



Studying bZIP transcription factor 1 gene expression pattern and the activity of some antioxidant enzymes and proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) under salinity stress

Marjan Jannatdoust¹ & Reza Darvishzadeh¹

¹ Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Corresponding author. E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Maize is a diploid species belonging to the Poaceae family and is classified as a C4 plant in terms of its photosynthetic pathway. Salinity stress results in the increased production of ROS, which in turn triggers a secondary stress known as oxidative stress in plants. Elevated ROS levels specifically induce the peroxidation of unsaturated fatty acids, resulting in the production of secondary products such as ketones, MDA, and other derived compounds. Lipid peroxidation and MDA production, as critical indicators of oxidative damage, are widely utilized to evaluate the degree of sensitivity or tolerance of plant genotypes to salinity stress. To combat salinity-induced oxidative stress, plants activate a suite of enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms. Antioxidant enzymes play a fundamental role in ROS detoxification and the maintenance of oxidative homeostasis. Additionally, under salinity stress, the increased synthesis of proline as an active osmolyte facilitates the maintenance of osmotic balance and protects cells against dehydration. The bZIP family represents one of the most extensive groups of transcription factors in plants, playing a crucial role in responding to both biotic and abiotic stresses. This research was conducted to investigate the physiological, biochemical, and molecular responses of maize to salinity stress, focusing on antioxidant enzyme activity, proline accumulation, lipid peroxidation, and the expression pattern of the *bZIP transcription factor 1* gene in two tolerant and sensitive lines under a salinity stress.

Materials and methods: Two maize lines, a tolerant line (R10; P14L2) and a sensitive line (S46; MO17), were selected based on the results of previous studies. The experiment was implemented as a factorial based on a CRD with three replications. The first factor consisted of the two maize genotypes, and the second factor included two salinity levels (control and 8 dS/m). Plants were grown in a controlled growth chamber at Urmia University, under temperature conditions of 25°C, a relative humidity of 60–65%, and a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness. Irrigation was performed using Hoagland nutrient solution starting from the two-leaf stage. Salinity stress was applied from the eight-leaf stage for a duration of 20 days using a nutrient solution containing NaCl at a concentration of 8dS/m. Following the stress period, young leaves were sampled for biochemical and molecular analyses, and samples were immediately stored at -80°C. To investigate the expression pattern of the *bZIP transcription factor 1* gene, specific primers for the target gene and the reference gene (actin) were designed based on sequences available in the NCBI.

Results: The results demonstrated that salinity stress significantly increased lipid peroxidation, as indicated by malondialdehyde accumulation, as well as proline content in both lines, with a greater magnitude of increase observed in the tolerant line. The activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and catalase were enhanced under salinity stress, whereas guaiacol peroxidase activity showed a decline. Catalase and ascorbate peroxidase exhibited genotype-dependent responses, with higher activity levels recorded in the sensitive line compared to the tolerant line. Correlation analysis revealed significant positive relation among proline content, malondialdehyde levels, and the activities of key antioxidant enzymes. At the molecular level, the expression of the *bZIP transcription factor 1* gene was significantly affected by time, genotype, and their interaction; the sensitive line displayed an early and transient upregulation of gene expression, while the tolerant line exhibited a delayed but sustained induction of this gene.

Conclusion: Overall, these findings indicate that salinity tolerance in maize is achieved through a coordinated interaction between antioxidant defense regulation, osmolyte accumulation, and temporal control of stress-responsive regulatory gene expression, and that *bZIP* may serve as a key molecular marker for improving salinity tolerance in maize.

Keywords: Abiotic stress, Antioxidant enzymes, Gene expression, Maize, Proline and Real-time PCR.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 24 Sep 2025, Revised: 22 Oct 2025, Accepted: 05 Dec 2025, Published online: 26 Dec 2025

Cite this article: Jannatdoust, M. & Darvishzadeh, R. (2025). Studying bZIP transcription factor 1 gene expression pattern and the activity of some antioxidant enzymes and proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 4(4), 444-472. DOI: [10.22126/cbb.2026.13714.1136](https://doi.org/10.22126/cbb.2026.13714.1136)





مطالعه فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تجمع پرولین و الگوی بیان ژن *bZIP transcription factor1* در ذرت (*Zea mays L.*) تحت تنش شوری

مرجان جنت‌دوست^۱ و رضا درویش‌زاده^۱

^۱ گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

✉ نویسنده مسئول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: ذرت (*Zea mays L.*)، گیاهی دیپلوئید از خانواده گندمیان بوده و از لحاظ فتوسنتز جزو گیاهان C4 می‌باشد. تنش شوری سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که این خود باعث ایجاد تنش ثانویه به نام تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. افزایش سطح ROS به‌ویژه موجب پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع شده و در نتیجه، فرآورده‌های ثانویه‌ای مانند کتون‌ها، مالون‌دی‌آلدئید و سایر ترکیبات مشتق از آن‌ها تولید می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم آسیب اکسیداتیو، به‌طور گسترده برای ارزیابی میزان حساسیت یا تحمل ژنوتیپ‌های گیاهی به تنش شوری مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از شوری، مجموعه‌ای از سازوکارهای دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی را فعال می‌کنند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش اساسی در سم‌زدایی ROS و حفظ هموستاز اکسیداتیو ایفا می‌کنند. علاوه بر این، در تنش شوری، افزایش سنتز پرولین به‌عنوان یک اسمولیت فعال موجب حفظ تعادل اسمزی و محافظت سلول‌ها در برابر کم‌آبی می‌شود. خانواده‌ی *bZIP* یکی از گسترده‌ترین گروه‌های عوامل رونویسی در گیاهان محسوب می‌شود که نقشی محوری در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کند. این پژوهش با هدف شناخت پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی ذرت به تنش شوری، با تمرکز بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تجمع پرولین، پراکسیداسیون لیپیدی و الگوی بیان ژن *bZIP transcription factor1* در دو لاین متحمل و حساس تحت تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر انجام شد.

مواد و روش‌ها: دو لاین ذرت شامل لاین متحمل (R10; P14L2) و حساس (S46; MO17) به شوری بر اساس نتایج مطالعات پیشین انتخاب شدند (Ebrahimipour et al., 2020). آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل دو ژنوتیپ ذرت و فاکتور دوم شامل دو سطح شوری (شاهد و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) بود. گیاهان در اتاق رشد کنترل‌شده دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تحت شرایط دمایی ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش یافتند. آبیاری گیاهان از مرحله دو برگی با محلول غذایی هوگلدن انجام شد. اعمال تنش شوری از مرحله هشت‌برگی به مدت ۲۰ روز با استفاده از محلول غذایی حاوی NaCl، ۸ دسی‌زیمنس بر متر، انجام گرفت. پس از پایان دوره تنش، نمونه‌برداری از برگ‌های جوان به‌منظور انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام و نمونه‌ها بلافاصله در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای بررسی الگوی بیان ژن *bZIP transcription factor1*، آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و ژن مرجع (اکتین) بر اساس توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI طراحی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدئید) و تجمع پرولین در هر دو لاین شد، به‌طوری که شدت این افزایش در لاین متحمل بیشتر بود. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز تحت تنش شوری افزایش یافت، در حالی که فعالیت گایاکول پراکسیداز کاهش نشان داد. کاتالاز و آسکوربات نیز پاسخ وابسته به ژنوتیپ از خود بروز دادند و فعالیت آن‌ها در لاین حساس نسبت به لاین متحمل افزایش بیشتری داشت. تحلیل همبستگی صفات، ارتباط مثبت و معنی‌دار بین پرولین، مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کلیدی را تأیید کرد. در سطح مولکولی، بیان ژن *bZIP transcription factor1* به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر زمان، لاین و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت؛ به‌طوری که لاین حساس افزایش بیان زودهنگام و گذرا و لاین متحمل افزایش بیان تأخیری اما پایدار این ژن را نشان داد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تحمل شوری در ذرت حاصل تعامل هماهنگ میان تنظیم سیستم آنتی‌اکسیدانت، تجمع اسمولیت‌ها و کنترل زمانی بیان ژن‌های تنظیم‌کننده پاسخ به تنش است و ژن *bZIP transcription factor1* می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مولکولی کلیدی در بهبود تحمل شوری مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، بیان ژن، پرولین، تنش غیرزنده، ذرت و Real-time PCR.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۲ **اصلاح:** ۱۴۰۴/۰۷/۳۰ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۰۹/۱۴ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۱۰/۰۵

استناد: جنت‌دوست، م. و درویش‌زاده، ر. (۱۴۰۴). مطالعه فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تجمع پرولین و الگوی بیان ژن *bZIP transcription factor1* در

ذرت (*Zea mays L.*) تحت تنش شوری. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۴(۴)، ۴۴۴-۴۷۲. DOI: [10.22126/cbb.2026.13714.1136](https://doi.org/10.22126/cbb.2026.13714.1136)



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.)، گیاهی دیپلوئید با عدد کروموزومی ($2n=2x=20$) از تیره Poaceae و خانواده گندمیان بوده و از لحاظ فتوسنتز جزو گیاهان C_4 می‌باشد. سومین غله مهم بعد از برنج و گندم است و در طیف وسیعی از خاک و شرایط آب و هوایی کشت می‌شود (Molazem & Bashirzadeh, 2015). از نظر تأمین غذای انسان، دام و طیور، توسعه و کشت ذرت و بهبود عملکرد و کیفیت آن دارای اهمیت زیادی می‌باشد (Aliyari Rad et al., 2019). گزارش‌های سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) نشان می‌دهد که تولید جهانی ذرت دانه‌ای طی ۱۰ سال منتهی به سال ۲۰۲۳ حدود ۲۰ درصد افزایش یافته و از ۱/۰۲ میلیارد تن در سال ۲۰۱۴ به بیش از ۱/۲۲ میلیارد تن در سال ۲۰۲۴ رسیده است (FAO, 2024). با این حال حساسیت نسبی آن به تنش‌های غیرزنده، به‌ویژه تنش شوری، تولید پایدار آن را در بسیاری از مناطق جهان با محدودیت مواجه کرده است. در حال حاضر، بیش از شش درصد از زمین‌های جهان تحت تأثیر شوری قرار دارند و این روند به دلیل تغییرات اقلیمی و مدیریت نادرست منابع آب، به‌طور فزاینده‌ای در حال گسترش است (Molazem & Bashirzadeh, 2015). در یک مطالعه (Zargar Yaghoubi et al., 2023)، گزارش شد که پتانسیل آب موجود در خاک با افزایش تنش

