دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(حاصلخیزی خاک و تغذیه گیاه)

تاثیر مقدار مناسب نیکل بر کمیت و کیفیت پروتئین تولید شده در برگ ذرت در دو محیط رشد اوره و نیترات آمونیوم

محمد نبی غیبی[1]، سعد اله تیموری [2] و نگار نیرومند حسینی[1]

1- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران.

2- کارشناس پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی

mngheibi@swri.ir

چکیده:

فعال سازی آنزیم اوره آز تنها نقش ثابت شده نیکل (Ni) در گیاهان آلی می باشد. به منظور بررسی تاثیر Ni بر مقدار و نوع پروتئین تولید شده در برگ گیاه ذرت، در دو محیط رشد حاوی اوره و نیترات آمونیوم و در زمان شیب تولید پروتئین در برگ، آزمایشی صورت فاکتوریل (3×2×2) در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. تیمارها شامل دو سطح Ni (صفر و در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم 0/05، در محیط رشد حاوی اوره 0/1 میلی گرم Ni در لیتر)، دو محیط رشد اوره و نیترات آمونیم و سه زمان نمونه برداری روزهای 3، 4 و 5 پس از انتقال گیاهان به محیط رشد تیمار اصلی بود. نتایج بررسی مقدار پروتئین در برگ و الکتروفورز پروتئین در SDS-PAGE بیانگر افزایش تولید پروتئین در کلیه تیمارها با افزایش زمان نمونه برداری بود. میزان پروتئین تولید شده در برگ پنجم ذرت، در تیمار Ni بیشتر از تیمار عدم مصرف Ni بود. همچنین تفسیر باندهای تشکیل شده روی ژل تشکیل پروتئینهای با وزن مولکولی بیشتر در این تیمار نسبت به تیمار عدم مصرف Ni نشان داد.

کلمات کلیدی: ذرت(*Zea maize*, L.)، پروتئین برگ، نیکل، اوره ، نیترات آمونیوم.

مقدمه:

اوره از متداولترین فرمهای کود ازته است که در جهان امروز کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرد. در ایران از 2052 هزار تن کود ازته مصرفی در سال 2004 سهم کود اوره 1727 هزار تن بوده است (بیش از 84 درصد کود ازته مصرفی. اوره نمی تواند به طور مستقیم در متابولیسم گیاهان مورد استفاده قرار گیرد مگر توسط آنزیم اوره آز به آمونیاک و دی اکسید کربن هیدرولیز گردد. یکی از راههای بر طرف نمودن سمیت اوره در گیاهان استفاده از نیکل برای افزایش فعالیت آنزیم اوره آز می باشد. فعال سازی آنزیم اوره آز تنها نقش ثابت شده نیکل در گیاهان آلی می باشد. محدودیت فعالیت آنزیم اوره آز در گیاهان با میزان کم نیکل به صورت علائم کمبود نیتروژن در گیاه ظاهر می گردید. غلظت اسید آمینه های محلول در گیاهان با میزان نیکل نا کافی کاهش پیدا می‌کند و پروتئین سازی محدود می شود.

مواد و روشها:

این آزمایش به منظور بررسی تاثیر نیکل بر مقدار و نوع پروتئین تولید شده در دو محیط رشد اوره و نیترات آمونیوم در برگ گیاه مذکور در طی مرحله پروتئین سازی طراح ریزی شد. زمانهای نمونه برداری از برگ مورد نظر از آزمایشات قبلی به دست آمد که برای هر تیمار در سه روز متوالی منتهی به تولید حداکثر پروتئین در برگ بود. با توجه به نتایج، روزهای 3، 4 و 5 بعد از انتقال گیاهان به محیط تیمار اصلی جهت نمونه برداری انتخاب گردید که برای گیاه ذرت برگ پنجم انتخاب گردید. بنابراین آزمایش فاکتوریل (3×2×2) در سه تکرار در قالب طرح کامل تصادفی اجرا گردید. تیمارها شامل دو سطح نیکل (صفر و در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم 0/05، در محیط رشد حاوی اوره 0/1 میلی گرم Ni در لیتر)، دو محیط رشد، اوره و نیترات آمونیم و سه زمان نمونه برداری بود. جوانه زنی بذرهای ذرت رقم 704 در پتری دیش و در کاغذ صافی در فیتوتروم انجام گردید پنج روز بعد از ظهور جوانه ها آنها

