

تأثیر تنش خشکی و کمبود نیتروژن بر تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌های محلول در برگ ذرت

سیروس منصوری‌فر^۱، سیدعلی محمد مدرس ثانوی^۲ و مختار جلالی جواران^۳
۱، ۲، ۳، دانشجوی دوره دکتری، دانشیار و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۴/۱۷

خلاصه

به منظور بررسی تاثیر تنش خشکی و نیتروژن بر میزان و چگونگی پروتئین‌های محلول در برگ ذرت، یک طرح تحقیقاتی در سال ۱۳۸۱ در دو مکان دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه به طور همزمان به اجرا در آمد. طرح مزبور به صورت اسپلینت فاکتوریل در قالب بلوکهای کاملاً تصادفی و در سه تکرار پیاده گردید. در این آزمایش تنش خشکی در چهار سطح شامل تنش در مرحله رویشی، مرحله زایشی و مراحل رویشی-زایشی به همراه تیمار شاهد (بدون تنش) در کرت‌های اصلی و تیمار کود نیتروژن در دو سطح کود نرمال (۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) و نصف این میزان (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) به همراه کاربرد دو رقم متوسط‌ترس S.C 647 و T.C 647 ذرت به صورت فاکتوریل و در کرت‌های فرعی قرار داشتند. در طول این آزمایش، مقدار کمی پروتئین‌های محلول در مراحل قبل و بعد از اعمال تنش با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد و سپس داده‌های حاصل تجزیه آماری گردید. همچنین جهت تعیین کیفیت پروتئین‌های محلول در تیمارهای آزمایشی، عصاره‌های حاصل به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده و تغییرات بوجود آمده در باندهای پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که اعمال تنش خشکی در مرحله رویشی (۱۰-۸ برگگی)، تاثیر بسیار معنی‌دار بر روی پروتئین‌های محلول در برگ داشته و موجب کاهش آن در تیمارهای تنشی نسبت به تیمار شاهد گردید. در تنش خشکی مرحله زایشی (بعد از گرده‌افشانی)، وضعیت پروتئین‌های محلول در تیمارها تغییر کرده و مقدار آن در تیمارهای تنشی I2 (تنش در مرحله زایشی) و I3 (تنش در هر دو مرحله رویشی و زایشی) بطور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای I4 (شاهد) و II (تنش در مرحله رویشی) گردید، در حالیکه در شروع مرحله دوم تنش، مقدار پروتئین‌های محلول در کلیه تیمارها به حد نسبتاً یکسان رسیده بود. تیمار نیتروژن نیز توانسته بود در بعضی مواقع تاثیر معنی‌دار بر روی این مؤلفه گذاشته و مقدار پروتئین در تیمار نیتروژن کامل بیشتر از تیمار کمبود نیتروژن شود. در شروع تنش‌ها، رقم V2 (T.C 647) برتری معنی‌دار نسبت به رقم V1 (S.C 647) داشت، اما در پایان تنش‌ها نتیجه عکس شده و رقم V1 پروتئین محلول بیشتری نسبت به رقم V2 در برگ‌های خود جمع نموده بود. در بررسی ژل‌های حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها در مرحله بعد از تنش رویشی، باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۳/۳، ۵۲/۸، ۱۴/۲ و ۴/۶ کیلو دالتن در تیمارهای تنشی نسبت به تیمار شاهد حذف شده و یا تحلیل رفته بود. همچنین در الکتروفورز بعد از تنش زایشی، باند پروتئینی با وزن ۸۹/۲ کیلو دالتن در تیمارهای تنشی I2 و I3 نسبت به تیمار شاهد ظاهر شده و باندهای با وزن ۲۱/۶ کیلو دالتن در تیمار I1 و ۳۵/۲ کیلو دالتن در تیمار I4 تحلیل رفته بود. در این مورد اختلاف قابل توجهی بین باندهای پروتئینی ارقام مورد آزمایش و سطوح کاربرد

نیروژن مشاهده نشد. به طور کلی بیشترین تأثیر تنش ناشی از خشکی بر مقدار کمی و کیفی پروتئین‌ها در مرحله رویشی بوده و عکس‌العمل مشابه ارقام به دلیل مقاومت به خشکی و کودپذیری یکسان آنها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، تنش خشکی، کمبود نیتروژن، پروتئین‌های محلول، الکتروفورز.

مقدمه

کمبود آب یکی از اساسی‌ترین عوامل محیطی محدودکننده تولیدات کشاورزی است. گیاهان زراعی در طی محدوده زندگی خود بطور مکرر با تنش رطوبتی مواجه بوده‌اند، لیکن مراحل معینی از رشد از قبیل جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و گلدهی از بحرانی‌ترین مراحل مواجه با خسارت‌های ناشی از تنش رطوبتی به‌شمار می‌آیند (۲۰).

رشد و نمو گیاهان در بسیاری از مناطق دنیا توسط تنش‌های محیطی زنده از قبیل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز و نیز تنش‌های محیطی غیرزنده گوناگون مانند: خشکی، شوری و دما محدود می‌گردد، به‌همین علت اختلاف قابل توجهی بین عملکرد بالقوه و عملکرد واقعی محصولات زراعی دیده شده و در چنین شرایطی موجب کاهش عملکرد، از بین رفتن حاصلخیزی و در مواردی عدم امکان تداوم کشاورزی می‌گردد.

کمبود آب با تأثیر بر آماس سلولی و در نتیجه باز و بسته شدن روزنه‌ها، فرایندهای فتوسنتز، تنفس و تعرق را تحت تأثیر قرار داده و از طرف دیگر با تأثیر بر فرایندهای آنزیمی که به‌طور مستقیم با پتانسیل آب کنترل می‌شوند، بر رشد گیاه اثر منفی می‌گذارد. گزارش‌های زیادی مبنی بر تأثیر کمبود آب از چند نوبت تا تنش‌های شدید در رابطه با مختل شدن فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان و تغییر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و نیتروژن و نیز تغییر در ساختمان پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها صورت گرفته است (۴، ۲۵، ۲۸).

تنش آبی میزان رشد را شدیدتر از جذب نیتروژن محدود می‌کند و بطور معمول غلظت عناصر غذایی جهت رشد در طی تنش آبی کاهش می‌یابد. این موضوع نشان‌دهنده اثر غیر مستقیم حجم آب خاک بر روی جذب عناصر غذایی است که از اثر مستقیم تنش آبی بر روی رشد گیاه، اهمیت بیشتری دارد (۱۹).

یکی از تغییرات عمده بیوشیمیایی که در اثر کاهش رطوبت خاک در گیاهان زراعی روی می‌دهد، تغییر در میزان تولید پروتئین‌های گیاهی در جهت تجزیه و یا جلوگیری از سنتز بعضی از آنها و نیز ساخت دسته کوچکی از پروتئین‌های مخصوص تنش است. این موضوع، تغییر و اصلاح مهمی را در بیان ژن بوجود آورده که سبب فعال یا غیر فعال شدن تعدادی از آنزیم‌ها می‌شود و بدنبال آن اجازه تغییر در ساختار مخصوص بافت‌های گیاهی را می‌دهد (۱، ۹، ۱۳). بروز تنش رطوبتی، وضعیت پلی‌رایبوزوم‌های مؤثر در ساخته شدن پروتئین‌ها را در بافت‌ها تغییر می‌دهد. تعداد پلی‌رایبوزوم‌ها در شرایط کم‌آبی کاهش یافته و میزان آن بستگی به گونه‌های مختلف گیاهی و نیز اندام‌های گوناگون در یک گیاه واحد، متفاوت می‌باشد. در این رابطه مطالعات انجام گرفته در ذرت دلالت بر این دارد که افزایش سطح تنش آبی موجب کاهش در سطح پلی‌رایبوزوم‌ها شده و در نتیجه گونه‌های گیاهی که توانسته‌اند تحت این شرایط ادامه بقاء یابند، ظرفیت و توانایی بیشتری در جهت تولید پلی‌رایبوزوم‌ها در بافت‌های خود نشان داده‌اند (۲۶). مهم‌ترین دستجات پروتئین‌های اختصاصی تنش رطوبتی عبارتند از: فراوانی پروتئین‌های جنینی با ظهور دیر هنگام^۱ (LEAs)، پروتئین‌های عکس‌العمل نشان‌دهنده به اسید آبسزیک^۲ ABA (RABs)، دهیدرین‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای رویشی. در این رابطه در گیاهانی مانند ذرت، جو و نخود، پروتئین‌های LEAs بیشتر حفاظت از ساختمان سلولی و اجزاء سلول در مقابل پسابیدگی ناشی از نقصان آب را بعهده داشته و دهیدرین‌ها، میان‌هایی هستند که از انعقاد و دلمه شدن دامنه وسیعی از ملکول‌های درشت جلوگیری کرده و تمامیت ساختار سلولی را حفظ می‌کنند. همچنین پروتئین‌های شبه-دهیدرین

