Razi University

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Agro-Physiological Responses and Expression Profiling of the Transcription Factor *Zm00001d043950* in Contrasting Maize Genotypes under Salinity Stress

Gholnaz Taghizadeh[1], Reza Darvishzadeh[1] ✉, Hadi Alipour[1] & Sanaz Khalifani[1]

[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: Soil salinity is one of the most critical abiotic stresses limiting maize (*Zea mays* L.) production worldwide, particularly in arid and semi-arid regions. Maize as a C4 glycophyte with relative to moderate sensitivity to salinity faces significant challenges from salt-induced osmotic stress, ionic toxicity, and oxidative stress, which severely impair growth, photosynthesis, ion homeostasis, and ultimately grain yield. Understanding the physiological and molecular mechanisms underlying salt tolerance is therefore of great importance for breeding programs. The WRKY transcription factor family plays key regulatory roles in plant stress responses, and the *Zm00001d043950* gene, a member of this family, has been identified as a candidate gene associated with salinity tolerance. This study aimed to evaluate the agro-physiological responses and investigate the expression pattern of *Zm00001d043950* in two contrasting maize inbred lines (the tolerant line P14L2 and the sensitive line MO17) to elucidate the relationship between physiological responses and molecular regulation under salt stress.

Materials and methods: The experiment was conducted as a factorial arrangement based on a completely randomized design (CRD) with three replications under greenhouse conditions. After establishment, plants were subjected to two salinity levels, including 2 (control) and 8 $dS \cdot m^{-1}$, until the eight-leaf stage. Leaf sampling was performed at 12, 24, and 48 hours after stress application. The relative expression of the Zm00001d043950* gene was determined following RNA extraction, cDNA synthesis, and Real-Time PCR using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with the Actin gene serving as the internal reference. Additionally, agro-physiological indices including chlorophyll index (SPAD), canopy temperature (CT), electrolyte leakage (EL), days to maturity (DTM), dry matter, grain yield, and yield components were measured.

Results: The results showed that salinity stress significantly reduced the chlorophyll index, dry matter, and growth duration while increasing canopy temperature and electrolyte leakage in both lines; however, the magnitude of these responses was genotype-dependent. Under salinity at 8 $dS\ m^{-1}$, P14L2 exhibited greater salinity tolerance than MO17, as indicated by a higher chlorophyll index (41.68 vs. 29.17), lower electrolyte leakage (31.89% vs. 61.33%), and a longer growth duration (83.33 vs. 71.67 days). Although grain yield did not differ significantly between the two lines under stress, the sensitive MO17 line compensated for part of its yield reduction—caused by decreased kernel weight and dimensions—through a higher kernel row number per ear. Analysis of gene expression variance revealed that the effects of time and the time × line interaction on Zm00001d043950 expression were significant. The highest expression level of this gene was observed at 24 hours post-treatment in both lines; however, the induction intensity was greater in the tolerant line and decreased at 48 hours, indicating a rapid and time-dependent response of this gene to salinity.

Conclusion: P14L2 maintained higher chlorophyll levels and a more stable phenological response than MO17 under salinity stress, whereas no significant differences were observed in plant dry weight or grain yield. The transient expression pattern of *Zm00001d043950*, characterized by a peak at 24 h after stress imposition, suggests a potential role for this gene in the early response to salinity. Therefore, *Zm00001d043950* may be considered a candidate gene associated with salinity tolerance in maize; however, further studies are required to validate its potential application as a molecular marker.

Keywords: Maize, Salt stress, WRKY transcription factor, Gene expression, Agro-physiological traits.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 22 Nov 2025, **Revised:** 15 Jan 2026, **Accepted:** 05 Mar 2026, **Published online:** 28 Mar 2026

Cite this article: Taghizadeh, G., Darvishzadeh, R., Alipour, H. & Khalifani, S. (2026). Agro-Physiological Responses and Expression Profiling of the Transcription Factor *Zm00001d043950* in Contrasting Maize Genotypes under Salinity Stress. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, *5*(1), 1-23. DOI: 10.22126/cbb.2026.14324.1158

© The Author(s).
10.22126/cbb.2026.14324.1158

Publisher: Razi University

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

ارزیابی اگرو-فیزیولوژیک و الگوی بیان فاکتور رونویسی *Zm00001d043950* در ژنوتیپ‌های متمایز ذرت تحت تنش شوری

گلناز تقی‌زاده[۱]، رضا درویش‌زاده[۱]✉، هادی علیپور[۱] و ساناز خلیفانی[۱]

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

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

چکیده

مقدمه: شوری خاک یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی محدودکننده تولید ذرت (*Zea mays* L.) در سراسر جهان، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌شود. ذرت به‌عنوان یک گیاه گلایکوفیت با مسیر فتوسنتزی C4، حساسیت نسبی تا متوسطی به شوری دارد و تنش شوری از طریق ایجاد تنش اسمزی، سمیت یونی و تنش اکسیداتیو، فرآیندهای رشد، فتوسنتز، هومئوستازی یونی و در نهایت عملکرد دانه را به‌شدت مختل می‌کند. از این رو، شناسایی سازوکارهای فیزیولوژیک و مولکولی مرتبط با تحمل به شوری، از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار است. خانواده فاکتورهای رونویسی WRKY نقش کلیدی در تنظیم پاسخ‌های گیاه به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند و ژن *Zm00001d043950* به‌عنوان یکی از اعضای این خانواده، ژنی کاندید مرتبط با تحمل به شوری شناسایی شده است. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی پاسخ‌های اگروفیزیولوژیک و بررسی الگوی بیان ژن *Zm00001d043950* در دو لاین اینبرد ذرت با واکنش‌های متضاد به شوری (لاین متحمل P14L2 و لاین حساس MO17) انجام شد تا ارتباط بین پاسخ‌های فیزیولوژیکی و تنظیم مولکولی این ژن در شرایط تنش شوری تبیین گردد.

مواد و روش‌ها: آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. گیاهان پس از استقرار تا مرحله هشت‌برگی، در دو سطح شوری شامل ۲ (شاهد) و ۸dS m^{-1} تیمار شدند و نمونه‌برداری از برگ‌ها در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش انجام گرفت. بیان نسبی ژن *Zm00001d043950* پس از استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام واکنش Real-Time PCR با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و با استفاده از ژن Actin به‌عنوان ژن مرجع تعیین شد. علاوه بر این، شاخص‌های اگروفیزیولوژیک شامل شاخص کلروفیل (SPAD)، دمای کانوپی، نشت الکترولیت، روز تا رسیدگی، ماده خشک، عملکرد دانه و اجزای عملکرد اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار شاخص کلروفیل، ماده خشک، طول دوره رشد و افزایش دمای کانوپی و نشت الکترولیت در هر دو لاین شد، اما شدت این تغییرات به ژنوتیپ وابسته بود. تحت شرایط شوری ۸dS m^{-1}، لاین P14L2 با حفظ شاخص کلروفیل بالاتر (۴۱/۶۸ در برابر ۲۹/۱۷) و نشت الکترولیت کمتر (۳۱/۸۹ ٪ در برابر ۶۱/۳۳٪) و همچنین دوره رشد طولانی‌تر (۸۳/۳۳ در برابر ۷۱/۶۷ روز) نسبت به MO17، تحمل بیشتری به شوری نشان داد.

اگرچه عملکرد دانه دو لاین تحت تنش اختلاف معنی‌داری نداشت، اما لاین حساس MO17 با برخورداری از تعداد ردیف دانه بیشتر در بلال، بخشی از کاهش عملکرد ناشی از افت وزن و ابعاد دانه را جبران کرد. تجزیه واریانس بیان ژن نشان داد که اثر زمان و برهم‌کنش زمان × لاین بر بیان *Zm00001d043950* معنی‌دار بود. بیشترین سطح بیان این ژن در هر دو لاین ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش مشاهده شد، اما شدت القای بیان در لاین متحمل بیشتر بود و در ۴۸ ساعت کاهش یافت که بیانگر پاسخ سریع و وابسته به زمان این ژن در مواجهه با شوری است.

نتیجه‌گیری: در مجموع، لاین P14L2 تحت تنش شوری وضعیت کلروفیل بالاتر و پاسخ فنولوژیک پایدارتری نسبت به MO17 نشان داد، در حالی‌که تفاوت معنی‌داری در وزن خشک بوته و عملکرد دانه مشاهده نشد. الگوی بیان گذرای *Zm00001d043950* با اوج بیان در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، مشارکت احتمالی این ژن را در پاسخ اولیه به شوری نشان داد. بنابراین، *Zm00001d043950* می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندید مرتبط با تحمل شوری در ذرت مطرح باشد، هرچند تأیید کاربرد آن به‌عنوان نشانگر مولکولی به مطالعات تکمیلی نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش شوری، ذرت، صفات اگروفیزیولوژیک، فاکتور رونویسی WRKY .

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۰۱ **اصلاح:** ۱۴۰۴/۱۰/۲۵ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۱۲/۱۴، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۵/۰۱/۰۸

استناد: تقی‌زاده، گ.، درویش‌زاده، ر.، علیپور، ه. و خلیفانی، س. (۱۴۰۵). ارزیابی اگرو-فیزیولوژیک و الگوی بیان فاکتور رونویسی *Zm00001d043950* در ژنوتیپ‌های متمایز ذرت تحت تنش شوری. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۵(۱)، ۱-۲۳. DOI: 10.22126/cbb.2026.14324.1158

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

CC BY NC

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات غله‌ای جهان و منبع مهم غذا، خوراک دام و مواد اولیه صنایع تبدیلی است؛ ازاین‌رو، حفظ پایداری تولید آن در شرایط نامساعد محیطی اهمیت زیادی دارد (Serna-Saldivar, 2016; García-Lara and Serna-Saldivar, 2019).

با وجود پتانسیل بالای این گیاه برای تولید زیست‌توده و دانه، پایداری عملکرد آن به‌شدت تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی، به‌ویژه شوری خاک، قرار می‌گیرد. شوری از مهم‌ترین محدودیت‌های تولید کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک است و گسترش آن در اراضی آبی، تهدیدی جدی برای پایداری تولید محصولات زراعی به شمار می‌رود (Qu *et al*., 2024; Liu *et al*., 2022).

