تغییرات القایی نیکل بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گیاه یونجه‌تاجی (*Coronilla varia* L.) در کشت هیدروپونیک

فریبا امینی*، میترا نوری، مهری عسکری، مونا فروغی و جلیل عباس‌پور[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۲۴)

چکیده

نیکل یکی از عناصری است که امروزه به مجموعه عناصر کم‌مصرف مورد نیاز گیاهان افزوده شده است. ولی به عنوان یک فلز سنگین به‌ویژه در غلظت‌های زیاد، موجب بروز تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. دانستن پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان نسبت به تنش نیکل می‌تواند به درک بیشتر از سازوکارهای مختلف سازگاری منجر گردد. اثر نیکل بر میزان کلروفیل، پرولین، پروتئین محلول و الگوی الکتروفورز پروتئین گیاهان ۴۰ روزه حاصل از کشت بذر یونجه‌تاجی در محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول با نیم غلظت هوگلند همراه با غلظت‌های صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار $NiCl_2$ بررسی گردید. پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت از شروع تیمار، محتوای کلروفیل، پرولین، پروتئین و هم‌چنین الگوی الکتروفورزی پروتئین برگ‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل برگ‌های تحت تنش نیکل در هر دو زمان کاهش یافت. ولی این کاهش در ۷۲ ساعت محسوس‌تر بود. میزان پرولین در همه تیمارهای نیکل در هر دو زمان افزایش معنی‌داری را نشان داد. به‌طورکلی، افزایش میزان پرولین در تیمار کوتاه مدت نیکل بیشتر بود که این می‌تواند ناشی از سازش گیاه در تیمار طولانی مدت نسبت به تنش باشد. برعکس، مقدار پروتئین محلول کل برگ گیاهان با افزایش تنش نیکل کاهش معنی‌داری را نشان داد. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها نیز در تیمار با نیکل دستخوش تغییراتی گردید. به‌طوری‌که با افزایش غلظت نیکل، باندهای ۷۲ و ۲۵۰ کیلو دالتونی حذف و برعکس باندهای ۹۵ و ۱۳۰ کیلو دالتونی پدیدار گشتند. نتایج این تحقیق اثر متضاد نیکل بر تجمع کلروفیل و پروتئین با پرولین در گیاه را بحث می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، پروتئین، تنش نیکل، کلروفیل

۱. به‌ترتیب استادیار، دانشیار، استادیار و کارشناسان ارشد زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: f-amini@araku.ac.ir

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]

مقدمه

نیکل یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های فلزی است که غلظت آن به سرعت در خاک‌های نواحی مختلف جهان در حال افزایش است (۳ و ۱۵). در اثر فرآیندهای طبیعی مانند فرسایش معادن و صخره‌ها و هم‌چنین ترکیبات مختلف نیکل (مانند استات نیکل، کربنات نیکل، هیدروکسید نیکل و اکسید نیکل) که در فرآیندهای مختلف صنعتی استفاده می‌شوند، نیکل در محیط انباشته شده و می‌تواند به آسانی توسط گیاهان جذب و وارد زنجیره غذایی شده و سبب ایجاد آثار زیان‌آور بر زندگی جانوران و انسان گردد (۹). امروزه نیکل به مجموعه عناصر کم‌مصرف مورد نیاز گیاهان افزوده شده است (۲۷ و ۳۷). نیکل به عنوان یک فلز سنگین، به‌ویژه در غلظت‌های زیاد، موجب بروز تنش اکسیداتیو می‌شود. از اولین آثار سمیت نیکل در گیاه، پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی است که این امر با تغییر ساختار غشای سلول‌ها موجب بازدارندگی رشد گیاه نیز می‌گردد (۲۹). نیکل هم‌چنین موجب کاهش میزان آب بافت می‌گردد (۴).