1. Late Embryogenesis Abundant
2. Responsive to ABA

همچنین علاوه بر پروتئین‌های قبلی شناخته شده در عکس‌العمل به تنش آبی (شامل پروتئین RAB 17 در پاسخ به ABA)، آنزیم‌های متعددی در مسیرهای اساسی متابولیک سلولی از قبیل گلیکولیز و چرخه کربس (انولاز و تریوز فسفات ایزومراز) و بسیاری از پروتئین‌های دیگر مانند کافئات 0-متیل ترانسفراز مرتبط با لیگنینی شدن نسبت به تنش آبی از خود واکنش نشان داده بودند.

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر توأم تنش خشکی به‌صورت قطع موقت آبیاری در مراحل معینی از رشد و نیز تغییرات نیتروژن قابل دسترس در جهت کمبود آن بر میزان پروتئین‌های محلول ساخته شده در برگ و وضعیت باندهای پلی‌پپتیدی حاصل از الکتروفورز این پروتئین‌ها بود. همچنین عکس‌العمل دو رقم اصلاح شده ذرت میان‌رس در این خصوص مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

یک آزمایش مزرعه‌ای در سال ۱۳۸۱ در دو محل دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه به‌طور همزمان به اجرا در آمد. بافت خاک اولین مکان، شنی لومی با pH مساوی ۷/۷۴ و در کرمانشاه از نوع رسی و با pH برابر ۷/۷۳ بوده و محل اجرای طرح در سال قبل از کاشت آیش بود.

آزمایش مزبور شامل عامل تنش رطوبتی در چهار سطح به‌صورت قطع آبیاری در مرحله رویشی (مرحله ۸ تا ۱۰ برگی V8-V10)، مرحله زایشی (بعد از گرده افشانی R3) و در هر دو مرحله رویشی و زایشی بود که به همراه تیمار شاهد (بدون تنش رطوبتی) به‌ترتیب با حروف اختصاری I1، I2، I3 و I4 جمعاً در چهار سطح به‌عنوان کرت‌های اصلی (فاکتور اصلی) و عامل کود نیتروژن در دو سطح شامل مقدار کود توصیه شده توسط مرکز تحقیقات ذرت به‌میزان ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (N1) و نیز نصف این مقدار (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2) با استفاده از منبع کود اوره و نیز با در نظر گرفتن مقدار کل نیتروژن موجود در خاک به‌همراه تیمار ارقام شامل دو واریته متوسط‌طرس هیبرید ذرت به اسامی S.C 647 و T.C

در شرایط تنش اسمزی متاثر از ABA تولید شده و بیشتر در آندوسپرم دانه تجمع می‌یابند (۷، ۲۳).

طبق گزارش مرکز اطلاعات ذرت (MAIZE DB)، دهیدرین‌ها پروتئین‌هایی هستند که بر اثر تنش‌های ناشی از پسابدگی، اسید ایزوزیک و سرما در گیاهانی مانند ذرت وجود آمده و اندازه آنها دارای دامنه ۱۴ تا ۸۵ کیلو دالتن می‌باشد (۵). فویر و همکاران (۱۹۹۸) با اعمال تنش خشکی روی گیاه ذرت در مرحله ۹ برگی، به این نتیجه دست یافتند که علی‌رغم ذخیره کافی نیتروژن در خاک، مقدار اندکی نیترات در برگ‌های جوان بالغ وجود دارد. در این رابطه علاوه بر افزایش تجمع قندهای مختلف و نیز اسیدهای آمینه در برگ‌های تنش دیده، یک همبستگی بین نیترات ریداکتاز (NR) قابل استخراج در برگ و میزان آسیمیلایسیون CO2 مشاهده گردید، به‌طوری‌که فعالیت نیترات ریداکتاز در پاسخ به تنش کم‌آبی کاهش یافته و در زمان بازسازی گیاه با محلول غذایی، کاهش فعالیت نیترات ریداکتاز و مقدار فتوسنتز به‌سرعت جبران شده بود.

کورنول و کیگاسترا (۱۹۸۷) در توصیف آنزیم روبیسکو چنین اظهار نموده‌اند که ریبولوز ۱ و ۵- بای فسفات کربوکسیلاز- اکسیژناز یکی از آنزیم‌های حیاتی در کلروپلاست بوده که به‌عنوان مثال ۴۰٪ از کل پروتئین‌های محلول در برگ اسفناج را تشکیل می‌دهد. این آنزیم شامل ۸ زیر واحد بزرگ^۱ (LSU) و ۸ زیر واحد کوچک^۲ (SSU) است که زیر واحد بزرگ به‌وسیله کلروپلاست و زیر واحد کوچک به‌وسیله ژنوم هسته‌ای به رمز در آمده است. وزن مولکولی زیر واحد بزرگ در حدود ۵۵ کیلو دالتن و زیر واحد کوچک بین ۱۲ تا ۱۴ کیلو دالتن در گیاهان سبز می‌باشد.

ریکاردی و همکاران (۱۹۹۸) دو لاین ذرت ۲۱ روزه به‌همراه هیبریدهای آنها را به‌مدت ۱۰ روز تحت تنش شدید آبی قرار داده و تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌های موجود را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، از ۴۱۳ لکه پروتئینی تشخیص داده شده در پروتئومیکس، ۷۸ لکه تغییرات کمی معنی‌دار در جهت کاهش یا افزایش از خود نشان دادند،

کنترل آب بر روی هر کرت در طول دوره رشد استفاده گردید. زمان شروع محدود آبیاری بعد از هر تنش توسط اندازه‌گیری رطوبت خاک به روش ثقلی و با در نظر گرفتن پتانسیل آب خاک و نیز وضع ظاهری گیاهان در نظر گرفته می‌شد. برای تهیه نمونه‌های پروتئینی در هر مرحله ۵ بوته از هر کرت به طور تصادفی انتخاب و سپس از برگ‌های معین و یکسانی نمونه برداری انجام می‌گرفت.

