



"مقاله پژوهشی"

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

سجاد محمد نژاد^۱، علی بنده حق^۲ و یگانه شفیعی^۳

^۱- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات زراعی و باقی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (معان)، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، معان، ایران، (نویسنده مسؤول: sm.chaherlo@yahoo.com)

^۲- دانشیار، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی، اردبیل، 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

به منظور ارزیابی اثر تنش شوری روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پروتئین‌های درگیر در سیستم فتوستتری و میزان سدیم و پتاسیم گیاهچه‌های لاین ذرت، آزمایشی در گلخانه به صورت 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 میلی‌مولاًر 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 دو بعدی نشان داد که در لاین‌های ذرت تحت تنش شوری به ترتیب ۱۰ و ۲ لکه پروتئینی تکرار پذیر درگیر در سیستم فتوستتری برای B73 و MO17 شناسایی گردید. تنش شوری باعث افزایش بیان ۱۲ لکه پروتئینی درگیر در فتوستتری لاین‌های ذرت شد. با توجه به نتایج به دست آمده و بررسی صفات مورفو‌لوزیکی 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 فتوستتری و تنظیم سدیم و پتاسیم اثرات ناشی از تنش شوری را کنترل می‌کنند.

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

نسبت‌های Na^+/K^+ و $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ می‌شود. کاهش پتاسیم در اثر تنش شوری می‌تواند به دلیل رقابت سدیم بر سر مکان های اتصال به ناقل‌های غشاء پلاسمایی و یا ناشت به دلیل عدم ثبات غشاء پلاسمایی باشد (۱۳). شوری از مهم‌ترین عوامل ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش گونه‌های فعل 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). آزو و همکاران (۱۵) در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سه رقم ذرت نشان دادند که در بین غلظت‌های مختلف شوری، اختلاف معنی‌دار وجود داشت و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تنش شوری افزایش معنی‌داری نشان داد. مطالعات کوکا و همکاران (۲۷) و آثار 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 آنتی اکسیدان و برولین در ارقام ذرت تحت تنش آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برولین در ارقام ذرت وجود شوری نشان دادند که اختلاف مختلفی بین ارقام ذرت وجود داشت به طوریکه رقم BC662 بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و غلظت کلروفیل را تحت تنش شوری به خود اختصاص داد.

مقدمه

ذرت بعد از گندم مقام دوم را از نظر سطح زیر کشت دارد 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 به منظور تولید دانه زراعت می‌شود سطح زیرکشت ذرت در دنیا بیش از ۱۳۰ میلیون هکتار گزارش شده است و سهم کشور ایران از این مقدار حدود ۲۳۴ هزار هکتار برآورد شده است (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، معمول ترین 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 Cl^- و Na^+ و

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 ۴-۵ برگی رسیدند، تنش شوری با استفاده از محلول نیم هوگلندر 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) اندازه گیری شد.

استخراج سدیم و پتاسیم

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

ستخراج و رنگ آمیزی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

نمونه‌های برگی تازه در بافر استخراج (تریس ۵۰ میلی مولار، پنج درصد ساکاروز، ۵۰ میلی مولار اسکوربیک اسید، ۲۰ میلی مولار سدیم متابی‌سولفیت و دو درصد پلی‌اتیلن گلیکول) با pH ۷/۵ برابر ۱/۰ درصد ۲-۳ 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 سانتریفیوژ شد. عصاره آنزیمی با قطعات بریده شده کاغذ و اتمن شماره سه و مناسب با ابعاد چاهک، جذب و در ژل پلی‌اکریلامید هشت درصد با ابعاد ۰/۶ × ۱۲ × ۱۵ سانتی‌متر بارگذاری شد. برای خنک کردن ژل و نگهداشتن دمای پایین هنگام الکتروفوروز، از طرف واحد استفاده شد. حدود چهار ساعت پس از راه اندازی دستگاه الکتروفوروز با آمپرای کمتر از ۳۰ میلی آمپر، آبی بروموفنول با حرکت ۸-۱۰ سانتی‌متری به انتهای ژل رسید و ژل برای برش و رنگ آمیزی آماده شد (۲۶).