یکی از اثراتی که فلزات سنگین بر بیشتر گونه‌های گیاهی دارند بازدارندگی فتوسنتز است. اغلب در گیاهان، میزان کلروفیل به منظور ارزیابی اثر تنش محیطی بر بازدارندگی فتوسنتز محاسبه می‌شود. فلزات سنگین اثرهایی بر سازماندهی کلروپلاست، بیوسنتز کلروفیل، انتقال الکترون و آنزیم‌های فتوسنتزی و متابولیسم کربن دارند (۳۵). هم‌چنین فلزات سنگین موجب برخی تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان می‌شوند. در بررسی گیاه ذرت با تنش غلظت‌های متفاوت نیکل، سرب و روی، میزان کلروفیل کل و فتوسنتز خالص کاهش یافت. میزان این کاهش متناسب با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار بود (۱۷). مونی و همکاران (۲۵) نشان دادند که میزان کلروفیل کل در برگ گیاهان لوبیا که در تیمار با شکل معدنی نیکل رشد کرده بودند کاهش یافت. هم‌چنین کاهش کلروفیل کل در نوعی نخود (*Pigeon pea*) در تنش نیکل گزارش شده است (۳۳). گزارش‌ها نشان می‌دهند که تجمع پرولین آزاد در پاسخ به تنش عناصر سنگین در گیاهان مقاوم عمومیت دارد (۱ و ۱۱). القای تنش، غلظت پرولین را در بسیاری از گیاهان افزایش می‌دهد، که تا بیشتر از ۱۰۰ برابر میزان نرمال هم می‌رسد. وقوع این تغییر چشمگیر چندین ساعت تا چندین روز طول می‌کشد. این افزایش غلظت پرولین یک مکانیسم مولکولی مقاومت به تنش فلزات سنگین است. مطالعات نشان می‌دهد که تجمع پرولین می‌تواند به عنوان معرف بیوشیمیایی برای تنش فلزات سنگین در خانواده نخود به کار رود. به نظر می‌رسد که برگ‌های جوان اندام مناسبی برای ارزیابی پرولین هستند. گزارش‌ها نشان داده که میزان پرولین در تنش با سرب، کادمیم، مس و روی در گیاه آفتابگردان افزایش می‌یابد (۲۱). گزارش‌های زیادی تأثیر فلزات سنگین بر میزان پروتئین‌های محلول و هم‌چنین الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها را در گیاهان نشان می‌دهند. به‌طوری‌که بیان شده که تنش‌های غیرزیستی می‌توانند موجب بازدارندگی سنتز برخی از پروتئین‌ها و افزایش برخی دیگر شوند که عموماً با کاهش در میزان کل پروتئین همراه است (۱۴). اثر فلزات سنگین در کاهش میزان پروتئین در ذرت گزارش شده است. هم‌چنین میزان پروتئین در گیاه لوبیا که با مقادیر مختلف سرب تیمار شده بود، کاهش مشخصی را نشان داد (۱۹).

یونجه‌تاجی از خانواده نخود (*Leguminosae*) است که به خوبی در برابر فرسایش مقاومت می‌کند و به‌طور وسیعی در امتداد جاده‌ها و بزرگراه‌ها برای کنترل فرسایش یا استحکام حاشیه جاده به کار می‌رود. هم‌چنین به‌طور وسیعی به منظور پوشش زینتی زمین کاشته می‌شود که از طریق همزیستی با سیانوباکترهای تثبیت‌کننده نیتروژن، نیتروژن خاک را نیز افزایش می‌دهد. این گیاه از نظر تولید علوفه و ایجاد پوشش در آبخیزها نیز قابل‌توجه می‌باشد. هم‌چنین گل آن مورد استفاده زنبور عسل قرار می‌گیرد (۵). بررسی آثار آلودگی فلزات سنگین بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین و پروتئین می‌تواند موجب شناخت بیشتر سازوکارهای مقاومت این‌گونه در برابر تنش گردد. لذا، این تحقیق با هدف بررسی پاسخ گیاه یونجه‌تاجی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]

نسبت به تنش نیکل با تکیه بر تغییرات کلروفیل، پرولین و پروتئین در این گیاه طراحی و انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت بذر یونجه‌تاجی

یونجه‌تاجی (*Coronilla varia* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. کشت بذر در گلدان با نسبت ۱:۱ خاک کشاورزی به پرلیت صورت گرفت. پس از کشت ۲۰ بذر در هر گلدان، آنها با محلول با نیم غلظت هوگلند (۱۸) آبیاری و در اتاق کشت با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۰۰ میکرو مول بر مترمربع ثانیه نگهداری گردیدند. در مراحل اولیه، گلدان‌ها هر ۲ روز یک‌بار با آب مقطر آبیاری شده و در مراحل بعد از جوانه‌زنی (بعد از ۲ هفته از کشت بذر) هفته‌ای یک‌بار با محلول با نیم غلظت هوگلند و یک‌بار با آب مقطر آبیاری شدند.