شوری در منطقه ریزوسفرو، کاهش یافته و سبب کم شدن جذب آب توسط گیاه می‌شود، به طوری که با کاهش کیفیت آب آبیاری (افزایش شوری از ۰/۵ به ۷/۵ ds/m) عملکرد و نیز مقدار تبخیر- تعرق به ترتیب ۶۰ و ۳۱ درصد کاهش نشان دادند. تنش شوری از طریق ایجاد تنش اسمزی و سمیت یونی، تعادل آب و یون‌ها را در سلول‌های گیاهی برهم می‌زند و در نهایت منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Gharsallah et al., 2016). از طرف دیگر تنش شوری منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که این خود باعث ایجاد تنش ثانویه به نام تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (Jahantigh et al., 2016). تجمع ROS با آسیب به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، یکپارچگی ساختاری و عملکردی سلول را مختل کند (Jahantigh et al., 2016). افزایش سطح ROS به‌ویژه موجب پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع شده و در نتیجه، فرآورده‌های ثانویه‌ای مانند کتون‌ها، مالون‌دی‌آلدئید و سایر ترکیبات مشتق از آن‌ها تولید می‌شود (Kaur & Asthir, 2019). پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم آسیب اکسیداتیو، به‌طور گسترده برای ارزیابی میزان حساسیت یا تحمل ژنوتیپ‌های گیاهی به تنش شوری

- مورد استفاده قرار می‌گیرد (Filippou *et al.*, 2014).
- گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از شوری، مجموعه‌ای از سازوکارهای دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی را فعال می‌کنند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر سوپراکسیددسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) نقش اساسی در سم‌زدایی ROS و حفظ هموستاز اکسیداتیو ایفا می‌کنند (Yilmaz *et al.*, 2020). علاوه بر این، در تنش شوری، افزایش سنتز پرولین به‌عنوان یک اسمولیت فعال موجب حفظ تعادل اسمزی و محافظت سلول‌ها در برابر کم‌آبی می‌شود (Yaish, 2015; Abdelaziz *et al.*, 2018). پرولین با حفظ پایداری آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و غشاهای و نیز از طریق حذف رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در افزایش تحمل به تنش‌های شوری و خشکی دارد (Abdelaziz *et al.*, 2018). میزان تجمع پرولین بیانگر تفاوت بین گونه‌های گیاهی در ظرفیت تحمل تنش است و ارتباط مستقیمی با افزایش تحمل به شوری دارد (Celik *et al.*, 2019; Perveen & Mariyam, 2018).
- مطالعات متعددی نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. به‌عنوان مثال، (Cai *et al.*, 2019) تفاوت قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح بیان ژن‌های مرتبط در
- لایه‌های متحمل و حساس ذرت گزارش کردند. همچنین، نتایج مطالعات انجام‌شده در برنج نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، متابولیسم پرولین و تحمل به شوری است (Vighi *et al.*, 2017; Celik *et al.*, 2019).
- در کنار پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، در سطح مولکولی، پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیچیده انتقال سیگنال و تنظیم بیان ژن‌ها انجام می‌شود (He *et al.*, 2024). فاکتورهای رونویسی (TFs) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی این فرآیند، نقش مهمی در فعال‌سازی یا مهار ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش ایفا می‌کنند (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2022). بسیاری از عوامل رونویسی، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی (Main regulators) در انتخاب ژن‌های هدف عمل کرده و فرآیندهای حیاتی همچون تمایز سلولی، الگوهای نموی و کنترل مسیرهای اختصاصی (سیگنال‌دهی و متابولیسم) را مدیریت می‌کنند (Strader *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023a).
- در میان خانواده‌های مختلف TF، فاکتورهای رونویسی زیپ پایه لوسین (bZIP) یکی از بزرگ‌ترین و حفاظت‌شده‌ترین خانواده‌های ژنی در گیاهان هستند که در تنظیم رشد، نمو، سیگنال‌دهی هورمونی و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نقش دارند

مواد گیاهی

در این پژوهش، دو لاین ذرت (*Zea mays* L.) لاین متحمل (R10; P14L2) و حساس (S46; MO17) به شوری ذرت بر اساس نتایج مطالعات پیشین (Ebrahimipour *et al.*, 2020) انتخاب شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل دو ژنوتیپ ذرت و فاکتور دوم شامل دو سطح شوری (شاهد و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) بود. گیاهان در اتاق رشد کنترل شده دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تحت شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش یافتند (Jannatdoust *et al.*, 2021). آبیاری گیاهان از مرحله دوبرگی با محلول غذایی هوگلند انجام شد. اعمال تنش شوری از مرحله هشت‌برگی به مدت ۲۰ روز با استفاده از محلول غذایی حاوی NaCl، ۸ دسی‌زیمنس بر متر، انجام گرفت (Ebrahimipour *et al.*, 2020). پس از پایان دوره تنش، نمونه برداری از برگ‌های جوان به منظور انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام و نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های برگ تازه، با استفاده از محلول استخراج RNX-PLUS (سیناکلون، ایران) و

(Yilmaz *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2019). عوامل رونویسی bZIP در اکثر تنش‌ها فعال بوده و در طول تنش‌های محیطی باعث بیان و تنظیم تعدادی زیادی ژن می‌شوند (Heidari & Najafi Zarrin, 2016). گرچه نقش خانواده bZIP در گیاهان مدل نظیر آرابیدوپسیس و برنج به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است، اطلاعات موجود درباره الگوهای بیان و عملکرد این خانواده ژنی در ذرت، به ویژه در ارتباط با پاسخ‌های فیزیولوژیک به تنش شوری، همچنان محدود است (Dröge-Laser *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023b). این در حالی است که ذرت به عنوان یک گیاه نسبتاً حساس به شوری، با وجود دارا بودن تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای برای تحمل شوری، نیازمند بررسی‌های دقیق‌تری در این زمینه است (Mansour *et al.*, 2005; Farooq *et al.*, 2015).

بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر، بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، میزان پراکسیداسیون لیپیدها (براساس مالون‌دی‌آلدئید)، تجمع پرولین و مطالعه الگوی بیان ژن *bZIP transcription factor* 1 در دو لاین متحمل و حساس ذرت تحت تنش شوری بود. نتایج این مطالعه می‌تواند به درک بهتر سازوکارهای فیزیولوژیکی-مولکولی تحمل به شوری در ذرت و شناسایی نشانگرهای بالقوه مرتبط با مقاومت به این تنش کمک نماید.

مواد و روش‌ها

RevertAid™ M-MuLV Reverse
Transcriptase به کار گرفته شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real time PCR)

برای بررسی الگوی بیان ژن *bZIP transcription factor 1*، آغازگرهای اختصاصی ژن هدف و ژن مرجع (اکتین) بر اساس توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI طراحی شدند. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3 انجام و ویژگی‌های آن‌ها از نظر تشکیل ساختارهای ثانویه و دایمر با نرم‌افزار Oligo Analyzer بررسی شد (جدول ۱).

مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی گردید. نسبت‌های جذب $\frac{A260}{A230}$ و $\frac{A260}{A280}$ به‌منظور بررسی آلودگی‌های پروتئینی و ترکیبات فنلی مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای این منظور، ۵ میکرولیتر RNA به‌عنوان الگو، الیگو dT ((oligo(dT₁₈)) به‌عنوان آغازگر عمومی، و آنزیم

جدول ۱ – آغازگرهای اولیگونوکلوئوتیدی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used for Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

نام ژن Gene name	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگر (5' → 3')	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	اندازه محصول (bp) Product size
<i>bZIP transcription factor1</i>	Zm00001d043992	F: GGTAACCCATTGAGTGCG R: GCCACTTGACACAGCAGAT	56	103
Actin	NM-001155179.2	F: GATTCCTGGGATTGCCGAT R: TCTGCTGCTGAAAAGTGCTGAG	58	152

آزمایش بیان ژن به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار زیستی انجام شد. محاسبه بیان نسبی ژن *bZIP transcription factor 1* با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ (Livak & Schmittgen, 2001) انجام گرفت. تجزیه واریانس بر روی داده‌های بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد.

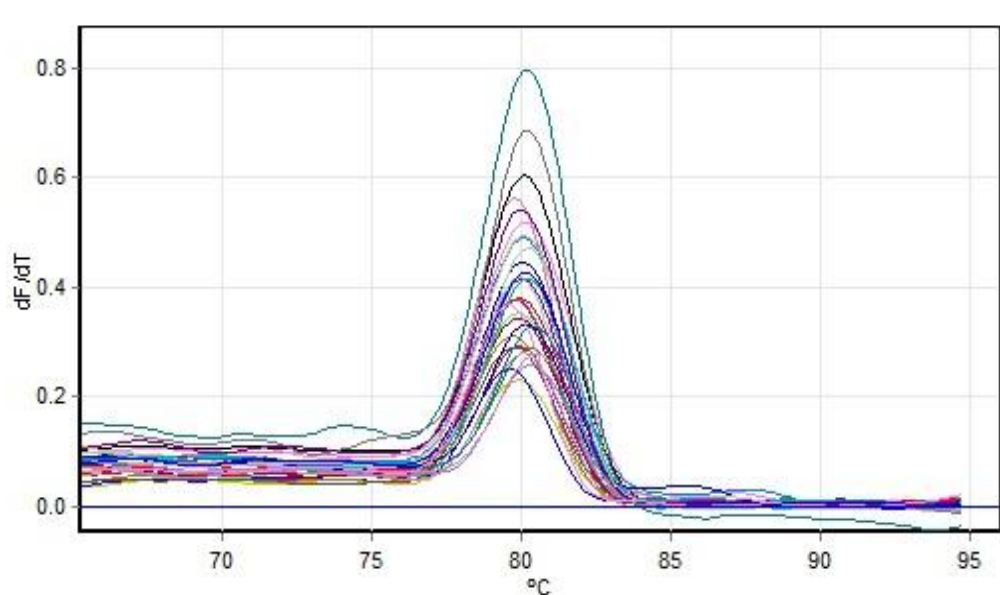
اندازه‌گیری محتوای پرولین

به منظور تهیه عصاره گیاهی، ابتدا نیم گرم از بافت تر برگ گیاهی توزین گردید و محلول روئی جهت سنجش محتوی پرولین نمونه‌ها استخراج گردید (Paquin & Lechasseur, 1979; Nazarli & Faraji, 2011). در ادامه از روش (Bates et al., 1973) با کمی تغییر برای بررسی محتوی پرولین استفاده گردید. میزان جذب پرولین توسط دستگاه نانودراپ (Microplate reader, EPOCH 2) در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پرولین بر اساس منحنی استاندارد محاسبه و بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن تر گزارش شد (شکل ۲).

