



"مقاله پژوهشی"

ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پروتئین‌های درگیر در سیستم فتوسنتزی و میزان سدیم و پتاسیم گیاهچه‌های لاین ذرت تحت تنش شوری

سجاد محرم نژاد^۱، علی بنده حق^۲ و یگانه شفیی^۳

۱- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، مغان، ایران، (نویسنده مسول: sm.chakherlo@yahoo.com)

۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰

صفحه: ۱۸۵ تا ۱۹۶

چکیده

به‌منظور ارزیابی اثر تنش شوری روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پروتئین‌های درگیر در سیستم فتوسنتزی و میزان سدیم و پتاسیم گیاهچه‌های لاین ذرت، آزمایشی در گلخانه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور اول شامل دو لاین ذرت (B73 و MO17) و فاکتور دوم دو سطح شوری شامل صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تنش شوری اثر معنی‌دار روی وزن خشک و میزان سدیم و پتاسیم گیاهچه‌های لاین ذرت داشت. تجزیه الکتروفورزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که سه ایزوفرم وجود داشت. تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد. نتایج حاصل از الکتروفورز دوئیدی نشان داد که در لاین‌های ذرت تحت تنش شوری به ترتیب ۱۰ و ۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر درگیر در سیستم فتوسنتزی برای MO17 و B73 شناسایی گردید. تنش شوری باعث افزایش بیان ۱۲ لکه پروتئینی درگیر در فتوسنتزی لاین‌های ذرت شد. با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در دو لاین B73 و MO17 پس از اعمال تنش شوری، لاین MO17 دارای حساسیت نسبی بالایی نسبت به تنش شوری بود. نتایج حاصل نشان داد که لاین‌های ذرت از طریق افزایش فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز و تنظیم سدیم و پتاسیم اثرات ناشی از تنش شوری را کنترل می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: ایزوفرم، پروتئین، ذرت، شوری، فتوسنتز

مقدمه

ذرت بعد از گندم مقام دوم را از نظر سطح زیر کشت دارا است و یکی از مهم‌ترین غلات جهان محسوب می‌شود. ذرت با نام علمی *Zea mays* از تیره غلات، گیاهی یک ساله، تک لپه و ساقه بلند است که اغلب به‌منظور تولید دانه زراعت می‌شود سطح زیرکشت ذرت در دنیا بیش از ۱۳۰ میلیون هکتار گزارش شده‌است و سهم کشور ایران از این مقدار حدود ۲۳۴ هزار هکتار برآورد شده‌است (۱۲).

شوری خاک از محدودیت‌های تولید پایدار در مناطق خشک و نیمه خشک است. شوری با افزایش فشار اسمزی و در نتیجه کاهش جذب آب و همچنین از طریق اثرات سمیت یونی، جوانه‌زنی بذور و رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۵). بیشترین حساسیت گیاهان به تنش شوری، در مرحله جوانه‌زنی بذر و ابتدای رشد گیاهچه‌ای است (۵). پس از جوانه‌زنی، معمول‌ترین و آشکارترین اثر شوری، تأخیر در رشد است. تنش شوری یک مشکل جدی و در حال افزایش می‌باشد، بنابراین شناسایی سازوکارهایی جهت بهبود تحمل شوری در گیاهان با تکنولوژی‌های زیست مولکولی از اهمیت خاصی برخوردار است. تنش شوری سبب تنش اسمزی، بهم خوردن هموستازی سلولی و سمیت یونی در سلول‌های گیاهی می‌شود (۵). تنش شوری در خاک باعث اختلال در جذب عناصر غذایی K^+ و Ca^{2+} ، افزایش عناصر سمی Na^+ ، Cl^- و

نسبت‌های Na^+/K^+ و Na^+/Ca^{2+} می‌شود. کاهش پتاسیم در اثر تنش شوری می‌تواند به دلیل رقابت سدیم بر سر مکان‌های اتصال به ناقل‌های غشاء پلاسمایی و یا نشت به دلیل عدم ثبات غشاء پلاسمایی باشد (۱۳). شوری از مهم‌ترین عوامل ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، از جمله سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است که تجمع آن‌ها سبب پراکسیداسیون چربی‌ها، انفعال آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاءهای سلول می‌شود (۶). آروز و همکاران (۱۵) در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سه رقم ذرت نشان دادند که در بین غلظت‌های مختلف شوری، اختلاف معنی‌دار وجود داشت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش شوری افزایش معنی‌داری نشان داد. مطالعات کوکا و همکاران (۲۷) و آتار و همکاران (۱۴) نشان دادند که میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در رقم متحمل به شوری به شدت افزایش می‌یابد. ملازم و بشیرزاده (۳۰) در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین در ارقام ذرت تحت تنش شوری نشان دادند که اختلاف مختلفی بین ارقام ذرت وجود داشت به‌طوری‌که رقم BC662 بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت کلروفیل را تحت تنش شوری به خود اختصاص داد.

پرلیت منتقل شدند. برای کنترل رشد گیاهچه‌ها، دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی در گلخانه استفاده شد. زمانی که بوته‌ها به مرحله ۵-۴ برگی رسیدند، تنش شوری با استفاده از محلول نیم هوگلدن در دو سطح سدیم کلراید (صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار) اعمال گردید. بعد از اعمال تنش شوری به مدت دو هفته صفت بیوماس (وزن خشک گیاهچه‌ها) اندازه‌گیری شد.

استخراج سدیم و پتاسیم

برگ‌های گیاهچه‌های ذرت به مدت یک هفته در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آن خشک شدند. برای هضم بافت‌های گیاهی به ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه پودر شده، ۲۵ میلی‌لیتر محلول حاوی اسید استیک ۱۰٪ و اسید نیتریک ۱٪/۱ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت با ۱۸۰ دور (rpm) در دمای محیط شیک شدند. پس از صاف نمودن محلول با کاغذ صافی، عصاره‌ی بدست آمده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شد. مقدار سدیم و پتاسیم نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر (JENWAY PFP7) اندازه‌گیری شد (۳۱).

استخراج و رنگ آمیزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

نمونه‌های برگ‌ی تازه در بافر استخراج (تریس ۵۰ میلی‌مولار، پنج درصد ساکاروز، ۵۰ میلی‌مولار اسکوربیک اسید، ۲۰ میلی‌مولار سدیم متابی‌سولفیت و دو درصد پلی‌اتیلن گلیکول) با pH برابر ۷/۵ حاوی ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول با نسبت وزنی یک از برگ و یک از بافر استخراج، به خوبی هموژنیزه و سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. عصاره آنزیمی با قطعات بریده شده کاغذ واتمن شماره سه و مناسب با ابعاد چاهک، جذب و در ژل پلی‌آکریلامید هشت درصد با ابعاد ۱۲ × ۱۵ سانتی‌متر بارگذاری شد. برای خنک کردن ژل و نگهداشتن دمای پایین هنگام الکتروفورز، از ظرف واجد استفاده شد. حدود چهار ساعت پس از راه اندازی دستگاه الکتروفورز با آمپراژ کمتر از ۳۰ میلی‌آمپر، آبی بروموفنول با حرکت ۸-۱۰ سانتی‌متری به انتهای ژل رسید و ژل برای برش و رنگ آمیزی آماده شد (۲۶).