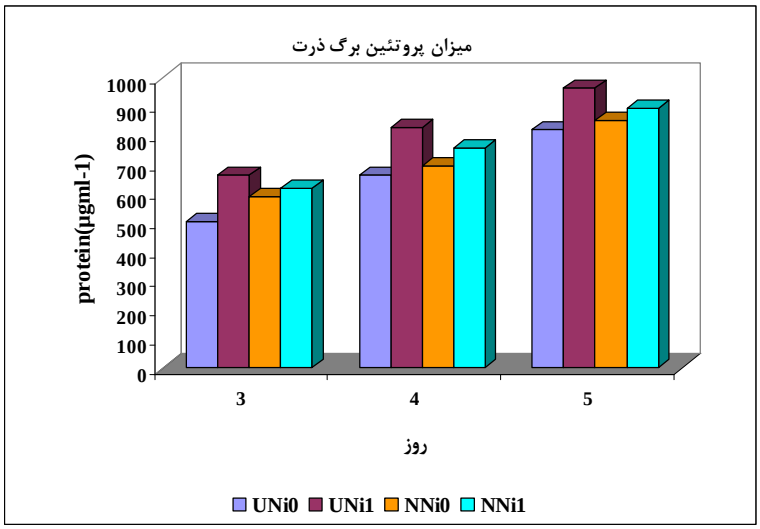
به محیط کشت هدروپونیک در گلخانه با متوسط دمای $32C^{\circ}$ و $20C^{\circ}$ به ترتیب برای روز و شب منتقل گردیدند. محیط کشت هوگلند نیم قدرت برپایه نیترات آمونیم قبل از اعمال تیمارها مورد استفاده قرار گرفت. هنگامی که گیاهچه ها به مرحله رشدی سه تا چهار برگی رسیدند هر کدام از گیاهان به 4 گلدان پلی اتیلن منتقل شدند و در هر گلدان 15 گیاهچه یکسان مستقر گردید.

سپس گیاهان در دو محیط غذایی اوره و نیترات آمونیم به میزان 84 میلی گرم ازت در لیتر تیمار شدند همچنین دو غلظت صفر و مقدار نیکل (در محیط رشد نیترات آمونیوم 0/05، در محیط رشد اوره 0/1 میلی گرم در لیتر) از منبع $NiSO_4.6H_2O$ به عنوان دو تیمار نیکل اعمال گردید. همچنین pH محلول غذایی روزانه با استفاده از سود 1 نرمال و یا اسید کلرید ریک 1 نرمال در 6/0±0/2pH تنظیم شد. در روزهای 3، 4 و 5 انتقال گیاه به محیط اصلی از برگ مورد نظر گیاهان نمونه برداری صورت گرفت. نمونه ها بلافاصله پس از برداشت با نیتروژن مایع منجمد شدند و در فریزر $-20C^{\circ}$ نگهداری گردیدند. از نمونه های برداشت شده از برگ پنجم ذرت در روزهای 3، 4 و 5 انتقال گیاه به محیط اصلی میزان پروتئین به روش Bradford (1976) و با استفاده از BSA به عنوان استاندارد، تعیین گردید. کیفیت پروتئین بر اساس وزن با روش الکتروفورز پروتئین در SDS-PAGE از نمونه های گرفته شده انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS انجام پذیرفته و از آزمون F و مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح 5% استفاده شد.

نتایج و بحث:

نمونه برداری از برگ پنجم ذرت در روزهای 3، 4 و 5 پس از انتقال گیاهچه ها به محیط رشد تیمار اصلی انجام گردید و مقدار پروتئین در آنها اندازه گیری شد. شکل 1 مقدار پروتئین در تیمار های مختلف را نشان می دهد.