تیمارها، اندازه‌گیری‌ها و بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها

گیاهان ۴۰ روزه با دقت کامل از خاک مرطوب خارج و ریشه آنها چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس این گیاهان در اپندروف‌هایی که انتهای آنها بریده شده بود قرار گرفتند. بعد، در ظرف‌هایی با اندازه۳۰ در ۱۵ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر حاوی محلول با نیم غلظت هوگلند به عنوان شاهد و محلول با نیم غلظت هوگلند همراه با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل ($NiCl_2$) قرار داده شدند. برای انجام تهویه مناسب نیز از پمپ هوا استفاده شد. گیاهان منتقل شده به شرایط هیدروپونیک در همان شرایط دمایی و فتوپریود شرح داده شده در قسمت قبل قرار داده شده و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گیاهان (دو مرحله) جهت آنالیزهای مورد نظر برداشت گردیدند. اندازه‌گیری کلروفیل با استفاده از روش آرنون (۲) صورت گرفت. برای اندازه‌گیری پرولین از روش تغییریافته بارسلو و همکاران (۴) استفاده گردید. رسم منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف پرولین خالص انجام گرفت (۳۰). به منظور استخراج پروتئین محلول کل، ۰/۵ گرم از برگ گیاه وزن و پس از افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (Tris-HCl, 50 mM; PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride), (1mM; EDTA, 2mM; Mercaptoethanol, 1mM; pH 7.2 روی یخ ساییده شد و پس از ۴۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس محلول رویی به اپندروف‌های جدید انتقال یافته و یکبار دیگر به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از این محلول به منظور اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول کل و بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گیاه استفاده شد. پروتئین‌های محلول کل گیاه به روش لاوری و همکاران (۲۴) اندازه‌گیری گردید. از آلبومین سرم گاوی (BSA) نیز برای رسم منحنی استاندارد پروتئین استفاده گردید. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول به روش SDS-PAGE و با استفاده از ژل عمودی با غلظت ۱۲٪ و شرایط دناتوره کننده غیرپیوسته انجام گرفت (۱۶). برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از نیترات نقره استفاده شد. هر یک از آزمایش‌ها در ۵ تکرار برای شاهد و تیمارهای مختلف نیکل با ۱۰ گیاه در هر تیمار انجام گردید.

آنالیزهای آماری

کلیه آزمایش‌ها براساس طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS15، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

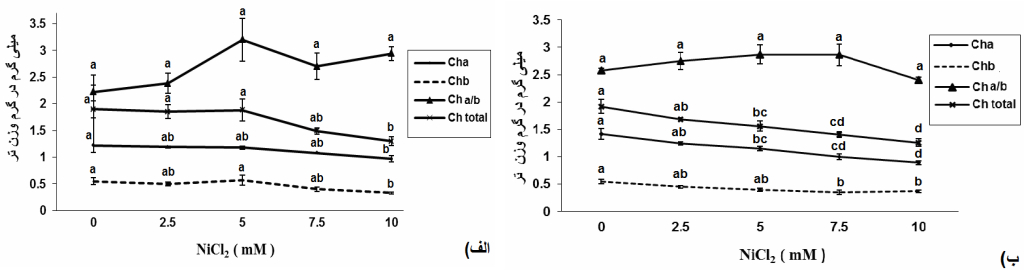
نتایج و بحث

الف) بررسی تغییرات کلروفیل گیاه

مطابق شکل ۱ و جدول ۱، نتایج آنالیز تیمار با نیکل نشان داد که ۲۴ ساعت پس از تیمار، تغییر معنی‌داری بین گیاه شاهد و تیمارهای مختلف نیکل به‌جز غلظت ۱۰ میلی‌مولار، در میزان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]



شکل۱. میزان کلروفیل a، کلروفیل b، نسبت کلروفیل a/b و کلروفیل کل برگ: الف) ۲۴ ساعت و ب) ۷۲ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل. داده‌ها میانگین ۵ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر منحنی می‌باشند. مقایسه برای هر شاخص، جداگانه انجام شده است.