الکتروفورز دو بُعدی

به‌منظور استخراج محتوای پروتئین برگ ذرت از روش TCA/acetone استفاده شد (۳۴). برای انجام الکتروفورز بُعد اول از ژله‌ای لوله‌ای دست ساز استفاده شد که حاوی آب دیونیزه، NP-40، محلول آکریل‌امید ۳۰ درصد، آمفولین‌های با pH ۳ تا ۱۰ و ۵ تا ۸، APS ۱۰ درصد و محلول TEMED بود. غلظت پروتئین نمونه‌های برگ‌ی با استفاده از روش برادفورد (۸) مورد سنجش قرار گرفت. محلول پروتئینی بر حسب غلظت پروتئین‌های بافت برگ‌ی بر روی ژل بُعد اول بارگذاری شد. برای جداسازی پروتئین‌ها براساس نقطه ایزوالکتریک آن‌ها، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه ولتاژ ۲۰۰ ولت، به مدت ۱۶ ساعت ولتاژ ۴۰۰ ولت و به مدت یک ساعت ولتاژ ۶۰۰ ولت اعمال شد. برای جداسازی پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی آن‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی طبق دستورالعمل مربوطه

سازگاری و تحمل شوری در گیاهان یک فرآیند کاملاً پیچیده هم در سطح سلولی و هم در سطح کل گیاه می‌باشد و نیازمند تغییرات در سطح بیان ژن‌ها می‌باشد که این تغییرات به نوبه خود منجر به تغییرات در بیان پروتئین می‌شود (۳۳). با وجود ظهور تکنیک‌های جدید هم اکنون الکتروفورز دو بُعدی روش اصلی برای جداسازی پروتئین‌ها می‌باشد، به طوری که برای شناسایی پروتئین‌ها و تغییرات پروتئومی القاء شده به وسیله‌ی تیمارها و تغییرات محیطی از الکتروفورز دو بُعدی استفاده می‌شود (۳۳). تحقیقات اخیر بیشتر روی پروتئوم در گیاهان متمرکز شده‌است، زیرا اطلاعات جامعی برای درک سازوکارهای پیچیده پاسخ و سازگاری گیاهان به تنش شوری را ارائه می‌دهد (۱۶). تنش شوری منجر به تغییر الگوی پروتئوم بافت‌های گیاهی شده و با توجه به اینکه پروتئین‌ها محل پاسخ گیاه به تنش می‌باشند، رهیافت پروتئومیک می‌تواند در مطالعه این پاسخ به عنوان یک ابزار قوی مد نظر قرار گیرد. پیدایش و ورود طیف سنجی جرمی (MS) در تحقیقات پروتئومیک منجر به یک تغییر الگوی واقعی گردید که بسیاری از پژوهشگران توانستند روی پروتئوم ذرت تمرکز یابند. پیشرفت‌های مداوم تکنولوژی‌های با توان بالا، دسترسی به داده پایگاه‌های پروتئین، EST و ژنوم (ژنوتیپ B73) زمینه مطالعات پروتئومیک ذرت را بسیار تسریع نمود (۴۰). بنابراین درک درست از تعاملات بین ذرت و تنش شوری در سطح مولکولی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد، چرا که ممکن است منجر به شناسایی ژن‌های کاندیدای مقاومت شده و متعاقب آن منجر به توسعه واریته‌های مقاوم گردد. به‌منظور بررسی پروتئین‌های دخیل در مقاومت گیاه ذرت به شوری می‌توان از تجزیه‌ی پروتئوم بهره گرفت. تجزیه و تحلیل‌های پروتئومیک امروزه به‌عنوان یکی از روش‌های مهم در مطالعات پروتئین‌ها محسوب می‌شوند و مقدمه‌ای برای انتقال ژن و به‌نژادی ارقام به حساب می‌آیند (۳). ارزیابی پروتئوم گیاهچه‌های ذرت تحت تنش شوری نشان داد که گروه‌های پروتئینی مختلفی از قبیل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان، سیستم فتوسنتزی و تنظیم کننده نسبت به تنش شوری افزایش بیان داشتند (۴۹). در این راستا تحقق حاضر با هدف ارزیابی تاثیر شوری بر مقدار سدیم و پتاسیم و میزان فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش ژل پلی‌آکریلامید و شناسایی پروتئین‌های درگیر در سیستم فتوسنتزی در گیاهچه‌های لاین ذرت انجام شد.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش و نحوه اعمال تنش شوری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه‌ی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. فاکتور اول دو لاین ذرت MO17 و B73 (تهیه شده از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل) و فاکتور دوم دو سطح شوری شامل صفر و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بودند. بذور ابتدا با محلول سه درصد هیپوکلریت سدیم به مدت دو دقیقه ضد عفونی و پنج روز پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به پلاستیک‌های خاص حاوی

رنگ آمیزی شد (۳۴). برای تصویربرداری از ژل‌ها دستگاه Bio-Rad GS-800 مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم‌افزار MCID برای کمی سازی (مساحت × شدت) نوار آنزیمی به‌عنوان فعالیت دنسیتومتریک ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روی ژل پلی آکریلامید استفاده شد. تصاویر به دست آمده الکتروفورز دوبعدی توسط نرم افزار PD-quest، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ژل‌ها به همراه تکرار آن‌ها بررسی شده و لکه‌های مشترک بین تکرارها توسط نرم افزار برچسب زده شدند. به‌منظور شناسایی احتمالی لکه‌های پروتئینی از دو معیار نقطه ایزوالکتریک (pI) و وزن مولکولی (MW) در نرم‌افزار آنالین -Expasy Tag Ident داده پایگاه UniprotKB استفاده شد. برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

وزن خشک گیاهچه‌ها

نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها برای صفت وزن خشک گیاهچه‌ها در لاین‌های ذرت نشان داد که اثر لاین و شوری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین برهم‌کنش لاین × تنش شوری نیز در سطح احتمال پنج درصد برای صفت وزن خشک گیاهچه‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش لاین × تنش شوری نشان داد که شوری به‌طور معنی‌دار باعث کاهش وزن خشک گیاهچه‌های هر دو لاین ذرت شد به‌طوری‌که این میزان کاهش نسبت به شرایط عادی حدود ۳۶ درصد بود (شکل ۱) و میانگین وزن خشک گیاهچه لاین B73 و MO17 به‌ترتیب ۱/۳۹ و ۱/۲۵ گرم بود.

جیانگ و همکاران (۱۵) با بررسی اثر شوری روی گیاهچه‌های ذرت اظهار کردند که تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک گیاهچه‌های ذرت شد. به‌طوری‌که این میزان کاهش نسبت به تیمار شاهد در حدود ۲۵ درصد بود. اشرف (۴) گزارش کرد که اثر تنش اسمزی شوری ممکن است موجب بهم زدن تعادل آب گیاه، کاهش تورژسانس سلول و جلوگیری از رشد کلی گیاه شود. پژوهش‌های مختلف روی ذرت نشان داده که تنش شوری وزن خشک گیاهچه‌های ذرت را به‌طور معنی‌دار کاهش می‌دهد (۱،۴،۳۳). که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

