

«مقاله پژوهشی»

بررسی و مقایسه پروتئوم برگ در ذرت (*Zea mays L.*) تحت تنش شوریمرجان جنت دوست^۱، رضا درویش زاده^{۲*}، ستار طهماسبی انفرادی^۳، مریم منزله^۴

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳. دانشیار، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۴. دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۴)

Study and comparison of leaf proteome in maize (*Zea mays L.*) under salt stressMarjan Jannatdoust¹, Reza Darvishzadeh², Sattar Tahmasebi Enferadi³ and Maryam Monazzah⁴

1. Ph.D. Candidate in Plant Genetic and Breeding, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

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

3. Associate Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

4. Ph.D. in Plant Pathology, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran.

(Received: May 9, 2021 - Accepted: Sep. 15, 2021)

Abstract

Salinity is a major abiotic stress that limits the growth and productivity of plants in many parts of the world due to increased use of poor-quality water for irrigation and soil salinity. Plant adaptation or tolerance to salinity stress involves alteration in physiological processes and metabolic pathways and activating molecular or gene networks. In this study, 2DE technique was used to identify proteins responsive to salinity stress in maize. Two maize lines with different responses to salinity stress; R10 (tolerant) and S46 (sensitive) were selected. In the eight-leaf stage, salinity stress treatment of 8 dS/m was applied to plants for 20 days and then leaf proteins were extracted. Spots with more than a 1.5-fold increase or decrease in their expression were isolated and sequenced by mass spectrometry. Functional classification of protein spots per line after MS/MS revealed that the differentially expressed proteins have different metabolic activities. In the tolerant line (R10), 5 spots including Pyruvate orthophosphate dikinase proteins, ATP synthase subunit beta, Germin-like protein, Chlorophyll a-b binding protein, Triosephosphate isomerase, and 40S ribosomal protein, respectively showed an increased expression level. Moreover, in the sensitive line (S46), one spot showed an increased expression level that related to Proteasome subunit beta proteins, and two spots including Chlorophyll a-b binding protein and Ribulose biphosphate carboxylase small chain protein showed a decreased expression level. The proteins identified in this study and the possible related biochemical pathways provide new information on the response of maize lines (R10 and S46) to salinity stress.

Keywords: Maize, salt stress-responsive proteins, salt tolerance, two-dimensional electrophoresis.

چکیده

شوری یک تنش اصلی غیر زیستی محدودکننده رشد و بهره‌وری گیاهان در بسیاری از مناطق جهان است که به دلیل افزایش استفاده از آب بی‌کیفیت برای آبیاری و شوری خاک ایجاد می‌شود. سازگاری یا تحمل گیاه به تنش شوری شامل تغییر فرآیندهای فیزیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی و فعال‌سازی شبکه‌های مولکولی یا ژنی است. در این مطالعه از الکتروفوروز دو بعدی برای شناسایی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در ذرت استفاده شد. دو لاین ذرت با واکنش متفاوت به تنش شوری R10 (متحمل) و S46 (حساس) انتخاب شدند. در مرحله هشت برگی، تیمار شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر بر گیاهان به مدت ۲۰ روز اعمال شد و سپس پروتئین‌های برگ، استخراج گردید. لکه‌هایی با بیش از ۱/۵ برابر افزایش یا کاهش بیان جدا گردیدند و توسط دستگاه طیف‌سنجی جرمی شناسایی و تعیین توالی شدند. طبقه‌بندی عملکردی لکه‌های پروتئینی هر لاین بعد از MS/MS نشان داد که پروتئین‌های متفاوت بیان شده دارای فعالیت‌های متابولیکی مختلفی هستند. در لاین متحمل R10 تعداد پنج لکه افزایش بیان نشان داد که شامل پروتئین‌های Pyruvate orthophosphate dikinase، ATP synthase subunit beta، Germin-like protein، Chlorophyll a-b binding protein، Triosephosphate isomerase و 40S ribosomal protein می‌باشند. همچنین در لاین حساس S46 یک لکه افزایش بیان نشان داد که شامل پروتئین Proteasome subunit beta می‌باشد و دو لکه کاهش بیان نشان دادند که شامل پروتئین‌های Ribulose biphosphate carboxylase small chain و Chlorophyll a-b binding protein می‌باشند. پروتئین‌های شناسایی شده در این مطالعه و مسیرهای بیوشیمیایی احتمالی مرتبط، اطلاعات جدیدی را در پاسخ لاین‌های ذرت (R10 و S46) به تنش شوری ارائه می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: الکتروفوروز دو بعدی، پروتئین‌های پاسخگو به تنش شوری، تحمل شوری، ذرت.