ذرت به عنوان یک گیاه غیرشورپسند (گلایکوفیت)، دارای حساسیتی نسبی تا متوسط به تنش شوری است؛ به طوری که قرارگیری در معرض غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (NaCl)، موجب کاهش ۵۰ درصدی زیست‌توده (رشد) گیاهچه‌های آن می‌شود (Cao *et al*., 2019). از آنجا که بخش عمده‌ای از اراضی زیر کشت ذرت در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان واقع شده‌اند؛ نواحی که به دلیل نرخ بالای تبخیر و تعرق، مستعد شور شدن فزاینده هستند، گسترش این تنش اسمزی و یونی، تهدیدی مستقیم و جدی برای پایداری تولید و امنیت غذایی جهانی به شمار می‌رود (Cao *et al*., 2021). تنش شوری، فرآیندهای فیزیولوژیکی و نموی ذرت را در تمامی مراحل زیستی به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مراحل رویشی و زایشی، شوری ابتدا با کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک و محدود کردن جذب آب، و سپس با تجمع بیش از حد یون‌های Na^+ و Cl^- در بافت‌های گیاهی، موجب برهم خوردن تعادل آب و هومئوستازی یونی می‌شود. تجمع سدیم همچنین می‌تواند با رقابت با K^+، نسبت K^+/Na^+ سیتوزولی را کاهش می‌دهد. این برهم‌کنش‌های نامطلوب یونی، با برهم زدن یکپارچگی غشاهای سلولی (نشت الکترولیت فزاینده) و غیرفعال‌سازی آنزیم‌های کلیدی دخیل در چرخه کلوین و زنجیره انتقال الکترون، کارایی فتوسنتز جاری گیاه را به شدت سرکوب می‌کند (Niu *et al*., 2012; Chattha *et al*., 2023). شوری همچنین با کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید، تغییر هدایت روزنه‌ای و آسیب به ساختار برگ، فتوسنتز را مختل می‌کند (Omoto *et al*., 2012; Akram et *al*., 2011). در مرحله زایشی نیز تداوم این اختلالات می‌تواند انتقال و تخصیص مواد فتوسنتزی به اندام‌های زایشی را کاهش داده و در نهایت به افت اجزای عملکرد و عملکرد دانه منجر شود (Hasan *et al*., 2017; Schubert *et al*., 2009).

پاسخ‌های ذرت به تنش شوری، برآیند هم‌افزایی سازوکارهای پیچیده فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی است. در مقیاس سلولی و فیزیولوژیکی، تعدیل پتانسیل اسمزی از طریق تجمع اسمولیت‌های سازگار نظیر پرولین، گلیسین‌بتائین، قندهای محلول و پلی‌آمین‌ها صورت می‌گیرد (Liang *et al*., 2021)، که این فرآیند با کاهش تعرق اتمسفری با

واسطه مسیر سیگنالینگ هورمونی اسید آبسزیک (ABA) همراه است (Cao *et al*., 2021). در سطح هومئوستازی یونی، حفظ پتانسیل غشا و ممانعت از تجمع سدیم در سیتوزول، مستلزم فعالیت هماهنگ ناقل‌های غشایی خانواده HKT (جهت ممانعت از انتقال سدیم به اندام‌های هوایی) و NHX (جهت واکوئولیزه کردن سدیم) است (Yang and Guo, 2018). علاوه بر این، تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از طریق تحریک آنزیم‌های جاروب‌گر نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD[1])، کاتالاز (CAT[2]) و پراکسیداز (POD[3])، نقشی حیاتی در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[4]) و پیشگیری از تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند (Nouman *et al*., 2016). در سطوح فوقانی هدایت ژنتیکی، تنظیم بیان این پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت کنترل شبکه پیچیده‌ای از فاکتورهای رونویسی قرار دارد. امروزه با پیشرفت‌های شگرف در فناوری‌های ژنومیکس و متابولومیکس ساختاری، مطالعات ارتباط ژنوم در گستره متابولوم (mGWAS[5]) به‌طور فزاینده‌ای برای شناسایی جایگاه‌های صفت کمّی (QTLs[6]) مؤثر بر صفات پیچیده فیزیولوژیکی؛ از جمله نوسانات متابولیتی تحت تنش اسمزی ناشی از شوری، به‌کار گرفته می‌شوند (Medeiros *et al*., 2021).

در سطح مولکولی، تنظیم مجدد بیان ژن‌ها یکی از محورهای اصلی سازگاری گیاه با تنش شوری است و این فرایند تا حد زیادی تحت کنترل شبکه‌های پیچیده‌ای از فاکتورهای رونویسی (TFs[7]) قرار دارد. اگرچه خانواده‌های مختلفی از TFها، از جمله bZIP، NAC، MYB، AP2/ERF، DREB و HSF، در تنظیم پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مشارکت دارند، خانواده WRKY به دلیل جایگاه گسترده آن در تنظیم پاسخ‌های دفاعی، سیگنالینگ تنش و برهم‌کنش با مسیرهای هورمونی، یکی از گروه‌های مهم تنظیم‌کننده پاسخ به شوری محسوب می‌شود (Kimotho *et al*., 2019; Li *et al*., 2020). پروتئین‌های WRKY از طریق اتصال به عناصر تنظیمی W-boxدر نواحی پروموتوری ژن‌های هدف، می‌توانند بیان مجموعه‌ای از ژن‌های دخیل در هومئوستازی یونی، پاسخ اکسیداتیو، سیگنالینگ هورمونی و سازگاری با تنش را تنظیم کنند. در ذرت نیز اعضای مختلف خانواده WRKYدر پاسخ به شوری و سایر تنش‌های غیرزیستی شناسایی شده‌اند؛ برای نمونه، تغییر بیان برخی اعضای این خانواده با پاسخ به شوری، ABA و تنش‌های اسمزی همراه بوده و مطالعات عملکردی نیز نشان داده‌اند که برخیWRKY ها می‌توانند بیان ژن‌های پایین‌دست مرتبط با تحمل تنش را تنظیم کنند (Du *et al*., 2017; Niu *et al*., 2022).

در سطح مولکولی، فاکتورهای رونویسی نقش تنظیم‌کننده کلیدی در پاسخ به تنش شوری دارند. در ذرت، شواهد ترانسکریپتومیکس مبیّن پویایی شبکه‌های تنظیمی

[1] Superoxide dismutase
[2] Catalase
[3] Peroxidase
[4] Reactive Oxygen Species
[5] Metabolomics in genome-wide association studies
[6] Quantitative trait locus
[7] Transcription factor

پیچیده‌ای است که در آن خانواده‌های بزرگی از فاکتورهای رونویسی، به‌ویژه اعضای خانواده WRKY، نقش کلیدی در هماهنگ‌سازی پاسخ‌های دفاعی به تنش شوری ایفا می‌کنند؛ در این میان، ژن *Zm00001d043950* به عنوان یکی از اعضای شاخص این خانواده ژنی، عملکرد مؤثری در پاسخ به تنش نشان داده است

بر این اساس، انتخاب *Zm00001d043950* در پژوهش حاضر بر مبنای صرفاً تعلق آن به خانواده WRKY صورت نگرفت، بلکه این ژن در مرحله غربالگری و متاآنالیز داده‌های ترانسکریپتومیک به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندیدای مرتبط با پاسخ ذرت به تنش شوری شناسایی شد. اهمیت این ژن در مقایسه با سایر کاندیداها بر اساس الگوی پاسخ آن در داده‌های بیان ژن و ارتباط آن با شرایط تنش مورد بررسی تعیین شد و ازاین‌رو، *Zm00001d043950* برای اعتبارسنجی تجربی بیشتر انتخاب گردید. با توجه به اینکه شواهد حاصل از مطالعات بیان ژن به‌تنهایی برای اثبات نقش عملکردی یک ژن کافی نیست، هدف مطالعه حاضر اثبات مستقیم عملکرد *Zm00001d043950* نیست، بلکه بررسی و اعتبارسنجی الگوی بیان آن در دو اینبردلاین ذرت با فنوتیپ‌های متضاد نسبت به شوری است. مقایسه الگوی بیان این ژن در لاین متحمل و حساس می‌تواند مشخص کند که آیا پاسخ رونویسی *Zm00001d043950* با تفاوت در تحمل شوری مرتبط است و آیا این ژن می‌تواند به‌عنوان یک کاندیدای مولکولی مناسب برای مطالعات تکمیلی تحمل شوری در ذرت مطرح شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طراحی آزمایش

ەمنظور ارزیابی صفات آگروفیزیولوژیک و بررسی الگوی بیان ژن *Zm00001d043950* تحت تنش شوری، دو لاین اینبرد ذرت با واکنش‌های متضاد به شوری، شامل لاین P14L2 به‌عنوان ژنوتیپ متحمل و لاین MO17 به‌عنوان ژنوتیپ حساس، مورد استفاده قرار گرفتند. این دو ژنوتیپ بر اساس نتایج مطالعات فنوتیپی پیشین به‌عنوان لاین‌های دارای واکنش متضاد به شوری انتخاب شدند (Arzangh *et al.*, 2021). آزمایش در سال‌های ۱۴۰۳–۱۴۰۲ در گلخانه تحقیقاتی گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه ارومیه به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل آزمایش شامل دو ژنوتیپ ذرت (P14L2 و MO17) و دو سطح شوری شامل ۲ و ۸ $dS\ m^{-1}$ بودند.