الكتروفورز دو بُعدی

به منظور 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 آکریل آمید ۳۰ درصد، آمفورلین‌های pH ۳ تا ۱۰ و ۵ تا ۸ APS ۱۰ درصد و محلول TEMED بود. غلظت پروتئین نمونه‌های برگی با استفاده از روش برادافورد (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 ایزوکلتریک آن‌ها، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه ولتاز ۲۰۰ ولت، به مدت ۱۶ ساعت ولتاز ۴۰۰ ولت و به مدت یک ساعت ولتاز 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 فرایند کاملاً پیچیده هم در سطح سلولی و هم در سطح کل گیاه میباشد و نیازمند تغییرات در سطح بین 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 بعدی روش اصلی برای جداسازی پروتئین‌ها میباشد، بهطوری که برای شناسایی پروتئین‌ها و تغییرات پروتئومی القاء شده به وسیله‌ی تیمارها و تغییرات محیطی از الکتروفورز دو بعدی استفاده میشود (۳۳). تحقیقات اخیر بیشتر روی پروتئوم در گیاهان متمرک شده‌است، زیرا اطلاعات جامعی برای درک سازوکارهای پیچیده پاسخ و سازگاری گیاهان به تش شوری را ارائه می‌دهد (۱۶). تش شوری منجر به تغییر الگوی پروتئوم بافت‌های گیاهی شده و با توجه به اینکه پروتئین‌ها محل پاسخ گیاه به تش میباشند، رهیافت پروتئومیک میتواند در مطالعه این پاسخ به عنوان یک ابزار قوی مد نظر قرار گیرد. پیدايش 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 (ژنتیپ B73) زمینه مطالعات پروتئومیک ذرت را بسیار تسريع نمود (۴۰). بنابراین درک درست از تعاملات بین ذرت و تش 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 به عنوان یکی از روش‌های مهم در مطالعات پروتئین‌ها محسوب میشوند و مقدمه‌ای برای انتقال ژن و بهنژادی ارقام به حساب می‌آیند (۳). ارزیابی پروتئوم گیاهچه‌ای ذرت تحت تش شوری نشان داد که گروههای پروتئینی مختلفی از قبیل سیستم دفاع آنتی اکسیدان، سیستم فتوستراتری و تنظیم کننده نسبت به تش شوری افزایش بیان داشتند (۴۹). در این راستا تحقق حاضر با هدف ارزیابی تاثیر شوری بر مقدار سیدم و پتانسیم و میزان فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش ژل پلی اکریلامید و شناسایی پروتئین‌های درگیر در سیستم فتوستراتری در گیاهچه‌های لاین ذرت انجام شد.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش و نحوه اعمال تنفس شوری

آزمایش به صورت 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 میلی مولار کلرید سدیم بودند. بذور ابتدا با محلول سه درصد هیپوکلریت سدیم به مدت دو دقیقه خرد گرفته و پنچ روز پس از جوانهزنی، گیاهچه‌ها به پلاستیک‌های خاص حاوی

جيانگ و همکاران (۱۵) با بررسی اثر شوری روی گیاهچه‌های ذرت اظهار کردند که تنش شوری باعث کاهش معنی دار وزن خشک گیاهچه‌های ذرت شد. به طوری که 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 به طور معنی دار کاهش می‌دهد (۱، ۴، ۳۲).

مقدار سدیم و پتاسیم

براساس تجزیه واریانس داده‌ها، بین لاین‌ها و سطوح شوری برای مقدار Na^+ و K^+ در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار وجود داشت. همچنین برهم‌کنش لاین × تنش شوری به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد برای Na^+ و K^+ معنی دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش لاین × تنش شوری برای Na^+ و K^+ نشان داد که شوری به طور معنی دار باعث افزایش مقدار سدیم (به ترتیب ۲۲/۸ و ۲۶/۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک برای B73 و MO17) و پتاسیم (به ترتیب 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 مرتب بیشتر از لاین B73 بود. همچنین میزان پتاسیم در لاین B73 به مرتب 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.

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 آنژیمی به عنوان فعالیت دنسیتومتریک ایزوفرم‌های آنژیم سوپراکسید دیسموتاز روی ژل پلی آکریلامید استفاده شد. تصاویر به دست آمده الکتروفورز دوبعدی توسط نرم افزار PD-quest، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و ژل‌ها به همراه تکرار آن‌ها بررسی شده و لکه‌های مشترک بین تکرارها توسط نرم افزار برقسب زده شدند. به منظور شناسایی احتمالی لکه‌های پروتئینی از دو معیار نقطه ایزووالکتریک (pI) و وزن مولکولی (MW) در نرم‌افزار آنلاین- Tag- Ident داده پایگاه UniprotKB استفاده شد. برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن استفاده شد.