جدول۱. آنالیز واریانس نتایج تأثیر ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار کلرید نیکل بر پارامترهای بیوشیمیایی گیاه با آنالیز ANOVA

	زمان تیمار (ساعت)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a/b	کلروفیل کل	پرولین	پروتئین کل
F	۲۴	۲/۴۲۶ ns	۲/۷۴۳ ns	۱/۳۱۶ ns	۳/۸۰۸ *	۵/۱۴۵ *	۲۴/۴۷۹ **
F	۷۲	۱۲/۶۴۹ **	۳/۲۴۰ ns	۱/۹۳۴ ns	۹/۱۴۶ **	۳/۸۹۱ *	۱۰/۰۰۹ **

**، * و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱٪ و ۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار

کلروفیل a مشاهده نشد. درحالی‌که پس از ۷۲ ساعت، میزان کلروفیل a کاهش معنی‌داری را نشان داد. تغییرات کلروفیل b نیز در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار، کمابیش مشابه تغییرات کلروفیل a مشاهده گردید. در نسبت کلروفیل a/b در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری بین گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار وجود نداشت. هم‌چنین در ۲۴ ساعت پس از تیمار، کاهش کلروفیل کل فقط در غلظت ۱۰ میلی‌مولار نیکل معنی‌دار بود. درحالی‌که پس از ۷۲ ساعت تیمار، همراه با افزایش غلظت تیمار، میزان کلروفیل کل کاهش معنی‌داری نشان داد. با مقایسه میزان کلروفیل کل در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با نیکل، نشان داده شد که با افزایش مدت زمان و غلظت تیمار، درصد کاهش کلروفیل افزایش می‌یابد.

یکی از تأثیراتی که عناصر سنگین بر بیشتر گونه‌های گیاهی دارند، بازدارندگی از فتوسنتز است. میزان کلروفیل در بافت‌های گیاهی یک پارامتر جامع است که می‌تواند دید وسیعی را در مورد تنش‌های محیطی بدهد. یکی از علل کاهش کلروفیل می‌تواند کاهش در سنتز کلروفیل باشد که ممکن است به علت بازدارندگی مستقیم از یک مرحله آنزیمی یا به علت رقابت فلزات سنگین با جذب عناصر ضروری مانند منیزیم و آهن (۸) صورت گیرد. همچنین کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به علت افزایش فعالیت کلروفیلاز باشد (۱۳). مونی و همکاران (۲۵) نشان دادند که میزان کلروفیل کل در گیاه crowberry که در تیمار نیکل و مس رشد کرده بود، به طور قابل توجهی کاهش یافت، که یکی از علل آن تأثیر فلزات سنگین بر تخریب کلروپلاست، جلوگیری از سنتز کلروفیل، انسداد زنجیره انتقال الکترون و بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین بوده است. در آزمایشی روی گیاه ذرت که در تیمار با نیکل قرار گرفته بود، کاهش میزان رنگدانه‌های کلروپلاستی مشاهده شد که علت آن را کاهش سنتز رنگدانه یا افزایش تجزیه اکسیداتیو

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]

رنگدانه‌ها، که در نتیجه افزایش تولید و تجمع انواع اکسیژن واکنشگر در سمیت نیکل رخ می‌دهد، دانستند (۲۲).