کشت گیاهان در گلدان‌های پلاستیکی (به قطر ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر) با بستر کشت پرلیت + پیت‌ماس با نسبت حجمی ۲:۱ انجام شد. کشت و پرورش گیاهان در گلخانه تحقیقاتی گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه ارومیه تحت شرایط محیطی کنترل‌شده شامل دمای روز ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دمای شب ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی انجام گرفت. گیاهان به مدت ۶ هفته و تا زمان رسیدن به

مرحله ۸ برگی کامل (V8)؛ بر اساس سیستم شاخص‌گذاری رشدی دانشگاه ایالتی آیووا (Abendroth *et al.*, 2011) تحت این شرایط استاندارد نگهداری شدند. تغذیه و تأمین نیازهای غذایی گیاهان به صورت منظم با استفاده از محلول غذایی هوگلند [8] صورت پذیرفت. با رسیدن گیاهان به مرحله هشت‌برگی، تیمار شوری در دو سطح شامل سطح شاهد (۲dS m^{-1}) و سطح تنش شوری (۸dS m^{-1}) اعمال گردید. به منظور پیشگیری از بروز شوک اسمزی ناگهانی در گیاهان، غلظت کلرید سدیم (NaCl)، در سیستم ریشه به صورت تدریجی و طی سه مرحله در بازه زمانی ۴۸ ساعت افزایش یافت تا هدایت الکتریکی به مقدار هدف یعنی ۸dS m^{-1} برسد. در همین حال، هدایت الکتریکی گلدان‌های شاهد در سطح ثابت ۲dS m^{-1} حفظ شد. به‌منظور بررسی پاسخ اولیه و وابسته به زمان بیان ژن *Zm00001d043950*، نمونه‌برداری از برگ‌ها در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع اعمال تدریجی شوری انجام شد. نمونه زمان صفر پیش از آغاز تیمار به‌عنوان خط پایه بیان ژن در نظر گرفته شد. نمونه‌های برگ بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراجRNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. صفات آگروفیزیولوژیک و زراعی در ادامه دوره رشد گیاه و در مرحله رشد موردنظر اندازه‌گیری شدند تا اثرات تجمعی تنش شوری بر رشد، وضعیت فیزیولوژیک و عملکرد ارزیابی شود. نکته قابل توجه این است که نمونه‌برداری از برگ‌ها در زمان صفر (پیش از اعمال تنش) و در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش انجام شد. نمونه‌های زمان صفر به‌عنوان نمونه‌های پایه برای تعیین وضعیت اولیه بیان ژن و نرمال‌سازی داده‌های بیان نسبی مورد استفاده قرار گرفتند، در حالی که تحلیل آماری الگوی زمانی بیان ژن بر اساس سه زمان پس از اعمال تنش (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) انجام شد.

اندازه‌گیری صفات آگروفیزیولوژیک از آغاز مرحله تاسل‌دهی انجام شد. اندازه‌گیری صفات آگروفیزیولوژیک شامل تعداد روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته، دمای کانوپی، زاویه برگ، شاخص کلروفیل (SPAD)، تعداد کل برگ، قطر ساقه، نشت الکترولیت، طول برگ پرچم، عرض برگ پرچم، محتوای نسبی آب برگ، وزن خشک بوته، وزن بلال با غلاف، وزن بلال بدون غلاف، طول بلال، تعداد ردیف دانه در بلال، تعداد دانه در هر ردیف، قطر بلال با دانه، قطر چوب بلال، وزن چوب بلال، وزن صد دانه، عملکرد دانه، ضخامت دانه، عرض دانه و طول دانه بعد از مرحله تاسل‌دهی انجام شد.

استخراج و ارزیابی کیفیت RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از نمونه‌های برگی با استفاده از واکنش‌گر RNX-Plus (شرکت سیناکلون، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت ارزیابی کیفیت و یکپارچگی نمونه‌های استخراج‌شده، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد (w/v) به منظور پایش باندهای متمایز 28S و 18S مربوط به rRNA انجام گرفت (شکل ۱). علاوه بر این، غلظت و شاخص‌های

[8] Hoagland

خلوص RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ[9] و از طریق پایش و ثبت نسبت‌های جذب فرابنفش شامل A260/A280 (استاندارد؛ در محدوده ۱.۹ تا ۲.۱) و نسبت A260/A230 (استاندارد؛ بزرگتر از ۲.۰) ارزیابی گردید. در نهایت، تنها نمونه‌های واجد معیارهای کیفی استاندارد برای مراحل سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای سنتز رشته نخست cDNA، ابتدا مخلوط واکنش اولیه‌ای شامل ۵ میکرولیتر از RNA کل، ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo(dT)، ۱ میکرولیتر آغازگر Random Hexamer، مخلوط dNTPs و آب عاری از نوکلئاز تیمارشده با DEPC (در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر) تهیه شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بلافاصله به منظور جلوگیری از باز شدن مجدد زنجیره‌ها روی یخ منتقل گردید. در مرحله بعد، ۴ میکرولیتر بافر واکنش M- ×5 MuLV و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (M-MuLV Reverse Transcriptase) به همراه آب DEPC به مخلوط افزوده شد تا حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر برسد. واکنش سنتز به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ثابت ۴۲ درجه سانتی‌گراد اجرا و در ادامه، فرآیند با انکوباسیون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت غیرفعال‌سازی آنزیم خاتمه یافت. نمونه‌های cDNA حاصل تا زمان انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

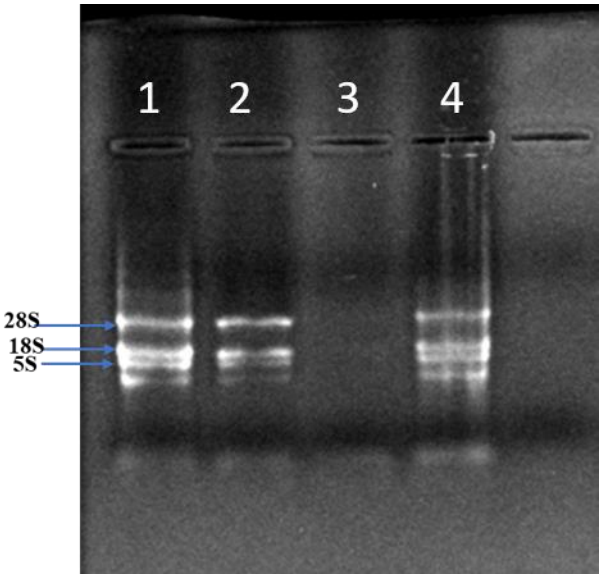
[9] Nanodrop

واکنش Real-Time PCR

جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن *Zm00001d043950* توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده این ژن از پایگاه اطلاعاتی NCBI استخراج گردید. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات هدف در PCR با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای تخصصی Oligo 7 و Primer3Plus انجام گرفت. اختصاصیت آغازگرها با استفاده از BLAST بررسی و ویژگی‌های ترمودینامیکی شامل دمای ذوب (Tm)، درصد GC، ساختارهای ثانویه و تشکیل دایمر با نرم‌افزار OligoAnalyzer ارزیابی شد (جدول ۱). بررسی بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از تکنیک Real-Time PCR مبتنی بر رنگ SYBR Green در دستگاه Rotor-Gene Q 6000 (QIAGEN) انجام شد. واکنش‌ها با سه تکرار بیولوژیک در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر مخلوط Sina Green × ۲HS-qPCR (فاقد ROX)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA و ۴ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز انجام شد. شرایط چرخه حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای بهینه به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. در پایان، منحنی ذوب جهت بررسی اختصاصیت محصولات تکثیر رسم شد (شکل ۲). ژن Actin به‌عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS

(نسخه ۹.۴) انجام شد. بیان نسبی ژن‌ها بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) پس از نرمال‌سازی نسبت به ژن مرجع محاسبه گردید. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شدند.

مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای توکی (Tukey's HSD) در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) انجام شد.



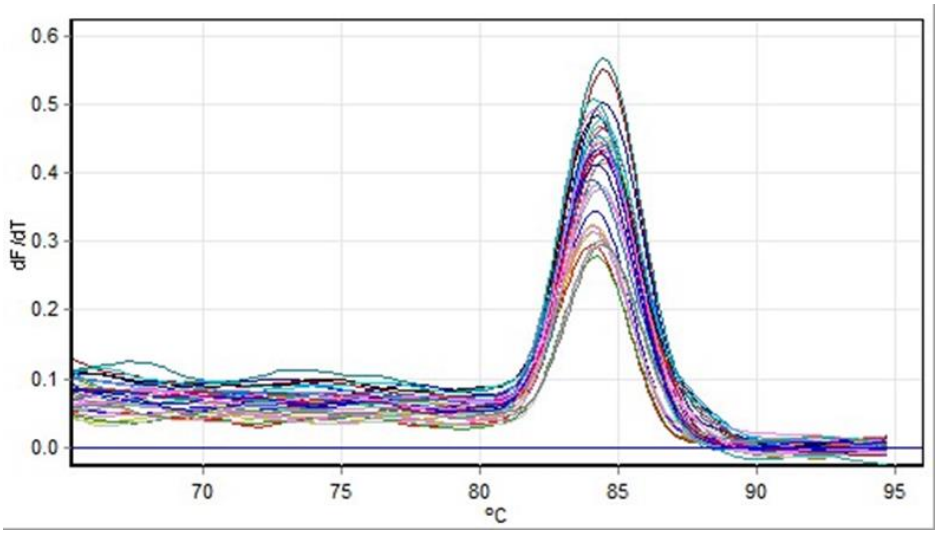
شکل ۱- نمونه‌ای از کیفیت RNA استخراج شده در این مطالعه (در تصویر، در تصویر چاهک‌های ۱، ۲ و ۴ به ترتیب مربوط به P14L2 و MO17 در زمان‌های مختلف و دارای سیگنال RNA هستند، هر سه چاهک دارای RNA ریبوزومی با الگوی مناسب؛ با مقدار قابل‌تشخیص و الگوی باندی واضح است.)