برای استخراج پروتئین‌های محلول در برگ، یک گرم نمونه برگی فریز شده در -80°C درجه سانتی‌گراد در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع کاملاً پودر گردید و سپس با اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج با ترکیب: تریس-اسید کلریدریک یک مولار $(\text{pH}=7.5)$ + ۵٪ Na_2EDTA یک مولار + ۱۲٪ + دو-مرکاپتواتانل ۰۴٪ در آب مقطر به نمونه و هموژنیزه کردن آن، مخلوط حاصل به تیوب‌های در دار منتقل و به دنبال آن در 13000 دور در دقیقه (RPM) و به مدت ۲۰ دقیقه سانتری فیوژن شده و عصاره شفاف از محلول جدا و در -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اندازه‌گیری مقدار کمی پروتئین‌های محلول بر اساس روش برادفورد (۳) با استفاده از معرف بیو-رد (Bio-rad) در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت و سپس با رسم منحنی حاصل از قرائت استانداردهای پروتئینی تهیه شده از سرم آلبومین گاوی (BSA) در غلظت‌های معین بر روی کاغذ شطرنجی تعیین گردید. همچنین به منظور الکتروفورز پروتئین‌های محلول در برگ، عصاره‌های حاصل از استخراج پروتئین‌ها همراه با بافر نمونه ۲X یا ۴X با ترکیب تریس-اسید کلریدریک ۰/۵ مولار $(\text{pH}=6.8)$ + SDS ۲٪ + دو-مرکاپتواتانل ۵٪ + گلسیرویل ۱۰٪ + برموفنل-بلو ۱٪ به مقدار لازم در آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در آب 100°C درجه سانتی‌گراد جوشانده و سپس در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد فریز و آماده استفاده گردید. الکتروفورز پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE (سدیم دو دسیل سولفات - ژل پلی‌اکریل آمید) انجام گردید (۱۷). در این روش، ژل تحتانی (ژل جدا کننده) با غلظت‌های ۱۴ تا ۱۵ درصد با ترکیب اکریل‌آمید ۳۰٪ + بیس-اکریل‌آمید ۰/۸٪ + بافر ژل تحتانی + آمونیوم پیرسولفات (APS) ۱٪ + تریس ۱٪ + ۵ تا ۱۰

647) (از ارقام توصیه شده توسط مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر برای کاشت در مناطق معتدل و سردسیر) به عنوان کرت‌های فرعی (فاکتور فرعی) به صورت یک طرح اسپلیت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار به اجراء درآمد. این طرح شامل ۴۸ واحد آزمایشی (به صورت $3 \times 2 \times 4$) در هر مکان بوده و کلیه مراحل اعمال تنش و نمونه برداری برای ارقام مورد آزمایش، در مراحل رشد یکسان انجام پذیرفت. هر کرت از پنج خط کاشت به طول ۷ متر و به فواصل ۷۵ سانتی‌متر از یکدیگر تشکیل شده و سطحی معادل $31/5$ مترمربع را در بر می‌گرفت. قبل از کاشت با نمونه برداری از خاک هر دو مزرعه در عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر، منحنی رطوبتی خاک (P.F) بر اساس پتانسیل آب خاک در فشارهای مختلف محاسبه و رسم گردید. کودهای بکار برده شده شامل کود فسفره (P_2O_5) به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار به فرم سوپر فسفات تریپل با کاربرد قبل از کاشت (پاییز سال قبل) و کود نیتروژن مورد نیاز بر اساس نتایج آزمایش خاک و تیمار مورد نظر به صورت $\frac{1}{3}$ پایه و $\frac{2}{3}$ سرک در دو مرحله ۶-۴ برگی و ظهور اولین گره ساقه به فرم نواری به کار رفت. تراکم کاشت نهایی، ۷۰۰۰۰ بوته در هکتار در نظر گرفته شد.

تاریخ کاشت طرح در مکان اول، $81/2/28$ و برداشت نهایی در $81/6/29$ انجام گرفت، هم‌چنین تاریخ کاشت در مکان دوم، $81/2/18$ و برداشت نهایی در $81/7/9$ صورت گرفت. در طی مراحل داشت دوبار از کود سرک بر اساس تیمارهای کودی استفاده گردید. دور آبیاری طرح بر اساس منحنی رطوبتی خاک و نگهداری رطوبت خاک در حد ظرفیت مزرعه در محل تهران هر دو تا سه روز یکبار و در کرمانشاه به طور متوسط یک هفته بود.

دوره تنش و قطع آبیاری در مرحله رویشی در مکان تهران به دلیل سبک بودن خاک، ۸ روز و در کرمانشاه نیز به دلیل سنگینی خاک آن، ۱۸ روز به طول انجامید و مدت قطع آبیاری در مرحله زایشی در تهران ۷ روز و در کرمانشاه ۱۵ روز بود. به منظور تنظیم دقیق آبیاری و اعمال صحیح دوره‌های تنش و قطع آبیاری از یک شبکه لوله‌کشی پلی‌اتیلن به همراه شیرهای

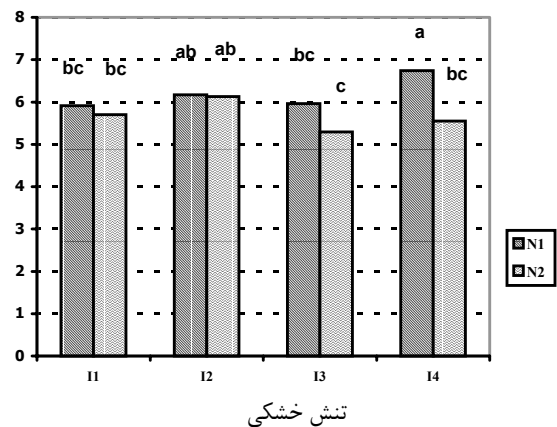
از شروع تنش رویشی، تیمار I4N1 بیشترین مقدار و تیمار I3N2 کمترین مقدار پروتئین محلول را داشتند (شکل ۱). تیمار تنش خشکی در این مرحله از رشد (۸ برگگی) در سطح ۱٪ معنی دار بود (جدول ۱) و ملاحظه گردید که مقدار پروتئین‌های محلول برگ در تیمارهای I1 (تنش در مرحله رویشی) و I3 (تنش در هر دو مرحله رویشی و زایشی) نسبت به تیمار شاهد (I4) بیش از ۱ میلی‌گرم یا چیزی در حدود ۳۳٪ کاهش داشته و به ۳/۶۹ تا ۳/۷۰ میلی‌گرم بر گرم برگ رسیده است. همچنین به دلیل شرایط یکسان تیمارهای I4 (شاهد) و I2 (تنش در مرحله زایشی) در ارتباط با عدم فرا رسیدن زمان اعمال تنش زایشی، اختلاف معنی‌داری بین آنها دیده نشد (جدول ۲).

مایکرولیتر تمد (TEMED)+ آب مقطر و به‌دنبال آن ژل فوقانی (ژل متراکم کننده) با غلظت ثابت ۴٪ تهیه و در بافر تانک در ولتاژ ۸۰ الی ۱۰۰ ولت پس از بارگذاری نمونه‌ها، الکتروفورز انجام گرفت. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی بلو برلیانت G250 انجام شده و پس از رنگ‌بری، باندهای ظاهر شده در نمونه‌های آزمایشی با باندهای حاصل از مارکر پروتئینی M4038 سیگما (Sigma) با ترکیب ۱۳ نوع پروتئین با وزن‌های ملکولی ثابت ۶/۵، ۱۴/۲، ۲۰، ۲۴، ۲۹، ۳۶، ۴۵، ۵۵، ۶۶، ۸۴، ۹۷، ۱۱۶ و ۲۰۵ کیلودالتن (KDa) مقایسه گردید. سپس با استفاده از کاغذ نیمه لگاریتمی بر اساس Rf باندهای مورد نظر و log10 وزن ملکولی باندهای مارکر، اندازه وزن ملکولی باندهای مجهول برآورد گردید.