ب) بررسی تغییرات پرولین گیاه

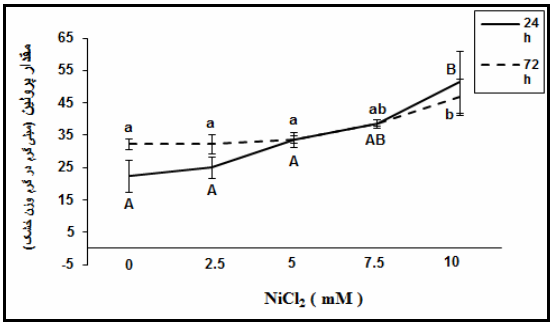
نتایج به‌دست آمده از آنالیز مقدار پرولین در گیاه یونجه‌تاجی نشان داد که میزان پرولین در غلظت ۱۰ میلی‌مولار نیکل در مقایسه با شاهد و غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری یافت. در حالی که در مقایسه با غلظت ۷/۵ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری نشان نداد. تغییرات پرولین در ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار نیکل مشابه بود (شکل ۲). با استناد به گزارش‌های معتبر، علت افزایش پرولین در غلظت‌های زیاد فلزات سنگین را می‌توان کاهش تجزیه پرولین یا افزایش بیوسنتز پرولین دانست (۱۰). مشابه با نتایج این تحقیق، درآزمایش دیگری در تنش سرب، کادمیم، مس و روی در گیاه آفتابگردان مشاهده شد که در طی تنش، تجمع پرولین افزایش یافته بود (۲۱). هم‌چنین تجمع پرولین در تنش فلزات سنگین در گندم (۲۳) و در *Vigna unguiculata* (۷) گزارش شده است. احتمال دیگر افزایش میزان پرولین در طی تنش، سنتز پرولین از مسیر گلوتامیک اسید است که به عنوان یک مکانیسم سازشی سبب کاهش انباشتگی NADH می‌شود. چرا که تنش فلزات سنگین منجر به کاهش فعالیت سیستم انتقال الکترون و در نتیجه منجر به انباشتگی NADH و H^+ می‌گردد. لذا گیاهان به منظور کاهش تجمع NADH و اسیدیته سلول که می‌تواند اثرهای مضر داشته باشد، سنتز پرولین را از مسیر گلوتامیک اسید که با مصرف دو NADH و کاهش اسیدیته همراه است افزایش داده و در نتیجه منجر به افزایش پرولین در طی تنش می‌گردند (۳۶). بین تجمع پرولین و کمبود آب ایجاد شده در اثر فلزات سنگین و در نتیجه ممانعت از رشد ریشه ارتباط مخصوصی وجود دارد. احتمالاً تجمع پرولین در گیاهان در اثر حضور نیکل ارتباطی با سازوکار مقاومت در برابر تغییرات اسمزی داشته و یا با کاهش در فعالیت سیستم انتقال الکترون در گیاهان ارتباط دارد. علاوه بر این، پرولین می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و با ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدها، خطر رادیکال‌های آزاد را کاهش داده و باعث حفظ تمامیت غشا گردد (۳۲). در آزمایشی که روی *Eichhornia crassipes* در تیمار با روی و نیکل انجام شد، نشان داده شد که در غلظت‌های کم فلزات سنگین و برای مدت کوتاه، میزان پرولین برگ در مقایسه با غلظت‌های بیشتر و مدت طولانی‌تر کمتر بود و میزان پرولین با افزایش غلظت و مدت تیمار به سرعت افزایش یافت (۲۶). این نتیجه با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر مشابه بود.