Figure 1. Representative gel electrophoresis image showing the quality of total RNA extracted in this study

جدول ۱- مشخصات و اطلاعات مربوط به آغازگرهای ژن مورد مطالعه

Table 1. Characteristics and details of the primers used for the studied genes

دمای اتصال (°C) Annealing temperature	توالی آغازگر (5′→3′) **Primer Sequence (5′→3′)**	شماره دسترسی Accession Number	نام ژن Gene name
59.80	F: GTAACATCCAGCCCTGAATCG R: GGAAAGGCAAATCAAGGACCG	Zm00001d043950	*Zm00001d043950*



شکل ۲- منحنی ذوب ژن *Zm00001d043950* مورد مطالعه در واکنش Real Time PCR. 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 2. Temperature melting curves of studied of *Zm00001d043950* gene in real-time PCR in *Zea mays* L. under 8 ds/m salt stress. In all curves, X-axis represents the temperature (℃) 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.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که تنش شوری موجب تغییرات معنی‌داری در برخی شاخص‌های کلیدی رشد، وضعیت فتوسنتزی و فنولوژی دو ژنوتیپ ذرت شد، اما شدت و الگوی این پاسخ‌ها بین ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. در شرایط نرمال، P14L2 و MO17 از نظر تعداد روز تا رسیدگی تفاوت معنی‌داری نداشتند و دوره رشد آن‌ها به‌ترتیب ۱۳۱/۶۷ و ۱۳۰/۳۳ روز بود. با اعمال تنش شوری، دوره رشد هر دو ژنوتیپ کاهش یافت، اما این کاهش در MO17بسیار شدیدتر بود؛ به‌طوری‌که DTM از ۱۳۰/۳۳ به ۷۱.۶۷ روز کاهش یافت، در حالی که P14L2 توانست ۸۳/۳۳ روز از دوره رشد خود را حفظ کند. این اختلاف تحت شوری معنی‌دار بود ($P = 0.0014$؛ (جدول ۲) و نشان می‌دهد که MO17 نسبت به P14L2 حساسیت فنولوژیک بیشتری به شوری داشته و زودتر وارد مرحله رسیدگی شده است. کوتاه شدن شدید دوره رشد در ژنوتیپ حساس می‌تواند فرصت تداوم فتوسنتز و انتقال آسیمیلات به دانه را محدود کند، در حالی که حفظ طول بیشتر دوره رشد در P14L2 امکان استمرار فعالیت منبع و پر شدن دانه را فراهم می‌کند. تفاوت فنولوژیک دو ژنوتیپ با وضعیت فتوسنتزی آن‌ها نیز همخوانی داشت. شاخص کلروفیل در شرایط نرمال در P14L2 برابر ۵۰/۱۳ و در MO17 برابر ۳۶/۰۹ بود و اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار بود ($P = 0.0465$؛ جدول ۲). تحت تنش شوری،

مقدار SPAD در P14L2 به ۴۱/۶۸ کاهش یافت، در حالی که در MO17 به ۲۹/۱۷ رسید؛ به‌طوری‌که اختلاف بین دو ژنوتیپ در این شرایط بسیار معنی‌دار بود (P = 0.0006؛ جدول ۲). بنابراین، P14L2 توانست بخش بیشتری از ظرفیت رنگیزه‌ای برگ خود را در شرایط شوری حفظ کند، در حالی که MO17 کاهش شدیدتری در شاخص کلروفیل نشان داد. از آنجا که کلروفیل برای جذب انرژی نوری و تداوم فتوسنتز ضروری است، حفظ نسبی آن می‌تواند یکی از مؤلفه‌های مهم پایداری فیزیولوژیک P14L2 تحت شوری باشد.

پایداری غشا نیز الگوی مشابهی را نشان داد. در شرایط شوری، نشت الکترولیت در P14L2 برابر ۳۱/۸۹٪ و در MO17برابر ۶۱/۳۳٪ بود؛ اگرچه اختلاف بین دو ژنوتیپ در این صفت در سطح ۵٪ به حد معنی‌داری نرسید (P = 0.0547؛ جدول ۲)، روند مشاهده‌شده نشان‌دهنده آسیب غشایی کمتر در P14L2 بود. نشت الکترولیت بیشتر معمولاً با افزایش آسیب غشایی و اختلال در یکپارچگی سلول‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی همراه است.

دمای کانوپی نیز تفاوت فیزیولوژیک دو ژنوتیپ را در شرایط نرمال نشان داد. دمای کانوپی P14L2 برابر ۲۵/۸۷ درجه سانتی‌گراد بود، در حالی که این مقدار در MO17به ۲۸/۶۳ درجه سانتی‌گراد رسید و اختلاف بین دو ژنوتیپ معنی‌دار بود (P = 0.0078؛ جدول ۲). دمای پایین‌تر کانوپی می‌تواند با فعالیت بیشتر تعرق و تبادل گازی تحت شرایط مطلوب مرتبط باشد و با وضعیت فتوسنتزی بهتر P14L2 همخوانی دارد. در شرایط تنش شوری، دمای کانوپی P14L2 و MO17 به‌ترتیب به ۲۸/۵۳ و ۲۷/۸۷ درجه سانتی‌گراد رسید و اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود (P = 0.5215؛ جدول ۲).

تفاوت در حفظ وضعیت فتوسنتزی و طول دوره رشد، در نهایت باید در عملکرد زیستی و عملکرد دانه منعکس شود؛ بااین‌حال، پاسخ عملکردی دو ژنوتیپ کاملاً مطابق با برتری فیزیولوژیک P14L2 نبود. وزن خشک بوته در شرایط نرمال در P14L2 برابر ۳۷۲ گرم و در MO17 برابر ۱۸۷/۳۳ گرم بود و اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار بود (P = 0.0271؛ جدول ۲). تحت شوری، وزن خشک در P14L2 به ۲۹۱/۳۳ و در MO17 ۲۱۲ گرم رسید و اختلاف ژنوتیپ‌ها معنی‌دار نبود (P = 0.2594؛ جدول ۲). بنابراین، اگرچه P14L2 از نظر زیست‌توده روند مطلوب‌تری داشت، شوری موجب کاهش این برتری شد.

در همین راستا، عملکرد دانه نیز تفاوت معنی‌داری بین دو ژنوتیپ تحت شوری نشان نداد. عملکرد P14L2 از ۵۰/۳۵ در شرایط نرمال به ۳۲/۸۵ تحت شوری کاهش یافت، در حالی که عملکرد MO17 از ۲۴/۳۲ به ۳۹/۵۵ رسید؛ با وجود این، اختلاف عملکرد دو ژنوتیپ در شرایط شوری معنی‌دار نبود (P = 0.6582؛ جدول ۲). این نتیجه اهمیت بررسی اجزای عملکرد را نشان می‌دهد، زیرا عملکرد نهایی تنها تابع ظرفیت فتوسنتزی و زیست‌توده نیست و می‌تواند تحت تأثیر ویژگی‌های ساختاری بلال و نحوه تخصیص منابع نیز قرار گیرد. در شرایط شوری، MO17 تعداد ردیف دانه بیشتری در بلال داشت (۱۵/۶۷ در برابر ۱۲/۶۷ ردیف در P14L2)، اگرچه این

اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P = 0.4334$). بنابراین، می‌توان مطرح کرد که تفاوت عددی در KRN ممکن است بخشی از کاهش ظرفیت منبع در MO17 را جبران کرده باشد؛ بااین‌حال، به دلیل نبود اختلاف معنی‌دار، این مکانیسم باید به‌عنوان یک احتمال تفسیری و نه یک نتیجه قطعی در نظر گرفته شود. و این صفتِ ساختاری به عنوان یک ضربه‌گیر عملکردی عمل کرده و مانع از افت شدید عملکرد دانه در این لاین حساس شده است (جدول ۲). در مجموع، داده‌های اگروفیزیولوژیک نشان دادند که تفاوت اصلی دو ژنوتیپ تحت شوری بیشتر در پایداری فرایندهای منبع و فنولوژی آشکار شد تا در عملکرد نهایی دانه. P14L2 با حفظ بیشتر کلروفیل، کاهش کمتر شاخص پایداری غشا و حفظ طولانی‌تر دوره رشد، الگوی فیزیولوژیک سازگارتری با شرایط شوری نشان داد. در مقابل، MO17 با کاهش شدیدتر شاخص کلروفیل و کوتاه شدن قابل توجه دوره رشد، نشانه‌های بیشتری از آسیب فیزیولوژیک و رسیدگی زودرس نشان داد. با وجود این، عدم تفاوت معنی‌دار در وزن خشک و عملکرد دانه بیانگر آن است که عملکرد نهایی تحت تأثیر مجموعه‌ای از فرآیندهای منبع، مخزن و تخصیص آسیمیلات قرار دارد و نمی‌توان تحمل شوری را بر اساس یک صفت منفرد ارزیابی کرد. بنابراین، صفاتی مانند پایداری کلروفیل و حفظ دوره رشد می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های فیزیولوژیک ارزشمند برای تفکیک پاسخ ژنوتیپ‌ها به شوری در نظر گرفته شوند، در حالی که تفسیر عملکرد دانه باید با توجه همزمان به ظرفیت منبع و اجزای عملکرد انجام گیرد.

در این مطالعه، تفاوت پاسخ فنولوژیک دو لاین به شوری نشان داد که تحمل به شوری در ذرت الزاماً از یک مسیر واحد پیروی نمی‌کند و می‌تواند حاصل ترکیبی از حفظ فرایندهای فیزیولوژیک و تعدیل زمان‌بندی رشد باشد. در شرایط نرمال، طول دوره رشد P14L2 و MO17 تفاوت معنی‌داری نداشت، اما تحت شوری، دوره رسیدگی MO17به‌طور معنی‌داری کوتاه‌تر شد، در حالی که P14L2بخش بیشتری از دوره رشد خود را حفظ کرد. این الگو را می‌توان نشانه‌ای از حساسیت بیشتر MO17 به اثرات شوری بر تداوم رشد و نمو دانست.

کوتاه شدن دوره رشد تحت شوری می‌تواند از پیامدهای فشار اسمزی و یونی و اختلال در رشد و نمو باشد. شوری با کاهش پتانسیل آب، محدود کردن جذب آب و عناصر غذایی و در ادامه ایجاد سمیت یونی و اختلالات متابولیکی، رشد و توسعه ذرت را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Li *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2024). در همین راستا، Farooq و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که شوری علاوه بر ایجاد فشار اسمزی و سمیت یونی، می‌تواند با کاهش رشد برگ، اختلال در فتوسنتز، تسریع پیری و تغییر تخصیص مواد فتوسنتزی، مسیر طبیعی رشد زایشی را تغییر دهد. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که پاسخ ذرت به شوری به‌شدت وابسته به ژنوتیپ است و ژنوتیپ‌های متحمل‌تر قادرند پیری برگ را به تأخیر

انداخته، دوره پر شدن دانه طولانی‌تری دارند و در نتیجه عملکرد پایدارتری در شرایط تنش تولید می‌کنند (Vennam *et al.*, 2024).