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب تأثیر تنش خشکی و کمبود نیتروژن بر مقدار پروتئین‌های محلول در برگ ذرت

میانگین مربعات M.S					
S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	بعد از تنش زایشی (D)	بعد از تنش رویشی (B)	بعد از تنش قبل از تنش زایشی (A)
	R تکرار (بلوک)	۲	۳/۸۷	۱/۳۶	۵/۰۱
	L مکان	۱	۳/۵۶	۷۱۴/۴۲	۲۳/۹۹
	L×R خطای الف	۲	۲/۱۳	۲/۶۵	۲/۲۵
	I تنش خشکی	۳	**۸/۵۷	**۸/۶۷	۲/۹۲
	IL تنش خشکی×مکان	۳	۲/۱۸	*۱/۹۱	۱/۶۷
	I(L)×R خطای ب	۱۲	۱/۰۳	۰/۵۳	۱/۱۵
	N نیتروژن	۱	**۶/۳۲	*۲/۲۰	۱/۲۰
	V رقم	۱	۵/۲۱	۰/۱۶	**۴/۶۸
	IN تنش×نیتروژن	۳	۱/۳۴	۰/۶۸	*۲/۱۱
	IV تنش×رقم	۳	۱/۹۰	۰/۴۹	۰/۲۵
	NV نیتروژن×رقم	۱	۰/۶۱	۰/۰۲	۱/۲۷
	NL نیتروژن×مکان	۱	**۸/۰۸	۱/۷۵	۰/۳۷
	VL رقم×مکان	۱	۰/۱۴	۰/۷۴	*۲/۹۶
	INV تنش×نیتروژن×رقم	۳	۰/۷۸	۰/۵۷	۰/۶۴
	INL تنش×نیتروژن×مکان	۳	۰/۶۴	*۱/۶۹	۱/۰۰
	NVL نیتروژن×رقم×مکان	۱	۰/۵۲	*۲/۷۸	*۲/۶۰
	IVL تنش×رقم×مکان	۳	۰/۷۸	*۲/۲۳	۰/۳۸
	INVL تنش×نیتروژن×رقم×مکان	۳	۰/۷۰	۱/۳۵	۰/۰۴
	E خطای آزمایش	۴۸	۰/۱۸۵	۰/۵۷	۰/۶۰

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪



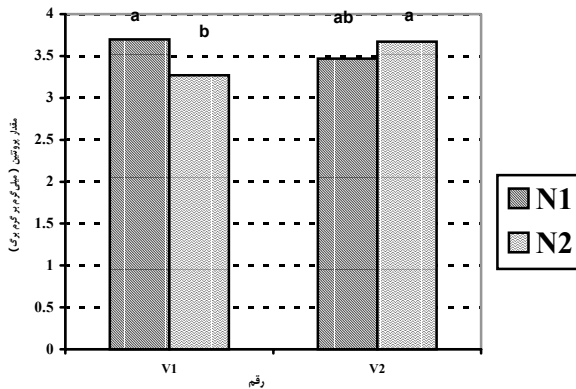
شکل ۱: اثر متقابل تنش خشکی و نیتروژن (IN) بر پروتئین‌های محلول در برگ ذرت (قبل از تنش رویشی)

(I1=تنش رویشی، I2=تنش زایشی، I3=تنش رویشی و زایشی، I4 =بدون تنش، S.C 647=V1، T.C 647=V2)

نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس جدول ۱/۱ در حالت قبل از اعمال تنش رویشی در مرحله ۸ برگگی (I1-V8)، عامل رقم در سطح ۱٪ معنی دار شده است. همچنین اثر متقابل تنش رطوبتی در نیتروژن (IN) در سطح ۵٪ معنی دار می‌باشد. میانگین رقم V2(T.C 647) با مقدار کل پروتئین محلول ۶/۱۵ میلی‌گرم بر گرم برگ تازه، برتری مشهود نسبت به رقم V1(S.C 647) داشت (جدول ۲). در اثر متقابل تنش رطوبتی در نیتروژن قبل

توانایی جبران پروتئین‌های از دست رفته را داشته و در فاصله زمانی حدود ۳۷ تا ۴۳ روزه (با توجه به منطقه مورد آزمایش) به حالت عادی بازگشته است. در این مرحله بین سطوح تیمار کمبود نیتروژن و ارقام نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۲).



شکل ۲- اثر متقابل رقم و نیتروژن (NV) بر پروتئین‌های محلول در برگ ذرت (قبل از تنش زایشی)
 (II = تنش رویشی، I2 = تنش زایشی، I3 = تنش رویشی و زایشی، I4 = بدون تنش، V1 = S.C647، V2 = T.C647)

طبق نظر هسیانو (۱۹۷۳)، عکس‌العمل سریع گیاهان تحت تنش کمبود رطوبت و قابلیت برگشت سریع آنها به وسیله تجدید آبیاری در این رابطه بوده که تنش رطوبتی بر روی سنتز اصلی پروتئین‌ها و خصوصاً در سطح ترجمه آنها اثر می‌گذارد.

در همین خصوص شاه و لومیس (۱۹۹۵) مشاهده کردند که مقادیر پروتئین‌های کل و محلول در برگ‌های چغندر قند بر اساس هر گرم وزن خشک پایه در شرایط تنش رطوبتی فزاینده، کاهش یافته است. در این رابطه ملاحظه گردید که عکس‌العمل گیاهان مذکور به تنش رطوبتی، سریع بوده و می‌تواند با تجدید آبیاری آنها به حالت قبل برگردد. این موضوع بر این امر دلالت می‌کند که اثر تنش رطوبتی در اندازه و مقدار معین، قابل برگشت است.

نتایج حاصل از اعمال تنش رطوبتی در مرحله زایشی (بعد از گرده‌افشانی، R1- R3) نشانگر یک اختلاف معنی‌دار مجدد در سطح ۱٪ در تیمار تنشی است (جدول ۱/۱). در این رابطه تیمار

ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تنش خشکی و کمبود نیتروژن بر مقدار پروتئین‌های محلول در برگ ذرت (تهران)

میانگین مربعات M.S		
df	درجه آزادی	منابع تغییرات S.O.V
۲	۱/۹۵	R تکرار (بلوک)
۳	۰/۱۱	I تنش خشکی
۶	۰/۳۰	I×R خطای الف
۱	۰/۱۷	N نیتروژن
۱	۰/۰۹	V رقم
۳	۰/۴۶	IN تنش×نیتروژن
۳	۰/۵۱	IV تنش×رقم
۱	*۱/۱۹	NV نیتروژن×رقم
۳	۰/۰۵	INV تنش×نیتروژن×رقم
۲۴	۰/۲۳	E خطای آزمایش

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

گوگورسنا و همکاران (۱۹۹۵) نیز گزارش کرده‌اند که در گره‌های گیاهان نخود در شرایط تنش رطوبتی ۲/۰۳ مگا پاسکال (Mpa)، حدود ۳۰٪ کاهش در سطح پروتئین‌های محلول نسبت به گیاهان با آبیاری مناسب، بوجود آمده است. همچنین کلشوستا و همکاران (۱۹۸۷) چنین اظهار داشته‌اند که در تمامی کلروپلاست‌های جداسازی شده از ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی ارقام گندم تحت شرایط تنش خشکی مانند ژنوتیپ‌های حساس به خشکی، یک کاهش در مقدار پروتئین‌های محلول برگ نسبت به گیاهان بدون تنش حاصل شده است.

بین تیمارهای آزمایشی قبل از اعمال تنش رطوبتی در مرحله زایشی (بعد از گرده‌افشانی - مرحله R1-R3)، اختلاف معنی‌داری دیده نشد (جدول ۱، مکان تهران)، در این مرحله اثر متقابل نیتروژن در رقم در سطح ۵٪ معنی‌دار شده است، بطوریکه تیمار N1V1 با ۳/۷ میلی‌گرم بر گرم برگ، بیشترین مقدار و تیمار N2V1 با ۳/۲ میلی‌گرم بر گرم برگ، کمترین مقدار پروتئین محلول در برگ را دارا بودند (شکل ۲). همچنین در مقایسه میانگین‌ها مشاهده گردید که مقدار پروتئین محلول در برگ‌ها در فاصله بین تنش رویشی و تنش زایشی به حالت نرمال برگشته و یک تعادل نسبی بین سطوح تیماری برقرار است (جدول ۲). این موضوع نشان‌دهنده این است که گیاه ذرت

جدول ۲- مقایسه میانگین مرکب اثر تنش خشکی و کمبود نیتروژن بر روی مقدار پروتئین‌های محلول (mg/g) در برگ ذرت