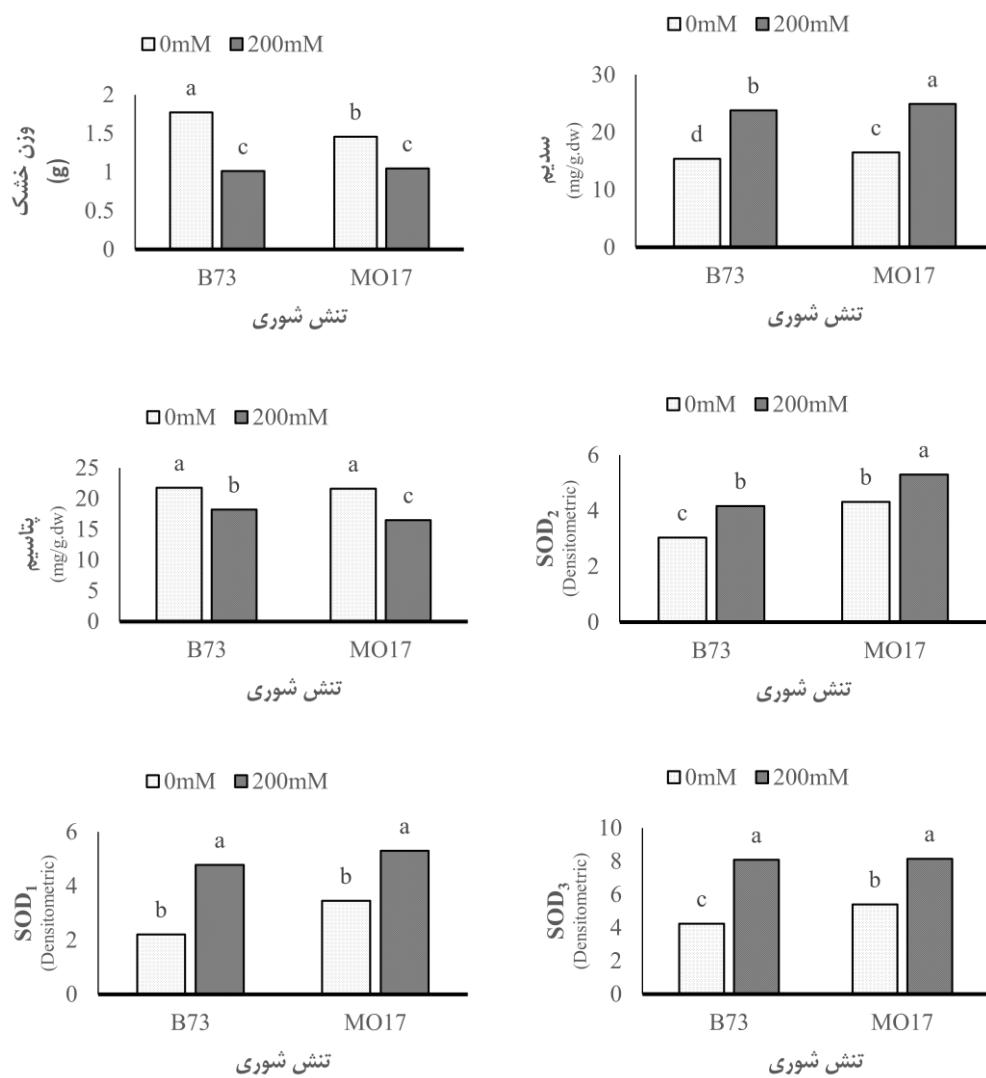
نتایج و بحث وزن خشک گیاهچه‌ها

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 معنی دار بود. همچنین برهم‌کنش لاین × تنش شوری نیز در سطح احتمال پنج درصد برای صفت وزن خشک گیاهچه‌ها معنی دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین برهم‌کنش لاین × تنش شوری نشان داد که شوری به طور معنی دار باعث کاهش وزن خشک گیاهچه‌های هر دو لاین ذرت شد به طوری که این میزان کاهش نسبت به شرایط عادی حدود ۳۶ درصد بود (شکل ۱) و میانگین وزن خشک گیاهچه لاین B73 و MO17 به ترتیب ۱/۳۹ و ۱/۲۵ گرم بود.

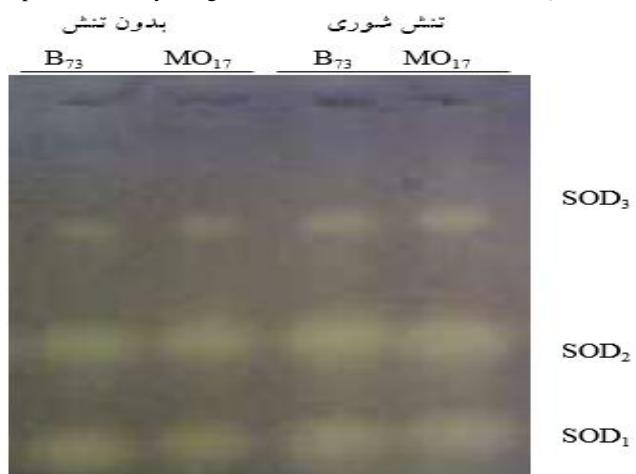
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه تحت تنش شوری در دو لاین B73 و MO17 ذرت
Table 1. The analysis of the variance of the physiological traits studied under salinity stress on B73 and MO17