جدول ۲- میانگین، اشتباه استاندارد و آزمون تی برای صفات اندازه‌گیری شده در دو ژنوتیپ ذرت با واکنش متفاوت به تنش شوری (شرایط نرمال ۲ و شوری ۸ دسی زیمنس بر متر)

Table 2. Means, standard errors, and t-test values for traits measured in two maize genotypes with contrasting responses to salinity under normal (2 dS m^{-1}) and saline (8 dS m^{-1}) conditions

صفت Character	Abbreviate اختصار	Salinity (dS m^{-1}) سطح شوری	P14L2 میانگین Mean	P14L2 اشتباه استاندارد Std Error	MO17 میانگین Mean	MO17 اشتباه استاندارد Std Error	Pr > F	واریانس Variances	مقدار تی t Value	Pr > |t|
تعداد روز تا رسیدگی Days to maturity	DTM	2	131.67	1.67	130.33	0.33	0.0769	Equal	0.78	0.4766
		8	83.33	1.33	71.67	0.67	0.4	Equal	7.83	0.0014
دمای کانوپی Canopy temperature	CT	2	25.87	0.37	28.63	0.42	0.8826	Equal	4.95	0.0078
		8	28.53	0.93	27.87	0.2	0.0911	Equal	0.7	0.5215
شاخص کلروفیل (SPAD) Chlorophyll index (SPAD)	CHL	2	50.13	2.62	36.09	4.18	0.5626	Equal	2.85	0.0465
		8	41.68	0.74	29.17	1.03	0.6796	Equal	9.84	0.0006
نشت الکترولیت Electrolyte leakage	EL	2	60.78	1.14	46.69	8.16	0.0385	Unequal	1.71	0.2247
		8	31.89	5.94	61.33	9.2	0.588	Equal	2.69	0.0547
وزن خشک بوته Plant dry weight	PDW	2	372	12.7	187.33	52.72	0.1097	Equal	3.41	0.0271
		8	291.33	27.24	212	53.93	0.4065	Equal	1.31	0.2594
تعداد ردیف دانه در بلال (KRN) Kernel row number (KRN)	KRN	2	12.67	0.67	14	1.15	0.5	Equal	1	0.3739
		8	12.67	1.76	15.67	2.96	0.5234	Equal	0.87	0.4334
وزن صد دانه (HKW) 100-kernel weight	HKW	2	22.06	2.03	18.04	7.19	0.5262	Equal	0.29	0.7834
		8	18.54	2.52	16.97	2.13	0.2933	Equal	1.08	0.3411
عملکرد دانه (GY) Grain yield (GY)	GY	2	50.35	13.19	24.32	4.65	0.1478	Equal	0.54	0.6189
		8	32.85	3.27	39.55	13.05	0.8348	Equal	0.48	0.6582

تفاوت فنولوژیک مشاهده‌شده با وضعیت کلروفیل دو ژنوتیپ نیز هم‌راستا بود. در شرایط نرمال، شاخص کلروفیل P14L2 برابر ۵۰/۱۳ و در MO17 برابر ۳۶/۰۹ بود و این اختلاف معنی‌دار بود ($P = 0.0465$؛ جدول ۲) . تحت شوری، SPAD درP14L2 به ۴۱/۶۸ و در MO17 به ۲۹/۱۷رسید و اختلاف دو ژنوتیپ بسیار معنی‌دار بود ($P = 0.0006$). اگرچه مقدارSPAD نسبت به شرایط نرمال در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت، کاهش توصیفی آن در P14L2 حدود ۱۶/۹٪ و در MO17 حدود ۱۹/۲٪ بود. بنابراین، P14L2 نه‌تنها مقدار اولیه بالاتری از شاخص کلروفیل داشت، بلکه در شرایط شوری نیز مقدار مطلق بیشتری از آن را حفظ کرد. زیرا تجمع Na^+ وCl^-، اختلال در تعادل یونی و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به تخریب کلروفیل، آسیب به غشاهای تیلاکوئیدی و

کاهش ظرفیت فتوسنتزی منجر شوند؛ در نتیجه، کاهش کلروفیل یکی از نخستین پیامدهای آسیب اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های حساس به شوری است (Balasubramaniam *et al.*, 2023; Tammam *et al.*, 2023). در مقابل، ژنوتیپ‌های متحمل به دلیل برخورداری از سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی کارآمدتر، تنظیم بهتر هموستازی یونی و تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین، توانایی بیشتری در محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی و حفظ کلروفیل دارند؛ ازاین‌رو، محتوای کلروفیل به‌عنوان یکی از شاخص‌های بیوشیمیایی قابل اعتماد برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری معرفی شده است (Zamani *et al.*, 2024). بنابراین، برتری P14L2 از نظر شاخص کلروفیل را می‌توان به‌عنوان نشانه‌ای از پایداری بیشتر دستگاه فتوسنتزی در برابر شوری در نظر گرفت، نه صرفاً افزایش مقدار کلروفیل. در واقع، تفاوت در حفظ کلروفیل و فعالیت فتوسنتزی، تبیین‌کننده تفاوت فنولوژیک دو لاین نیز هست؛ زیرا تسریع پیری برگ در MO17 به بروز رسیدگی اجباری و کوتاه شدن دوره پر شدن دانه منجر شد، در حالی که تداوم فعالیت فتوسنتزی در P14L2 امکان حفظ روند طبیعی نمو و استمرار انتقال مواد فتوسنتزی به دانه را فراهم ساخت. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که ژنوتیپ‌هایی که قادر به حفظ فعالیت فتوسنتزی و تأخیر در پیری برگ هستند، معمولاً دوره پر شدن دانه طولانی‌تر و عملکرد پایدارتری در شرایط تنش دارند (Jian *et al.*, 2024; Niu *et al.*, 2024). الگوی دمای تاج پوشش نیز نشان داد که پاسخ دو لاین به شوری را نمی‌توان صرفاً بر اساس یک شاخص تبادلات گازی تفسیر کرد. در شرایط نرمال، دمای تاج پوشش P14L2پایین‌تر از MO17 بود، اما تحت شوری این اختلاف از بین رفت و تفاوت بین دو لاین معنی‌دار نبود. بنابراین، اگرچه دمای پایین‌تر تاج پوشش در شرایط نرمال می‌تواند با وضعیت آبی بهتر یا فعالیت تعرقی بیشتر سازگار باشد این تفسیر با مطالعات اخیر روی ذرت سازگار است که نشان داده‌اند کاهش هدایت روزنه‌ای و تعرق تحت شوری می‌تواند با افزایش دمای کانوپی همراه باشد (Vennam *et al.*, 2024).

تفاوت زیست‌توده خشک نیز نکته مهم دیگری را آشکار کرد. P14L2 در شرایط نرمال زیست‌توده خشک بیشتری داشت، اما تحت شوری اختلاف آن با MO17 معنی‌دار نبود. این الگو نشان می‌دهد که مزیت اولیه P14L2 از نظر رشد رویشی در محیط بدون تنش، در شرایط شوری تا حدی کاهش یافته است. بنابراین، تحمل فیزیولوژیک P14L2به معنای مصونیت کامل از کاهش رشد نیست؛ بلکه ممکن است به معنای کاهش شدت آسیب و حفظ نسبی عملکردهای حیاتی در مقایسه با ژنوتیپ حساس باشد. مطالعات گسترده روی ذرت نیز نشان داده‌اند که شوری می‌تواند به‌طور همزمان رشد، تجمع ماده خشک، رنگیزه‌های فتوسنتزی و تعادل یونی را تحت تأثیر قرار دهد و شدت این پاسخ‌ها بین ژنوتیپ‌ها متفاوت است (Gao *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2026).

با وجود برتری فیزیولوژیک P14L2، عملکرد دانه دو لاین تحت شوری اختلاف معنی‌داری نداشت. این یافته نشان می‌دهد که حفظ وضعیت فیزیولوژیک مطلوب الزاماً به عملکرد بالاتر منجر نمی‌شود، زیرا عملکرد نهایی ذرت حاصل تعامل ظرفیت منبع برای تولید آسیمیلات و ظرفیت مخزن برای دریافت و ذخیره آن است (Lee & Tollenaar, 2007). بنابراین، اگرچه P14L2 با حفظ بیشتر کلروفیل، پایداری نسبی غشا و تداوم رشد، ظرفیت منبع خود را بهتر حفظ کرد، این مزیت به افزایش معنی‌دار عملکرد دانه منجر نشد. محدودیت‌های مرحله تولیدمثلی، از جمله کاهش تشکیل یا بقای دانه و اختلال در انتقال آسیمیلات‌ها، می‌توانند موجب محدودشدن عملکرد تحت شوری شوند؛ به‌ویژه آنکه شوری با اختلال در انتقال قند به دانه و رشد مخزن همراه است (Gao *et al.*, 2024; Muhammad Farooq *et al.*, 2015).

اگرچه تعداد ردیف دانه در MO17 تحت شوری بیشتر بود، این اختلاف معنی‌دار نبود؛ بنابراین نمی‌توان آن را یک سازوکار جبرانی اثبات‌شده تلقی کرد. همچنین، نبود تفاوت معنی‌دار در وزن صد دانه نشان می‌دهد که تفاوت‌های فیزیولوژیک دو لاین به تفاوت مشخص در اندازه نهایی دانه منجر نشده است. در مجموع، این الگو بر اهمیت تعادل منبع–مخزن در تعیین عملکرد ذرت تحت شوری تأکید می‌کند، زیرا اثر حفظ ظرفیت فتوسنتزی تنها در صورت برخورداری مخزن از ظرفیت کافی برای استفاده از آسیمیلات‌ها می‌تواند به افزایش عملکرد منجر شود (Liao *et al.*, 2024).