مقایسه میانگین‌ها				
	بعد از تنش	قبل از تنش	بعد از تنش	قبل از تنش
	زایشی (D)	زایشی (C)	رویشی (B)	رویشی (A)
تنش خشکی	n.s	**	n.s	**
I1 تنش رویشی	a5/81	b3/69	a3/40	bc4/58
I2 تنش زایشی	a6/43	a4/69	a3/61	ab4/98
I3 تنش رویشی/زایشی	a5/63	b3/70	a3/50	a5/41
I4 بدون تنش(شاهد)	a5/86	a4/79	a3/60	c4/00
نیتروژن	n.s	n.s	n.s	**
N1 نیتروژن کامل	a6/04	a4/37	a3/59	a4/60
N2 ۵۰٪ نیتروژن کامل	a5/82	a4/06	a3/47	b3/90
ارقام	**	n.s	n.s	*
V1 (S.C 647)	b5/71	a4/18	a3/48	a4/98
V2 (T.C 647)	a6/15	a4/26	a3/57	b4/51
مکان	**	n.s	—	n.s
L1 تهران	a8/66	a4/02	—	a4/24
L2 کرمانشاه	b3/20	a4/41	—	a5/24

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

در مقایسه میانگین‌های دو مکان آزمایش، مشاهده می‌شود که در شروع تنش خشکی در مرحله رویشی، مقدار پروتئین‌های محلول در شرایط تهران با اختلاف بسیار معنی‌داری بیشتر از مکان کرمانشاه شده است، اما با ادامه یافتن تنش در مرحله رویشی و نیز تجدید آن در مرحله زایشی، مقدار این پروتئین‌ها در شرایط کرمانشاه بیشتر شده و با این حال اختلاف آماری در این رابطه وجود ندارد (جدول ۲). این اختلاف عمدتاً ناشی از تفاوت‌های موجود در شرایط آب و هوایی و خصوصاً نوع خاک در دو مکان آزمایش بوده است.

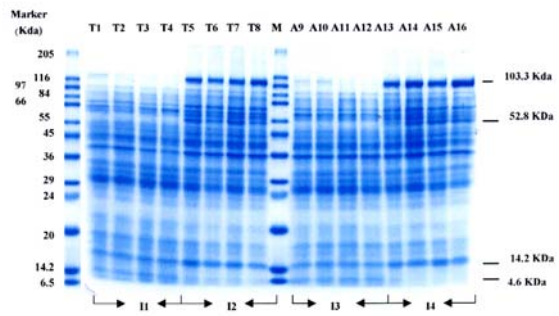
در تصاویر حاصل از اسکن ژل‌های الکتروفورز مربوط به نمونه‌های پروتئینی تیمارهای آزمایشی به همراه مارکر پروتئینی استاندارد سیگما، جمعاً ۱۷ ستون از باندهای پروتئینی تشکیل شده است. در شکل ۳، تصویر ژل مرحله قبل از تنش اول (تنش) در مرحله رویشی بین ۸ تا ۱۰ برگی دیده می‌شود. همانطور که

I3 (تنش در هر دو مرحله رویشی و زایشی) با ۵/۴۱ میلی‌گرم بر گرم برگ بیشترین میزان و تیمار I1 (تنش در مرحله رویشی) با ۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم برگ کمترین مقدار پروتئین محلول را داشته‌اند (جدول ۲).

با توجه به افزایش میزان پروتئین‌های محلول در برگ در تیمارهای تنش دیده در مرحله دوم (I2 و I3) نسبت به تیمارهای تنش ندیده (I1 و I4)، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که قطع آبیاری و قرار گرفتن گیاهانی مانند ذرت در شرایط خشکی و کمبود آب قابل جذب در موقعیت نزدیک به نقطه پژمردگی دائم (PWP) در مرحله بعد از گرده‌افشانی و ابتدای پر شدن دانه‌ها موجب کاهش نقل و انتقالات آب و املاح در درون آوندها و در نتیجه کاهش انتقال شیره پرورده از برگ‌ها به دانه‌ها شده و در نهایت مقدار این املاح خصوصاً پروتئین‌های محلول در برگ‌ها انباشته و افزایش یافته است.

رای و همکاران (۱۹۸۳) در مقایسه میزان پروتئین کل و اسیدهای آمینه آزاد در کولتیوارهای مقاوم و نیز حساس به خشکی نخود و ذرت، مشاهده کردند که گیاهان مقاوم در شرایط خشکی در سطوح پروتئین کل و اسیدهای آمینه آزاد خود نسبت به گیاهان حساس به خشکی افزایش داشته‌اند. علاوه بر این در آزمایش دیگر وقتی که گیاه ذرت کولتیوار Ageti- 76 در شرایط پتانسیل‌های اسمزی افزایشی از ۱ تا ۱۰ آتمسفر رشد کرده بود، ملاحظه گردید که مقدار پروتئین‌های آن افزایش یافته و به میزان ۱۹۰٪ گیاهان شاهد رسیده است.

تنش رطوبتی در مرحله زایشی، اثر معنی‌داری در سطح ۵٪ بر روی ارقام مورد آزمایش داشت (جدول ۱/۱)، بطوریکه در مقایسه میانگین‌ها بر خلاف مرحله رویشی، رقم V1(S. C. 647) با ۴/۹۸ میلی‌گرم بر گرم برگ مقدار پروتئین محلول بیشتری نسبت به رقم V2(T.C 647) در برگ‌های خود جمع نموده بود (جدول ۲). معنی‌دار شدن تیمار کمبود نیتروژن در سطح ۱٪، تکمیل‌کننده اختلاف بین دو سطح تیمار کود نیتروژن در مراحل قبل بوده و برتری تیمار مصرف نیتروژن کامل را نسبت به مصرف نصف این مقدار نشان می‌دهد (جدول ۱/۱)، مقایسه میانگین‌ها نیز این اختلاف در تولید پروتئین‌های محلول را به خوبی نشان داده است (جدول ۲).



شکل ۴- ژل اس‌دی‌اس پلی‌اکریل‌آمید پروتئین‌های محلول

برگ ذرت قبل از تنش مرحله رویشی (B)

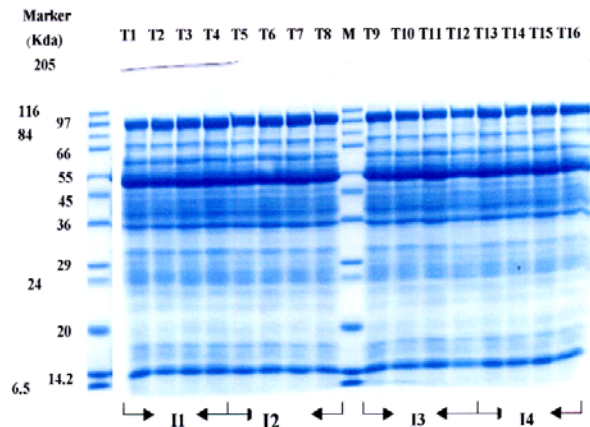
T1=N1V1, T2=N2V1, T3= N1V2, T4=N2V2,
T5=N1V1, T6=N2V1, T7=N1V2, T8=N2V2,
T9=N1V1, T10=N2V1, T11=N1V2, T12=N2V2,
T13=N1V1, T14=N2V1, T15=N1V2, T16=N2V2
N1=۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2=۱۰۰ کیلوگرم
نیتروژن در هکتار، V1=رقم 647 S.C، V2=رقم 647 T.C

بورو سکی و همکاران (۲۰۰۰) بر روی یک دسته از پروتئین‌های حاصل از تنش‌های سرما و خشکی با نام شبه-دهیدرین‌ها تحقیق کرده و موفق به شناسایی ۵ پروتئین شبه-دهیدرین در میتوکندری سلول‌های ذرت شدند. حضور این باندهای پروتئینی یا خیلی ضعیف بوده و یا در هنگامیکه آنتی‌بادی‌ها به وسیله پپتیدهای دهیدرین بلوکه شده بودند، وجود نداشته و غایب بوده‌اند. پروتئین‌های شبه-دهیدرین با وزن مولکولی ۶۳، ۵۲ و ۲۸ کیلو دالتن در مطالعات قبلی در گندم و چاودار یافت شده بود که ظاهراً جزء پروتئین‌های اولیه میتوکندریایی می‌باشند. سازگاری ذرت به درجات حرارتی پایین باعث تجمع قابل توجه پلی‌پپتیدهای دارای تنظیم حرارتی با وزن‌های مولکولی ۶۳ و ۵۲ کیلو دالتن گردید.