میانگین مربوط						درجه آزادی	منابع تغییر
SOD ₃	SOD ₂	SOD ₁	K ⁺	Na ⁺	وزن خشک		
۲/۵۵ ^{ns}	۷/۵۹ ^{ns}	۴/۶۲ ^{ns}	۶۱/۵ ^{**}	۱۱/۵ ^{**}	۴/۲ ^{**}	۱	زنوتب
۱۴۲/۸۷ ^{**}	۱۳۵/۹۹ ^{**}	۲۲/۵۸ ^{**}	۳۸/۰ ^{**}	۹۰/۱ ^{**}	۵/۸ ^{**}	۱	تنش شوری
۱۴/۰۱ [*]	۱۱/۶۷ [*]	۸/۲۴ [*]	۱۴/۹ ^{**}	۸/۰ [*]	۳/۸ [*]	۱	زنوتب × 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 غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین وزن خشک، سدیم، پتانسیم، SOD_1 ، SOD_2 و SOD_3 تحت تنش شوری در لاین B73 و MO17
Figure 1. Mean comparisons of dry weight, Na^+ , K^+ , SOD_1 , SOD_2 and SOD_3 under salinity stress



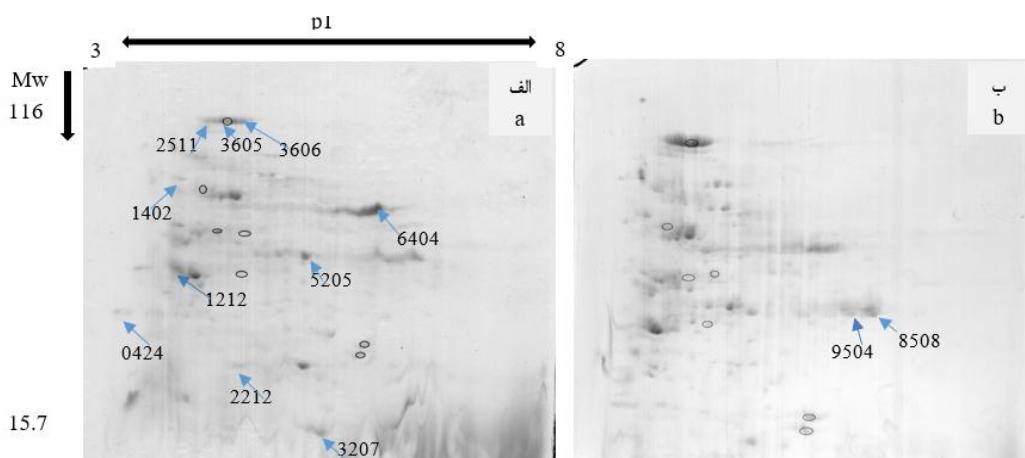
شکل ۲- الگوی پروتئینی ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز لاین B₇₃ و MO₁₇ تحت تنش شوری
Figure 2. Protein pattern of superoxide dismutase's isoforms in B73 and MO17 lines under salinity stress

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

پاسخ آنزیم‌های آنتی اکسیدان به تنش در تمامی گیاهان یکسان نیست و همه آنزیم‌های آنتی اکسیدان در طی اعمال تنش شوری افزایش پیدا نمی‌کنند، بلکه بسته به عوامل مختلف از جمله گونه گیاهی، غلظت و نوع نمک، فعالیت آنتی اکسیدان‌ها 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 زندۀ محیطی برای ارقام مختلف بسیار متفاوت است (۳۰). نتایج حاصل از تجزیه الکتروفورزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روی یونجه (۴۷)، ذرت (۲۷) و لوپیا (۲۵) سه ایزوفرم برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گزارش کردند. که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. ملازم و بشیرزاده (۲۸) با بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پروولین 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 فتوسترنزی

در این پژوهش تعییرات بیان پروتئین‌های بافت برگ‌های لاین B73 و MO17 و 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 بعدی لاین‌های ذرت تحت تنش شوری به ترتیب ۱۰ و ۲ لکه پروتئینی تکرارپذیر در گیر در سیستم فتوسترنزی برای B73 و MO17 شناسایی گردید (جدول ۲). تمام لکه‌های شناسایی شده افزایش بیان داشتند. لکه پروتئینی ۳۲۰۷ (Protein 5, TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL (chloroplastic (chloroplastic بیشترین بیان را به خود اختصاص داد (شکل ۴).