ج) بررسی میزان پروتئین محلول کل گیاه

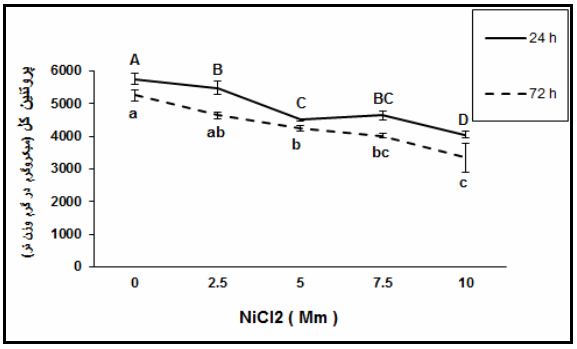
با افزایش غلظت نیکل، میزان پروتئین کل کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۳). بیشترین میزان پروتئین کل (۵۷۵۰ میکروگرم در گرم وزن تر گیاه) مربوط به گیاه شاهد در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار با نیکل بود. در بیشترین غلظت تیمار (۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل) میزان پروتئین کل به ۴۰۴۳/۳ میکروگرم در گرم وزن تر رسید که نسبت به گیاهان شاهد ۳۰ درصد کاهش داشت. به‌طورکلی، تمام غلظت‌های تیمار با نیکل در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین داشتند. غلظت ۱۰ میلی‌مولار نیکل در مقایسه با بقیه غلظت‌های نیکل نیز کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین محلول پیدا کرد. در ۷۲ ساعت پس از تیمار با نیکل در بیشترین غلظت تیمار، میزان پروتئین کل ۳۳۴۱/۳ میکروگرم در گرم وزن تر به‌دست آمد که در مقایسه با شاهد ۳۶/۴ درصد کاهش نشان داد. هم‌چنین غلظت ۱۰ میلی‌مولار در مقایسه با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری نشان داد. ولی در مقایسه با غلظت‌های ۵ و ۷/۵ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری نداشت. به‌طورکلی، نتایج در مورد پروتئین کل در تیمار با نیکل نشان داد که با افزایش غلظت تیمار با نیکل در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، میزان پروتئین کل کاهش می‌یابد و در غلظت‌های بیشتر نیکل، با افزایش مدت تیمار از ۲۴ به ۷۲ ساعت، میزان پروتئین کل کاهش بیشتری نشان می‌دهد. باندهای پروتئینی حاصل از

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]



شکل۲. میزان پرولین برگ یونجه‌تاجی در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با کلرید نیکل با غلظت‌های صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلریدنیکل. داده‌ها میانگین ۵ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر منحنی می‌باشند. مقایسه برای هر شاخص، جداگانه انجام گرفته است.



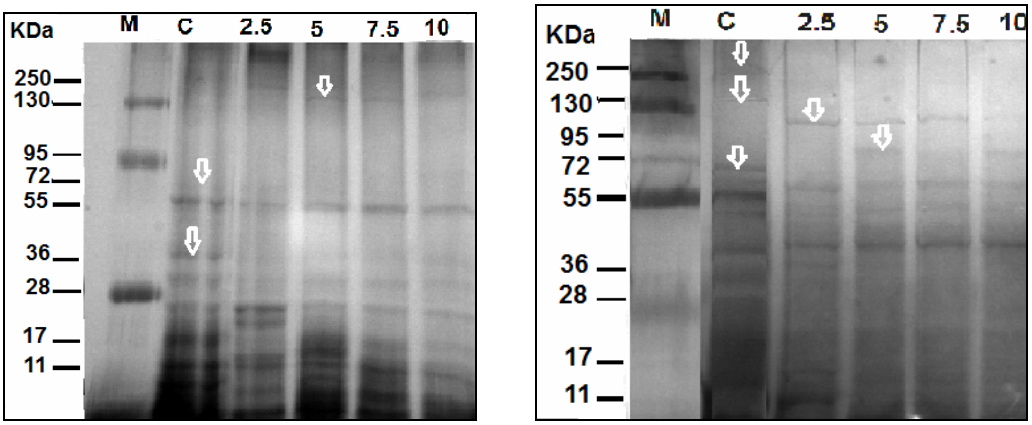
شکل ۳. میزان پروتئین کل برگ یونجه‌تاجی در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با کلرید نیکل با غلظت‌های صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار. داده‌ها میانگین ۵ تکرار ± انحراف معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر منحنی می‌باشند. مقایسه برای هر شاخص، جداگانه انجام گرفته است.