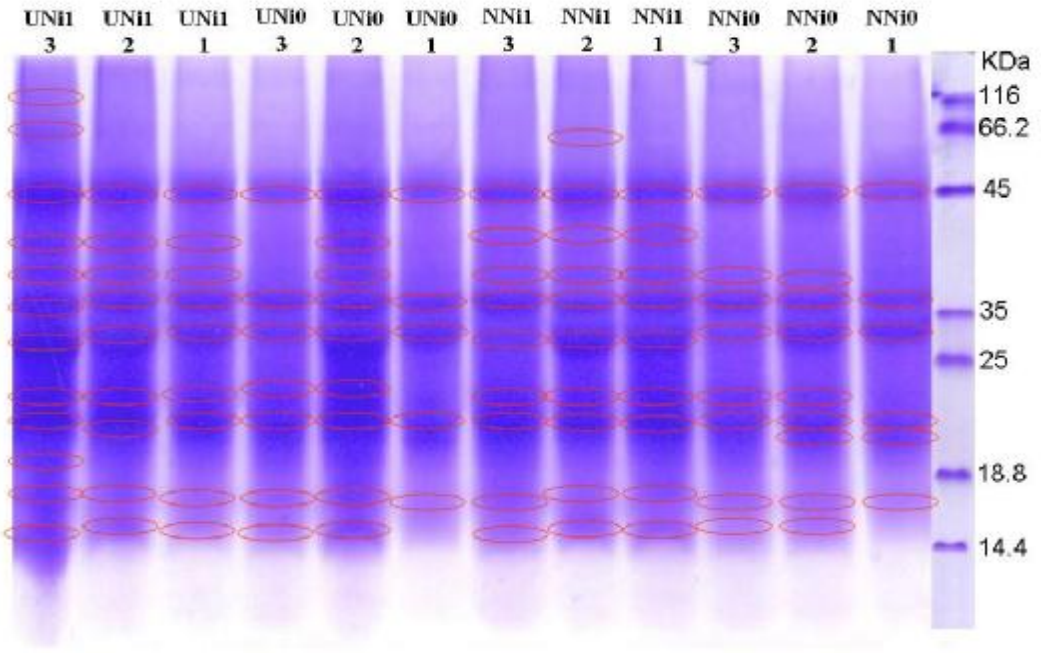
شکل 1. تاثیر سطوح مختلف نیکل و زمان نمونه برداری بر میزان پروتئین برگ ذرت. N و U به ترتیب نشان دهنده محیط های رشد حاوی نیترات آمونیوم و اوره می باشند.

در کلیه تیمارها مقدار پروتئین تولید شده در برگ پنجم ذرت با گذشت زمان بیشتر شد و در روز پنجم بیشترین مقدار را داشتند. در محیط حاوی اوره پروتئین تولید شده در برگ ذرت با حضور نیکل بیشتر از حالت عدم مصرف آن بود و این همبستگی در کلیه روزهای نمونه برداری مشاهده گردید. در محیط حاوی نیترات آمونیوم مقدار پروتئین برگ در تیمار نیکل بیشتر از عدم مصرف آن بود که این رابطه نیز در کلیه روزهای نمونه برداری حاکم بود. در مقایسه هر دو محیط رشد، میزان پروتئین تولید شده در محیط رشد حاوی اوره و تیمار نیکل بیشتر از

سایرتیمارها در روزهای نمونه برداری بود و بعد از آن میزان پروتئین تولید شده در برگ در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم در حضور نیکل بیشتر از بقیه بود. در مقایسه دو محیط رشد و عدم مصرف نیکل پروتئین تولید شده در برگ در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم بیشتر از محیط رشد حاوی اوره بود.

با انجام الکتروفورز پروتئین تولید شده در برگ ذرت بوسیله SDS-PAGE و تفسیر باندهای تشکیل شده روی ژل برای هریک از تیمارها در روزهای مختلف نتایج زیر به دست آمد. باندهای قابل تشخیص روی ژل برای هر تیمار در روزهای مختلف نمونه برداری در شکل 2 نشان داده شده است. پس از تعیین حجم حلال و RF منحنی وزن مولکولی مارکر و RF رسم گردید و بر اساس آن وزن مولکولی پروتئین های تفکیک شده روی ژل محاسبه گردید.

با بررسی شکل 2 برای هر یک از تیمارها در روزهای مختلف نمونه برداری نتایج زیر به دست آمد:



شکل 2. تاثیر مصرف نیکل و زمان نمونه برداری بر نوع پروتئین های تشکیل شده در برگ پنجم ذرت. N و U به ترتیب نشان دهنده محیط های رشد حاوی نیترات آمونیوم و اوره می باشند.