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

مطالعات فیزیولوژیک نشان داده است که تنش شوری اثرات منفی بر رشد گیاهان دارد. این امر به سبب تعییر در نسبت عناصر غذایی، تنش اسمزی و سمتی 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 گلوفیت‌ها 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 پتانسیم دارند نه تنها تنظیم اسمزی موفق‌تری دارند، بلکه توانایی بیشتری در کاهش سمتی 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 پلی آکریلامید 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 به طور معنی‌دار باعث افزایش فعالیت هر سه ایزوفرم آنزیم

جدول ۲- اطلاعات پروتئین های شناسایی شده در برگ لاین B73 و MO17 تحت تنش شوری
Table 2. Information of identified proteins in B73 and MO17 leafs under salinity stress

O.pI ^c	O.MW ^d	T.pI ^c	T.MW ^b	فاکتور القا	Ac.No ^a	پروتئین های شناسایی شده	لاین	شماره لکه
۵/۰۱	۱۸/۱۰	۵/۰۱	۱۷/۲۷	۲/۰۵	Q949U7	Peroxiredoxin-2E, chloroplastic	B73	۰۴۲۴
۵/۱۷	۲۴/۴۳	۵/۰۲	۲۴/۵۱	۲/۱۰	Q9SYW8	Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 2, chloroplastic	B73	۱۲۱۲
۵/۱۷	۶۳/۲۸	۵/۲۲	۶۳/۴۷	۲/۰۷	A0A178U9Y5	Bifunctional dolabella-3,7-dien-18-ol synthase.dolathalia-3,7,11-triene synthase TPS20, chloroplastic	B73	۱۴۰۲
۵/۳۶	۱۵/۱۰	۵/۳۷	۱۵/۷۴	۲/۱۳	Q9C5C8	Peptide methionine sulfoxide reductase B2, chloroplastic	B73	۲۲۱۲
۵/۳۶	۱۰۶/۳۳	۵/۳۲	۱۰۶/۳۳	۲/۰۱	Q8LPR9	Protein TIC110, chloroplastic	B73	۲۵۱۱
۵/۶۰	۹/۱۷	۵/۶۱	۸/۹۹	۱۵/۸۸	Q8VY77	Protein TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 5, chloroplastic	B73	۳۲۰۷
۵/۶۴	۱۰۷/۴۵	۵/۶۳	۱۱۱/۱۵	۲/۰۸	Q9SYI0	Protein translocase subunit SECA1, chloroplastic	B73	۳۶۰۵
۵/۹۰	۱۱۶/۳۷	۵/۶۹	۱۱۲/۹۸	۲/۱۰	D8WUA4	Isoform 2 of Protein translocase subunit SECA2, chloroplastic	B73	۳۶۰۶
۶/۱۳	۲۵/۵۷	۶/۱۲	۲۶/۸۱	۲/۰۷	P27140	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic	B73	۵۲۰۵
۶/۷۴	۴۵/۴۶	۶/۷۰	۴۷/۶۱	۲/۰۵	F4J264	Peptide chain release factor PrfB3, chloroplastic	B73	۶۴۰۴
۵/۰۵	۳۹/۹۲	۵/۱۰	۴۱/۱۳	۷/۲۰	P16127	Magnesium-chelatase subunit Chl1-1, chloroplastic	MO17	۹۵۰۴
۵/۶۸	۳۳/۹۵	۵/۴۵	۳۳/۹۱	۲/۱۹	POC1M0	ATP synthase subunit gamma, chloroplastic	MO17	۸۵۰۸

: شماره دسترسی در داده پایگاه های MASCOT و NCBInr و TagIdent؛ a: وزن مولکولی تئوری؛ b: وزن مولکولی تجربی؛ c: نقطه ایزو الکتریک تئوری؛ d: وزن مولکولی تجربی

protein 2, chloroplastic (شماره لکه ۱۲۱۲) انرژی نوری (نخستین گام در فرایند فتوستتری) را به دام می اندازد، بنابراین گیرنده های دریافت کننده نور بایستی در پاسخ به وضعیت فیزیولوژیکی و سیگنال های محیطی تنظیم شوند. کلروفیل با اتصال به کمپلکس های پروتئینی دریافت کننده نور کارتوئیدها به عنوان گیرنده نور در جلبک ها و گیاهان عالی عمل می کند (۳۷، ۴۵). تکامل دستگاه فتوستتری بطور نزدیکی در ارتباط با خانواده بزرگ پروتئین LHC^۱ می باشد. خانواده پروتئین LHC به زیرخانواده های پروتئین های متصل به کلروفیل a (CAA)، پروتئین های متصل به کلروفیل a/b (CAB)، پروتئین های متصل به a/b^۲ و LHCx^۳ و LHCz^۴ تقسیم می شوند. این پروتئین به عنوان عمدترين پروتئين غشائي موجود در طبيعت بوده (۱۰) توسط ژنهای هسته اي کد شده، روی ريبوزون های سيتوپلاسمی سنتز شده، در عرض غشائي دولائي ای کلروفيل است عبور کرده و در درون غشائي تيلاکوئيدی قرار می گيرد. در تنش های غيرزيستي، فسفوريلاسيون برگشت پذير پروتئين ها يك ابزار قدرتمند برای کاهش آسيب به سلول های گیاهی بويژه سيستم فتوستتری می باشد (۱۷). ليو و شن (۲۲) گزارش کردنده که پروتئين chlorophyll a/b-binding protein 2, chloroplastic افروختگی انرژی بین فتوستتری I و II متعادل می کند. پس از اعمال تنش شوري، کلروفيل استها در اثر شوري تخریب می شوند و سیستم فتوستتری گیاه نیز تا حدود زیادی از کار می افتد این پروتئین نیز در ذرت پس از اعمال تنش شوري ممکن است به دلیل تخریب سیستم فتوستتری و کاهش تولید انرژی در گیاه کاهش یافته باشد.