مقدار سدیم و پتاسیم

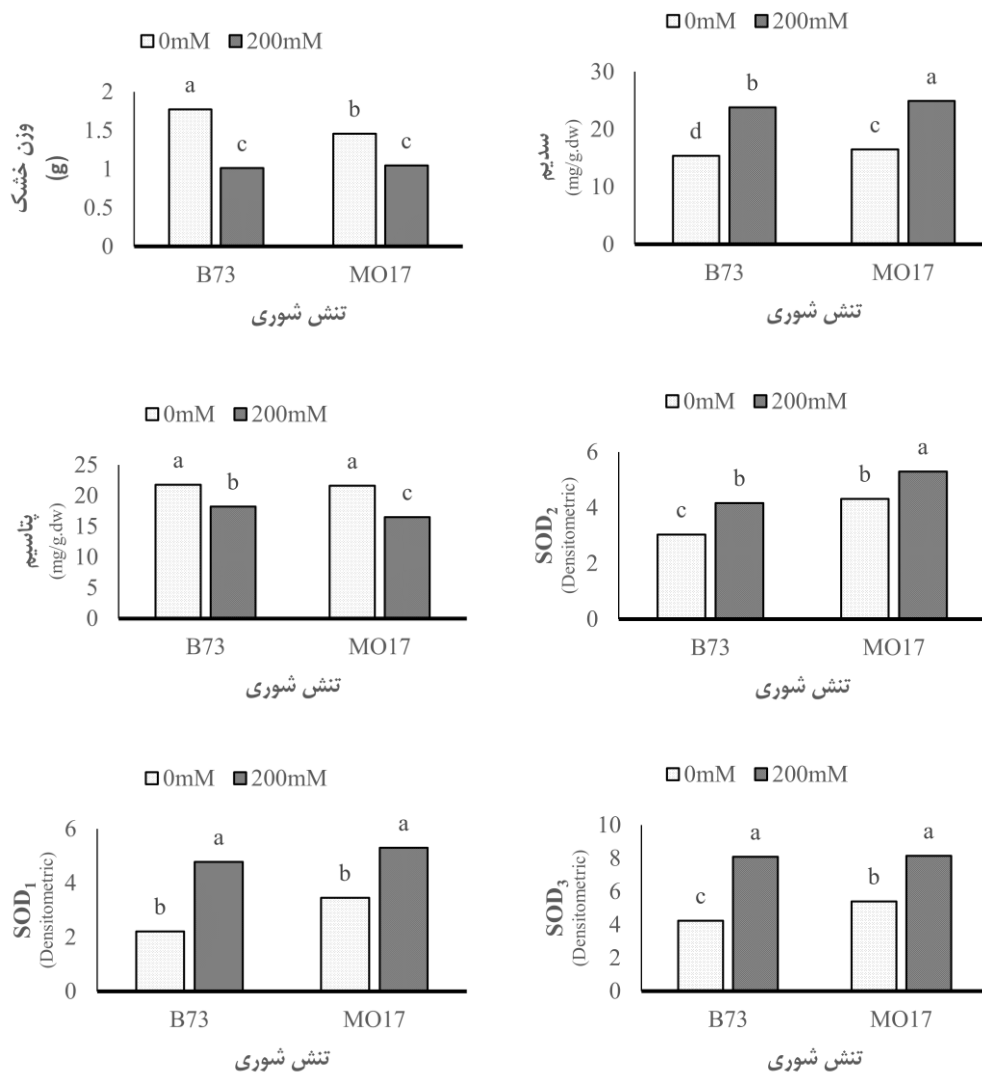
براساس تجزیه واریانس داده‌ها، بین لاین‌ها و سطوح شوری برای مقدار K^+ و Na^+ در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین برهم‌کنش لاین × تنش شوری به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد برای K^+ و Na^+ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش لاین × تنش شوری برای K^+ و Na^+ نشان داد که شوری به‌طور معنی‌دار باعث افزایش مقدار سدیم (به‌ترتیب ۲۳/۸ و ۲۴/۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک برای B73 و MO17) و پتاسیم (به‌ترتیب ۱۸/۲ و ۱۶/۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک برای B73 و MO17) برگ‌های لاین‌های ذرت شد. این میزان افزایش خصوصاً سدیم در لاین MO17 به مراتب بیشتر از لاین B73 بود. همچنین میزان پتاسیم در لاین B73 به مراتب بیشتر از لاین MO17 بود (شکل ۲). نتایج حاصل نشان می‌دهد که لاین B73 نسبت به لاین MO17 از مقاومت نسبی بالایی در جهت جذب سدیم برخوردار است.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه تحت تنش شوری در دو لاین B73 و MO17 ذرت

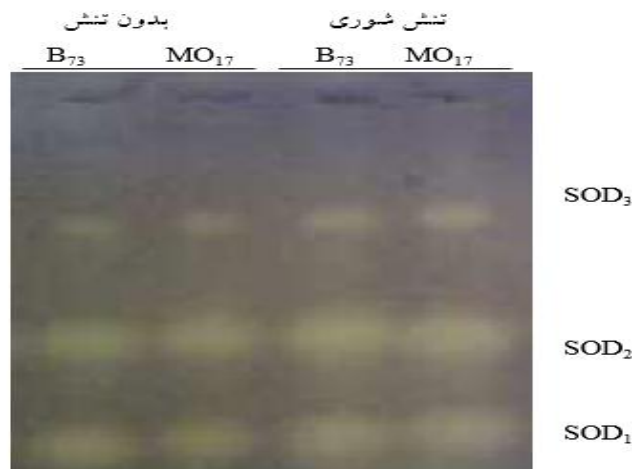
Table 1. The analysis of the variance of the physiological traits studied under salinity stress on B73 and MO17

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
SOD ₃	SOD ₂	SOD ₁	K ⁺	Na ⁺	وزن خشک		
۲/۵۵ ^{ns}	۲/۵۹ ^{ns}	۴/۶۳ ^{ns}	۶۱/۵ ^{**}	۱۱/۵ ^{**}	۴/۲ ^{**}	۱	ژنوتیپ
۱۴۲/۸۷ ^{**}	۱۳۵/۹۹ ^{**}	۲۲/۵۸ ^{**}	۳۸/۰ ^{**}	۹۰/۱ ^{**}	۵/۸ ^{**}	۱	تنش شوری
۱۴/۰ [*]	۱۱/۶۷ [*]	۸/۲۴ [*]	۱۴/۹ ^{**}	۸/۰ [*]	۳/۸ [*]	۱	ژنوتیپ × تنش شوری
۶/۰۷	۲/۸۳	۱/۸۳	۳/۱	۲/۷	۰/۶	۱۲	خطا
۱۷/۹	۱۹/۰	۲۰/۴	۲/۹	۸/۹	۱۳/۷		ضریب تغییرات (%)

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین وزن خشک، سدیم، پتاسیم، SOD₁، SOD₂ و SOD₃ تحت تنش شوری در لاین B73 و MO17
 Figure 1. Mean comparisons of dry weight, Na⁺, K⁺, SOD₁, SOD₂ and SOD₃ under salinity stress



شکل ۲- الگوی پروتئینی ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز لاین B73 و MO17 تحت تنش شوری
 Figure 2. Protein pattern of superoxide dismutase's isoforms in B73 and MO17 lines under salinity stress

سوپراکسید دیسموتاز شد. این میزان افزایش در لاین MO17 به مراتب بیشتر از لاین B73 بود (شکل ۱).

پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به تنش در تمامی گیاهان یکسان نیست و همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در طی اعمال تنش شوری افزایش پیدا نمی‌کنند، بلکه بسته به عوامل مختلف از جمله گونه گیاهی، غلظت و نوع نمک، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است افزایش یا کاهش یابند. نه تنها گیاهان دارای سطوح متنوعی از تحمل به تنش‌های مختلف هستند بلکه حتی در یک گونه خاص سطح تحمل به تنش‌های غیر زنده محیطی برای ارقام مختلف بسیار متفاوت است (۳۰). نتایج حاصل از تجزیه الکتروفورزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روی یونجه (۴۷)، ذرت (۲۷) و لوبیا (۲۵) سه ایزوفرم برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گزارش کردند. که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. ملازم و بشیرزاده (۲۸) با بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین در ارقام ذرت تحت تنش شوری بیان داشتند که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری افزایش می‌یابد. که باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از شوری می‌شود. که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