الکتروفورز SDS-PAGE نشان داد که تنش نیکل در گیاه یونجه‌تاجی سبب تغییر برخی از باندهای پروتئینی در تیمارها نسبت به گیاهان شاهد شد. در تیمار با نیکل، باند پروتئینی ۷۲ کیلو دالتون در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت در شاهد وجود داشت. اما با افزایش غلظت تیمار، به تدریج کمرنگ شده و در بیشترین غلظت تیمار با نیکل کاملاً حذف گردید. هم‌چنین باند پروتئینی ۱۳۰ کیلو دالتون در هر دو زمان تیمار، در غلظت‌های مختلف تیمار با نیکل وجود داشت. درحالی‌که در شاهد دیده نشد. هم‌چنین در ۷۲ ساعت پس از تیمار با کلرید نیکل، باند ۲۵۰ کیلو دالتون در شاهد دیده شد. درحالی‌که در غلظت‌های مختلف تیمار مشاهده نشد. هم‌چنین باند پروتئین ۹۵ کیلو دالتونی که در شاهد وجود نداشت با اعمال تنش نیکل پس از ۷۲ ساعت به وجود آمد (شکل ۴).

مطالعات کاستا و اسپیتز (۱۱)، مشابه با نتایج این پژوهش، کاهش در میزان پروتئین محلول را تحت تنش فلزات سنگین در *Lupinus albus* نشان داد. کاهش پروتئین می‌تواند به علت اختلال در متابولیسم نیتروژن در گیاهان تیمار شده با مقادیر زیاد فلزات سنگین باشد. دلیل دیگر برای کاهش میزان پروتئین در اثر تنش نیکل می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و هم‌چنین تخریب پروتئین‌ها به علت اثرهای سمی انواع اکسیژن فعال، که طی تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابند، باشد (۱۲)؛ یا به علت افزایش فرآیند تجزیه پروتئین در نتیجه افزایش

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]



شکل ۴. الکتروفورز پروتئین گیاه یونجه‌تاجی در a) ۲۴ ساعت پس از تیمار با کلریدنیکل b) ۷۲ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلریدنیکل. فلش‌ها محل تغییرات باندها را نشان می‌دهند. M: مارکر

فعالیت پروتئاز باشد که تحت شرایط تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابد (۲۸). متضاد با نتایج این تحقیق، افزایش میزان پروتئین در تنش فلزات سنگین توسط شاه و دوبی (۳۱) بیان شده که این تفاوت پاسخ‌ها می‌تواند به علت تفاوت در گونه گیاهی، نوع فلزات سنگین مورد آزمایش یا مکانیسم مقاومت گیاهان در پاسخ به تنش فلزات سنگین باشد. در آزمایشی که توسط جوموا (۲۰) روی گیاه *Lupinus luteus* L. در تیمار با عناصر سنگینی مانند کادمیم، سرب و آرسنیک انجام شد، مشابه با نتایج پژوهش حاضر، عناصر سنگین سبب تغییر در باندهای پروتئینی در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد شدند.

نتیجه‌گیری

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که تغییرات پروتئین در برگ گیاه یونجه‌تاجی مرتبط با افزایش مقاومت این گیاه نسبت به تنش عناصر سنگین به‌وسیله مکانیسم‌های متفاوت می‌باشد و این گیاه با تغییر بیان الگوی بعضی از پروتئین‌ها تا حدی در مقابل آسیب ناشی از تنش نیکل مقاومت می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Alia, P. and P. P. Saradhi. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 138: 554-558.
2. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-10.
3. Atiq-ur-Rehman, S. and M. Z. Iqbal. 2008. Level of heavy metals in the foliage of naturally growing plants collected from Korangi and Landhi industrial areas of Karachi city, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 40(2): 785-789.
4. Barcelo, J., C. H. Poschenrieder, I. Andreu and B. Gunse. 1986. Cadmium induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *Journal of Plant Physiology* 125: 17-25.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]