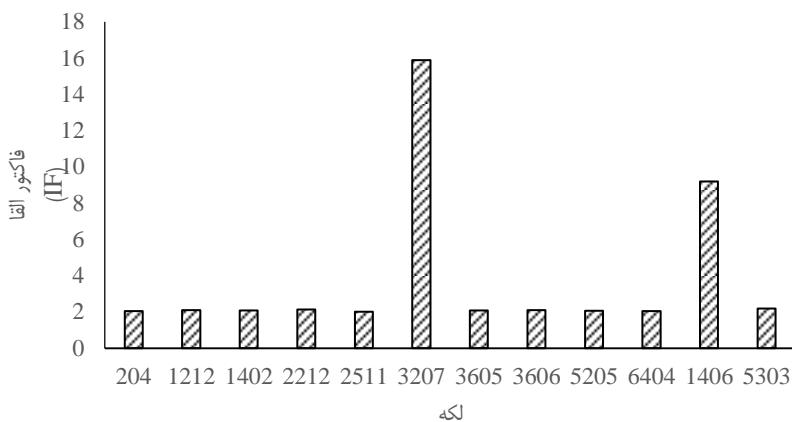
تنش شوري منجر به تغيير الگوي پروتئوم بافت های گیاهی شده و با توجه به اينکه پروتئین ها محل پاسخ گیاه به تنش می باشند، رهیافت پروتئومیک می تواند در مطالعه این پاسخ به عنوان يك ابزار قوی مدنظر فرار گيرد. شوري یکی از مشکلات محیطی جدی است که باعث ايجاد تنش های اسمزی، کاهش رشد و در نهايیت کاهش محصول می گردد. مهم ترین واکنش گیاه به افزایش شوري خاک، کاهش آهنگ رشد است. در اين آزمایش اين کاهش رشد در هر دو لاین ذرت مشاهده شد و در لاین B73 کمتر از لاین دیگر بود و اين نشان دهنده تحمل نسبی بالا در اين لاین می باشد، چرا که در شرایط شوري، ابتدا رشد رویشي گیاه و توسعه برگ ها متاثر می شوند. پروتئین Peroxiredoxin-2E, chloroplastic (لکه شماره ۰۴۲۴) از آنزیمه های آنتی اکسیدان تجزیه کننده H₂O₂ می باشد. علاوه بر اجای H₂O₂ اين پروتئين ها سمزادي از الكيل هیدروپروکسیدها و پروکسی نیتریت را نیز انجام می دهند. با وجود اين که تفاوت های بارزی در اختصاصي بودن سوبسترا و ویژگی های کینتیکی وجود دارد، به واسطه اين عملکرد پروکسی ردوکسین ها در تنظيم پیام رسانی وابسته به اگزولپید و پیام رسانی مرتبط با NO نقش دارد (۵، ۳۷). سزاد حسین و همکاران (۳۹) گزارش کردنده که با اعمال تنش شوري در گیاه چند رقد پروتئين پروکسی ردوکسین 2E کاهش یافت. آن ها همچنین بيان کرده اند که اين آنزیم در شرایط تنش شوري برای افزایش تحمل گیاه در برابر تنش اکسیداتیو نیز نقش دارد. در اين آزمایش اين پروتئين با اعمال تنش شوري کاهش یافته باشد. که با نتایج اين پژوهش مطابقت داشت. پروتئين Photosystem I chlorophyll a/b-binding

1- Light-harvesting complex

2- Chlorophyll a/c

3- Light harvesting complex X Family

4- Light harvesting complex Z Family



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

ماده پروتئین به کلروپلاستها بوده و کanal وابسته به ولتاژ انتخابی کاتیون را در قسمت داخلی کلروپلاست پوشش می دهد. به طور خاص به حمل و نقل پیتیدها واکنش نشان می دهد. با هر دو پیش ماده و فرم های بالغ از پروتئین های اولیه همکاری می کنند (۱۸). در گیاه آرابیدوپسیس ژن های اولیه همکاری می کنند (۱۹). در TIC110 atTIC40 و atTIC110 گزارش کردند که به علت کاهش کمپلکس TIC تحت تنش گرمایی، پروتئین های مهم به کلروپلاست کاهش ورود داشته و پردازش پیتیدهای استرومای استرومای در گیاه گوجه فرنگی کاهش نشان داد.