در مجموع، P14L2 الگوی فیزیولوژیک سازگارتری با شوری نشان داد که با حفظ بیشتر کلروفیل، پایداری نسبی غشا و تداوم رشد همراه بود؛ بااین‌حال، این برتری به عملکرد بالاتر منجر نشد. بنابراین، تحمل شوری باید به‌عنوان صفتی چندجزئی و حاصل تعامل ظرفیت منبع، پایداری غشا، تنظیم فنولوژیک و ظرفیت مخزن در نظر گرفته شود. از دیدگاه اصلاحی، تلفیق شاخص‌های فیزیولوژیک و یونی با اجزای عملکرد می‌تواند نسبت به استفاده از یک صفت منفرد، معیار دقیق‌تری برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل فراهم کند (Iftikhar *et al.*, 2024; Zaidi *et al.*, 2022). با وجود این برتری‌های فیزیولوژیک، عملکرد دانه دو لاین اختلاف معنی‌داری نشان نداد که بیانگر پیچیدگی سازوکارهای تعیین‌کننده عملکرد در ذرت است. عملکرد نهایی حاصل برهم‌کنش میان ظرفیت منبع و ظرفیت مخزن بوده و کاهش یکی از این دو مؤلفه می‌تواند تا حدودی توسط دیگری جبران شود. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که در شرایط تنش، پایداری اجزای عملکرد، به‌ویژه ویژگی‌های ساختاری بلال، نقش مهمی در حفظ عملکرد ایفا می‌کند (Gao *et al.*, 2024). در پژوهش حاضر، اگرچه P14L2 از طریق حفظ کلروفیل، سلامت غشا و طولانی‌تر شدن دوره پر شدن دانه و تأخیر در پیری برگ استوار ظرفیت منبع را حفظ کرد، اما MO17 با برخورداری از تعداد بیشتر ردیف دانه در بلال، بخشی از کاهش اندازه دانه و افت فعالیت فتوسنتزی را جبران نمود. این جبران اجزای عملکرد احتمالاً موجب شد اختلاف فیزیولوژیک دو لاین

به اختلاف معنی‌دار در عملکرد دانه منجر نشود. از نظر زیستی، افزایش EL معمولاً با افزایش نفوذپذیری غشا و آسیب سلولی در اثر تنش اکسیداتیو و یونی همراه است. نشت الکترولیت شاخصی از اختلال در یکپارچگی غشا و افزایش نفوذپذیری سلولی است و افزایش آن معمولاً با آسیب اکسیداتیو و اختلال در ساختار غشا تحت شوری همراه است. در مطالعات مقایسه‌ای روی ژنوتیپ‌های ذرت نیز افزایش نشت الکترولیت در ژنوتیپ‌های حساس‌تر شدیدتر گزارش شده است (Gao *et al.*, 2016; Zamani *et al.*, 2024). بنابراین، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تحمل شوری در ذرت می‌تواند از دو مسیر مکمل حاصل شود؛ نخست، حفظ منبع از طریق سبزمانی گیاه، سلامت غشا و استمرار فتوسنتز، و دوم، حفظ ظرفیت مخزن از طریق صفات ساختاری بلال. ازاین‌رو، تلفیق این دو گروه صفت در برنامه‌های اصلاحی می‌تواند راهبرد مؤثرتری برای توسعه ارقام ذرت با عملکرد پایدار در شرایط شوری باشد (Chibane *et al.*, 2024; Khan *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023).

تجزیه واریانس بیان نسبی ژن *Zm00001d043950*

در تحلیل نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن *Zm00001d043950* نتایج نشان داد که اثر زمان بر بیان نسبی این ژن بسیار معنی‌دار بود ($P<0.0001$)، در حالی که اثر اصلی لاین معنی‌دار نبود، با این حال، برهم‌کنش زمان × لاین معنی‌دار بود ($P<0.01$؛ جدول ۳)، که نشان می‌دهد روند تغییرات بیان ژن در طول زمان در دو لاین یکسان نبود.

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان نسبی ژن *Zm00001d043950* تحت شرایط نرمال و تنش شوری در لاین‌های ذرت
Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the relative expression of the Zm00001d043950 gene under normal and salinity stress conditions in maize lines

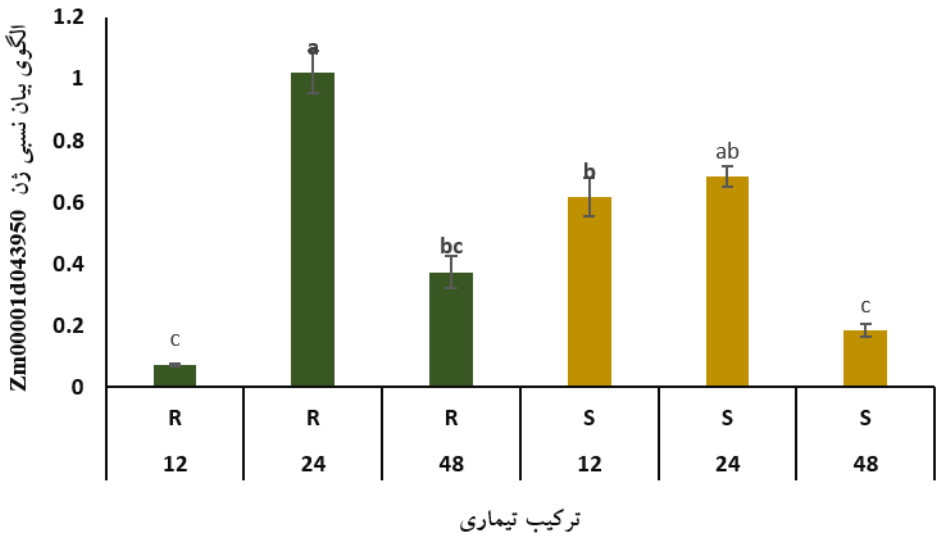
منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	Mean square *Zm00001d043950*
زمان Time	2	0.592***
لاین Line	1	0.0001ns
زمان × لاین Line × Time	2	0.334**
خطاي آزمايشي Experimental error	12	0.019
ضريب تغييرات Coefficient of variation		28.09

*** معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ و ns غیر معنی‌دار

*** indicate statistical significance at the p < 0.0001 probability level; ns, not significant.

الگوی بیان نسبی ژن *Zm00001d043950*

در بررسی الگوی بیان نسبی ژن *Zm00001d043950*، اثر زمان و برهم‌کنش زمان × لاین بر میزان بیان ژن معنی‌دار بود($P<0.0001$) ، که نشان داد تغییرات بیان ژن در طول زمان، در دو لاین ژنتیکی یکسان نبود. بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون Tukey در سطح احتمال ۱ درصد، در لاین مقاوم (R)، میزان بیان ژن از حدود ۰/۰۷ در ۱۲ ساعت به حدود ۱/۰۱ در ۲۴ ساعت افزایش یافت و در ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید. بیان ژن در ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری بیشتر از مقادیر ثبت‌شده در ۱۲ و ۴۸ ساعت بود، در حالی که بین ۱۲ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در لاین حساس (S)، میزان بیان ژن در ۱۲ و ۲۴ ساعت به‌ترتیب حدود ۰/۶۲ و ۰/۶۸ بود و بین این دو زمان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. با این حال، بیان ژن در ۴۸ ساعت به حدود ۰/۱۸ کاهش یافت که نسبت به هر دو زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری کمتر بود. بنابراین، در لاین حساس نیز بیشترین مقدار عددی بیان در ۲۴ ساعت مشاهده شد، اما این مقدار با ۱۲ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت. مقایسه دو لاین در هر زمان نشان داد که در ۱۲ ساعت، میزان بیان ژن در لاین حساس (S) به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاین مقاوم (R) بود. در ۲۴ ساعت، اگرچه میانگین بیان در لاین مقاوم بیشتر بود، تفاوت آن با لاین حساس از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین، در ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری بین دو لاین مشاهده نشد. در مجموع، بیشترین مقدار بیان ژن در لاین مقاوم در ۲۴ ساعت مشاهده شد و این مقدار با تمام ترکیب‌های زمانی × لاین، به‌جز S24، تفاوت معنی‌دار داشت. این نتایج نشان داد که الگوی بیان *Zm00001d043950* تحت تنش شوری به زمان نمونه‌برداری و زمینه ژنتیکی لاین وابسته بود (شکل ۳).



شکل ۳. الگوی بیان نسبی ژن *Zm00001d043950* در دو لاین مقاوم (R) و حساس (S) ذرت در ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری. میله‌های سبز و زرد به‌ترتیب نشان‌دهنده لاین مقاوم و حساس هستند. مقادیر با میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده‌اند. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون مقایسه میانگین Tukey در سطح احتمال ۱ درصد (P≤0.01) هستند.

Figure 3. Relative expression pattern of gene *Zm00001d043950* in two maize lines; resistant (R) and susceptible (S) at 12, 24, and 48 hours after salt stress treatment. Green and yellow bars represent the resistant and susceptible lines, respectively. Values are presented as mean ± standard error. Different letters indicate significant differences between means based on Tukey's mean comparison test at the 1% probability level (P≤0.01).

ژن *Zm00001d043950* در پایگاه‌های ژنومی رسمی ذرت (B73 reference genome) به‌عنوان یکی از ژن‌های ثبت‌شده در *MaizeGDB* و *JBrowse* است. داده‌های در دسترس از این منابع، شامل موقعیت ژنی، الگوهای بیان عمومی، و محل‌های اتصال فاکتورهای رونویسی[10]، نشان می‌دهند که این ژن در خوشه‌های هم‌بیانی مرتبط با مسیرهای پاسخ به تنش‌های محیطی و تنظیم هورمونی قرار دارد (jbrowse.maizegdb.org).