Real time PCR جهت بررسی الگوی بیان نسبی ژن *bZIP transcription factor 1* بر پایه رنگ فلورسنس SYBER green (Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 2X; Thermo) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل (۶/۲۵ میکرولیتر سایبرگرین^۱، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرها با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز) انجام شد. واکنش در دستگاه QIAGEN (Rotor-Gene Q-Pure Detection-Qiagen Model 6000; USA)، با برنامه حرارتی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگر در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. پس از پایان واکنش، منحنی ذوب (Melting curve) با افزایش تدریجی دما به منظور تأیید اختصاصی بودن محصولات تکثیر رسم شد. صحت محصولات PCR همچنین با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید. ژن مرجع مورد استفاده اکتین بود. چرخه آستانه‌ها (CTs) با استفاده از نرم‌افزار Q Gene-Rotor بدست آمد (شکل ۱).

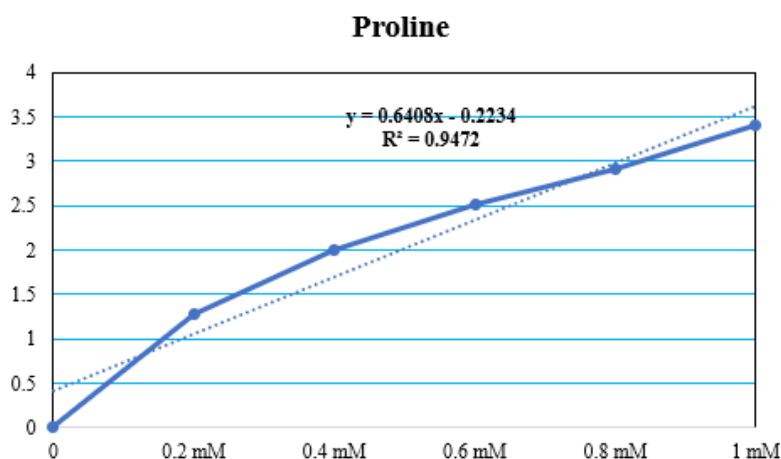
تجزیه آماری داده‌های بیان ژن

¹ Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix



شکل ۱- منحنی ذوب ژن *bZIP transcription factor 1* مورد مطالعه در واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز در زمان واقعی (Real Time PCR) در ذرت تحت تنش شوری 8 dS m^{-1} . محور x، دما (درجه سانتی‌گراد) و محور y، نسبت dF به dT است (dF/dT). به عبارتی نسبت مشتق تابع فلورسنس در مقابل دمای ذوب است که نشان‌دهنده میزان تغییرات فلورسنس در واکنش می‌باشد.

Figure 1. Temperature melting curves of studied of *bZIP transcription factor 1* gene in real-time PCR in *Zea mays* L. under 8 ds/m salt stress. In all curves, X-axis represents the temperature (°C) and Y-axis represents the dF/dT ratio. dF/dT ratio is the derivative of the function 'fluorescence vs. temperature melting' that represents the rate of the fluorescence variation in the reaction.



شکل ۲- منحنی استاندارد برای محاسبه میزان پرولین در لاین‌های ذرت تحت تنش شوری

Figure 2. Standard curve to calculate the amount of proline in Maize lines under salt stress

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید^۱

محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش Popham & Novacky (1990) اندازه‌گیری شد. میزان جذب واکنش آنزیمی در دو طول موج در ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ (Microplate reader, EPOCH 2) قرائت و جهت محاسبه‌ی غلظت مالون‌دی‌آلدئید از فرمول زیر استفاده گردید (ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

$$\text{MDA (mol/gr FW)} = [(A532 - A600)/155] \times 100$$

استخراج عصاره‌ی گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

برای تهیه عصاره گیاهی از روش Sudhakar *et al.*, (2001) با کمی تغییر استفاده شد. بر این اساس به ۵/۰ گرم از برگ‌های ذرت منجمد شده در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد، ۳/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (حاوی Tris-HCl ۵/۰ درصد) و پلی‌وینیل-پیرولیدون^۲ (۵/۰ درصد) با (pH= ۸) اضافه و به خوبی در هاون سرد آسیاب شد تا یک عصاره‌ی همگن حاصل شد. سپس عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی مجدداً با

شرایط مذکور سانتریفیوژ شدند. و محلول نهایی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز^۳ (CAT, E.C. 1.11.1.6)

اندازه‌گیری میزان این آنزیم با روش Aebi (۱۹۸۴) انجام گرفت و میزان فعالیت آنزیمی آن در مدت یک دقیقه و در فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر (برنامه کینتیک^۴) با دستگاه نانودراپ (Microplate reader, EPOCH 2) قرائت شد. آنزیم کاتالاز دارای ضریب خاموشی معادل $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بوده و محتوی فعالیت آن براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه واحد به ازای گرم وزن تر محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان آسکوربات‌پراکسیداز^۵ (APX; EC 1.11.1.11)

سنجش میزان آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز با روش Nakano & Asada (1987) انجام گرفت و میزان فعالیت آنزیمی در مدت یک دقیقه و در فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج ۲۹۰ نانومتر (برنامه کینتیک^۶) با دستگاه نانودراپ (Microplate reader, EPOCH 2) قرائت شد. آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز دارای ضریب خاموشی معادل $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بوده و محتوی

³ Catalase (CAT)

⁴ Kinetic

⁵ Ascorbate peroxidase (APX)

⁶ Kinetic

¹ Malondialdehyde (MDA)

² Polyvinylpyrrolidone (PVP)

فعالیت آن براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه واحد به ازای گرم وزن تر محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان گایاکول پراکسیداز^۱ (GPX, EC 1.11.1.7)

در این مطالعه از گایاکول به عنوان سوبسترا جهت فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز انجام شد. فعالیت گایاکول پراکسیداز براساس روش *MacAdam et al.*, (1992)، با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. میزان جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۴۷۰ نانومتر از زمان شروع واکنش و به مدت یک دقیقه پس از آن به صورت افزایشی قرائت شد. آنزیم گایاکول پراکسیداز دارای ضریب خاموشی معادل $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان سوپراکسیددسموتاز^۲ (EC 1.15.1.1)

فعالیت SOD با اندازه‌گیری توانایی آن در مهار کاهش فتوشیمیایی نیترو بلو تیترازولیوم^۳ با استفاده از روش *Dhindsa et al.* (1981) مورد سنجش قرار گرفت. جذب نوری آنزیم SOD توسط مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی آن بر حسب میکرومول بر گرم بافت برگ تازه بیان شد.

تجزیه‌های آماری

پیش از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی داده‌های مربوط به فعالیت هر یک از آنزیم‌ها با استفاده از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ بررسی شد. پس از تأیید فرض نرمال بودن، تجزیه واریانس داده‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه مدل خطی عمومی (GLM) در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت. در مواردی که یک عامل آزمایشی تنها شامل دو سطح بود و نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها نشان داد، به دلیل کفایت آزمون آماری، از انجام آزمون‌های مقایسه میانگین صرف‌نظر شد و برتری آماری یکی از سطوح نسبت به سطح دیگر گزارش گردید.

نتایج و بحث

اثر تنش شوری بر میزان مالون‌دی‌آلدئید

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر تنش شوری بر محتوای MDA در برگ‌های ذرت در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود، در حالی که اثر ژنوتیپ (لاین) و اثر متقابل ژنوتیپ × شوری بر این صفت معنی‌دار نشد. این نتیجه نشان می‌دهد که تنش شوری به‌عنوان عامل غالب، موجب القای پاسخ اکسیداتیو در هر دو لاین ذرت شده است، و پاسخ کلی گیاه به شوری، مستقل از تفاوت‌های ژنتیکی لاین‌ها، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی را در پی داشته است.

¹ Guaiacol peroxidase

² Superoxide dismutase (SOD)

³ Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

مطالعات (Hussain *et al.*, 2013)، نشان داده شد که اعمال تنش شوری با NaCl باعث افزایش معنی‌دار محتوای MDA در برگ‌های ذرت شده و این افزایش در ارقام حساس به شوری شدیدتر بوده است. همچنین محققین (Ashraf *et al.*, 2010) در گندم و (Perveen & Mariyam, 2018) در ذرت گزارش کردند که تنش شوری با افزایش محتوای MDA و هم‌زمان کاهش صفات فتوسنتزی و رشد همراه است؛ که این موضوع نقش کلیدی پراکسیداسیون لیپیدها را در محدودیت رشد گیاهان تحت شوری برجسته می‌کند. محققین (Odjegba & Chukwunwike, 2012)، در *A. hybridus* افزایش مشابهی در MDA تحت غلظت‌های مختلف شوری گزارش کردند.

مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳a, b) نشان داد که اعمال تنش شوری 8 dS m^{-1} موجب افزایش معنی‌دار محتوای MDA نسبت به شرایط نرمال گردید. بررسی روند تغییرات میانگین‌ها نشان داد که لاین حساس (S46) مقدار MDA بالاتری نسبت به لاین متحمل (R10) تحت تنش شوری از خود نشان داد (شکل ۳a, ۳b). این اختلاف گرچه از نظر آماری در قالب اثر اصلی ژنوتیپ معنی‌دار نگردید، اما از دیدگاه فیزیولوژیکی حائز اهمیت است و بیانگر توان بالاتر لاین متحمل در مهار پراکسیداسیون لیپیدی و حفظ پایداری غشایی می‌باشد.

افزایش نشت الکترولیت (EL) و MDA به‌عنوان نشانه‌ای از آسیب غشاء ناشی از تنش شوری در نظر گرفته می‌شوند (Sarker & Oba, 2020). نتایج این تحقیق با گزارش‌های پیشین همخوانی دارد. در

جدول ۲- آنالیز واریانس برای مقدار پرولین و مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز تحت شرایط نرمال و تنش شوری 8 dS m^{-1} در برگ‌های لاین‌های ذرت (*Zea mays* L.).

Table 2. Analysis of variance for the amount of Proline and Malondialdehyde and the activity of antioxidant enzymes including Catalase, Guaiacol peroxidase, Ascorbate peroxidase and Superoxide desmutase under normal and salt stress (8 decisiemens/m) conditions in the leaves of maize (*Zea mays* L.) lines.