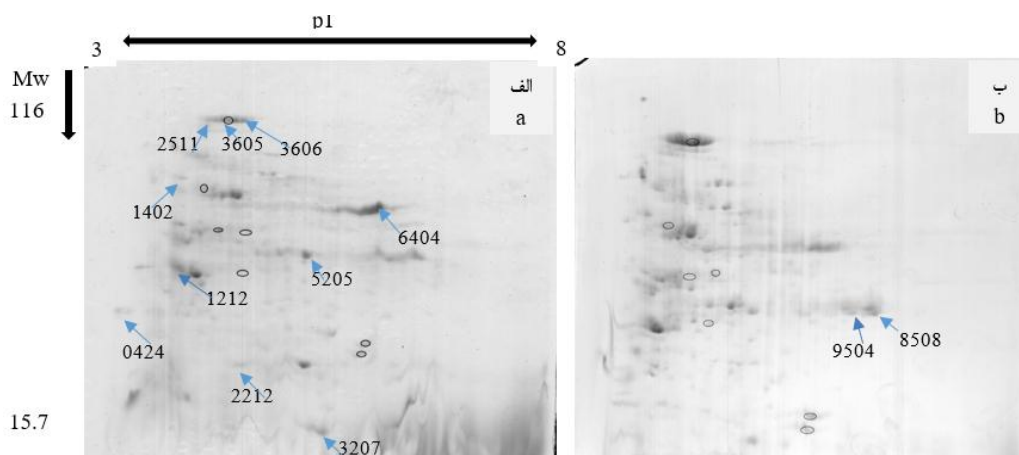
پروتئوم فتوسنتزی

در این پژوهش تغییرات بیان پروتئین‌های بافت برگ‌های لاین MO17 و B73 ذرت تحت شرایط بدون تنش و تنش (۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) با رهیافت پروتئومیک و از طریق شناسایی پروتئین‌های پاسخ دهنده مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۳). پس از تجزیه تصاویر ژل‌های، دو بُعدی لاین‌های ذرت تحت تنش شوری به ترتیب ۱۰ و ۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر درگیر در سیستم فتوسنتزی برای B73 و MO17 شناسایی گردید (جدول ۲). تمام لکه‌های شناسایی شده افزایش بیان داشتند. لکه پروتئینی ۳۲۰۷ (Protein TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 5, chloroplastic) بیشترین بیان را به خود اختصاص داد (شکل ۴).

مطالعات فیزیولوژیک نشان داده است که تنش شوری اثرات منفی بر رشد گیاهان دارد. این امر به سبب تغییر در نسبت عناصر غذایی، تنش اسمزی و سمیت برخی از یون‌های خاص می‌باشد (۵). آسیب اختصاصی ناشی از سدیم با تجمع سدیم در بافت برگ همراه بوده و حاصل آن نکروزه شدن برگ‌های پیر می‌باشد، که ابتدا از نوک و حاشیه‌ها شروع شده و در صورت تشدید آن به سمت مرکز برگ گسترش می‌یابد. همچنین نحوه دفع نمک در گلوپیت‌ها با ایجاد محدودیت در جذب و یا انتقال کلر و سدیم از ریشه به قسمت‌های بالایی گیاه مرتبط می‌باشد (۲۹). در شرایط تنش شوری گیاهانی که توانایی بالایی در جذب پتاسیم دارند نه تنها تنظیم اسمزی موفق‌تری دارند، بلکه توانایی بیشتری در کاهش سمیت یون سدیم نیز نشان می‌دهند (۱). عمرانی و محرم‌نژاد (۳۲) با بررسی تحمل به تنش شوری در هیبریدهای ذرت در مرحله گیاهچه‌ای، افزایش تجمع میزان سدیم در برگ‌های هیبریدهای ذرت را معنی‌دار گزارش کردند. که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

الکتروفورز با استفاده از ژل پلی‌آکرلامید آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که سه ایزوفرم برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز وجود داشت (شکل ۲). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که اثر تنش شوری برای میزان فعالیت هر سه ایزوفرم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد، ولی بین دو لاین هیچ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. برهم‌کنش لاین × تنش شوری برای ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش لاین × تنش شوری برای میزان فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که شوری به‌طور معنی‌دار باعث افزایش فعالیت هر سه ایزوفرم آنزیم



شکل ۳- ژل الکتروفورز دو بُعدی برگ لاین B73 (الف) و MO17 (ب) تحت تنش شوری
Figure 3. Two-DE gel in B73 (a) and MO17 (b) leaves under salinity stress

جدول ۲- اطلاعات پروتئین‌های شناسایی شده در برگ لاین B73 و MO17 تحت تنش شوری

Table 2. Information of identified proteins in B73 and MO17 leaves under salinity stress

شماره لکه	لاین	پروتئین‌های شناسایی شده	Ac.No ^a	فاکتور القا	T.MW ^b	T.pI ^c	O.MW ^d	O.pI ^e
۰۴۲۴	B73	Peroxiredoxin-2E, chloroplastic	Q949U7	۲/۰۵	۱۷/۲۷	۵/۰۱	۱۸/۱۰	۵/۰۱
۱۲۱۲	B73	Photosystem I chlorophyll a.b-binding protein 2, chloroplastic	Q9SYW8	۲/۱۰	۲۴/۵۱	۵/۰۲	۲۴/۴۳	۵/۱۷
۱۴۰۲	B73	Bifunctional dolabella-3,7-dien-18-ol synthase.dolathalia-3,7,11-triene synthase TPS20, chloroplastic	A0A178U9Y5	۲/۰۷	۶۲/۴۷	۵/۲۲	۶۳/۲۸	۵/۱۷
۲۲۱۲	B73	Peptide methionine sulfoxide reductase B2, chloroplastic	Q9C5C8	۲/۱۳	۱۵/۷۴	۵/۳۷	۱۵/۱۰	۵/۳۶
۲۵۱۱	B73	Protein TIC110, chloroplastic	Q8LPR9	۲/۰۱	۱۰۶/۳۳	۵/۳۲	۱۰۶/۳۳	۵/۳۶
۳۲۰۷	B73	Protein TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 5, chloroplastic	Q8VY77	۱۵/۸۸	۸/۹۹	۵/۶۱	۹/۱۷	۵/۶۰
۳۶۰۵	B73	Protein translocase subunit SECA1, chloroplastic	Q9SYI0	۲/۰۸	۱۱۱/۱۵	۵/۶۳	۱۰۷/۴۵	۵/۶۴
۳۶۰۶	B73	Isoform 2 of Protein translocase subunit SECA2, chloroplastic	D8WUA4	۲/۱۰	۱۱۲/۹۸	۵/۶۹	۱۱۶/۳۷	۵/۹۰
۵۲۰۵	B73	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	P27140	۲/۰۷	۲۶/۸۱	۶/۱۲	۲۵/۵۷	۶/۱۳
۶۴۰۴	B73	Peptide chain release factor PrfB3, chloroplastic	F4J264	۲/۰۵	۴۷/۶۱	۶/۷۰	۴۵/۹۶	۶/۷۴
۹۵۰۴	MO17	Magnesium-chelatae subunit ChlI-1, chloroplastic	P16127	۷/۲۰	۴۱/۱۳	۵/۱۰	۳۹/۹۲	۵/۰۵
۸۵۰۸	MO17	ATP synthase subunit gamma, chloroplastic	P0C1M0	۲/۱۹	۳۳/۹۱	۵/۴۵	۳۴/۹۵	۵/۶۸

a: شماره دسترسی در داده پایگاه‌های NCBI, Mascot و TagIdent; b: وزن مولکولی تنوری; c: نقطه ایزوالکتریک تنوری; d: وزن مولکولی تجربی; e: نقطه ایزوالکتریک تجربی