هم‌چنین در ناحیه دیگر باندهای پروتئینی آنزیم زیر واحد کوچک روبیسکو (RUBP-SSU) نیز فقدان باندهای با وزن مولکولی ۱۴/۲ کیلو دالتن در تیمارهای تنشی I1 و I3 مشاهده می‌شود، در حالیکه در تیمارهای شاهد (I4) و I2 چنین نیست (شکل ۴).

بر اساس اطلاعات Maize DB، ژن کنترل کننده این پلی‌پپتید، 50S ribosomal protein L20 نام داشته و در

ملاحظه می‌گردد کلیه تیمارها در شرایط یکسان بوده و اختلاف ظاهری در ظهور باندهای پروتئینی دیده نمی‌شود.

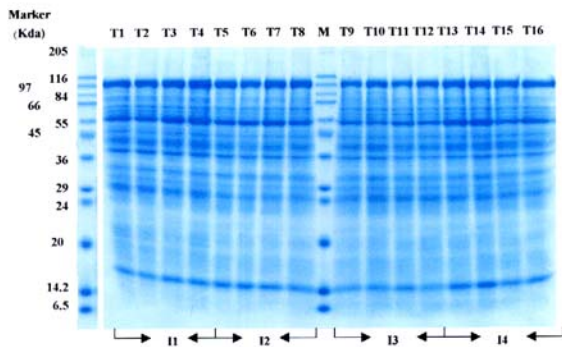


شکل ۳- ژل اس‌دی‌اس پلی‌اکریل‌آمید پروتئین‌های محلول

برگ ذرت قبل از تنش مرحله رویشی (A)

T1=N1V1, T2=N2V1, T3= N1V2, T4=N2V2,
T5=N1V1, T6=N2V1, T7=N1V2, T8=N2V2,
T9=N1V1, T10=N2V1, T11=N1V2, T12=N2V2,
T13=N1V1, T14=N2V1, T15=N1V2, T16=N2V2
N1=۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2=۱۰۰ کیلوگرم
نیتروژن در هکتار، V1=رقم 647 S.C، V2=رقم 647 T.C

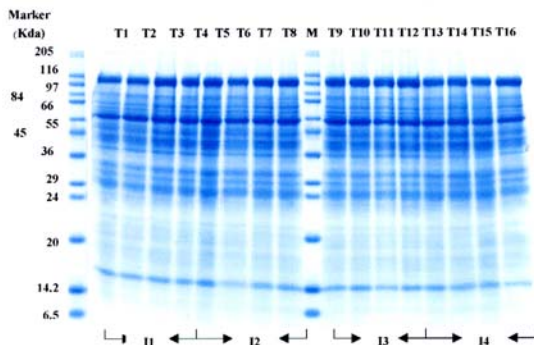
در شکل ۴، تصویر ژل مرحله بعد از اعمال تنش رطوبتی اول (تنش در مرحله رویشی) در شرایط تهران دیده می‌شود. در مقایسه بین تیمارها ملاحظه می‌گردد که باندهای پروتئینی در ناحیه با وزن مولکولی ۱۰۳/۳ کیلو دالتن (kDa) در تیمارهای تنشی I2 (تنش در مرحله رویشی) و I3 (تنش در هر دو مرحله رویشی و زایشی) نسبت به تیمار شاهد (I4- بدون تنش) و I2 (تنش در مرحله زایشی) حذف و تقریباً ناپدید گشته است. این رابطه به دلیل شرایط یکسان در بین تیمارهای I1 و I3 از یک طرف و نیز بین تیمارهای I2 و I4 از طرف دیگر موجب تشابه باندها در بین این تیمارها به صورت دو به دو شده بود. در ناحیه نزدیک به باندهای پروتئینی آنزیم روبیسکو (RUBP-LSU) ملاحظه می‌شود که باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ۵۲/۸ کیلو دالتن در کلیه سطوح تیمارهای I1 و I3 نسبت به شاهد حذف و ناپدید شده است (شکل ۴).



شکل ۵- ژل اس‌دی‌اس پلی‌اکریل‌آمید پروتئین‌های محلول

برگ ذرت بعد از تنش مرحلهٔ رویشی (B)

T1=N1V1, T2=N2V1, T3= N1V2, T4=N2V2,
T5=N1V1, T6=N2V1, T7=N1V2, T8=N2V2
T9=N1V1, T10=N2V1, T11=N1V2, T12=N2V2,
T13=N1V1, T14=N2V1, T15=N1V2, T16=N2V2
N1=۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2=۱۰۰ کیلوگرم
نیتروژن در هکتار، V1=رقم 647 S.C، V2=رقم 647 T.C



شکل ۶- ژل اس‌دی‌اس پلی‌اکریل‌آمید پروتئین‌های محلول

برگ ذرت قبل از تنش مرحلهٔ زایشی (C)

T1=N1V1, T2=N2V1, T3= N1V2, T4=N2V2,
T5=N1V1, T6=N2V1, T7=N1V2, T8=N2V2
T9=N1V1, T10=N2V1, T11=N1V2, T12=N2V2,
T13=N1V1, T14=N2V1, T15=N1V2, T16=N2V2
N1=۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2=۱۰۰ کیلوگرم
نیتروژن در هکتار، V1=رقم 647 S.C، V2=رقم 647 T.C

بیولی و لارسن (۱۹۸۲) نیز در نتایج آزمایش‌های خود بر روی برخی از گیاهان زراعی اعلام داشته‌اند که افزایش تنش رطوبتی از حالت خفیف به طرف متوسط، بازده ساخت پروتئین در گیاهان را کاهش می‌دهد، اما این‌گونه گیاهان بعد از رفع

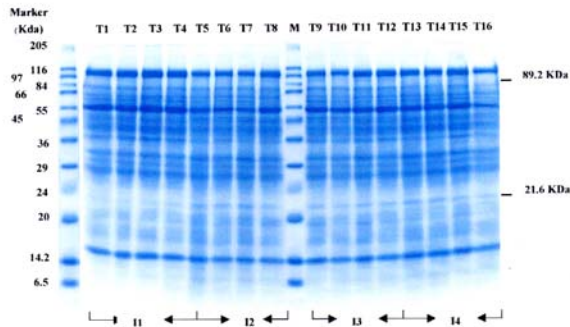
کلروپلاست سلول‌ها وجود دارد. این ژن رایبوزومی دارای وزن مولکولی ۱۴/۲ کیلو دالتن و نقطهٔ ایزوالکتریک ۱۲/۸ است (۳۱). همچنین یک پروتئین مشابه با وزن مولکولی ۱۴/۱ کیلو دالتن به گزارش مرکز اطلاعات ژنتیک Swiss-prot و Nice-prot با نام پروتئین فرضی با شمارهٔ شناسایی Q36279 در میتوکندری ذرت شناخته شده است و طول زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی آن شامل ۱۲۵ اسید آمینه می‌باشد (۲۱). کلوز و همکاران (۱۹۸۹) از گیاهچه‌های جو و ذرت تحت تنش کمبود آب، چهار پلی‌پپتید در اندازه‌های مولکولی ۲۲/۶، ۱۶/۲، ۱۴/۴ و ۱۴/۲ کیلو دالتن و یک پلی‌پپتید منفرد با وزن مولکولی ۱۷ کیلو دالتن از توالی نوکلئوتید DNAهای کلون شده شناسایی کرده بودند. این پروتئین‌های حاصل از پسابیدگی خیلی شبیه به هم بوده و در ردیف پروتئین‌های حاصل از تیمار ABA و شوری می‌باشند.