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
Mean squares						df	Source of variations
گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسیددسموتاز	مالون‌دی‌آلدئید	کاتالاز	پرولین		
Guaiacol peroxidase	Ascorbate peroxidase	Superoxide desmutase	Malondialdehyde	Catalase	Proline		
$2.5 \times 10^{-6 \text{ns}}$	$4.95 \times 10^{-7 \text{ns}}$	$3.8 \times 10^{-5 \text{ns}}$	0.003^{ns}	$3.4 \times 10^{-8 **}$	0.339^{ns}	1	لاین
							Line (L)
$8.6 \times 10^{-5 *}$	$5.99 \times 10^{-5 **}$	0.006^*	0.009^{**}	$5.07 \times 10^{-8 **}$	40.759^{**}	1	شوری
							Salinity (S)
$4.8 \times 10^{-8 \text{ns}}$	$4.95 \times 10^{-7 \text{ns}}$	0.001^{ns}	$7.5 \times 10^{-5 \text{ns}}$	$9.6 \times 10^{-9 \text{ns}}$	0.268^{ns}	1	L × S
2.2×10^{-5}	1.98×10^{-6}	0.007	0.001	3.05×10^{-9}	1.2	8	خطای آزمایشی
							Experimental error
0.49	0.13%	0.10	0.26	0.24	7.8		ضریب تغییرات
							Coefficient of variation (CV%)

* و ** معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

* and **: Significant at the 5 and 1% probability levels, respectively

اثر تنش شوری بر میزان پرولین

همانطور که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داده شده است تفاوت بین سطوح مختلف شوری از لحاظ میزان تجمع پرولین معنی‌دار ($P \leq 0.01$) است. مقایسات میانگین نشان داد فعالیت پرولین تحت تنش شوری در مقایسه با شرایط نرمال افزایش یافته است (شکل ۳c, d). بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر لاین و اثر متقابل لاین $\times$ شوری بر میزان پرولین معنی‌دار نبود. پرولین که در پاسخ به تنش شوری تجمع می‌یابد، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان سلولی با وزن مولکولی پایین عمل کرده و از طریق جاروب‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، حفظ یکپارچگی غشا (Reddy et al., 2015)، مشارکت در تنظیم اسمزی سلولی و پایداری آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، از گیاهان در برابر اثرات نامطلوب ناشی از شوری محافظت می‌کند (Sarker & Oba, 2020). بنابراین، افزایش معنی‌دار پرولین مشاهده‌شده در این پژوهش را می‌توان به‌عنوان بخشی از راهبرد دفاعی گیاه برای کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو ناشی از شوری تفسیر کرد. یافته‌های این تحقیق با نتایج گزارش‌شده در مطالعات پیشین همخوانی دارد. منصور و همکاران (Mansour et al., 2005) نشان دادند که تنش NaCl موجب افزایش تجمع پرولین در اندام هوایی دو رقم ذرت می‌شود. صبا‌حان و همکاران (Sobahan et al., 2012) گزارش کردند که کاربرد

پرولین برون‌زا تحمل به شوری را در ارقام حساس برنج به‌طور مؤثرتری نسبت به ارقام متحمل افزایش می‌دهد. لوونت تونا و همکاران (Levent Tuna et al., 2013) افزایش قابل توجه محتوای پرولین برگ ذرت را در پاسخ به تنش شوری گزارش نمودند. عبدالعزیز و همکاران (Abdelaziz et al., 2018) نیز نشان دادند که میزان تجمع پرولین در ارقام متحمل به شوری برنج بیشتر از ارقام حساس است و پرولین را به‌عنوان یک اسمولیت کلیدی با نقش محافظتی معرفی کردند. نتایج تحقیقات کبریا و همکاران (Kibria et al., 2017) و عمرانی و محمدنژاد (Omran & Moharramnejad, 2018) نیز مؤید آن است که با افزایش سطح شوری، میزان پرولین در گیاهان به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

اثر تنش شوری بر میزان کاتالاز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر اصلی لاین و سطح شوری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ ذرت در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود، در حالی که اثر متقابل لاین $\times$ شوری اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. این نتایج بیانگر آن است که پاسخ کاتالاز به تنش شوری عمدتاً تحت کنترل اثرات مستقل ژنتیکی و محیطی قرار دارد. مطابق با مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳e, f). اعمال تنش شوری منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز نسبت به شرایط نرمال شد که نشان‌دهنده فعال شدن سیستم

دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه در پاسخ به القای تنش اکسیداتیو است. همچنین لاین حساس (S46) فعالیت کاتالاز بالاتری نسبت به لاین متحمل (R10) داشت که می‌تواند ناشی از تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن و نیاز بالاتر به حذف پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ حساس باشد (شکل f, ۳e).

کاتالاز در مهار H_2O_2 در طی تنش شوری و سایر شرایط تنش غیرزنده نقش دارد (Gharsallah *et al.*, 2016). افزایش فعالیت کاتالاز یک واکنش سازگار برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از H_2O_2 است که در طول متابولیسم سلولی تولید می‌شود (Xie *et al.*, 2019; Moradbeygi *et al.*, 2020). در این شرایط، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه فعال شده و آنزیم کاتالاز به‌عنوان یکی از اجزای کلیدی این سیستم، نقش مهمی در تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن ایفا می‌کند. شواهد پژوهشی نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های حساس به شوری معمولاً به دلیل کارایی کمتر در کنترل اولیه ROS و ضعف نسبی در برخی مسیرهای دفاعی، با تجمع بالاتر H_2O_2 مواجه می‌شوند و در پاسخ، فعالیت کاتالاز را به‌صورت شدیدتر و جبرانی افزایش می‌دهند (de Azevedo Neto *et al.*, 2005). این افزایش فعالیت کاتالاز در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر منعکس‌کننده شدت تنش اکسیداتیو و نیاز فوری گیاه به حذف H_2O_2 است، نه الزاماً توان دفاعی بالاتر آن‌ها. در مقابل، ژنوتیپ‌های متحمل به

شوری به دلیل برخورداری از سامانه‌های دفاعی هماهنگ‌تر شامل سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین ترکیبات غیرآنزیمی، قادر به مدیریت مؤثرتر ROS در مراحل اولیه تنش هستند و در نتیجه نیاز کمتری به القای شدید کاتالاز نشان می‌دهند (Sarker *et al.*, 2020). بنابراین، بالاتر بودن فعالیت کاتالاز در لاین حساس نسبت به لاین متحمل را می‌توان به‌عنوان یک پاسخ جبرانی به تولید بیشتر ROS و آسیب اکسیداتیو شدیدتر در ژنوتیپ حساس تحت تنش شوری تفسیر کرد.

اثر تنش شوری بر میزان گایاکول پراکسیداز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ‌های ذرت در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) معنی‌دار بود، در حالی‌که اثر لاین و برهم‌کنش لاین $\times$ شوری بر این صفت از نظر آماری معنی‌دار مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات فعالیت GPX عمدتاً تحت تأثیر عامل شوری بوده است. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳g, h) نشان داد که فعالیت گایاکول پراکسیداز در شرایط تنش شوری به‌طور معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال کاهش یافت و پاسخ این نژیم در لاین متحمل (R10) کمتر از لاین حساس (S46) الگوی این کاهش بیانگر تضعیف نقش این آنزیم در سیستم

دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت شرایط تنش شوری است.

گایاکول‌پراکسیدازها به‌عنوان ایزوآنزیم‌هایی با پراکنش وسیع در بافت‌های گیاهی، در حذف H_2O_2

در سیتوزول، واکوئل و دیواره سلولی نقش دارند، با این حال کارایی آن‌ها در مهار گونه‌های فعال اکسیژن در مقایسه با آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز محدودتر گزارش شده است (Gondim *et al.*, 2012; Carrasco-

Ríos & Pinto, 2014). کاهش فعالیت GPX تحت تنش شوری می‌تواند ناشی از مهار سنتز ایزوآنزیم‌های فعال، تغییر در پایداری پروتئین یا جابه‌جایی اولویت سیستم دفاعی گیاه به سمت آنزیم‌هایی با ظرفیت بالاتر برای تجزیه H_2O_2 مانند کاتالاز باشد. نتایج این پژوهش با گزارش Carrasco-Ríos & Pinto

(۲۰۱۴) در ذرت، که کاهش فعالیت GPX را در واریته سازگار با شوری تحت شرایط تنش نشان دادند، همخوانی دارد. همچنین (Bhusan *et al.*, 2016) کاهش معنی‌دار فعالیت GPX را در هر دو رقم حساس و نسبتاً متحمل برنج تحت تنش شوری گزارش کردند. محققین (Auobi & Rahmani,

2017) نیز در مطالعه‌ای بر ذرت تحت تنش شوری و خشکی، کاهش فعالیت GPX همراه با افت کلروفیل a و b را در همه تیمارها مشاهده نمودند. در مجموع، کاهش فعالیت گایاکول‌پراکسیداز در پاسخ به تنش شوری نشان می‌دهد که این آنزیم احتمالاً نقش

تنظیمی یا ثانویه در سیستم آنتی‌اکسیدانی ذرت ایفا کرده و در شرایط تنش شدید، سهم آن در مهار ROS کاهش یافته و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش غالب‌تری بر عهده می‌گیرند.

اثر تنش شوری بر میزان آسکوربات‌پراکسیداز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در برگ‌های ذرت در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود، در حالی‌که اثر لاین و همچنین برهم‌کنش لاین $\times$ شوری بر این صفت معنی‌دار نبود. مطابق با نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳i, j)، فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز تحت تنش شوری به‌طور معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت. همچنین فعالیت این آنزیم در لاین حساس بیشتر از لاین متحمل بود (شکل ۳i, j). گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که افزایش فعالیت APX یکی از پاسخ‌های رایج گیاهان زراعی به تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری بوده و نقش مهمی در حفظ تعادل اکسید و احیا و کاهش آسیب‌های سلولی ایفا می‌کند (Gharsallah *et al.*, 2016; Yilmaz *et al.*, 2020). نتایج این مطالعه با گزارش Ouertani *et al.* (2021) در جو همخوانی دارد؛ به‌طوری که افزایش معنی‌دار فعالیت APX در پاسخ به تنش شوری در هر دو ژنوتیپ و در هر دو بافت برگ و ریشه مشاهده شد. برخی مطالعات دیگر نیز افزایش فعالیت APX در

(Ouertani *et al.*, 2021) همخوانی دارد که افزایش معنی‌دار فعالیت SOD را در برگ و ریشه ژنوتیپ‌های جو تحت تنش شوری گزارش کردند. همچنین مطالعات متعددی بر روی ذرت و سایر غلات نشان داده‌اند که افزایش فعالیت SOD یکی از پاسخ‌های عمومی و محافظتی گیاهان در مواجهه با تنش شوری است (Molazem & Bashirzadeh, 2015; Levent Tuna *et al.*, 2013; Hussain *et al.*, 2013). این الگوی افزایشی نشان می‌دهد که القای SOD یک مکانیسم تطبیقی برای محدود کردن آسیب‌های اکسیداتیو در شرایط تنش محسوب می‌شود. با این حال، افزایش فعالیت SOD به‌تنهایی برای خنثی‌سازی کامل ROS کافی نیست. در این راستا، هماهنگی عملکرد SOD با سایر آنزیم‌های پایین‌دست نظیر کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز اهمیت ویژه‌ای دارد. نتایج مطالعات پیشین و نیز یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش همزمان فعالیت SOD، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز تحت تنش شوری، یک شبکه دفاعی کارآمد برای حذف ROS و کاهش آسیب اکسیداتیو فراهم می‌کند (Reddy *et al.*, 2015; Kibria *et al.*, 2017; AbdElgawad *et al.*, 2016).

