ghorbanli and Kiapour, 2012).

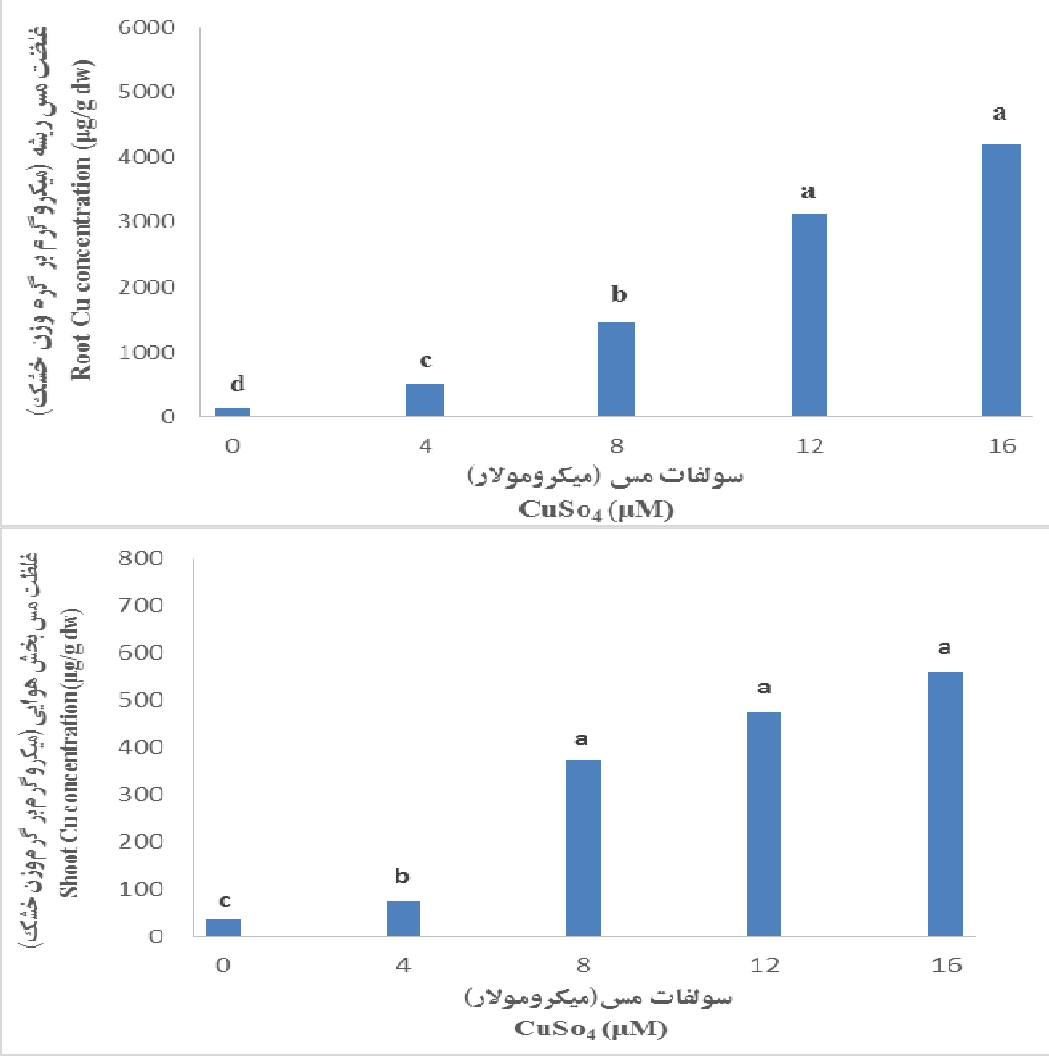


شکل ۸- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان کربوهیدرات (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن تر) در گیاه *N. officinale* حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$)

Fig. 8. Effect of different levels of copper sulfate on Carbohydrate (mg/g dw) and Antocyanin (µM/g fw) in *N. officinale* ($P \leq 0.05$)

میزان مس جذب شده

شکل (۹) نشان می‌دهد که میزان مس جذب شده توسط ریشه گیاه *N. officinale* با افزایش غلظت سولفات مس در محلول غذایی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. هم‌چنین میزان مس تجمع‌یافته در بخش هوایی نیز با افزایش غلظت مس، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. در غلظت ۱۶ میکرومولار سولفات مس در محلول غذایی میانگین میزان مس تجمع‌یافته در ریشه و بخش هوایی به‌ترتیب ۴۲۱۰ و ۵۵۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود. جذب مس توسط ناقلین آن در ریشه صورت می گیرد و میزان مس جذب شده توسط ریشه گیاه *N. officinale* با افزایش غلظت سولفات مس در محلول غذایی افزایش می‌یابد. براساس نتایج به‌دست آمده بیشتر مس جذب شده در ریشه گیاه تجمع یافته و مقدار بسیار کمی از آن به بخش هوایی منتقل شده است.