نتایج حاصل از سه روز نمونه برداری در شیب تولید پروتئین در برگ پنجم ذرت نسبت به زمان نشان داد که در تیمار نیکل نسبت به تیمار بدون مصرف نیکل در هر دو محیط رشد پروتئین بیشتری تولید شده است (شکل 1). تولید پروتئین در تیمار نیکل در محیط رشد حاوی اوره از سایر تیمارها بیشتر بود. این مطلب بیانگر فعال شدن آنزیم اوره آز در برگ ذرت می باشد که توانسته است با متابولیسم بهتر اوره در محیط رشد حاوی اوره و سم زدایی اوره درونی گیاه در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم شرایط بهتری برای پروتئین سازی در برگ ایجاد کند. مشابه این نتایج در تحقیقات Brown و همکاران (1990)، Gerendas و Sattelmacher (1999 الف)، Sinha و Pandey (2003) و Bai و همکاران (2006) به دست آمده است. تفسیر باندهای قابل تشخیص روی ژل (شکل 2) با توجه به افزایش پروتئین در کلیه تیمارها در طی زمان نمونه برداری، تشکیل پروتئین های با وزن مولکولی بیشتر که با این ژل قابل تشخیص نمی باشد قابل پیش بینی بود. در تیمار نیکل در هر دو محیط رشد باندهای جدیدی با وزن مولکولی بیشتر دیده شد که در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم پروتئین با وزن مولکولی 43/92 کیلو دالتون در هر سه روز نمونه برداری و در محیط رشد حاوی اوره پروتئین با وزن مولکولی 42/58 کیلو دالتون در هر سه روز

نمونه برداری قابل تشخیص بود که به نظر می رسید واحدهای سازنده و یا ژن های القا کننده آنزیم باشد ولی وجود این باند در تیمار عدم مصرف نیکل در محیط رشد حاوی اوره و در روز دوم نمونه برداری این نظر را رد و تنها تولید پروتئین با وزن مولکولی بیشتر را نشان می دهد. تشخیص پروتئین با وزن مولکولی بیشتر در تیمار نیکل در هر دو محیط رشد و عدم تشخیص آن در تیمار عدم مصرف نیکل می تواند مربوط به واحدهای سازنده آنزیم اوره آز باشد. در تیمار نیکل و در محیط رشد حاوی اوره در روز سوم نمونه برداری دو باند قابل تشخیص بود که وزن مولکولی پروتئین های تشکیل دهنده آن برابر 119/84 و 67/21 کیلو دالتون و در محیط رشد حاوی نیترات آمونیوم در روز دوم نمونه برداری یک باند قابل تشخیص بود که وزن مولکولی پروتئین های تشکیل دهنده آن برابر 62/37 کیلو دالتون بود. از آنجایی این باندها تنها در یک روز از نمونه برداری قابل تشخیص بود و با توجه به فعال شدن آنزیم در هر دو محیط رشد با مصرف نیکل در تمام روزهای نمونه برداری (تولید پروتئین بیشتر نسبت به عدم مصرف نیکل) این نظریه که این پروتئین ها واحدهای سازنده آنزیم و یا ژن های بیان کننده آن باشد را کم رنگ کرد ولی به طور قطع تولید پروتئین با وزن مولکولی بیشتر در این تیمار را نشان می دهد.

منابع:

Bai, C., Reilly, C.C. and Wood B.W. 2006. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acid, and organic acid of young pecan foliage. Plant Physiology. 140: 433-443.

Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. **72:**248-254.

Brown, P.H., Welch, R.M. and Madison, J.T. 1990. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid and nitrogen levels in barley. Plant and Soil. 125: 19-27.

Ciurli, S., Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson,K.S., Miletti, S. and Mangani, S. 1999. Structural properties of the nickel ion in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanism. Coordination Chemistry Reviews, 190- 192: 331-355.

Gerendas, J. and Sattelmacher, B. 1999. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source. Annals of Botany. 83: 65-71.

Malakouti, M.J. 2004. Fertilizer use by crop in Iran. Soil and Water Research Institute. Ministry of Agriculture, Iran.

Marschner, H**.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. 889p.

Sinha, S. Pandey, K. 2003. Nickel induced toxic effects and bioaccumulation in the submerged plant, *hydrilla verticillata* (L.F.) royle under repeated metal exposure. Bulletin of Environmental contamination and Toxicology. 71: 1175-1183.

Vavrina, C.S. and Obreza, T.A. 1993. Response of chinese cabbage to nitrogen rate and source in sequential plantings. Hortscience, 28(12): 1164-1165.