پروتئین Protein Trygalactosyl D-Acyl Glycerol ۵ (لکه شماره ۳۲۰۷) برای رفت و آمد پیتیدها از شبکه آندوپلاسمی به پلاستید به عنوان بخشی از مسیر یوکاربیوتی اجتماع لیپید در تیلاکوئید ضروری می باشد (۹،۳۱). این پروتئین به انتقال لیپید از پوشش بیرونی به داخل TGD4 با اتصال TGD4 به کمپلکس حمل و نقل ۱,2,3 کمک می کند. پروتئین TGD5 یک پروتئین کوچک غنی از گلایسین را در غشاء کلروپلاست گلبرگ ها پوشش می دهد (۴). لو و همکاران (۲۳) بیان کردند که با فعال شدن TGD5 در گیاه، این پروتئین درگیر ترافیک لیپیدها از شبکه آندوپلاسمی به پلاستیدها بوده و مسیر یوکاربیوتی تجمع لیپیدها در تیلاکوئید را شناسایی می کند. لیپیدهای غشاء ای در تولید لیپیدهای سیگنالینگ نقش دارند و همچنین ساخت و متابولیسم مولکول های سیگنالینگ را تنظیم کرده و باعث فعال شدن سیگنال های تنش های غیرزیستی می شوند. تنش های غیرزیستی مثل تنش خشکی و تنش حرارتی باعث ایجاد انبویه ای از سیگنال های وابسته به لیپید می شود (۱۳). هو و همکاران (۱۴) بیان کردند که در شرایط تنش غیرزیستی نظریه تنش اکسیداتیو، لیپیدهای غشاء ای باعث فعال شدن لیپیدهای سیگنالینگ تنش های غیرزیستی می شوند که باعث انتقال لیپیدها به تیلاکوئید می شوند. بنابراین نتایج این اختصار وجود دارد که با قرار گرفتن گیاه ذرت در شرایط تنش شوری، این پروتئین باعث فعال شدن لیپیدهای غشاء ای گیاه و در

بروتوئین Bifunctional dolabella-3,7-dien-18-ol synthase/dolathalia-3,7,11-triene synthase TPS20, chloroplastic dolatripen ها نقش دارد. سبب فعال شدن dolathalia-3,7-dien-18-ol و فعال شدن dolathalia-3,7,11-triene synthase dolathalia-3,7-dien-18-ol dolabella-3,7-dien-18-ol triene را از گرانیل گرانیل دی فسفات (GGPP) کاتالیز می کند. بنظر نمی رسد که در بیوسنتر سرکوئی ترپن ها دخالت داشته باشد (۴۴). در برخی از گیاهان در اثر تنش های زیستی و غیر زیستی، آنزیم مسئول سنتر ترپنوتئیدها در برگ ها فعال می شود. TPS20 و TPS12 در انتشار ترپنوتئیدها در برگ های گیاهان اهمیت خاصی دارند. این دو ژن بویژه TPS20 در کرک های برگ های گیاهان مرکز می شوند (۱۱).

پروتئین Peptide methionine sulfoxide reductase B2 (لکه شماره ۲۲۱۲) کاهش سولفوکسید متیونین (MetSO) به متیونین در پروتئین ها را کاتالیز می کند. نقش محافظتی در برابر تنش اکسیداتیو با بازیابی فعالیت های پروتئینی که از طریق اکسیداسیون متیونین غیرفعال شده اند، دارد. می تواند نقش مهمی در ارتباط با MSRB در حفظ رشد رویشی در طول محدودیت های محیط زیست، از طریق حفظ آتنن های فتوسنتری ایفا کند (۲۱). بسیاری از پژوهشگران نشان دادند که پروتئین های MSRB در گیاهانی مثل برنج، آربیدوپسیس و فلفل در برابر تنش های اکسیداتیو نقش محافظتی دارند (۲۰،۴۳). لاوجیر و همکاران (۲۱) بیان کردند که وجود مقادیر بالای MSRB از گیاه در برابر شرایط نامساعد تنش محافظت می کند و نیز به این نتیجه رسیدند که در گیاه آربیدوپسیس بیان بالای MSRB باعث کاهش انباسته شدن H_2O_2 و تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو می شود. طبق این گزارش ها، 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 ۲- Translocon at The Inner Envelope Membrane of Chloroplasts (لکه شماره ۲۵۱۱) جزو پروتئین های کانالی می باشد و درگیر واردات پیش