تنش شوری منجر به تغییر الگوی پروتئوم بافت‌های گیاهی شده و با توجه به اینکه پروتئین‌ها محل پاسخ گیاه به تنش می‌باشند، رهیافت پروتئومیک می‌تواند در مطالعه این پاسخ به عنوان یک ابزار قوی مد نظر قرار گیرد. شوری یکی از مشکلات محیطی جدی است که باعث ایجاد تنش‌های اسمزی، کاهش رشد و در نهایت کاهش محصول می‌گردد. مهم‌ترین واکنش گیاه به افزایش شوری خاک، کاهش آهنگ رشد است. در این آزمایش این کاهش رشد در هر دو لاین ذرت مشاهده شد و در لاین B73 کمتر از لاین دیگر بود و این نشان دهنده تحمل نسبی بالا در این لاین می‌باشد، چرا که در شرایط شوری، ابتدا رشد رویشی گیاه و توسعه برگ‌ها متاثر می‌شوند. پروتئین Peroxiredoxin-2E, chloroplastic (لکه شماره ۰۴۲۴) از آنزیم‌های آنتی اکسیدان تجزیه‌کننده H₂O₂ می‌باشد. علاوه بر احیای H₂O₂ این پروتئین‌ها سم‌زدایی از الکیل هیدروپروکسیدها و پروکسی‌نیتريت را نیز انجام می‌دهند. با وجود این که تفاوت‌های بارزی در اختصاصی بودن سوبسترا و ویژگی‌های کینتیکی وجود دارد، به واسطه این عملکرد پروکسی‌دوکسین‌ها در تنظیم پیام‌رسانی وابسته به اگزولیبید و پیام‌رسانی مرتبط با NO نقش دارد (۵،۳۷). سزاد حسین و همکاران (۳۹) گزارش کردند که با اعمال تنش شوری در گیاه چغندر قند پروتئین پروکسی‌دوکسین 2E کاهش یافت. آن‌ها همچنین بیان کردند که این آنزیم در شرایط تنش شوری برای افزایش تحمل گیاه در برابر تنش اکسیداتیو نیز نقش دارد. در این آزمایش این پروتئین با اعمال تنش شوری کاهش بیان داشت. که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. پروتئین Photosystem I chlorophyll a/b-binding

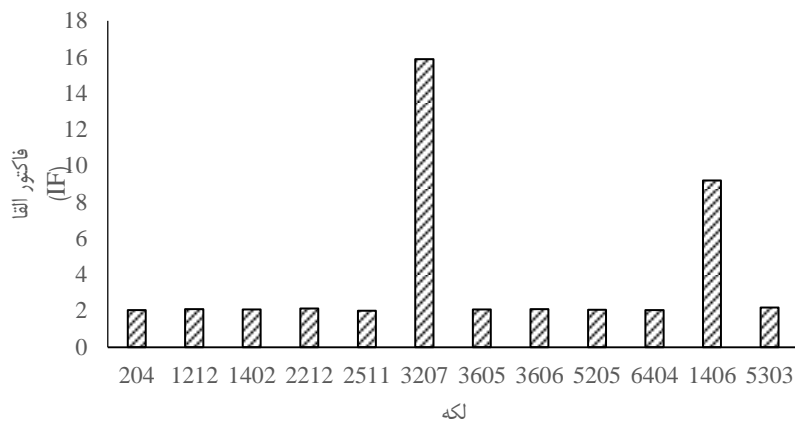
protein 2, chloroplastic (شماره لکه ۱۲۱۲) انرژی نوری (نخستین گام در فرایند فتوسنتز) را به دام می‌اندازد، بنابراین گیرنده‌های دریافت‌کننده نور بایستی در پاسخ به وضعیت فیزیولوژیکی و سیگنال‌های محیطی تنظیم شوند. کلروفیل با اتصال به کمپلکس‌های پروتئینی دریافت‌کننده نور کارتنوئیدها به عنوان گیرنده نور در جلبک‌ها و گیاهان عالی عمل می‌کند (۳۷،۴۵). تکامل دستگاه فتوسنتزی بطور نزدیکی در ارتباط با خانواده بزرگ پروتئین LHC^۱ می‌باشد. خانواده پروتئین LHC به زیرخانواده‌های پروتئین‌های متصل به کلروفیل a (CAA)، پروتئین‌های متصل به کلروفیل a/b (CAB)، پروتئین‌های متصل به a/c، LHCx^۲ و LHCz^۳ تقسیم می‌شوند. این پروتئین به عنوان عمده‌ترین پروتئین غشایی موجود در طبیعت بوده (۱۰) توسط ژن‌های هسته‌ای کد شده، روی ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی سنتز شده، در عرض غشای دولایه‌ای کلروپلاست عبور کرده و در درون غشای تیلاکوئیدی قرار می‌گیرد. در تنش‌های غیرزیستی، فسفوریلاسیون برگشت‌پذیر پروتئین‌ها یک ابزار قدرتمند برای کاهش آسیب به سلول‌های گیاهی بویژه سیستم فتوسنتزی می‌باشد (۱۷). لیو و شن (۲۲) گزارش کردند که پروتئین Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 2, chloroplastic برگشت‌پذیر را توسط بخشی از کمپلکس برداشت نور با برگشت‌پذیری انرژی بین فتوسیستم I و II متعادل می‌کند. پس از اعمال تنش شوری، کلروپلاست‌ها در اثر شوری تخریب می‌شوند و سیستم فتوسنتزی گیاه نیز تا حدود زیادی از کار می‌افتد این پروتئین نیز در ذرت پس از اعمال تنش شوری ممکن است به دلیل تخریب سیستم فتوسنتزی و کاهش تولید انرژی در گیاه کاهش یافته باشد.

1- Light-harvesting complex

2- Chlorophyll a/c

3- Light harvesting complex X Family

4- Light harvesting complex Z Family



شکل ۴- بیان لکه‌های پروتئینی شناسایی شده تحت تنش شوری در لاین‌های ذرت (MO17 و B73)
Figure 4. Expression of identified proteins under salinity stress in maize lines (B73 and MO17)

ماده پروتئین به کلروپلاست‌ها بوده و کانال وابسته به ولتاژ انتخابی کاتیون را در قسمت داخلی کلروپلاست پوشش می‌دهد. به طور خاص به حمل و نقل پپتیدها واکنش نشان می‌دهد. با هر دو پیش ماده و فرم‌های بالغ از پروتئین‌های اولیه همکاری می‌کنند (۱۸). در گیاه آرابیدوپسیس ژن‌های atTIC40 و atTIC110 پروتئین TIC² را رمز گذاری می‌کنند. این ژن‌ها نقش مهمی را در بیوسنتز پلاستیدها در زمان رشد و نمو در اکثر بافت‌ها ایفا می‌کنند. فلارا و همکاران (۱۵) گزارش کردند که به علت کاهش کمپلکس TIC تحت تنش گرمایی، پروتئین‌های مهم به کلروپلاست کاهش ورود داشته و پردازش پپتیدهای استروما در گیاه گوجه فرنگی کاهش نشان داد.

پروتئین Protein Trygalactosyl D-Acyl Glycerol 5, chloroplastic (لکه شماره ۳۲۰۷) برای رفت و آمد لیپیدها از شبکه آندوپلاسمی به پلاستید به عنوان بخشی از مسیر یوکاریوتی اجتماع لیپید در تیلاکوئید ضروری می‌باشد (۹،۳۱). این پروتئین به انتقال لیپید از پوشش بیرونی به داخل پلاستید با اتصال TGD4² به کمپلکس حمل و نقل TGD 1,2,3 کمک می‌کند. پروتئین TGD5 یک پروتئین کوچک غنی از گلیسین را در غشای کلروپلاست گلب‌رگ‌ها پوشش می‌دهد (۴). لو و همکاران (۲۳) بیان کردند که با فعال شدن پروتئین TGD5 در گیاه، این پروتئین درگیر ترافیک لیپیدها از شبکه آندوپلاسمی به پلاستیدها بوده و مسیر یوکاریوتی تجمع لیپیدها در تیلاکوئید را شناسایی می‌کند. لیپیدهای غشایی در تولید لیپیدهای سیگنالینگ نقش دارند و همچنین ساخت و متابولیسم مولکول‌های سیگنالینگ را تنظیم کرده و باعث فعال شدن سیگنال‌های تنش‌های غیرزیستی می‌شوند. تنش‌های غیر زیستی مثل تنش خشکی و تنش حرارتی باعث ایجاد انبوهی از سیگنال‌های وابسته به لیپید می‌شود (۱۳). هو و همکاران (۱۴) بیان کردند که در شرایط تنش غیرزیستی نظیر تنش اکسیداتیو، لیپیدهای غشایی باعث فعال شدن لیپیدهای سیگنالینگ تنش‌های غیرزیستی می‌شوند که باعث انتقال لیپیدها به تیلاکوئید می‌شوند. بنابراین نتایج این احتمال وجود دارد که با قرار گرفتن گیاه ذرت در شرایط تنش شوری، این پروتئین باعث فعال شدن لیپیدهای غشایی گیاه و در