مقدمه

گیاهان عالی^۱ بسته به مسیر جذب کربن در فتوسنتز به دو گروه C₃ و C₄ تقسیم می‌شوند. گیاهان C₄ شامل محصولات مهم اقتصادی مانند ذرت، سورگوم و نیشکر هستند (Broglie et al., 1984). ذرت با نام علمی *Zea mays* L. گیاهی دیپلوئید با 2n= 20 کروموزوم، یک‌ساله و دگرگشن می‌باشد (Ghafari Azar et al., 2019). این گیاه از لحاظ تولید در رتبه سوم اهمیت پس از گندم و برنج می‌باشد و در سراسر جهان در طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی رشد می‌کند (Carpici et al., 2009). براساس آمارنامه کشاورزی در سال ۹۸-۱۳۹۷، بیشترین میزان تولید آبی از بین محصولات زراعی مربوط به ذرت علوفه‌ای با تولید حدود ۱۱/۶ میلیون تن و سهم ۱۵/۵ درصد از کل میزان تولید محصولات زراعی بوده است (Ahmadi et al., 2020). بر طبق گزارش FAO در سال ۲۰۱۷، سطح زیر کشت ذرت در دنیا حدود ۱۹۷ میلیون هکتار و متوسط تولید محصول آن حدود ۵/۷ تن در هکتار بوده است. ذرت یک منبع مهم برای تغذیه حیوانات، تهیه روغن پخت و پز و سوخت زیستی^۲ است (Yan et al., 2011).

غلظت بالای NaCl بر فیزیولوژی و متابولیسم گیاه در سطوح مختلف تأثیر می‌گذارد. غلظت‌های بالای نمک باعث کمبود آب (تنش اسمزی)، سمیت یونی (تنش یونی)، عدم تعادل مواد مغذی و تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر^۳ (تنش اکسیداتیو) (Munns and Tester, 2008; Passamani et al., 2017) می‌شود که نتیجه آن کاهش فتوسنتز، تنفس و سنتز پروتئین (Meloni et al., 2003; Ashraf and Foolad, 2007; Tuteja et al., 2012) و نیز کاهش رشد و توسعه و عملکرد و حتی مرگ در گونه‌های حساس است (Xiong et al., 2017).

(2017). ذرت گیاهی نسبتاً حساس به شوری است (Zörb et al., 2004) و شوری آستانه عصاره اشباع خاک برای کاهش عملکرد نسبی آن ۱/۷ دسی‌زیمنس بر متر گزارش شده است (Mass, 1986). با افزایش شوری عصاره اشباع خاک نسبت به سطح شوری آستانه، عملکرد نسبی گیاه کاهش می‌یابد (Zörb et al., 2019). حساسیت ذرت به شوری با تجمع بیشتر Na⁺ در برگ‌ها همراه است (Fortmeier and Schubert, 1995; Farooq et al., 2015). شرایط تنش شوری، تولید گیاهچه‌های سالم برای رشد بعدی گیاه بسیار مهم است (Cui et al., 2015).

تنش شوری موجب القای پاسخ‌های بسیاری در گیاهان از جمله تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می‌شود (Ambede et al., 2012; Abreu et al., 2013; Abd Elgawad et al., 2016). پذیرفته شده است که تجمع املاح سازگار در گیاهان به طور اساسی به سازگاری سلول‌ها با تنش‌های محیطی کمک می‌کند. املاح سازگار شامل پلیول‌ها^۴، قندها، آمینواسیدها، بتائین‌ها و ترکیبات مربوطه هستند (Sakamoto and Murata, 2002). همچنین پروتئین‌های مرتبط با انتقال یون، سنتز یا تجزیه پروتئین و انتقال پیام در پاسخ به تنش شوری در گیاهان زراعی، به عنوان نمونه در برنج (*Oryza sativa* L.) (Yan et al., 2005)، گندم دورم (*Triticum durum* L.) (Capriotti et al., 2014) و چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) (Wakeel et al., 2011) شناسایی شده‌اند (Passamani et al., 2017).