در انتهای ژل مربوط به تنش مرحلهٔ اول (شکل ۴) بر خلاف حالت‌های قبل، باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴/۶ کیلو دالتن در تیمارهای تنشی I1 و I3 ظاهر شده است که در تیمارهای شاهد (I4) و I2 دیده نمی‌شود. در همین خصوص چند پروتئین با وزن‌های مولکولی نزدیک به هم بین ۴/۴ تا ۵ کیلو دالتن در گیاه ذرت شناسایی شده است که بیشتر در کلروپلاست سلول وجود داشته و اغلب در مرکز واکنش نوری فتوسنتز II قرار دارند (۱۰).

تصویر ژل الکتروفورز پروتئین‌های برگ ذرت در مرحلهٔ بعد از تنش رویشی در شرایط کرمانشاه در شکل ۵ نشان داده شده است. در اینجا اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین ظهور باندهای پروتئینی حاصل از تیمارهای آزمایشی دیده نمی‌شود.

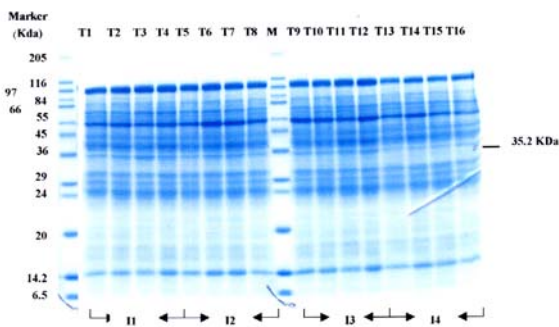
در شکل ۶ وضعیت باندهای پروتئینی تیمارهای آزمایشی در اثنای اعمال تنش رطوبتی دوم در مرحلهٔ زایشی نشان داده شده است. در این مرحله تقریباً کلیهٔ تغییرات باندهای پروتئینی حاصل از تنش رطوبتی در مرحلهٔ قبل (مرحلهٔ رویشی)، در شروع پر شدن دانه‌ها و قبل از اعمال تنش مرحلهٔ زایشی به حالت اول برگشته است و تفاوت قابل توجهی بین این باندها مشاهده نمی‌شود.

ابسیزیک (ABA) ظاهر شده بود، این در حالی است که مقدار کل پروتئین‌های محلول در رقم Southeast بر خلاف رقم Rebel jr در شرایط فوق‌الذکر افزایش یافته و از ۴/۶ میلی‌گرم بر گرم در تیمار کنترل (بدون تنش) به حداکثر ۶/۸ میلی‌گرم بر گرم برگ تازه در تیمار ۱۰ روز تنش خشکی رسیده بود.



شکل ۷- ژل اس‌دی‌اس پلی‌اکریل‌آمید پروتئین‌های محلول برگ ذرت بعد از تنش مرحله زایشی (D)

T1=N1V1, T2=N2V1, T3= N1V2, T4=N2V2, T5=N1V1, T6=N2V1, T7=N1V2, T8=N2V2, T9=N1V1, T10=N2V1, T11=N1V2, T12=N2V2, T13=N1V1, T14=N2V1, T15=N1V2, T16=N2V2
N1=۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2=۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، V1=رقم 647 S.C، V2=رقم 647 T.C



شکل ۸- ژل اس‌دی‌اس پلی‌اکریل‌آمید پروتئین‌های محلول برگ ذرت قبل از تنش مرحله رویشی (A)

T1=N1V1, T2=N2V1, T3= N1V2, T4=N2V2, T5=N1V1, T6=N2V1, T7=N1V2, T8=N2V2, T9=N1V1, T10=N2V1, T11=N1V2, T12=N2V2, T13=N1V1, T14=N2V1, T15=N1V2, T16=N2V2
N1=۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، N2=۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، V1=رقم 647 S.C، V2=رقم 647 T.C

تنش، مجدداً به حالت اول برگشته و ساخت پروتئین در آنها شکل طبیعی به خود می‌گیرد و مشابه گیاهانی می‌شوند که تجدید آبیاری شده‌اند.

اعمال تنش رطوبتی در مرحله زایشی بعد از گرده‌افشانی (مرحله R3) توانسته است تغییراتی در وضعیت پروتئین‌های برگ ذرت در تیمارهای آزمایشی به وجود آورد (شکل ۷). در این خصوص یک باند پروتئینی جدید در تیمارهای I2 (تنش زایشی) و I3 (تنش در مرحله رویشی و زایشی) در مقایسه با I4 (شاهد) و I1 (تنش رویشی) دیده می‌شود که وزن مولکولی آن حدود ۸۹/۲ کیلو دالتن می‌باشد. همچنین نماد باند پروتئین با وزن مولکولی حدود ۲۱/۶ کیلو دالتن در تیمار I1، ضعیف‌تر از سایر تیمارها بوده و این اختلاف نیز تا اندازه‌ای در تصویر ژل حاصل از الکتروفورز در شروع مرحله زایشی و قبل از اعمال تنش دوم قابل تشخیص است (شکل ۶). بنا بر گزارش مارس و همکاران (۱۹۹۳)، یک پروتئین با وزن مولکولی ۹۰ کیلو دالتن تحت عنوان hsp90 در ذرت شناسایی شده بود که از پروتئین‌های شوک حرارتی^۱ می‌باشد. دو پروتئین ۲۲ کیلو دالتنی نیز تحت اسامی پروتئین‌های Zeamatin ضد قارچ و آلفا- زئین در ذرت شناسایی شده است که بیشتر به‌عنوان پروتئین‌های بذر شناخته شده‌اند. نام ورودی این پروتئین‌ها به ترتیب Q9S909 و Q00919 می‌باشد و طول زنجیره اسیدهای آمینه آنها ۲۷ و ۲۶۶ است (۲۹، ۳۰).

در شکل ۸ مربوط به ژل الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی تیمار بعد از اعمال تنش رطوبتی در مرحله زایشی (بعد از گرده‌افشانی) در شرایط کرمانشاه، یک اختلاف در ظهور باندهای پروتئینی دیده می‌شود که مربوط به عدم حضور باند ۳۵/۲ کیلو دالتن در تیمار شاهد (I4) نسبت به تیمارهای تنشی می‌باشد.

جیانگ و هوانگ (۲۰۰۲) نیز در بررسی اثر تنش خشکی و اسید ابسیزیک بر روی تغییرات پروتئینی در دو رقم علف فستوک پابلند (*Festuca arundinacea* L.)، مشاهده کردند که یک پلی‌پپتید دهیدرین با وزن مولکولی ۳۵ کیلو دالتن در هر دو رقم در تنش خشکی ۱۰ روزه به‌همراه یا بدون تیمار با اسید

1. heat shock proteins

تنش رطوبتی و کمبود نیتروژن بر کیفیت پروتئین برگ‌ها و وضعیت باندهای پروتئینی بیشتر در جهت حذف و یا تحلیل بعضی از باندها در تیمارهای تنشی خصوصاً در نواحی مربوط به زیر واحدهای آنزیم رویسکو نسبت به شاهد بوده و کمتر موجب ظهور باندهای جدید در عکس‌العمل به تنش شده است. در این بین اختلاف قابل توجهی در بین سطوح تیمارهای ارقام و مقدار نیتروژن دیده نشد. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که هر دو رقم، واکنش مشابهی به تنش خشکی از خود نشان داده و دارای کودپذیری یکسان می‌باشند.