پروتئین Bifunctional dolabella-3,7-dien-18-ol synthase/dolathalia-3,7,11-triene synthase TPS20, chloroplastic (لکه شماره ۱۴۰۲) در متابولیسم (بیوسنتز) درتین‌ها نقش دارد. سبب فعال شدن dolabella-3,7-dien-18-ol synthase و فعال شدن dolathalia-3,7,11-triene synthase در محیط آزمایشگاهی می‌شود. تشکیل dolathalia-3,7,11- و dolabella-3,7-dien-18-ol triene را از گرانیل گرانیل دی فسفات (GGPP) کاتالیز می‌کند. بنظر نمی‌رسد که در بیوسنتز سزکوئی‌ترین‌ها دخالت داشته باشد (۴۴). در برخی از گیاهان در اثر تنش‌های زیستی و غیر زیستی، آنزیم مسئول سنتز ترپنوئیدها در برگ‌ها فعال می‌شود. TPS20 و TPS12 در انتشار ترپنوئیدها در برگ‌های گیاهان اهمیت خاصی دارند. این دو ژن بویژه TPS20 در کرک‌های برگ‌های گیاهان متمرکز می‌شوند (۱۱).

پروتئین Peptide methionine sulfoxide reductase B2, chloroplastic (لکه شماره ۲۲۱۲) کاهش سولفوکسید متیونین (MetSO) به متیونین در پروتئین‌ها را کاتالیز می‌کند. نقش محافظتی در برابر تنش اکسیداتیو با بازیابی فعالیت‌های پروتئینی که از طریق اکسیداسیون متیونین غیرفعال شده‌اند، دارد. می‌تواند نقش مهمی در ارتباط با MSRB در حفظ رشد رویشی در طول محدودیت‌های محیط زیست، از طریق حفظ آنتن‌های فتوسنتزی ایفا کند (۲۱). بسیاری از پژوهشگران نشان دادند که پروتئین‌های MSRB در گیاهانی مثل برنج، آرابیدوپسیس و فلفل در برابر تنش‌های اکسیداتیو نقش محافظتی دارند (۲۰،۴۳). لاجبیر و همکاران (۲۱) بیان کردند که وجود مقادیر بالای MSRB، از گیاه در برابر شرایط نامساعد تنش محافظت می‌کند و نیز به این نتیجه رسیدند که در گیاه آرابیدوپسیس بیان بالای MSRB باعث کاهش انباشته شدن H₂O₂ و تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو می‌شود. طبق این گزارش‌ها، چون تنش شوری در این آزمایش در لاین B73 ذرت باعث کاهش MSRB شد در نتیجه مقاومت گیاه نیز در برابر تنش شوری و تنش اکسیداتیو کاهش پیدا کرده است (۲۱).

پروتئین Protein TIC110, chloroplastic (لکه شماره ۲۵۱۱) جزو پروتئین‌های کانالی می‌باشد و درگیر واردات پیش

پردازش می‌کند، بنابراین یک مرحله محدودکننده سرعت حمل و نقل الکترون فتوسنتزی در تنظیم تجمع سیتوکروم b6 می‌باشد. پروتئینی شبیه به PrfB بنام PrfB3 در استرومای کلروپلاست گیاهان در یک کمپلکس حاوی PrfB حاوی RNA متمرکز می‌شود که تنها در گیاهان آوندی یافت می‌شود. ممکن است برای محافظت از پروتکل‌های petB در مقابل حمله 3'-5' اگزونوکلئولیتیک، انتهای 3' را پوشش دهد. به عنوان فاکتور آزاد عمل نمی‌کند (۴۲). مورر و همکاران (۲۳) در یک پژوهش گزارش کردند که PrfB3 دارای مشخصات مهمی از موتیف‌های تری‌پپتید در تمام یوباکتری‌ها و ارگانل‌ها از جمله: کدون پایان، تشخیص موتیف SPF^۳ و کاتالیز مرکزی GGQ^۴ برای هیدرولیز peptidyl-tRNA می‌باشند. بیان آن با اعمال تنش نسبت به شاهد دارای افزایش بیان بود. که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

پروتئین Magnesium-chelatase subunit chlI-1, chloroplastic (لکه شماره ۹۵۰۴) در متابولیسم (بیوسنتز) کلروفیل نقش دارد. این پروتئین محل اتصال یون منیزیم به پروتوپورفیرین IX را کاتالیز می‌کند تا ترکیب Mg-protoporphyrin IX حاصل شود. منیزیم کلاتاز (magnesium-chelatase) یک کمپلکس از سه زیر واحد، CHLI، CHLD و CHLH است که واکنش یا عکس العمل آن در دو مرحله انجام می‌شود، اول اینکه ATP را فعال می‌کند و به دنبال آن ATP را کلاته می‌کند. با داشتن ATP بالا می‌تواند نقش مهمی در بیوسنتز کلروفیل داشته باشد. آبسزیک اسید (ABA) را درگیر نمی‌کند، بلکه یک تنظیم کننده مثبت سیگنال ABA است (۴۸). منیزیم کلاتاز یک آنزیم منحصر به فردی در مسیر بیوسنتز کلروفیل می‌باشد. آبسزیک اسید یک فیتوهورمون گیاهی است که این امر در تنظیم تنش‌های غیرزیستی مانند تنش شوری، تنش خشکی و سرما از طریق تنظیم بیان ژن دخیل است (۲). بیان این لکه پروتئینی پس از قرار گرفتن در شرایط تنش شوری، افزایش بیان داشت که بیانگر افزایش انرژی در شرایط تنش و در نتیجه با افزایش بیوسنتز کلروفیل همراه است.

پروتئین ATP synthase subunit gamma, chloroplastic (لکه شماره ۸۵۰۸) آنزیمی می‌باشد که گرادیان الکتروشیمیایی را در عرض غشای تیلاکوئیدی تنظیم کرده و بطور مستقیم بر میزان انتقال الکترون فتوسنتزی تأثیر می‌گذارد، بنابراین نمایانگر فاکتور کلیدی در تنظیم تبدیل انرژی در کلروپلاست‌ها می‌باشد (۱۹). نگارا و همکاران (۳۰) با قرار دادن گیاه سورگوم تحت شرایط تنش شوری نشان دادند که زیر واحد گاما آنزیم ATP سینتاز تحت شرایط شوری در برگ‌های این گیاه افزایش یافت ولی زیر واحدهای آلفا و بتا این آنزیم در شرایط شوری کاهش یافتند (۳۰).

با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی صفات بیوماس، فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز، میزان سدیم و پتاسیم در لاین B73 و MO17، تنش شوری اثر معنی‌داری روی صفات مذکور داشت. تنش شوری وزن خشک گیاهچه‌ها و مقدار پتاسیم را به‌طور معنی‌دار کاهش داد اما باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و میزان سدیم برگ شد.

نتیجه فعال شدن لیپیدهای سیگنالینگ و در نهایت تجمع لیپیدها در تیلاکوئید شود.