عدم معنی‌داری اثر ژنوتیپ در برخی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده با وجود تفاوت در سطح تحمل فنوتیپی دو لاین، در مطالعات فیزیولوژیک پدیده‌ای شناخته شده است. این امر احتمالاً

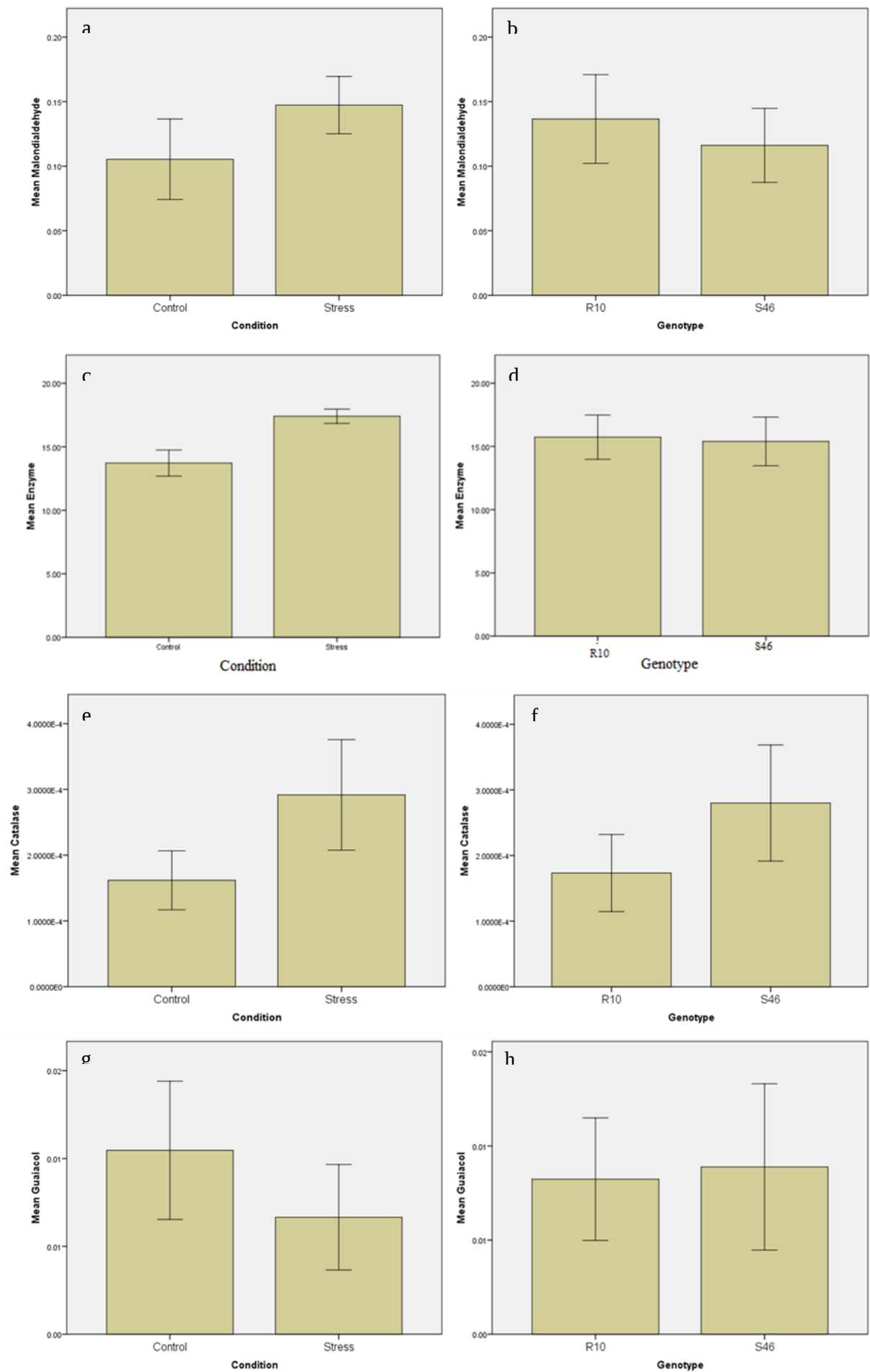
ارقام حساس و کاهش آن در ارقام متحمل را گزارش کرده‌اند (Rout & Shaw, 2001; Chawla *et al.*, 2013).

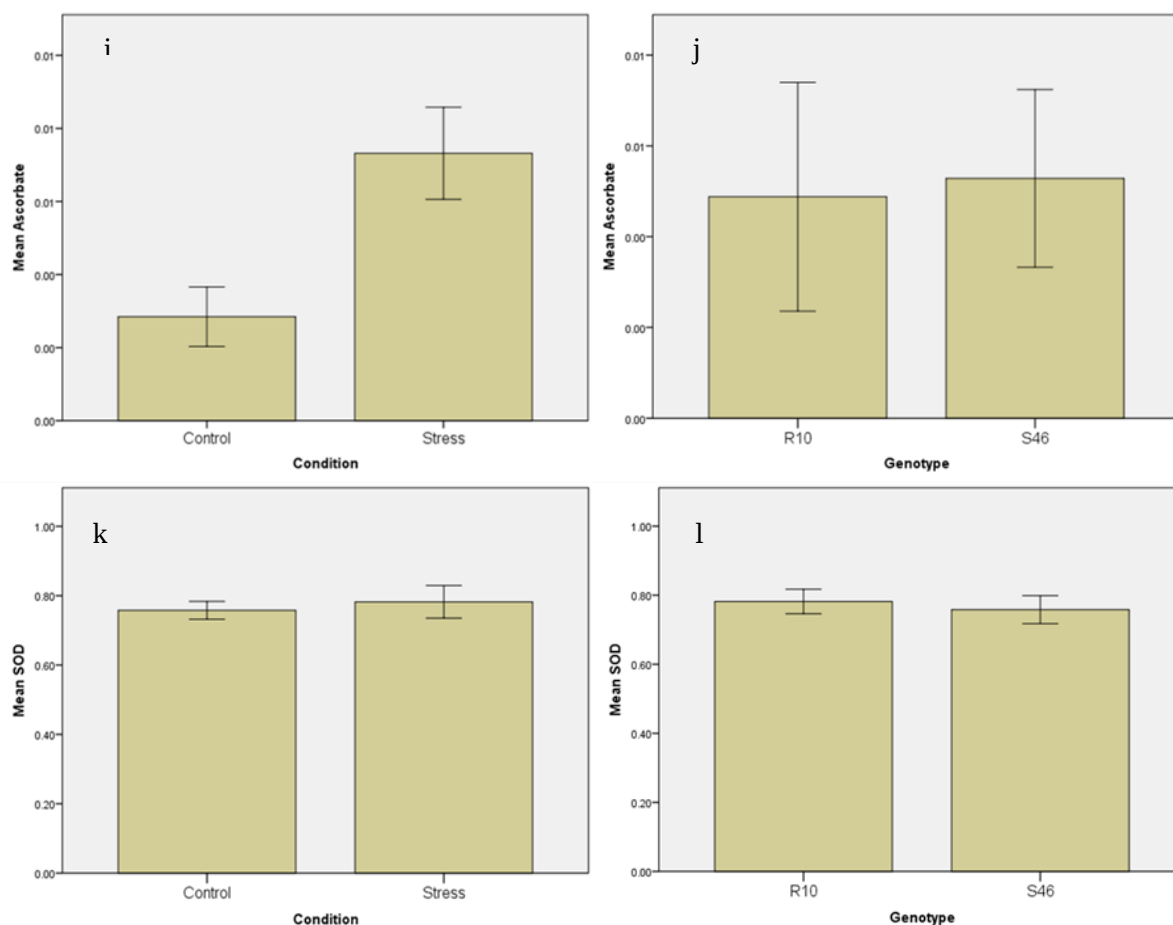
اثر تنش شوری بر میزان سوپراکسیددسموتاز (SOD)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تنش شوری اثر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در گیاه ذرت دارد. مقایسات میانگین نیز بیانگر افزایش معنی‌دار فعالیت سوپراکسید دسموتاز تحت تنش شوری در مقایسه با شرایط نرمال است (شکل ۱، ۳k). همچنین فعالیت این آنزیم در لاین متحمل بیشتر از لاین حساس می‌باشد. این افزایش بیانگر فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه در پاسخ به القای تنش اکسیداتیو ناشی از شوری می‌باشد. در شرایط تنش شوری، SOD به‌عنوان نخستین و کلیدی‌ترین آنزیم دفاعی، نقش محوری در تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 ایفا می‌کند و بدین ترتیب از تجمع ROS‌های بسیار واکنش‌پذیر و مخرب جلوگیری می‌نماید (Szóllósi, 2014; Berwal & Ram, 2018). افزایش فعالیت SOD مشاهده‌شده در این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه ذرت برای حفظ هموستازی اکسید-احیاء، مسیرهای دفاعی آنزیمی خود را به‌طور مؤثری فعال کرده است. نتایج این مطالعه با یافته‌های محققین

پایین بودن مقادیر ضریب تغییرات (CV%) در صفات مورد مطالعه، عمدتاً ناشی از اجرای آزمایش در شرایط کاملاً کنترل‌شده (اتاق رشد) است که عوامل محیطی ناخواسته و خطای آزمایشی را به حداقل رسانده است. همچنین، استفاده از لاین‌های خالص ژنتیکی به جای ارقام بومی یا جمعیت‌های ناهمگن، منجر به پاسخ یکنواخت گیاهان به تیمار شوری و کاهش چشمگیر واریانس درون‌گروهی (خطا) شده است. علاوه بر این، از منظر فیزیولوژیک، صفات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی در مقایسه با صفات مورفولوژیک (نظیر عملکرد)، ماهیت پایدارتری داشته و در گیاهان هم‌سن تحت شرایط یکسان، انحراف معیار بسیار اندکی میان تکرارها نشان می‌دهند. دقت بالای دستگاه اسپکتروفتومتر در سنجش پارامترهایی نظیر فعالیت آنزیم‌ها نیز مزید بر علت شده تا دقت آزمایش افزایش و مقدار CV کاهش یابد.