در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که بروز تنش خشکی قابل ملاحظه در اثر قطع آبیاری، ارقام متوسط‌سرس ذرت را در مرحله رویشی نسبت به مرحله زایشی بیشتر تحت تأثیر قرار داده و عکس‌العمل بین ارقام نسبت به تنش رطوبتی در مراحل مختلف رشد می‌تواند متفاوت از یکدیگر باشد. علاوه بر این کمبود نیتروژن مورد استفاده نیز تا اندازه‌ای بر روی تغییرات پروتئین برگ‌ها در طی دوره تنش تأثیر منفی گذاشته و مقاومت گیاهان را در برابر تنش کاهش داده است. همچنین اثر

REFERENCES

1. Bewley, J. D. & K. M. Larsen. 1982. Differences in the responses to water stress of growing and nongrowing regions of maize mesocotyls, protein synthesis on total, free and membrane bound polyribosome fractions. *J. Exp. Bot.*, 33:406- 415.
2. Borovskii, G. B. , I. V. Stupnicova, A. L. Antipina, S. V. Vladimirova, & V. K. Voinikov. 2000. Dehydrin-like proteins in maize mitochondria after cold adaptation, freezing, drought and ABA treatment. *Plant Physiol.*, 156:797- 800.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Ann. Biochem.*, 72:248- 254.
4. Brar, G., S. Kar, & NT. Singh. 1990. Photosynthetic response of wheat to soil water deficits in tropic. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 164: 343-348.
5. Campbell, S. & T. J. Close. 1997. Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytol.*, 137:61- 74.
6. Close, T. J., A. A. Kortt & P. M. Chandler. 1989. A cDNA- based comparison of dehydration- induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology*, 13:1, 95- 108.
7. Close, T. J. 1997. Dehydrins- A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant*, 100:291- 296.
8. Cornwell, K. L. & K. Keegstra. 1987. Evidence that a chloroplast surface protein is associated with a specific binding site for the precursor to the small subunit of ribulose- 1,5- bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.*, 85:780- 785.
9. Dasgupta, J. & J. D. Bewley. 1984. Variation in protein synthesis in different regions of greening leaves of barley seedlings and effects of imposed water stress. *J. Exp. Bot.*, 35:1450- 1459.
10. Expaty Word Wide Web molecular biology: Swiss- prot, Nice prot. 2003.
11. Foyer, CH., MH. Valadier, A. Migge, & TW. Becker. 1998. Drought -induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol.*, 117: 283- 292.
12. Gogorcena, Y., I. Iturbeorrea, P. R. Escuredo, & M. Becana. 1995. Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiology*, 108:753- 759.
13. Heikkila, J. J., J. E. T. Papp, J. A. Schultz & J. D. Bewley. 1984. Introduction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid and wounding. *Plant Physiology*, 76:270- 274.
14. Hsiao, T. C. 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24:519- 570.

15. Jiang, Y. & B. Huang. 2002. Protein alternations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acids. *Crop Science*, 42: 202- 207.
16. Kulshrestha, S., D. P. Mishra & R. K. Gupta. 1987. Changes in contents of chlorophyll, protein and lipids in whole chloroplast and chloroplasts membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotypes of wheat. *Photosynthetica*, 21:65- 70.
17. Laemmly, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680- 685.
18. Marrs, K., ES. Casey, SA. Capitant, RA. Bouchard, PS. Dietrich, IJ. Mettler & R. Sinibaldi. 1993. Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis and pollen development. *Dev. Genet.*, 14: 27-41.
19. Pugnaire, F. I., L. Serrano & J. Pardos. 1999. Constraints by water stress on plant growth. P: 271-280. *In: Handbook of plant and crop stress*. M. Pessarakli, 2nd edition. New York, Marcel Dekker Inc.
20. Pessarakli, M. 1999. *Handbook of plant and crop stress*. 2nd edition. New York, Marcel Dekker Inc, 1254 p.
21. Qin, J., C. M. Fauron, R. I. Brettell, M. Milhous & A. G. Abbott. 1987. Toxin resistance and/or male fertility reversion is correlated with defined transcription changes in the 1.5 kb Avai region of cms T. *Nucleic Acid Res.*, 15: 6091- 6103.
22. Rai, V. K., G. Singh, P. S. Thakur & S. Banyal. 1983. Protein and amino acid relationship during water stress in relation to drought resistance. *Plant Physiol Biochem*, 10(s):161- 167.
23. Ramagopal, S. 1993. Advances in understanding the molecular biology of drought and salinity tolerance in plants- the first decade. *Advances in plant biotechnology and Biochemistry*. Kapur (India). Indian society of Agricultural Biochemists, 39- 48.
24. Riccardi, F., P. Gazeau, D. Vienne & M. Zivy. 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize *Plant Physiol.*, 117: 1253- 1263.
25. Schussler, J. R. & M. E. Westgate. 1995. Assimilatic flux determines set at low water potential in maize. *Crop Science*, 53: 1074-1080.
26. Scott, N. S., R. Munns & E. W. R. Barlow. 1979. Polyribosome content in young and aged wheat leaves subjected to drought. *J. Exp. Bot.*, 30:905- 911.
27. Shah, C. B. & R. S. Loomis. 1995. Ribonucleic acid and protein metabolism in sugar beet during drought. *Physiol. Plant*, 18:240- 254.
28. Singh, J. & A. Patal. 1996. Water status, gaseous exchange, proline accumulation and yield of wheat in response to water stress. *Annual of Biology Ludhiana*, 12: 77-81.
29. Thompson, G. A., D. R. Siemieniak, L. C. Sieu, J. L. Slightom & B. A. Larkins. 1992. Sequence analysis of linked maize 22 Kda alpha- zein genes. *Plant Mol. Biol.*, 18: 827- 833.
30. Vigers, A. J., W. K. Roberts & C. P. Selitrennikoff. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant Microb Interact.*, 4: 315- 323.
31. Weglohner, W. & A. R. Subramanian. 1992. Nucleotide sequence of a region of maize chloroplast DNA containing the 3' end of clp P, exon 1 of rps 12 and rp 120 and their contrancription. *Plant Mol. Biol.*, 18: 415- 441

Effect of Drought Stress and Nitrogen Deficit on Quality and Quantity of Soluble Proteins in Maize (*Zea mays* L.) Leaf

**C. MANSOURI-FAR¹, S. A. M. MODARRES – SANAVY²
AND M. JALALI – JAVARAN³**

**1, 2, 3, Ph. D. Student and Assistant Professors,
Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University**

Accepted. July. 7, 2004

SUMMARY

To study the effect of drought stress as well as nitrogen deficit on sap protein in maize leaf an experiment was conducted in the two locations of College of Agriculture, Tarbiat Modarres University and Kermanshah Razy University. The experimental design was a split-factorial with treatments organized in a randomized complete block design of three replications. Four levels of drought stress (drought stress at vegetative stage = I1, reproductive stage = I2, both vegetative and reproductive stages = I3 and without stress or control = I4) were randomly assigned to the main plot units. A combination of two levels of nitrogen fertilizer (400 and 200 kg/ha) as well as two maize varieties (S. C. 647 and T. C. 647) were assigned to the subplot units. The results indicated that drought stress at vegetative stage reduced leaf sap protein. Drought stress at reproductive stage changed leaf sap protein and protein content in I2 and I3 more than I4 and I1 treatments, while leaf sap protein content became relatively equal in all irrigation treatments at the beginning of second stress stage. Soluble protein was more than in adequate nitrogen treatments than deficit nitrogen treatments. T C 647 variety had more leaf protein content than S. C. 647 in the beginning of stresses, but at end of stress stages, S. C. 647 variety had more leaf sap protein than T C 647 variety. Electrophoresis gel study at vegetative stress showed that protein bounds with 103.3, 52.8, 14.2 and 4.6 Kda molecular weights were omitted in comparison with control. After reproductive stress also protein bound with 89.2 Kda molecular weight were appeared in I2 and I3 treatments and protein bound with 21.6 Kda were observed in I1 treatment. Protein bound with 35.2 Kda molecular weight was weak in I4 treatment in comparison with control. Different protein bounds between varieties and application nitrogen levels were not observed.

Key words: Maize, Drought stress, Nitrogen deficit, Soluble proteins, Electrophoresis