پروتئین Protein translocase subunit SECA1, chloroplastic (لکه شماره ۳۶۰۵) به‌عنوان پروتئینی که دارای نقش متمرکز در هیدرولیز ATP برای اتصال به پروتئین‌ها در سراسر غشاء تیلاکوئید دارد شناسایی شد. همچنین این پروتئین درگیر ترکیبات فتوسنتزی بوده و برای خروج پروتئین‌ها از کلروپلاست مورد نیاز است (۴۱). با قرار گرفتن گیاهان در شرایط تنش اکسیداتیو کلروپلاست‌ها در برگ‌ها در اثر جهش در تیلاکوئیدها تخریب شده و تکامل نمی‌یابند (۲۳). لوجیز و همکاران (۲۱) گزارش کردند که SECA در گیاه آراییدوپسیس با قرار گرفتن گیاه در شرایط تنش اکسیداتیو القا می‌شود. اما بیان این پروتئین در لاین B73 ذرت در تیمار شوری نسبت به گیاه شاهد با افزایش بیان همراه شد که ممکن است به دلیل تخریب کلروپلاست‌ها در برگ‌ها در اثر اعمال تنش شوری باشد (۲۱).

پروتئین Isoform 2 of Protein translocase subunit SECA2, chloroplastic (شماره لکه ۳۶۰۶) در خارج کردن پروتئین‌ها از کلروپلاست نقش دارد و احتمالاً با سایر پروتئین‌ها پیوند برقرار می‌کند تا بعد از ورود پروتئین‌ها به غشا داخلی پلاستیدها در مسیرهای بیوشیمیایی صحیح مربوط به خودشان قرار بگیرند. همچنین این پروتئین می‌تواند نقش مهمی در هیدرولیز ATP برای اتصال به پروتئین‌ها به منظور عبور از میان غشا داشته باشد (۴۱).

پروتئین Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic (لکه شماره ۵۲۰۵) جهت فتوسنتز در کوتیلدون‌ها (لپه‌ها) ضروری است. این پروتئین اسید سالیسیلیک را نگه می‌دارد و همراه با BCA4، در مسیر سیگنالینگ CO₂ درگیر می‌شود که مبادله گاز بین گیاهان و جو را با تعدیل توسعه و حرکات روزنه ای کنترل می‌کند. این پروتئین راندمان مصرف آب را افزایش می‌دهد و برگشت‌پذیری آب از دی‌اکسیدکربن را انجام می‌دهد (۱۰). بنابراین آنزیم کربنیک آنهیدراز جهت حفاظت از گیاه در شرایط تنش‌های غیرزیستی فعالیت می‌کند. بیشتر گیاهان اشباع از محتویات CA^۱ کلروپلاستی می‌باشند ولی محتویات CA سیتوپلاسمی کافی ندارند. آنزیم‌های CA سیتوپلاسمی در بیشتر گیاهان باعث مقاومت گیاه در شرایط نامساعد می‌شوند زیرا فعالیت CA سیتوپلاسمی تنش شوری و اسمزی را تنظیم می‌کند (۱۰). یو و همکاران (۴۶) گزارش کردند که بیان CA به تنش‌های محیطی نظیر تنش شوری، تنش خشکی و تنش اکسیداتیو بستگی دارد. قرار گرفتن لاین B73 ذرت تحت تنش شوری، این آنزیم افزایش بیان داشت شاید دلیل این افزایش، وجود محتویات سیتوپلاسمی کافی جهت فعالیت این آنزیم باشد که ممکن است سمیت یون‌های حاصل از تنش شوری باعث عدم تنظیم شوری و اسمزی و در نهایت افزایش بیان این پروتئین باشد.

پروتئین Peptide chain release factor PrfB3, chloroplastic (شماره لکه ۶۴۰۴) تنش وابسته به نور را تنظیم می‌کند که ترجمه پایدار petB را از انتهای 3'

1- Carbonic Anhydrase

2- Cytochrome b6 Subunit (petB)

3- Sun Protection Factor

4- Glycine-Glycine-Glutamine Motif

می‌رسد که لاین B73 از طریق تعداد و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در سیستم فتوسنتزی به همراه افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و مقاومت از تجمع بیشتر سدیم در برگ‌ها، نسبت به لاین MO17 از مقاومت نسبی نسبت به تنش شوری از خود نشان داد.

تجزیه الکتروفورز دو بُعدی پروتئین‌های برگ دو لاین ذرت تحت تنش ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۱۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر درگیر در سیستم فتوسنتزی مشاهده شد که ۱۰ لکه پروتئینی مربوط به لاین B73 و دو لکه پروتئینی مربوط به لاین MO17 بود. براساس نتایج حاصل تمام لکه‌های پروتئینی شناسایی شده افزایش بیان داشتند. چنین به نظر

منابع

1. Aliu, S., I. Rusinovci, S. Fetahu, B. Gashi, E. Simeonovska and L. Rozman. 2015. The effect of salt stress on the germination of maize (*Zea mays* L.) seeds and photosynthetic pigments. *Acta Agriculturae Slovenica*, 105: 85-94.
2. André, C.M., R. Schafleitner, I. Lefèvre and D. Evers. 2009. Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry*, 70: 1107-1116.
3. Aoki, A., A. Kanegami, M. Mihara, T.T. Kojima, M. Shiraiwa and H. Takahara. 2005. Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress. *Gene*, 356: 135-145.
4. Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advance*, 27: 84-93.
5. Baier, M. and K.J. Dietz. 1999. Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 119: 4. 1407-1414.
6. Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14: 93-107.
7. Bandehagh, A., GH. Salekdeh, M. Toorchi, A. Mohammadi and S. Komatsu. 2011. Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics*, 11: 1965-1975.
8. Bradford, MM. 1979. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-day binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
9. Browse, J. and C. Somerville. 1991. Glycerolipid synthesis-biochemistry and regulation. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 467-506.
10. Engineer, C.B., M. Ghassemian, J.C. Anderson, S.C. Peck, H. Hu and J.I. Schroeder. 2014. Carbonic anhydrases. EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development. *Nature*, 11: 7517: 246-250.
11. Falara, V., T.A. Akhtar, T.T.H. Nguyen, E.A. Spyropoulou, P.M. Bleeker, I. Schauvinhold, Y. Matsuba, M.E. Bonini, A.L. Schillmiller, R.L. Last, R.C. Schuurink and E. Pichersky. 2011. The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiology*, 157(2): 770-789.
12. FAO, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. 2017.
13. Gaber, M.A. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal Behavior*, 5: 369-374.
14. Hou, Q., G. Ufer and D. Bartels. 2016. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress *Plant Cell and Environment*, 5: 1029-1048.
15. Jiang, C., Q. Cui, K. Feng, D. Xu, C. Li and Q. Zheng. 2016. Melatonin improves antioxidant capacity and ion homeostasis and enhances salt tolerance in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 82: 1-9.
16. Jiang, Y., B. Yang, N.S. Harris and M.K. Deyholos. 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress- responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58: 3591-3607.
17. Kono, M. and I. Terashima. 2014. Long-term and short-term responses of the photosynthetic electron transport to fluctuating light. *Journal of Photochemistry Photobiology*, 137: 89-99.
18. Kovacheva, S., J. Bedard, R. Patel, P. Dudley, D. Twell, G. Rios, C. Koncz and P. Jarvis. 2005. In vivo studies on the roles of Tic110- Tic40 and Hsp93. *Plant Journal*, 41: 412-428.
19. Kramer, R., J.W. Vieira, H.J. Khoury, F.R.A. Lima and D. Fuelle. 2003. All about MAX: a male adult voxel phantom for *Monte Carlo* calculations in radiation protection dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, 48: 1230-1239.
20. Kwon, S.J., S.I. Kwon, M.S. Bae, E.J. Cho and O.K. Park. 2007. Role of the methionine sulfoxide reductase MsrB3 in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 48: 1713-1723.
21. Laugier, E., L. Tarrago, C. Vieira Dos Santos, F. Eymery, M. Havaux and P. Rey. 2010. *Arabidopsis thaliana* plastidial methionine sulfoxide reductase B, MSRBs, account for most leaf peptide MSR activity and are essential for growth under environmental constraints through a role in the preservation of photosystem antennas. *Plant Journal*, 61(2): 271-282.
22. Liu, X.D. and Y.G. Shen. 2004. NaCl-Induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b roteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga. *Dunaliella salina*. *FEBS Letters*, 569: 337-340.