در گیاهان تحت تنش‌های غیرزیستی مانند تنش شوری، تغییرات قابل توجهی در بیان پروتئین اتفاق می‌افتد. شناسایی تغییرات در سطح پروتئین‌ها تحت

1. Higher plants
2. Biofuel
3. Reactive Oxygen Species (ROS)

4. Polyols

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور دو لاین متحمل (R10; P14L2) و حساس (S46; Mo17) به شوری در ذرت (Ebrahimipour *et al.*, 2020) به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی (فاکتور اول شامل دو لاین ذرت و فاکتور دوم شامل دو سطح شوری؛ صفر و ۸ دسی‌زیمنس بر متر (Ebrahimipour *et al.*, 2020)) با سه تکرار در شرایط کنترل شده (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، میانگین دمای 26 ± 6 درجه سانتی‌گراد و میانگین رطوبت ۴۷ درصد (Zahoor *et al.*, 2011)) کشت شد. در مرحله هشت برگی، شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر (Ebrahimipour *et al.*, 2020) بر گیاهان به مدت ۲۰ روز اعمال شد (شکل ۱) و برگ گیاهان برای ارزیابی‌های پروتئومی بلافاصله به فریزر با دمای -80 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های پروتئین و بررسی‌های کمی به‌منظور استخراج پروتئین از بافت برگ، از روش Görg و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییر استفاده شد. به هر نمونه استون^۳ حاوی تری‌کلرواستیک‌اسید^۴ ۱۰ درصد (w/v)^۵ و ۰/۰۷ درصد DTT (w/v)^۶ افزوده شد (Niu *et al.*, 2018) و جهت رسوب‌دهی بیشتر به مدت یک شب^۷ در فریزر -20 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه^۸ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی^۹ حاصل دور ریخته شده و رسوب

تنش شوری از این رو یک رویکرد بسیار مهم برای درک مکانیسم مولکولی پاسخ به شوری است. پروتئومیکس گیاهی یک فناوری مناسب برای مطالعه جامع پروتئین‌های گیاهی است.

پروتئومیکس یک ابزار قدرتمند برای تفکیک مجموعه پروتئین‌ها است و برای تجزیه تغییرات پروتئین در پاسخ به تغییرات محیطی استفاده می‌شود (Zang and Komatsu, 2007; Witzel *et al.*, Hossain *et al.*, 2013; Perez- 2009; *al.*, 2013; Ahmad *et al.*, Clemente *et al.*, 2016).

به‌واسطه عملکرد مؤثر پروتئین‌ها در تحمل شوری در گیاهان، پروتئومیکس و شناسایی پروتئین‌ها تحت تنش شوری موضوع مهمی از مطالعات در حوزه علوم زیستی هستند (Kosová *et al.*, 2013). دانشمندان حوزه پروتئومیکس با تعیین، شناسایی، بررسی بیان و تغییرات پس از ترجمه^۱ و تعاملات پروتئین- پروتئین تحت شرایط تنش و بدون تنش سر و کار دارند (Hashiguchi *et al.*, 2010; Nam *et al.*, 2012; Mertins *et al.*, 2013; Ghosh and Xu, 2014; Ahmad *et al.*, 2016). پروتئومیکس مبنی بر طیف‌سنجی جرمی^۲ ابزاری قدرتمند برای شناسایی، کمی‌سازی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها در نمونه‌های پیچیده بیولوژیکی می‌باشد (Bensimon *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018a). در این مطالعه تغییرات پروتئوم برگ و تغییرات میزان بیان در دو لاین حساس و متحمل به تنش شوری ذرت بررسی شده است. نتایج تحقیق می‌تواند در زمینه توسعه ارقام هیبرید مقاوم به شوری مفید باشد.