پردازش می‌کند، بنابراین یک مرحله محدود‌کننده سرعت حمل و نقل الکترون فتوستتری در تنظیم تجمع سیتوکروم b6 باشد. پروتئینی شبیه به PrfB بنام PrfB3 در استرومای کلروپلاست گیاهان در یک کمپلکس حاوی PrfB حاوی RNA متمنکر می‌شود که تهها در گیاهان آوندی یافت می‌شود. ممکن است برای محافظت از پروتکل‌های petB در مقابل حمله^{۳-۵} اگزونوکلئوتیک، انتهای^۳ 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 تریپتید در تمام یوباکتری‌ها و ارگانل‌ها از جمله: کدون پایان، تشخیص موتیف SPF^۳ و کاتالیز مرکزی GQQ^۳ 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 متاپولیسم (بیوستتر) کلروفیل نقش دارد. این پروتئین محل اتصال یون منیزیم به پروتوبورفیرین IX را کاتالیز می‌کند تا ترکیب Mg-IX protoporphyrin IX حاصل شود. منیزیم کلاتاز (magnesium-chelatase) یک کمپلکس از سه زیر واحد، CHLD و CHLH است که واکنش یا عکس العمل آن در دو مرحله انجام می‌شود، اول اینکه ATP را فال آن در دو مرحله انجام می‌شود، اول اینکه ATP می‌کند و به دنبال آن ATP را کلاته می‌کند. با داشتن ATP بالا می‌تواند نقش مهمی در بیوستتر کلروفیل داشته باشد. آسیزیک اسید (ABA) را درگیر نمی‌کند، بلکه یک تنظیم کننده مثبت سیگنال ABA است (۴۸). منیزیم کلاتاز یک آنزیم منحصر به فردی در مسیر بیوستتر کلروفیل می‌باشد. آسیزیک اسید یک فیتوهormون 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 بیوستتر کلروفیل همراه است.

پروتئین ATP synthase subunit gamma, chloroplastic (لکه شماره ۸۵۰۸) آنزیمی می‌باشد که گردایان الکتروشیمیایی را در عرض غشاء تیلاکوئید تنظیم کرده و بطور مستقیم بر میزان انتقال الکترون فتوستتری 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 سیستنار 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 پتانسیم در لاین B73 و MO17، تنش شوری اثر معنی‌داری روی صفات مذکور داشت. تنش شوری وزن خشک گیاهچه‌ها و مقدار پتانسیم را به طور معنی‌دار کاهش داد اما باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و میزان سدیم برگ شد.

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

Protein translocase subunit SECA1, chloroplastic (لکه شماره ۳۶۰۵) به عنوان پروتئینی که دارای نقش منمرکز در هیدرولیز ATP برای اتصال به پروتئین‌ها در سراسر غشاء فتوستتری بوده و برای همچنین این پروتئین درگیر ترکیبات فتوستتری 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 تخربی شده و تکامل نمی‌باشد (۲۳). لاوجیز و همکاران (۲۱) گزارش کردند که SECA در گیاه آرابیدوپسیس 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 تخربی کلروپلاست‌ها در برگ‌ها در اثر اعمال تنش شوری باشد (۲۱).

Isoform 2 of Protein translocase subunit SECA2, chloroplastic (لکه شماره 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 فتوستتر در کوتیدون‌ها (لیلهای) 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 تعديل 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 اشیاع از محتویات CA^۳ 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.

Peptide chain release factor PrfB3, chloroplastic (لکه شماره ۶۴۰۴) تنش وابسته به نور را تنظیم می‌کند که ترجمه پایدار petB^۳ را از انتهای^۳

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 دوبعدی پروتئین‌های برگ دو لاین ذرت تحت تنش ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۱۲ لکه پروتئینی تکارپذیر 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advance*, 27: 84-93.
- 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.
- Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14: 93-107.
- 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.
- 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.
- Browse, J. and C. Somerville. 1991. Glycerolipid synthesis-biochemistry and regulation. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 467-506.
- 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.
- Falara, V., T.A. Akhtar, T.T.H. Nguyen, E.A. Spyropoulou, P.M. Bleeker, I. Schauvinhold, Y. Matsuba, M.E. Bonini, A.L. Schilmiller, R.L. Last, R.C. Schuurink and E. Pichersky. 2011. The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiology*, 157(2): 770-789.
- FAO, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. 2017.
- Gaber, M.A. 2010. Antioxidant defense under salt stress. *Plant Signal Behaver*, 5: 369-374.
- Hou, Q., G. Ufer and D. Bartels. 2016. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress *Plant Cell and Environment*, 5: 1029-1048.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kramer, R., J.W. Vieira, H.J. Khouri, 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.
- 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.
- 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.
- Liu, X.D. and Y.G. Shen. 2004. NaCl-Induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins 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. Moore 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. Adamczky, 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, AREEÖ, 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