داده‌های RNA-seq از مطالعاتی که نمونه‌برداری در چندین بازه زمانی (از جمله ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بعد از چالش شوری انجام شده، نشان داده‌اند که این الگو با مکانیزم‌های کلاسیک پاسخ به تنش مطابقت دارد که در آن یک پاسخ سریع-میانی[11] فعال می‌شود تا سازوکارهای دفاعی و تنظیم اسمزی آغاز شوند و سپس با بازتنظیم همبسته کاهش می‌یابد. گزارش‌های قبلی در ذرت و گیاهان دیگر نشان می‌دهند که بسیاری از ژن‌های مرتبط با تنظیمات هورمونی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و

[10] TF ChIP peaks

[11] Early-induced

فاکتورهای رونویسی، همین الگوی «افزایش تا ۲۴h و کاهش بعدی» را نمایش می‌دهند (Niu *et al*., 2022; Zhang *et al*., 2023)؛ بنابراین رفتار *Zm00001d043950*با این تحلیل داده‌های بیان ژن از تیمارهای زمانی مختلف شوری (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) حاکی از آن است که *Zm00001d043950* الگویی سریع‌القایی دارد؛ به‌طوری‌که در مراحل اولیه‌ی تنش، بیان آن افزایش یافته و پس از ۲۴ ساعت به اوج می‌رسد، سپس در ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد. این الگو با پاسخ‌های کلاسیک ژن‌های دخیل در تنظیم اسمزی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و مسیرهای هورمونی (به‌ویژه ABA) مطابقت دارد (Niu *et al*., 2022).

تفاوت در الگوی بیان ژن میان ژنوتیپ‌ها می‌تواند ناشی از تغییر در عناصر تنظیمی سیس[۱۲] در ناحیه پروموتر و تغییر در تمایل اتصال[۱۳] فاکتورهای رونویسی، نوسان در پایداری ترنسکریپت‌ها[14] و یا تفاوت در شبکه تنظیم‌کننده‌های ترنس[۱۵] بالادستی، نظیر مسیرهای سیگنالینگ وابسته به ABA و کینازهای خانواده SnRKs باشد. شواهد حاصل از مطالعات ژنومیک و داده‌های ChIP-seq در ذرت نیز مؤید این مطلب است که تنوع در توزیع و فراوانی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی (TFBS) در نواحی پیرامونی ژن‌ها، از عوامل اصلی بروز تنوع بین-ژنوتیپی در سطوح رونویسی است. بر این اساس، مشاهده اوج بیان در زمان ۲۴ ساعت و متعاقب آن روند کاهشی پاسخ، کاملاً با مدل‌های مرجع در پاسخ به شوری و گزارش‌های ترنسکریپتومیکس در گیاه ذرت مطابقت دارد (jbrowse.maizegdb.org).

در مطالعه‌ای نشان دادند که تحمل به شوری در ذرت نتیجه‌ی تفاوت‌های مولکولی و تنظیمی بین ارقام متحمل و حساس است. رقم متحمل با پایداری فیزیولوژیکی بیشتر و تنظیم ویژه‌ی ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی (به‌ویژه خانواده‌هایAP2/ERF ، bZIP، MYB، WRKY) در برابر تنش شوری مقاومت می‌کند (Ji *et al*., 2025). از طرف دیگر پس از وقوع شوک اسمزی/یونیکی، مسیرهای حسگر و پیام‌رسانی (مثلاً مسیرهای وابسته بهCa^{2+}، ROS و هورمون ABA) ظرف ساعات اولیه فعال می‌شوند؛ تأثیر تنظیم بر رونویسی مجموعه‌ای از ژن‌ها معمولاً در چند ساعت بعد (پیک ~۱۲–۲۴h) آشکار می‌گردد، زمانی که هم پیام‌رسانی آغاز شده و هم ماشین‌آلات رونویسی ژن‌های پاسخ‌دهنده فعال شده است. مطالعات زمان-سری[۱۶] متعدد در گیاهان نشان می‌دهند که ۲۴ ساعت نقطه تکرارشونده‌ای است که تغییرات پایدارترِ رونویسی رخ می‌دهد (Nefissi Ouertani *et al*., 2021). همچنین آن دسته از ژن‌هایی که وظایف عملیاتی (مثل تولید آنزیم‌ها یا پروتئین‌های حامل یون) دارند، بعد از القای رونویسی باید زمان کافی برای ترجمه و تجمع پروتئینی داشته باشند؛ بنابراین اوج رونویسی در ۲۴h منطقی است چرا که فرصت کافی برای تولید پروتئین‌های مؤثر فراهم می‌آورد. این الگو در

[12] Cis-elements
[13] Binding affinity
[14] mRNA stability
[15] Trans-acting factors
[16] Time-series

مطالعات ترنسکریپتومی و پروتئومیکی متعددی دیده شده است (Wang *et al*., 2020).

بررسی ژن *Zm00001d043950* در ذرت نشان می‌دهد که این ژن به خانواده فاکتورهای رونویسی WRKY تعلق دارد. این دسته از فاکتورهای رونویسی نقش‌های مهمی در تنظیم پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. در مطالعه‌ای، ۱۴۰ پروتئین ZmWRKY در ذرت شناسایی شدند و بر اساس ویژگی‌های ساختاری و روابط فیلوژنتیکی به سه گروه اصلی تقسیم شدند که در فرآیندهای مختلفی مانند پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند (Hu *et al*., 2021). با توجه به مطالعات اخیر ژن *Zm00001d043950*، عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی ZmWRKY در ذرت، در تنظیم پاسخ‌های رشدی و تنش‌های محیطی، به‌ویژه شوری، نقش کلیدی دارد. این ژن روی کروموزوم ۳ (SNP: S3_210977671) قرار گرفته و در سازمان‌دهی برگ و خوشه دخیل است (Rice, 2021). در موتانت vp5، به‌عنوان ژن با بیان متفاوت در سنتز ABA شناسایی شد (Niu *et al*., 2022). در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن *Zm00001d043950* در لاین مقاوم به شوری در مقایسه با لاین حساس، نشان‌دهنده نقش تنظیمی آن در فعال‌سازی مسیرهای دفاعی مؤثر در برابر تنش شوری است. این یافته‌ها با مطالعات قبلی که نقش فاکتورهای WRKYدر پاسخ به تنش‌های محیطی را تأیید کرده‌اند، هم‌راستا هستند. برای نمونه، گزارش شده است که فاکتور رونویسی ZmWRKY29 تحت کنترل مستقیم ژن *ZmLSD1* در پاسخ به تنش شوری تنظیم می‌گردد (Li *et al*., 2024). همچنین، بیش بیان[17] ژن ZmWRKY106 در گیاهان تراریخت، منجر به بهبود هم‌زمان تحمل به تنش‌های خشکی و گرمایی شده است. این یافته‌ها حاکی از نقش کلیدی اعضای خانواده WRKYدر شبکه‌های تنظیمی ذرت و پتانسیل بالای آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی برای تحمل تنش‌های ترکیبی[18] می‌باشد (Wang *et al*., 2018). با توجه به این یافته‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که ژن *Zm00001d043950*، به‌عنوان یکی از اعضای خانواده WRKY، نقش مهمی در پاسخ به تنش شوری در ذرت ایفا می‌کند. این اطلاعات می‌تواند مبنایی برای تحقیقات بیشتر در زمینه به‌نژادی و بهبود مقاومت به تنش شوری در ذرت باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که دو لاین ذرت P14L2و MO17 در پاسخ به تنش شوری ۸ $dS\ m^{-1}$ از نظر برخی صفات فیزیولوژیک و فنولوژیک تفاوت مشخصی داشتند. حفظ نسبی شاخص کلروفیل، کاهش نشت الکترولیت و تداوم بیشتر دوره رشد در P14L2 نشان داد که این لاین توانایی بیشتری در حفظ وضعیت فیزیولوژیک و تأخیر در پیری تحت تنش شوری دارد. با این حال، این برتری فیزیولوژیک به تفاوت معنی‌دار در

[17] Overexpression
[18] Combined stresses

عملکرد دانه منجر نشد و عملکرد نهایی دو لاین تحت تنش اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. این یافته نشان می‌دهد که عملکرد دانه حاصل برهم‌کنش پیچیده میان صفات منبع، ظرفیت مخزن و اجزای عملکرد است و ارزیابی تحمل شوری نباید صرفاً بر اساس یک صفت منفرد انجام شود. از نظر مولکولی، الگوی بیان *Zm00001d043950* نشان‌دهنده پاسخ وابسته به زمان این ژن به تنش شوری بود و افزایش بیان آن در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش، همراه با تغییر الگوی بیان در دو پس‌زمینه ژنتیکی، این ژن را به‌عنوان یک ژن کاندید قابل توجه برای بررسی بیشتر در پاسخ ذرت به شوری معرفی می‌کند. با این حال، از آنجا که مطالعه حاضر تنها بر دو لاین و در شرایط گلخانه‌ای انجام شد، نمی‌توان بر اساس نتایج فعلی نقش *Zm00001d043950* را به‌عنوان یک نشانگر مولکولی قطعی تحمل شوری یا کاربرد مستقیم آن در انتخاب به کمک نشانگر اثبات کرد. اعتبارسنجی این ژن در مجموعه وسیع‌تری از ژنوتیپ‌ها، جمعیت‌های تفکیک‌شونده و شرایط محیطی مختلف، همراه با بررسی ارتباط سطح بیان یا آلل‌های ژن با صفات تحمل شوری، برای تعیین ارزش اصلاحی آن ضروری است. همچنین، بررسی عملکرد ژن از طریق مطالعات بیش‌بیانی، خاموش‌سازی یا ویرایش ژن می‌تواند در آینده به روشن‌شدن نقش مستقیم آن در تنظیم پاسخ به شوری کمک کند. بنابراین، اهداف مطالعه حاضر، شامل مقایسه پاسخ‌های اگروفیزیولوژیک دو لاین متضاد و بررسی الگوی زمانی بیان *Zm00001d043950* ، محقق شد؛ با این حال، نتایج باید به‌عنوان شواهد اولیه برای معرفی این ژن به‌عنوان یک ژن کاندید تفسیر شوند و نه به‌عنوان اثبات قطعی عملکرد آن در تحمل شوری.

References

Abendroth, L., Elmore, R., Boyer, M. & Marlay, S. 2011. Corn growth and development (PMR 1009). Iowa State University Extension, Ames, Iowa.

Akram, M., Ashraf, M. Y., Jamil, M., Iqbal, R. M., Nafees, M. & Khan, M. A. 2011. Nitrogen application improves gas exchange characteristics and chlorophyll fluorescence in maize hybrids under salinity conditions. Russian Journal of Plant Physiology, 58, 394–401.

Arzangh, S., Darvishzadeh, R. & Alipour, H. 2021. Evaluation of genetic diversity of maize lines (*Zea mays* L.) under normal and salinity stress conditions. Cereal Research, 11(3), 243–268.

Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmaeili, N. & Zhang, H. 2023. Plants' response mechanisms to salinity stress. Plants, 12(12), 2253.

Cao, Y., Liang, X., Yin, P., Zhang, M. & Jiang, C. 2019. A domestication-associated reduction in K+-preferring HKT transporter activity underlies maize shoot K+ accumulation and salt tolerance. New Phytologist, 222(1), 301-317.

Cao, Y., Wang, Y. & Jiang, C. 2021. 14 Recent Advancement of Molecular Understanding for Combating Salinity Stress in Maize. Molecular Breeding in Wheat, Maize and Sorghum: Strategies for Improving Abiotic Stress Tolerance and Yield, 247.

Chattha, M. U., Khan, M. A., Khan, I., Mahmood, A., Chattha, M. B., Hassan, M. U., Soufan, W., Okla, M., Kumari, A. & Ratnasekera, D. 2023. Comparison of physio-biochemical and antioxidant enzymes in maize during early growth stage in response to salt stress. Pak. J. Bot, 55(6), 1991–1997.

Chibane, N., Revilla, P., Yannam, V. R. R., Marcet, P., Covelo, E. F. & Ordás, B. 2024. Impact of irrigation, nitrogen fertilization, and plant density on stay-green and its effects on agronomic traits in maize. Frontiers in Plant Science, 15, 1399072.

Du, X., Wang, G., Ji, J., Shi, L., Guan, C. & Jin, C. 2017. Comparative transcriptome analysis of transcription factors in different maize varieties under salt stress conditions. Plant Growth Regulation, 81, 183–195.

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.

Gao, J., Liu, N., Wang, X., Niu, Z., Liao, Q., Ding, R., Du, T., Kang, S. & Tong, L. 2024. Maintaining grain number by reducing grain abortion is the key to improve water use efficiency of maize under deficit irrigation and salt stress. Agricultural Water Management, 294, 108727.

Gao, Y., Lu, Y., Wu, M., Liang, E., Li, Y., Zhang, D., Yin, Z., Ren, X., Dai, Y. & Deng, D. 2016. Ability to remove Na+ and retain K+ correlates with salt tolerance in two maize inbred lines seedlings. Frontiers in Plant Science, 7, 1716.

García-Lara, S. & Serna-Saldivar, S. O. 2019. Corn history and culture. Corn, 1–18.

Hasan, M. K., El-Sabagh, A., Sikdar, M. S. I., Alam, M. J., Ratnasekera, D., Barutcular, C., Abdelaal, K. A. A. & Islam, M. S. 2017. Comparative adaptable agronomic traits of blackgram and mungbean for saline lands.

Hu, W., Ren, Q., Chen, Y., Xu, G. & Qian, Y. 2021. Genome-wide identification and analysis of WRKY gene family in maize provide insights into regulatory network in response to abiotic stresses. BMC Plant Biology, 21, 1–21.

Iftikhar, N., Perveen, S., Ali, B., Saleem, M. H. & Al-Sadoon, M. K. 2024. Physiological and biochemical responses of maize (*Zea mays* L.) cultivars under salinity stress. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 48(3), 332–343.

Ji, M., Xu, S., Ma, Z., Xiao, C., Xu, J., Zhu, Y., Cai, R. & Bo, C. 2025. Maize leaves salt-responsive genes revealed by comparative transcriptome of salt-tolerant and salt-sensitive cultivars during the seedling stage. PeerJ, 13, e19268.

Jian, H., Gao, Z., Guo, Y., Xu, X., Li, X., Yu, M., Liu, G., Bian, D., Cui, Y. & Du, X. 2024. Supplemental irrigation mitigates yield loss of maize through reducing canopy temperature under heat stress. Agricultural Water Management, 299, 108888.

Khan, R., Gao, F., Khan, K., Shah, M. A., Ahmad, H., Fan, Z. P. & Zhou, X. B. 2024. Evaluation of maize varieties via multivariate analysis: Roles of ionome, antioxidants, and autophagy in salt tolerance. Plant Physiology, 196(1), 195–209.

Kimotho, R. N., Baillo, E. H. & Zhang, Z. 2019. Transcription factors involved in abiotic stress responses in Maize *Zea mays* L. and their roles in enhanced productivity in the post genomics era. PeerJ, 7, e7211.

Lee, E. A. & Tollenaar, M. 2007. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. Crop Science, 47, S-202.

Li, J., Zhu, Q., Jiao, F., Yan, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Ding, Z., Mu, C., Liu, X. & Li, Y. 2023. Research progress on the mechanism of salt tolerance in maize: a classic field that needs new efforts. Plants, 12(12), 2356.

Li, W., Pang, S., Lu, Z. & Jin, B. 2020. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants. Plants, 9(11), 1515.

Li, Y., Xu, Z., Lin, Y., Wang, S., Wang, B., Liu, J., Bao, H., Gao, J. & Yu, X. 2026. Comprehensive assessment of salt tolerance in nine spring maize hybrids across the entire growth period. Frontiers in Plant Science, 17, 1871695.

Liang, X., Liu, S., Wang, T., Li, F., Cheng, J., Lai, J., Qin, F., Li, Z., Wang, X. & Jiang, C. 2021. Metabolomics-driven gene mining and genetic improvement of tolerance to salt-induced osmotic stress in maize. New Phytologist, 230(6), 2355–2370.

Liao, Q., Ding, R., Du, T., Kang, S., Tong, L., Gu, S., Gao, S. & Gao, J. 2024. Stomatal conductance modulates maize yield through water use and yield components under salinity stress. Agricultural Water Management, 294, 108717.

Liu, C., Mao, B., Yuan, D., Chu, C. & Duan, M. 2022. Salt tolerance in rice: Physiological responses and molecular mechanisms. The Crop Journal, 10(1), 13–25.

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.

Medeiros, D. B., Brotman, Y. & Fernie, A. R. 2021. The utility of metabolomics as a tool to inform maize biology. Plant Communications, 2(4).

Muhammad Farooq, M. F., Mubshar Hussain, M. H., Abdul Wakeel, A. W. & Siddique, K. H. M. (2015). Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review.

Nefissi Ouertani, R., Arasappan, D., Abid, G., Ben Chikha, M., Jardak, R., Mahmoudi, H., Mejri, S., Ghorbel, A., Ruhlman, T. A. & Jansen, R. K. 2021. Transcriptomic analysis of salt-stress-responsive genes in barley roots and leaves. International Journal of Molecular Sciences, 22(15), 8155.

Niu, G., Xu, W., Rodriguez, D. & Sun, Y. 2012. Growth and physiological responses of maize and sorghum genotypes to salt stress. International Scholarly Research Notices, 2012(1), 145072.

Niu, L., Du, C., Wang, W., Zhang, M., Wang, W., Liu, H., Zhang, J. & Wu, X. 2022. Transcriptome and co-expression network analyses of key genes and pathways associated with differential abscisic acid accumulation during maize seed maturation. BMC Plant Biology, 22(1), 359.

Niu, S., Yu, L., Li, J., Qu, L., Wang, Z., Li, G., Guo, J. & Lu, D. 2024. Effect of high temperature on maize yield and grain components: A meta-analysis. Science of The Total Environment, 952, 175898.

Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E. & Domínguez-Perles, R. 2016. Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of Moringa oleifera Lam. Industrial Crops and Products, 83, 166–176.

Omoto, E., Taniguchi, M. & Miyake, H. 2012. Adaptation responses in C4 photosynthesis of maize under salinity. Journal of Plant Physiology, 169(5), 469–477.

Qu, M., Huang, X., García-Caparrós, P., Shabala, L., Fuglsang, A. T., Yu, M. & Shabala, S. 2024. Understanding the role of boron in plant adaptation to soil salinity. Physiologia Plantarum, 176(3), e14358.

Schubert, S., Neubert, A., Schierholt, A., Sümer, A. & Zörb, C. 2009. Development of salt-resistant maize hybrids: the combination of physiological strategies using conventional breeding methods. Plant Science, 177(3), 196–202.

Serna-Saldivar, S. O. (2016). Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes. CRC press.

Tammam, A., El-Aggan, W., Helaly, A., Badr, G. & El-Dakak, R. 2023. Proteomics and photosynthetic apparatus response to vermicompost attenuation of salinity stress Vicia faba leaves. Acta Physiologiae Plantarum, 45(1), 17.

Vennam, R. R., Bheemanahalli, R., Reddy, K. R., Dhillon, J., Zhang, X. & Adeli, A. 2024. Early-season maize responses to salt stress: Morpho-physiological, leaf reflectance, and mineral composition. Journal of Agriculture and Food Research, 15, 100994.

Wang, C.-T., Ru, J.-N., Liu, Y.-W., Li, M., Zhao, D., Yang, J.-F., Fu, J.-D. & Xu, Z.-S. 2018. Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants. International Journal of Molecular Sciences, 19(10), 3046.

Wang, D., Lu, X., Chen, X., Wang, S., Wang, J., Guo, L., Yin, Z., Chen, Q. & Ye, W. 2020. Temporal salt stress-induced transcriptome alterations and regulatory mechanisms revealed by PacBio long-reads RNA sequencing in Gossypium hirsutum. BMC Genomics, 21(1), 838.

Yang, Y. & Guo, Y. 2018. Unraveling salt stress signaling in plants. Journal of Integrative Plant Biology, 60(9), 796–804.

Zaidi, P. H., Shahid, M., Seetharam, K. & Vinayan, M. T. 2022. Genomic regions associated with salinity stress tolerance in tropical maize (*Zea Mays* L.). Frontiers in Plant Science, 13, 869270.

Zamani, E., Bakhtari, B., Razi, H., Hildebrand, D., Moghadam, A. & Alemzadeh, A. 2024. Comparative morphological, physiological, and biochemical traits in sensitive and tolerant maize genotypes in response to salinity and Pb stress. Scientific Reports, 14(1), 31036.

Zhang, C., Chen, B., Zhang, P., Han, Q., Zhao, G. & Zhao, F. 2023. Comparative transcriptome analysis reveals the underlying response mechanism to salt stress in maize seedling roots. Metabolites, 13(11), 1155.