5. Barnes, D. L. and C. P. Dempsey. 1992. Towards optimum grazing management for sheep production on crown vetch (*Coronilla varia* L.). *Journal of the Grassland Society of Southern Africa* 9(2): 83-89.
6. Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
7. Bhattacharjee, S. and A. K. Mukherjee. 1994. Influence of cadmium and lead on physiological and biochemical responses of *Vigna unguiculata* (L.) Walp seedlings. I. Germination behaviour, total protein, proline content and protease activity. *Polluant Research* 13: 269-277.
8. Bruzynski, M. 1987. The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Plant Physiology* 9: 229-238.
9. Cempel, M. and G. Nikel. 2006. Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Journal of Environmental Study* 15: 375-382.
10. Charest, C. and C. T. Phan. 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*) properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiologia Plantarum* 80: 159-168.
11. Costa, G. and E. Spitz. 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, and protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Science* 128: 131-140.
12. Davies, C. S., S. S. Nielsen and N. C. Nielsen. 1987. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase. *Journal of American Oil Chemistry Society* 64: 1428-1433.
13. Drazkiewicz, M. 1994. Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors. *Photosynthetica* 30: 321-331.
14. Ericson, M. C. and A. E. Alfinito. 1984. Proteins produced during salt stress in tobacco cell cultures. *Plant Physiology* 74: 506-509.
15. Faryal, R., F. Tahir and A. Hameed. 2007. Effect of wastewater irrigation on soil along with its micro and macro flora. *Pakistan Journal of Botany* 39(1): 193-204.
16. Hames, B. D. and D. Rickwood. 1990. Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach. 2nd Ed., IRL Press, Oxford.
17. Heckathorn, S. A., J. K. Mueller, S. LaGuidice, B. Zhu, T. Barrett, B. Blair and A. Dong. 2004. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91: 1312-1318.
18. Hoagland, D. R. and D. I. Arnon 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.
19. Jana, S. and M. A. Choudhuri 1984. Synergistic effect of heavy metal pollutants on senescence in submerged aquatic plants. *Water Air Soil Pollutant* 21: 351-357.
20. Jomova, K. and M. Morovic 2009. Effect of heavy metal treatment on molecular changes in root tips of *Lupinus luteus* L. *Czech Journal of Food Science* 27: 386-389.
21. Kastori, R., M. Petrovic and N. Petrovic. 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* 15: 2427-2439.
22. Kumar, P., R. K. Tewari and P. N. Sharma. 2007. Excess nickel-induced changes in antioxidative processes in maize leaves. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*170: 796-802.
23. Lalk, I. and K. Dorfling. 1985. Hardening, ABA, proline and freezing resistance in the winter wheat varieties. *Plant Physiology* 63: 287-292.
24. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193: 265-275.
25. Monni, S., C. Uhlig, O. Junttila, E. Hansen and J. Hynynen. 2001. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to above ground element application. *Environmental Pollution* 112: 417-426.
26. Odjegba, V. J. and I. O. Fasidi 2006. Effects of heavy metals on some proximate composition of *Eichhornia crassipes*. *Journal Applied Sciences and Environmental Management* 10(1): 83-87.
27. Oren Benaroya, R., V. Tzin, E. Tel-Or and E. Zamski. 2004. Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 639-645.
28. Palma, J. M., L. M. Sandalio, F. J. Corpas, M. C. Romero-Puertas, I. McCarthy and L. A. del Río. 2002. Plant proteases protein degradation and oxidative stress: Role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 521-530.
29. Panda, S. K., I. Chaudhury and M. H. Khan. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 46: 289-294.
30. Ringel, C., S. Siebert and O. Wienhaus. 2003. Photometric determination of proline in quartz microplates: Remarks on specificity. *Analytical Biochemistry* 313: 167-169.
31. Shah, K. and R. S. Dubey 1997. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: Role of proline as a possible enzyme protectant. *Plant Biology* 40:121-130.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]

32. Sharma Shanti, S. and K. J. Dietz. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* 57: 711-726.
33. Sheoran, I., N. R. Aggarwal and J. Singh. 1990. Effect of cadmium and nickel on *in vivo* carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Plant and Soil* 129: 243-249.
34. Smirnoff, N. and Q. J. Cumbes. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.
35. Van Assche, F. and H. Clijster. 1990. Effects of metal in enzyme activity in plants. *Plant Cell Environment* 13: 773-780.
36. Venekemp, J. H., J. E. Lampe and T. M. Kout. 1987. Organic acid as a source of drought-induced proline synthesis in field bean plant *Vicia faba* L. *Journal of Plant Physiology* 133: 654-659.
37. Witte-Claus, P., A. Tiller-Sarah, A. Taylor-Mark and V. Davies Howard. 2002. Addition of nickel to Murashig and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 103-104.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2023-03-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1391.2.5.12.0]