شکل ۹- تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر میزان مس تجمع یافته در ریشه و بخش هوایی (میکروگرم بر گرم وزن خشک) در گیاه *N. fficinale* حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P \leq 0.05$)

Fig. 9. Effect of different levels of copper sulfate on root and shoot Cu concentration (µg/g dw) in *N. officinale* ($P \leq 0.05$)

نتیجه‌گیری

در مجموع بر اساس یافته‌های این تحقیق می توان اظهار داشت که افزایش غلظت سولفات مس در گیاه *N. officinale* به‌طور محسوسی وزن تر اندام هوایی و ریشه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، سطح برگ، محتوای آب نسبی و هم‌چنین طول ریشه را کاهش می‌دهد و این کاهش در غلظت‌های بالا نسبت به شاهد معنی‌دار بود. مس می‌تواند از طریق اعمال تأثیرات زیانبار بر فرآیندهای فیزیولوژیک مهم موجب ناهنجاری‌هایی در رشد و نمو گیاه شود. در این تحقیق با افزایش غلظت سولفات مس میزان کلروفیل کل افزایش ولی اثر معنی‌داری بر میزان کاروتنوئید، کربوهیدرات، آنتوسیانین و پروتئین مشاهده نشد. کاهش رنگیزه‌های سبز و افزایش فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، ترکیب‌های فنلی، کاروتنوئیدها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به بالا رفتن غلظت فلزات سنگین، گواهی بر ارتباط‌بین‌تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش تجمع این مواداست. ممکن است در گیاه مطالعه شده در این پژوهش عدم کاهش معنی‌دار در محتوای آنتوسیانین و کارتنوئیدها می‌تواند در بردباری آن به فلز سنگین مس مؤثر باشد. بر اساس

نتایج حاصل از این تحقیق بیشتر مس جذب شده در ریشه گیاه تجمع یافته و مقدار بسیار کمی از آن به بخش هوایی منتقل شده است.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه یاسوج به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر قدردانی می‌نمایند.

References

1. Ali, A.A. and Alqurainy, F. 2006. Activities of antioxidants in plants underenvironmental stress. In: Motohashi, N. The lutein-prevention and treatment for diseases. Transworld Research Network, India, pp: 187-256.

2. Archambault, C.J. and Winterhalder, K. 1995. Metal tolerance in Agrostis scabra from the Sudbury Ontario area. Canadian Journal of Botany, 73: 766-775.

3. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-15.

4. Baker, A.J.M. and Walker, P.L. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, A.J. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 155-177.

5. Chaffai, R., Tekitek, A., and El-Ferjani, E. 2005. Comparative Effects of copper and cadmium on Growth and Lipd content in maize seedlings (*Zea mays* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences, 8 (4): 649-655.

6. Chapin, M.F. and Kennedy, G.F. 1987. Carbohydrate analysis. Lloydia, 22: 111-115.

7. Faust, M.B. and Christians, N.E. 2000. Copper reduces shoot growth and root development of Creeping Bentgrass. Crop Science, 40(2): 498-502.

8. Ghasemi, R., Ghaderian, S.M., and Kramer, U. 2009. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. New Phytologist, 184: 566-580.

9. Ghorbanli, M. and Kiapour, A. 2012. Copper-induced changes on pigments and activity of non-enzimatic and enzymatic defence systems in *Portulaca oleracea* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(2): 235-247. [In Farsi]

10. Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany, 53(366): 1-11.

11. Hosseinzadeh, P., Mohtadi, A., Movahedi Dehnavi, M., and Asmaneh, T. 2016. Effect of different zinc levels on some physiological characteristics of Plantago ovata under salt stress. Journal of Plant Process and Function, 5(15): 157-168. [In Farsi]

12. Khaveri Nejad, R.A., Najafi, F., and Babri Bonab, R. 2010. Effects of different concentrations of copper sulfate ($CuSO_4$) on certain physiological parameters of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Quarterly Journal of biological Science, 4(11): 77-85. [In Farsi]

13. Laspina, N.V., Groppa, M.D., and Benavides, M.P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science, 169(2): 323-330.

14. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology, 148: 350-382.

15. Liu, D., Li, T.Q., Jin, X.F., Yang, X.E., Islam, E., and Mahmood. Q. 2008. Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum Alfredii*. Journal of Integrative Plant Biology, 50(2): 129-140.

16. Luna, C.M., Gonzalez, C.A., and Trippi, V.S. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. Plant and Cell Physiology, 35: 11-15.

17. Marschner, H. 2012. Mineral nutrition of higher plants. Third edition. Academic Press, London, UK.

18. Monni, S., Salemaa, M., and Millar, N. 2000. The tolerance of *Empetrum nigrum* to copper and nickel. Environmental Pollution, 109(2): 221-229.

19. Ouzounidou, G., Ciamporova, M., Moustakas, M., and Karataglis, S. 1995. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. Environmental and Experimental Botany, 35: 167-176.

20. Rascio, N. and Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Science, 180: 169-181.

21. Robinson, B., Duwing, C., Bolan, N., Kannathasan, M., and Saravanan, A. 2003. Uptake of arsenic by New Zealand watercress (*Lepidium sativum* L.). Science Total Environment, 301: 67-73.

22. Schat, H. and Ten Bookum, W.M. 1992. Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. Heredity, 68: 219-229.

23. Serida, K., Mohammad, B.A., Eun, J.H., and Kee, Y.P. 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany, 64: 279-285.

24. Sheldon, A. and Menzies, N.W. 2005. The effect of copper toxicity on the growth and morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana*) in solution culture. Plant and Soil, 278(1-2): 341-349.

25. Shulan, Z., Qing L., Yanting, Q., and Lian, D. 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turf grass. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52(2): 7-11.

26. Sosse, B.A., Genet, P., Dunand, F.V., Toussaint, M.L., Epron, D., and Badot, P.M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. Plant

Science, 166: 1213-1218.

27. Wang, Y.S. and Yang, Z.M. 2005. Nitric oxide reduces Aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. Plant Cell Physiology, 46(12)*:* 1915-1923.

28. Wanger, G.J. 1979. Content and vacuole extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology, 64: 88-93.

29. Yalcin, M.G., Battaloglu, R., and Ilhan, S. 2007. Heavy metal sources in Sultan Marsh and its neighborhood, Kayseri, Turkey. Environmental Geology, 53(2): 399-415.

30. Yamasaki, S. and Dillenburg, L.C. 1999. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. Revista Brasilleira de Fisiologia Vegetal, 11(5): 69-75.

31. Yruela, I. 2005. Copper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17(1): 145-146.