23. Lu, B., C. Xu, K. Awai, A.D. Jones and C. Benning. 2007. A small ATPase protein of *Arabidopsis*. TGD3 involved in chloroplast lipid import. *Journal of Biological Chemistry*, 49: 35945-35953.
24. Meurer, J., L. Lezhneva, K. Amann, M. Gödel, S. Bezhani, I. Sherameti and R. Oelmüller. 2002. A peptide chain release factor 2 affects the stability of UGA-containing transcripts in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*, 12: 3255-3269.
25. Moharramnejad, S. and M. Valizadeh. 2015. Variation of pigment content and antioxidant enzyme activities in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings under salt stress. *Journal of Crop Ecophysiology*, 9: 153-166 (In Persian).
26. Moharramnejad, S., O. Sofalian, M. Valizadeh, A. Asghari, M. Shiri and M. Ashraf. 2019. Response of maize to field drought stress: Oxidative defense system: Osmolytes' accumulation and photosynthetic pigments. *Pakistan Journal of Botany*, 51: 799-807.
27. Moharramnejad, S. and M. Valizadeh. 2019. A key response of grain yield and superoxide dismutase in maize (*Zea mays* L.) to water deficit stress. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 2: 77-84.
28. Molazem, D. and A. Bashirzadeh. 2017. Investigation of the antioxidant enzymes and proline in varieties of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Journal of Molecular and Cellular Research*, 30: 77-90 (In Persian).
29. Munns, R., R.A. James and A. Lauchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Environmental and Experimental Botany*, 57: 1025-1043.
30. Ngara, R., R. Ndimba, J. Borch-Jensen, O.N. Jensen and B. Ndimba. 2012. Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in *Sorghum bicolor* seedlings. *Journal of Proteomics*, 75: 4139-4150.
31. Ohlrogge, J. and J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 957-970.
32. Omrani, B. and S. Moharramnejad. 2018. Study of salinity tolerance in four maize hybrids (*Zea mays* L.) at seedling stage. *Journal of Crop Breeding*, 9: 79-86 (In Persian).
33. Parker, R., T.J. Flowers, A.L. Moorem and N.V.J. Harpham. 2006. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1109-1118.
34. Pavoković, D., B. Križnik and M. Krsnik-Rasol. 2012. Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. *Croatica Chemica Acta*, 85: 177-183.
35. Rehman, H., T. Aziz, S.M.A. Basra, M.A. Cheema and M. Farooq. 2008. Chilling tolerance in maize hybrid induced by seed priming with salicylic acid. *Blackwell Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 161-168.
36. Rhee, S.G., H.Z. Chae and K. Kim. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 38: 1543-1552.
37. Rivoal, J., R. Dunford, W.C. Plaxton and D.H. Turpin. 1996. Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green alga *Selenastrum minutum*, evidence that association of the 102-kDa catalytic subunit with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the Eenzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332: 47-57.
38. Sairam, R.K. and G.C. Srivastava. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fraction of tolerant and susceptible wheat genotypes to long term salt stress. *Journal of Plant Science*, 162: 897-904.
39. Sazzad Hossain, M., A.I. ElSayed, M. Moore and K.J. Dietz. 2017. Notes redox and reactive oxygen species network in acclimation for salinity tolerance in sugar beet. *Journal of Experimental Botany*, 96: 1283-1298.
40. Schnable, P.S., D. Ware, R.S. Fulton, J.C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton, T.A. Graves and P. Minx. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics. *Journal of Science*, 326: 1112-1115.
41. Skalitzky, C.A., J.R. Martin, J.H. Harwood, J.J. Beirne, B.J. Adamczyk, G.R. Heck, K. Cline and D.E. Fernandez. 2011. Plastids contain a second sec translocase system with essential functions. *Plant Physiology*, 155: 354-369.
42. Stoppel, R., L. Lezhneva, S. Schwenkert, S. Torabi, S. Felder, K. Meierhoff, P. Westhoff and J. Meurer. 2011. Recruitment of a ribosomal release factor for light- and stress- dependent regulation of petB transcript stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 2680-2695.
43. Vieira Dos Santos, C., S. Cuine, N. Rouhier and P. Rey. 2005. The *Arabidopsis* plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A and induction by photooxidative stress. *Plant Physiology*, 138: 909-922.
44. Wang, Q., M. Jia, J.H. Huh, A. Muchlinski, R.J. Peters and D. Tholl. 2016. Identification of a dolabellane type diterpene synthase and other root-expressed diterpene synthases in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1761.
45. Wientjes, E., H. Van Amerongen and R. Croce. 2013. LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827: 420-426.

46. Yu, B., Z. Li, J. Yang, S. Minakhina, M. Yang, R.W. Padgett, R. Steward and X. Chen. 2005. Methylation as a step in plant microRNA biogenesis. *Journal of Science*, 307, 5711: 932-935.
47. Yusefi, M., V. Nasrollahzadeh Asl and S. Moharramnejad. 2017. Response of oxidative defense system to salt-treat in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Fresenius Environmental Bulletin*, 26: 5219-5224.
48. Zhang, D., E. Chang, X. Yu, Y. Chen, Q. Yang, Y. Cao, X. Li, Y. Wang, A. Fu and M. Xu. 2018. Molecular characterization of magnesium chelatase in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Frontiers Plant Science*, 9: 1-15.
49. Zörb, C., S. Schmitt and K.H. Mühling. 2010. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. *Proteomics System Biology*, 24: 4441-4449.

Assessment of Superoxide Dismutase Activity, Photosynthetic Proteins Involved and Sodium and Potassium Contents in Maize Line Seedlings under Salinity Stress

Sajjad Moharramnejad¹, Ali Bandehhagh² and Yeganeh Shafiei³

1- Research Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Ardabil Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Moghan, Iran,
(Corresponding author: sm.chakherlo@yahoo.com)

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- MSc in Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: December 22, 2020

Accepted: February 8, 2021

Abstract

To evaluate the effect of salinity stress activity of superoxide dismutase, photosynthetic proteins involved and sodium and potassium contents on maize line seedlings, a factorial experiment based on completely randomized design with four replicates was performed under greenhouse conditions. Two maize inbred lines as B73 and MO17, and two salinity levels including 0 and 200 mM NaCl were considered as the first and second factors, respectively. The results indicated that salinity stress had a significant effect on the dry weight and Na⁺ and K⁺ contents in maize line seedlings. Electrophoresis analysis of superoxide dismutase enzyme revealed three different isoforms. Salinity stress increased the activity of superoxide dismutase isoforms. The results obtained from 2-D electrophoresis of maize lines showed 10 and 2 repeatable protein spots in photosynthetic system in B73 and MO17 maize lines, respectively. Salinity stress increased the expression of 12 protein spots involved in photosynthesis of maize lines. As results indicated that MO17 line more salt-sensitive than B73 line. The results show that maize lines as B73 and MO17 can control the adverse effects of salinity stress by increasing the activity of superoxide dismutase isoforms and enhancing the expression of proteins involved in photosynthesis and regulating the Na⁺ and K⁺.

Keywords: Isoform, Maize, Photosynthetic, Protein, Salinity