3. Acetone

4. Trichloro acetic acid (TCA)

5. Percent of weight of solution in the total volume of solution. Percent here is the number of grams of solute in 100 mL of solution

6. Dithiothreitol

7. Overnight

8. Rounds per minute (rpm)

9. Supernatant

1. Post-translational modifications (PTMs)

2. Mass spectrometry (MS)

انجام شد. در بُعد اول (IEF)^۴، از استریپ‌های IPG^۵ به طول ۷ سانتی‌متر استفاده شد که دامنه Pi آن در محدوده بین ۴ تا ۷ بود. جهت ورود پروتئین‌ها به ژل، در ابتدا رهیدراسیون^۶ استریپ‌های نواری خشک انجام شد. نوارهای IPG در دمای اتاق و به مدت ۱۶ ساعت در محلول رهیدراسیون (8 M Urea; 2 M Thiourea; 50 mM DTT; 4% CHAPS; 0.001% Bromophenol Blue; 0.2% ampholyte) که حاوی ۱۲۵ میکروگرم پروتئین است، قرار گرفتند. با آماده‌سازی ژل بُعد دوم، ژل بُعد اول در دو مرحله در محلول متعادل‌کننده^۷ (0.05 M Tris-HCl, pH= 8.8; 1% DTT; 6 M Urea; 4% SDS; 30% Glycerol; 0.002% Bromophenol Blue) قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌ها با استفاده از دانسیومتر GE Healthcare اسکن شده و به فرمت TIFF ذخیره شدند.

تجزیه ژل‌ها با نرم‌افزار Image Master 6.02

با استفاده از نرم‌افزار ملانی Image Master 6.02 (GeneBio, Geneva, Switzerland) (Appel *et al.*, 1988)، بررسی کمی و کیفی لکه‌های پروتئینی حاصل از نمونه‌های مورد مطالعه انجام گرفت. در این مطالعه درصد حجمی لکه‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. لکه‌های پروتئینی که تفاوت معنی‌دار آن‌ها نسبت به شاهد با آماره t-Student در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) محرز شدند، انتخاب و هر یک جداگانه در میکروتیوپ‌های استریل قرار داده شد و سپس جهت شناسایی و تعیین توالی از طریق شرکت کاوش کلون (Ekbatan, Tehran, Iran) با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جرمی (MALDI-TOF/TOF)^۸ به دانشگاه یورک کانادا^۹ فرستاده شد.

پروتئینی چهار بار با استون سرد حاوی ۰/۰۷ درصد DTT (w/v) شستشو و تعلیق شد. سپس هر رسوب به‌طور کامل خشک شده و به هر یک ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده^۱ (8 M Urea, 2 M Thiourea, 20 mM Tris Hydrochloride, pH=7.6, 4% CHAPS and 1 mM PMSF) اضافه گردید. سپس تیوپ‌ها سانتریفیوژ شدند و مایع‌رویی (سوپرناتانت) حاوی عصاره پروتئینی به تیوپ‌های جدید برای نگهداری در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌های مورد مطالعه از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد.

SDS-PAGE

مقدار غلظت پروتئین‌های استخراج‌شده بر طبق معادله خط آزمون برادفورد تعیین شد. برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی آن‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد و یک نشانگر وزن مولکولی (Sinaclon # PR901641) که به صورت آماده خریداری شده و در محدوده بین ۹ تا ۲۳۵ کیلودالتون بود، به میزان ۴ میکرولیتر در اولین چاهک تزریق شد (شکل ۲). غلظت پروتئین ران شده در هر چاهک، ۲۰ میکروگرم بود. برای آشکارسازی نوارهای پروتئینی نمونه‌های مورد مطالعه، رنگ‌آمیزی ژل صورت گرفت. ژل‌ها با محلول رنگ‌آمیزی حاوی کوماسی آبی^۳ R250 رنگ‌آمیزی شدند و سپس ژل‌ها در محلول رنگ‌بری (۲۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک خالص و ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) قرار گرفتند تا اینکه رنگ زمینه از بین رفت و باندهای پروتئینی قابل رؤیت شدند (Reisner *et al.*, 1975).