نشان‌دهنده آن است که سازوکار تحمل در لاین متحمل مورد مطالعه، لزوماً متکی بر تجمع پرولین یا تمامی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیست. احتمالاً تفاوت در تحمل نهایی ناشی از پارامترهای دیگری مثل کنترل خروج سدیم از ریشه یا کارایی مصرف آب است که در این تحقیق اندازه‌گیری نشده‌اند. با توجه به اختلاف معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در دو لاین حساس و متحمل، به نظر می‌رسد این آنزیم نقش محوری و متمایزکننده‌ای در مدیریت تنش اکسیداتیو در این ژنوتیپ‌ها ایفا می‌کند. علاوه بر این، از آنجا که انتخاب اولیه لاین‌ها بر اساس عملکرد در شرایط واقعی مزرعه بوده است، تفاوت‌های فنوتیپی می‌تواند ناشی از صفات اجتناب از تنش یا بهره‌وری فیزیولوژیک باشد که لزوماً در شاخص‌های بیوشیمیایی کوتاه‌مدت در شرایط کنترل شده بروز پیدا نمی‌کنند. برای تعمیم دقیق نتایج بهتر است این موارد در مطالعات آتی مدنظر قرار گیرند. در جمع‌بندی با توجه به نتایج مطالعه حاصل می‌توان کاتالاز را به عنوان یک شاخص برای گزینش در برنامه‌های بعدی معرفی نمود به شرطی که در مطالعات تکمیلی تایید گردد.





شکل ۳- اثر تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (a, b)، میزان تجمع پرولین (c, d)، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (e, f)، گایاکول‌پراکسیداز (g, h)، آسکوربات‌پراکسیداز (i, j) و سوپراکسیددسموتاز (k, l)، در برگ لاین‌های متحمل (R10) و حساس (S46) ذرت.

Figure 3. Effect of salt stress on MDA content (a, b), proline accumulation (c, d), Catalase (e, f), guaiacol peroxidase (GPX) (g, h), Ascorbate peroxidase (APX) (i, j) and superoxide dismutase (k, l) enzymes activity in the leaves of tolerant (R10) and sensitive (S46) maize lines.

تجزیه ضریب همبستگی صفات

به‌منظور بررسی روابط بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان پرولین و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، تجزیه همبستگی بین صفات مورد مطالعه انجام شد. با توجه به کمی بودن داده‌ها، از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید و نتایج در جدول

۳ ارائه شده است. این تحلیل امکان درک بهتر هماهنگی و تعامل اجزای مختلف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه ذرت تحت تنش شوری را فراهم می‌کند. در این راستا، فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز با میزان مالون‌دی‌آلدئید همبستگی مثبت و معنی‌داری ($I^2=0/606^*$) در سطح پنج درصد نشان داد. همچنین

پرولین و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز گزارش کردند. همچنین (Azooz et al. 2009) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ارقام مختلف ذرت حتی در شرایط بدون تنش نیز تفاوت معنی‌داری دارد که بیانگر زمینه ژنتیکی متفاوت سیستم دفاعی است. بر اساس گزارش محققین (Gupta & Huang, 2014)، تحمل شوری به‌طور مثبت با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD، CAT، APX، GPX و GR نیز با تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی مرتبط است که این موضوع یافته‌های پژوهش حاضر را به‌خوبی تأیید می‌کند. در مجموع، نتایج همبستگی‌ها نشان می‌دهد که تحمل تنش شوری در ذرت حاصل تعامل پیچیده و هماهنگ بین تجمع پرولین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کنترل پراکسیداسیون لیپیدی است و این شبکه دفاعی نقش تعیین‌کننده‌ای در کاهش خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند.

بین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و مالون‌دی‌آلدئید همبستگی مثبت معنی‌دار ($r=0/685^*$) مشاهده شد. در مقابل، فعالیت گایاکول‌پراکسیداز با کاتالاز ($r=0/668^*$)، آسکوربات‌پراکسیداز ($r=0/593^*$) و پرولین ($r=0/630^*$) همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح پنج درصد نشان داد. همچنین، همبستگی‌های بسیار قوی و مثبت در سطح احتمال یک درصد بین پرولین و مالون‌دی‌آلدئید ($r=0/768^{**}$)، پرولین و سوپراکسید دیسموتاز ($r=0/787^{**}$)، پرولین و آسکوربات‌پراکسیداز ($r=0/781^{**}$) و نیز بین آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز ($r=0/729^{**}$) مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که تجمع پرولین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی و مولکول محافظ، به‌طور نزدیکی با فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی همراه است و نقش مهمی در کاهش اثرات مخرب تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. نتایج این پژوهش با یافته‌های محققین (Molazem & Bashirzadeh, 2015) در ذرت تحت تنش شوری همخوانی دارد؛ به‌طوری که آن‌ها نیز همبستگی معنی‌داری بین

جدول ۳- مقادیر همبستگی بین مقدار پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برگ‌های ذرت (*Zea mays* L.) مورد مطالعه تحت تنش شوری AdS m^{-1}
Table 3. Correlation values between the amount of proline and the activity of antioxidant enzymes studied in the maize leaves (*Zea mays* L.) under salt stress conditions (8 decisiemens/m).

	Catalase	Malondialdehyde	SOD	Ascorbate	Guaiacol	Prolin
کاتالاز	1					
Catalase						
مالون‌دی‌آلدئید	0.221	1				
Malondialdehyde						
سوپراکسیددسموتاز desmutase	0.376	0.685*	1			
آسکوربات پراکسیداز	0.729**	0.606*	0.550	1		
Ascorbate peroxidase						
گایاکول پراکسیداز	-0.668*	-0.283	-0.445	-0.593*	1	
Guaiacol peroxidase						
پرولین	0.552	0.768**	0.787**	0.781**	-0.630*	1
Proline						

* و ** معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

* and **: Significant at the 5 and 1% probability levels, respectively.

تجزیه و تحلیل بیان ژن *bZIP transcription factor1* در تنش شوری

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که اثرات اصلی زمان پس از اعمال تنش شوری، لاین و اثر متقابل لاین $\times$ زمان در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$) بر بیان نسبی ژن *bZIP transcription factor1* معنی‌دار هستند. معنی‌داری اثر متقابل لاین $\times$ زمان بیانگر آن است که پاسخ این ژن به تنش شوری، وابسته به ژنوتیپ و مرحله زمانی تنش بوده و نمی‌توان الگوی بیان آن را مستقل از پویایی زمانی تفسیر کرد. بررسی دقیق الگوی بیان ژن (شکل ۴) نشان داد که در مرحله اولیه تنش (۱۲ ساعت)، لاین حساس (S46) افزایش نسبی بیان این ژن را نسبت به لاین متحمل (R10) نشان می‌دهد. این پاسخ سریع اما گذرا در لاین حساس را می‌توان به‌عنوان یک واکنش شوکی اولیه به تنش شوری تفسیر کرد؛ واکنشی که احتمالاً ناشی از افزایش ناگهانی سیگنال‌های تنشی مانند ROS یا اختلالات اسمزی است، اما فاقد پایداری عملکردی در ادامه تنش می‌باشد. در مقابل، در لاین متحمل افزایش معنی‌دار بیان ژن *bZIP transcription factor1* با تأخیر زمانی (۲۴ ساعت پس از تنش) مشاهده شد و این روند افزایشی در ۴۸ ساعت پس از اعمال شوری نیز حفظ گردید. این الگوی بیان پایدار و زمان‌مند در لاین متحمل نشان می‌دهد که *bZIP transcription factor1* احتمالاً در این ژنوتیپ در چارچوب یک شبکه تنظیمی سازگار شونده و کنترل‌شده فعال می‌شود، نه صرفاً

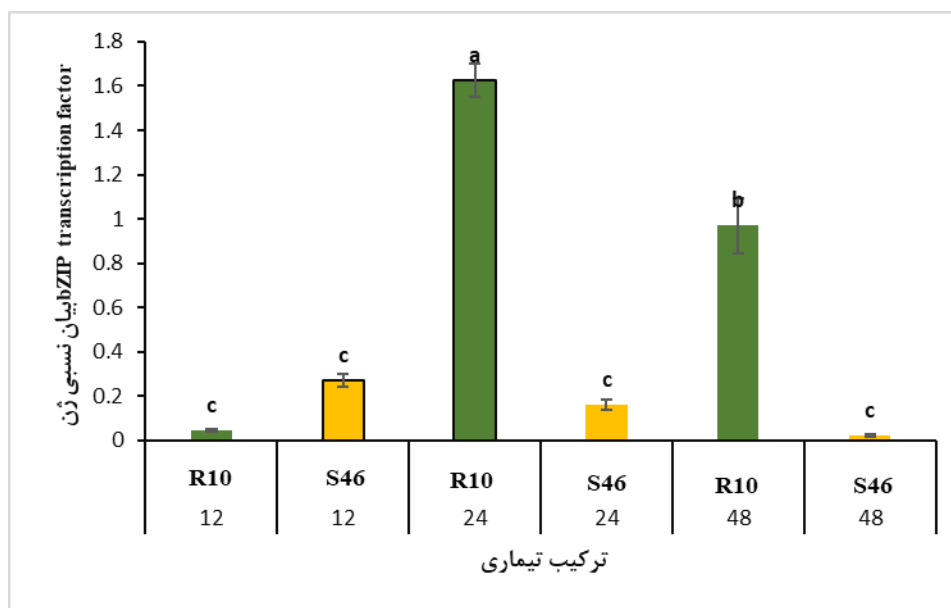
به‌عنوان پاسخ اولیه. کاهش تدریجی بیان این ژن در لاین حساس از کوتاه‌مدت (۱۲ ساعت) به بلندمدت (۴۸ ساعت) حاکی از ناتوانی این لاین در حفظ پاسخ‌های مولکولی مؤثر در مواجهه با تنش شوری است که می‌تواند منجر به فرسایش سیستم‌های دفاعی و کاهش تحمل شود. از آنجایی که نقش اساسی عوامل رونویسی شامل بهبود مقاومت به تنش در گیاه می‌باشد، مطالعه عملکردی این ژن‌ها نیز در مهندسی بیوتکنولوژی مقاومت در برابر تنش گیاه بسیار مهم است (Liu et al., 2023a). فاکتورهای رونویسی *bZIP* از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های پاسخ به تنش‌های غیرزیستی به شمار می‌روند و در تنظیم مسیرهای مرتبط با تعادل یونی، هموستازی ROS، سیگنال‌دهی ABA و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان نقش کلیدی دارند (Sun et al., 2012; Liu et al., 2023a). افزایش بیان *bZIP transcription factor1* در لاین متحمل، هم‌راستا با گزارش ما و همکاران (Ma et al., 2018) در مورد نقش تنظیمی مثبت *ZmbZIP4* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی در ذرت است و نشان می‌دهد که فعال‌سازی مؤثر و پایدار فاکتورهای رونویسی *bZIP* می‌تواند یکی از مؤلفه‌های مولکولی اصلی تحمل به شوری باشد. همچنین، تفاوت زمانی در اوج بیان ژن بین دو لاین با نتایج مطالعات دیگر در گیاهان زراعی همخوانی دارد؛ به‌طوری‌که محققین (López-González et al., 2022) و (Ebrahimipour et al., 2020) نشان دادند که ژنوتیپ‌های متحمل معمولاً بیان ژن‌های کلیدی

تنظیم کننده تنش را به صورت پایدار و بلندمدت فعال می کنند، در حالی که ژنوتیپ های حساس عمدتاً پاسخ های زودگذر و ناکارآمد نشان می دهند. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می دهد که افزایش پایدار و وابسته به زمان بیان ژن *bZIP transcription factor1* در لاین متحمل می تواند نقش مهمی در تنظیم پاسخ های سازگارانه به تنش شوری در ذرت ایفا کند. این یافته ها نه تنها بر اهمیت فاکتورهای رونویسی bZIP در تحمل به شوری تأکید دارند، بلکه این ژن را به عنوان یک نامزد بالقوه برای برنامه های اصلاحی و مهندسی ژنتیک ذرت متحمل به شوری معرفی می کنند.

جدول ۴- تجزیه واریانس بیان ژن *bZIP transcription factor1* در دو لاین متحمل (R10; P14L2) و حساس (S46; MO17) به شوری ذرت (*Zea mays* L.) تحت شرایط تنش شوری AdS m^{-1}

Table 4. Variance analysis of *bZIP transcription factor1* gene expression in salt tolerant (R10; P14L2) and susceptible (S46; MO17) maize (*Zea mays* L.) lines under salt stress conditions (8 decisiemens/m).

مناب تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار اف	Pr > F
Source of variation	Degree of freedom	Mean square	F Value	
زمان	2	0.808942	24.45	<.0001
Time				
لاین	1	2.384855	72.08	<.0001
Line				
لاین* زمان	2	1.124504	33.99	<.0001
Line × Time				
خطا	12	0.033084		
Experimental error				



شکل ۴- الگوی بیان نسبی ژن *bZIP transcription factor1* در دو لاین متحمل (R10; P14L2) و حساس (S46; MO17) به شوری ذرت تحت تنش شوری 8 dS m^{-1}

Figure 4. *bZIP transcription factor1* gene expression pattern in salt tolerant (R10; P14L2) and susceptible (S46; MO17) maize (*Zea mays* L.) lines under salt stress conditions (8 decisiemens/m).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی مهارکننده گونه‌های فعال اکسیژن، به‌ویژه سوپراکسید دیسموتاز، بیانگر نقش محوری سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت در کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از شوری می‌باشد. در سطح مولکولی، الگوی بیان وابسته به زمان ژن *bZIP transcription factor1* تفاوت‌های مشخصی میان لاین‌های متحمل و حساس آشکار ساخت، به‌طوری که پاسخ پایدارتر و تأخیری این ژن در لاین متحمل با سازگاری مؤثرتر به تنش شوری همراه بود. این یافته‌ها، بینش جدیدی در مورد نقش خانواده ژن *bZIP* در ذرت و همچنین بنیانی برای مطالعات بیشتر در مورد نقش ژن-های *bZIP transcription factor1* در رشد و پاسخ به

تنش غیر زیستی در ذرت ارائه می‌دهد. در ادامه نتایج تأکید می‌کنند که نه صرفاً شدت پاسخ، بلکه زمان‌بندی و پایداری تنظیم ژنتیکی و فیزیولوژیکی، عامل تعیین‌کننده تحمل شوری در ذرت است. در مجموع، ژن *bZIP transcription factor1* می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مولکولی بالقوه در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی ذرت برای بهبود تحمل به تنش شوری مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به مطالعات کمتر بر روی این دسته از ژن‌ها در ذرت تحت تنش‌های غیرزنده، پژوهش‌های بیشتری در این زمینه ضرورت دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت دانشگاه و پژوهشکده
زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه برای در اختیار قرار دادن
امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- Abdelaziz, M.N., Xuan, T.D., Mekawy, A.M.M., Wang H. & Khanh, T.D. 2018. Relationship of salinity tolerance to Na⁺ Exclusion, proline accumulation, and antioxidant enzyme activity in rice seedlings. *Agriculture*, 8, 166. Doi:10.3390/agriculture8110166.
- Abdelgawad, H., Zinta, G., Hegab, M.M., Pandey, R., Asard, H. & Abuelsoud, W. 2016. High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs. *Frontiers of Plant Science*, 7, 276. Doi: 10.3389/fpls.2016.00276.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. Doi: [10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ashraf, M.A., Ashraf, M. & Ali, Q. 2010. Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at different growth stages: Leaf lipid peroxidation and phenolic contents. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 559-566.
- Aliyari Rad, S., Bandehagh, A., Dezhsetan, S., Behnamian, M. & Moharramnejad S. 2019. Leaf proteome analysis of maize hybrid SC704 under salinity stress. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 8 (1), 39- 50.
- Azooz, M.M., Ismail, A.M. & Abou Elhamd M.F. 2009. Growth, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities as a Selection Criterion for the Salt Tolerance of Maize Cultivars. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(1), 21.
- Auobi, A., & Rahmani F. 2017. The Effects of Drought and Salt Stresses on the Antioxidant System and *pips* Gene Expression in (*Zea mays* L.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 13(4), 997-1013. <https://archives.ju.edu.jo/index.php/jjas/article/view/12873>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- [Berwal](#), M. K. & [Ram](#), C. 2018. Superoxide Dismutase: A Stable Biochemical Marker for Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants. In book: *Superoxide Dismutase* (pp.10), Publisher: Intech Open. DOI: 10.5772/intechopen.82079
- Bhusan, H., Das, D. K., Hossain, M., Murata, Y., & Hoque, Md. A. 2016. Improvement of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) By increasing antioxidant defense systems using exogenous application of proline. *Australian Journal of Crop Science (AJCS)*, 10(1)* 50-56. [Doi.org/10.21474/IJAR01/18738](https://doi.org/10.21474/IJAR01/18738)
- Cai, Z., K. Feng K., Li, X., Yan, H., Zhang, Z. & Liu, X. 2019. Pre-breeding: the role of antioxidant enzymes on maize in salt stress tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 102. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2880-3>.
- Cao, L., Lu, X., Zhang, P., Wang, G., Wei, L., & Wang, T. 2019. Systematic Analysis of Differentially Expressed Maize zmbzip Genes between Drought and Rewatering Transcriptome Reveals bzip Family Members Involved in Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4103. Doi:10.3390/ijms20174103

- Carrasco-Ríos, L. & Pinto, M. 2014. Effect of salt stress on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in leaves in two contrasting corn, 'Lluteño' and 'Jubilee'. Chilean Journal of Agricultural Research, 74 (1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392014000100014>.
- Chawla, S., Jain, S., & Jain, V. 2013. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). J. Plant Biochem. Biotechnol, 22, 27–34. Doi: 10.1007/s00709-011-0365-3.
- Celik, O., Cakır, B. C., & Atak, C. 2019. Identification of the antioxidant defense genes which may provide enhanced salt tolerance in *Oryza sativa* L. Physiol. Mol. Biol. Plants, 25 (1), 85–99. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0618-0>.
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C. E. B., & Gomes-Filho, E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56 (1), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.01.008>
- Dhindsa, R.S., Plump-Dhindsa, P., & Thorpe, T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Expt. Bot., 32, 93–101. [Doi.org/10.1093/jxb/32.1.93](https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93)
- Dröge-Laser, W., Snoek, B.L., Snel, B. & Weiste, C. 2018. The Arabidopsis bzip transcription factor family — an update. Curr Opin Plant Biol., 45, 36–49. Doi: 10.1016/j.pbi.2018.05.001.
- Ebrahimipour, Z., Darvishzadeh, R., & Arzhang, S. 2020. Study the expression of SOS1, P5CS1 and PMP3-6 genes in maize under salt stress. Crop Biotechnology, 9(4), 1-14 DOI: 10.30473/CB.2020.52969.1807.
- Fao, 2024. Cereal supply and demand brief (july 2024). Rome. Available at: <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>
- Farooq, M., Hussain, M., Wakeel, A., & Siddique K.H.M. 2015. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review. Agronomy for Sustainable Development, 35, 461–481. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0287-0>
- Filippou, P., Bouchagier, P., Skotti, E. & Fotopoulos V. 2014. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. Environmental and Experimental Botany, 97, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.010>
- Gharsallah, C., Fakhfakh, H., Grubb, D., & Gorsane, F. 2016. Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. Aob PLANTS8: plw055. Doi:10.1093/aobpla/plw055.
- Gondim, F. A., Gomes-Filho, E., Costa, J. H., Alencar, N.L. M. & Prisco J. T. 2012. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. Plant Physiology and Biochemistry, 56, 62-71. Doi: 10.1016/j.plaphy.2012.04.012.
- Gupta, B. & Huang, B. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. International Journal of Genomics. Article ID 701596, 18 Pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>.
- He, L., Wu, Z., Wang, X., Zhao, C., Cheng, D., Du, C., Wang, H., Gao, Y., Zhang, R., Han, J., & Xu, J. 2024. A novel maize F-bzip member, zmbzip76, functions as a positive regulator in ABA-mediated abiotic stress tolerance by binding to ACGT-containing elements. *Plant Science*, 341, 111952. Doi: 10.1016/j.plantsci.2023.111952.
- Heidari, P. And Najafi Zarrin, H. 2016. Classification and Gene Expression Analysis of bzip Family in Tomato Root under Sub-Optimal Temperature. Journal of Crop Breeding, 8 (17), 17-23. Doi:[10.18869/acadpub.jcb.8.17.23](https://doi.org/10.18869/acadpub.jcb.8.17.23).

- Hussain, I., Arsalan Ashraf, M., Anwar, F., Rasheed, R., Niaz, M., & Wahid, A. 2013. Biochemical characterization of maize (*Zea mays* L.) For salt tolerance. *Plant Biosystems*, 1016- 1026. DOI: 10.1080/11263504.2013.798369.
- Jahantigh, O., najafi, F., Naghdi badi H., Khavari-Nejad, R. A., & Sanjarian, F. 2016. Changes in antioxidant enzymes activites and proline, total phenol and anthocyanine contents in *Hyssopus Officinalis* L. Plants under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*, 67(2), 195–204. DOI: 10.1556/018.67.2016.2.7.
- Jannatdoust, M., Darvishzadeh, R., Tahmasebi Enferadi, S., & Monazzah, M. 2021. Study and comparison of leaf proteome in maize (*Zea mays* L.) Under salt stress. *Crop Biotechnology*, 10(4), 1-26. DOI: 10.30473/cb.2021.59885.1846.
- Kaur, G., & Asthir, B. 2019. Water and Salt Stress Metabolomics for Wheat Genotypes of India. *Cereal Research Communications*, 47 (4), 615–625. DOI: 10.1556/0806.47.2019.36.
- Kibria, M. G., Hossain, M., Murata, Y., & Hoque, Md. A. 2017. Antioxidant Defense Mechanisms of Salinity Tolerance in Rice Genotypes. *Rice Science*, 24 (3), 155- 162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rsci.2017.05.001>.
- Levent Tuna, A., Kaya, C., Altunlu H., & Ashraf, M. 2013. Mitigation effects of non-enzymatic antioxidants in maize (*Zea mays* L.) Plants under salinity stress. *AJCS, Australian Journal of Crop Sceience*, 7 (8), 1181-1188.
- Liu, H., Tang, X., Zhang, N., Li, S., & Si, H. 2023a. Role of bzip Transcription Factors in Plant Salt Stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 7893. <https://doi.org/10.3390/ijms24097893>.
- Liu, W., Wang, M., Zhong, M., Luo, C., Shi, S., Qian, Y., Kang, Y., & Jiang, B. 2023b. Genome-wide identification of bzip gene family and expression analysis of bhbzip58 under heat stress in wax gourd. *BMC Plant Biology*, 23, 598. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04580-6>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25 (4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-González, C., Juárez-Colunga, S., Trachsel, S., Marsch-Martínez, N., Gillmor, C.S., & Tiessen, A. 2022. Analysis of Global Gene Expression in Maize (*Zea mays*) Vegetative and Reproductive Tissues That Differ in Accumulation of Starch and Sucrose. *Plants*, 11, 238. <https://doi.org/10.3390/plants11030238>.
- Ma, H., Liu, C., Li, Z., Ran, Q., Xie, G., Wang, B., Fang, S., Chu, J., and Zhang, J. 2018. Zmbzip4 Contributes to Stress Resistance in Maize by Regulating ABA Synthesis and Root Development. *Plant Physiology*, 178 (2), 753–770. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00436>.
- Mansour, M. M. F., Salama, K.H.A., Ali, F.Z.M., & Abou Hadid, A.F. 2005. Cell and plant responses to nacl in *Zea mays* cultivars differing in salt tolerance. *General and Applied Plant Physiology*, 31, 29–41.
- Macadam, J. W., Sharp R. E., & Nelson, C. J. 1992. Peroxidase Activity in the Leaf Elongation Zone of Tall Fescue. *Plant Physiol.*, 99, 879-885. [Doi: 10.1104/pp.99.3.872](https://doi.org/10.1104/pp.99.3.872)
- Moharramnejad, S., & Valizadeh, M. 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*, 9(2), 77-84. Doi: [10.22034/jppb.2019.10606](https://doi.org/10.22034/jppb.2019.10606)
- Molazem, D., & Bashirzadeh, A. 2015. Impact of Salinity Stress on Proline Reaction, Peroxide Activity, and Antioxidant Enzymes in Maize (*Zea mays* L.). *Pol. J. Environ. Stud.*, 24(2), 597-603. [Doi: https://doi.org/10.15244/pjoes/29691](https://doi.org/10.15244/pjoes/29691)

- Moradbeygi, H., Jamei, R., Heidari, R., & Darvishzadeh, R. 2020. Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron oxide nanoparticles in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 272, 109537. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109537>.
- Nakano, Y., & Asada, K. 1987. Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts; Its Inactivation in Ascorbate-Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical. *Plant Cell Physiol*, 28 (1), 131-140. [Doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268)
- Nazarli, H., & Faraji, F. 2011. Response of proline, soluble sugars and antioxidant enzymes in Wheat (*Triticum Aestivum* L.) To different irrigation regimes in greenhouse condition. *Cercetari Agronomice in Moldova*, XLIV, 4 (148). DOI: [10.2478/v10298-012-0046-1](https://doi.org/10.2478/v10298-012-0046-1)
- Odjegba, V. J., & Chukwunwike, I. C. 2012. Physiological responses of *Amaranthus hybridus* L. under salinity stress. *Indian J. Innov. Dev.*, 1, 742-748. DOI: [10.52417/njls.v5i2.258](https://doi.org/10.52417/njls.v5i2.258)
- Ouertani, R. N., Abid, G., Karmous, C., Chikha, M. B., Boudaya O., Mahmoudi H., Mejri S., Jansen R.K., & Ghorbel A. 2021. Evaluating the contribution of osmotic and oxidative stress components on barley growth under salt stress. *Aob PLANTS*, 13 (4). DOI: [10.1093/aobpla/plab034](https://doi.org/10.1093/aobpla/plab034).
- Omrani, B., & Moharramnejad S. 2018. Study of Salinity Tolerance in Four Maize (*Zea Mays* L.) Hybrids at Seedling Stage. *Journal of Crop Breeding* 9 (24). DOI: [10.29252/jcb.9.24.79](https://doi.org/10.29252/jcb.9.24.79)
- Paquin, R., & Lechasseur, P. 1979. Observations sur une méthode de dosage de la praline libre dans les extraide plantes, *Can J Bot.*, 57, 1851-1854. DOI: [10.1139/b79-233](https://doi.org/10.1139/b79-233)
- Perveen, S., & Mariyam, N. 2018. Proline treatment induces salt stress tolerance in Maize (*Zea Mays* L. CV. Safaid Afgoi). *Pakistan Journal of Botany*, 50 (4), 1265-1271.
- Popham, P.L., & Novacky, A. 1990. Use of dimethylsulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Physiology*, 96, 1157-1160. DOI: [10.1104/pp.96.4.1157](https://doi.org/10.1104/pp.96.4.1157)
- Reddy, p. S., jogeswar, g., rasineni, g. K., maheswari, m., reddy, a. R., varshney, r. K., & kishor, p.b. k. 2015. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94: 104e113. DOI: [10.1016/j.plaphy.2015.05.014](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.014).
- Rout, N. P., & Shaw, B. P. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Science*, 160 (3), 415-423. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00406-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00406-4).
- Sarker, U., & Oba, S. 2020. The response of salinity stress-induced A. Tricolor to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Front. Plant Sci.*, 11, 559876. DOI: [10.3389/fpls.2020.559876](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559876)
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2022. Functional genomics in plant abiotic stress responses and tolerance: From gene discovery to complex regulatory networks and their application in breeding. [Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and Biological Sciences \(Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.\)](https://doi.org/10.2183/pjab.98.024), 98(8), 470-492. DOI: [10.2183/pjab.98.024](https://doi.org/10.2183/pjab.98.024).
- Sobahan, M. A., Akter, N., Ohno, M., Okuma, E., Hirai, Y., Mori, I.C., Nakamura, Y., & Murata, Y. 2012. Effects of exogenous proline and glycinebetaine on the salt tolerance of

- rice cultivars. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 1568–1570. Doi: 10.1271/bbb.120233.
- Strader, L., Weijers, D., & Wagner, D. 2022. Plant transcription factors-being in the right place with the right company. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 65, 102136. Doi: 10.1016/j.pbi.2021.102136.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., & Giridarakumar, S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) Under nacl salinity. *Plant Science*, 161, 613-619. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00450-2)
- Sun, X.L., Li, Y., Cai, H., Bai, X., Ji, W., Ding, X.D., & Zhu, Y.M. 2012. The Arabidopsis atbzip1 transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses. *J Plant. Res.*, 125, 429- 438. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0448-4>
- Szöllősi, R. 2014. Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants: An Overview. *Oxidative Damage to Plants*, Antioxidant Networks and Signaling, 89-129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00003-4>
- Vighi, I.L., Benitez, L.C., Amaral, M.N., Moraes, G.P., Auler, P.A., Rodrigues, G.S., Deuner, S., Maia, L.C., & Braga, E.J.B. 2017. Functional characterization of the antioxidant enzymes in rice plants exposed to salinity stress. *Biology Plant*, 61(3), 540-550. Doi: 10.1007/s10535-017-0727-6.
- Yilmaz, S., Temizgül, R., Yürürdurmaz, C., & Kaplan, M. 2020. Oxidant and antioxidant enzyme response of redbine sweet sorghum under nacl salinity stress. *Bioagro*, 32(1), 31-38.
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., & Cai, Y. 2019. The Roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Biomed Research International*, 1–11. Doi: 10.1155/2019/9732325.
- Yaish, M.W. 2015. Proline accumulation is a general response to abiotic stress in the date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). *Genetics and Molecular Research*, 14, 9943–9950. Doi: 10.4238/2015.August.19.30.
- Yilmaz, A., Nishiyama, M.Y., Fuentes, B.G., Souza, G.M., Janies, D., Gray, J., & Grotewold, E. 2009. GRASSIUS: A platform for comparative regulatory genomics across the grasses. *Plant Physiol.*, 149, 171–180. Doi: 10.1104/pp.108.128579.
- Zargar Yaghoubi, F., Sarai Tabrizi, M., Mohammadi Torkashvand, A., Esfandiari, M., & Ramezani Etedali, H. 2023. Evaluating the Effect of Combined Water and Salinity Stresses in Estimating the Fodder Maize Biological Yield through Periodic Evaporation and Transpiration. *Journal of Water and Soil*, 36(6), 677-693. DOI: 10.22067/jsw.2022.77735.1183.