الکتروفورز دوبعدی و تجزیه عکس‌ها

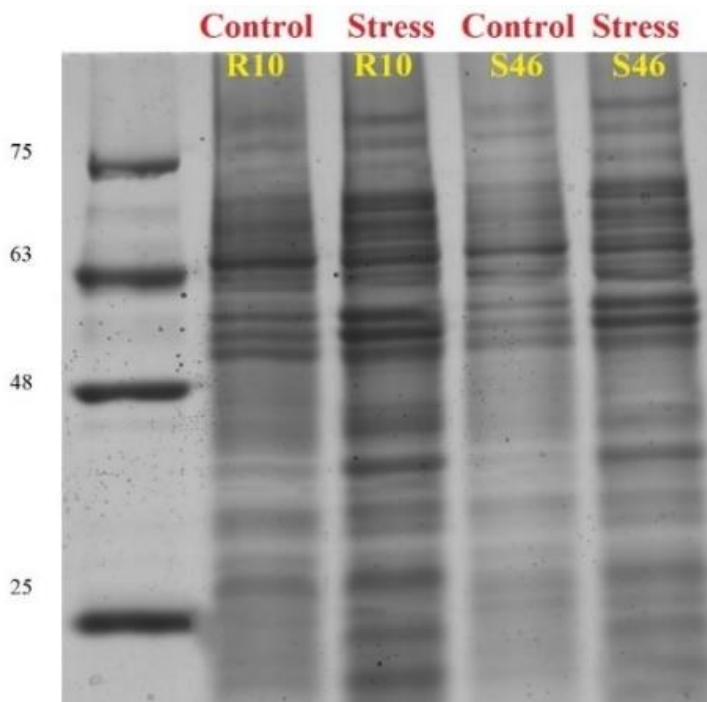
الکتروفورز دو بعدی براساس روش O'Farrell (۱۹۷۵)

4. Isoelectric focusing; IEF
5. Immobilized pH gradient
6. Rehydration
7. Equilibration
8. MALDI/TOF-TOF mass spectrometry
9. University of York, Canada

1. Lysis buffer
2. Millimolar
3. Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB-R250)



شکل ۱. گیاه ذرت (*Zea mays L.*) پس از ۲۰ روز از اعمال تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر). شکل سمت راست: لاین متحمل (R10) و سمت چپ: لاین حساس (S46).



شکل ۲. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها در برگ ۲ لاین حساس و متحمل به شوری ذرت (*Zea mays L.*) در دو سطح شوری (صفر و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) در ژل SDS-PAGE.

جستجوی پایگاه داده

تجزیه‌های مربوط به Gene ontology (GO) با نرم‌افزار AgriGO v2.0 انجام گرفت. AgriGOv2.0 یک ابزار و پایگاه داده مبنی بر وب برای تجزیه‌های Gene ontology (GO) در گونه‌های با اهمیت در کشاورزی را پشتیبانی می‌کند (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2>). این نرم‌افزار تجزیه‌های مختلف از جمله تجزیه غنی‌سازی تکی^۱، تجزیه پارامتریک غنی‌سازی مجموعه ژن^۲، نمایش DAG^۳ و Scatter Plots را فراهم می‌نماید. AgriGO قادر است خروجی‌ها را به صورت نمودار میله‌ای و سلسله مراتبی درختی ارائه دهد در درک کامل معنای بیولوژیکی داده‌ها به کاربران کمک می‌کند. شبکه‌های متقابل پروتئین با استفاده از پایگاه داده^۴ STRING v11.0 (<https://string-db.org>) پیش‌بینی شد (Szkarczyk *et al.*, 2018).

در این مطالعه بررسی‌ها براساس *Arabidopsis thaliana* انجام گرفت، زیرا پروتئین‌های ذرت در پایگاه داده STRING^۵ در دسترس نبودند. همچنین سعی گردید یک شبکه‌ای برای پروتئین‌های ذرت که نقش احتمالی در تنش شوری دارند، ارائه گردد. پروتئین‌ها و فعل و انفعالات عملکردی آن‌ها ستون ماشین سولوی را تشکیل می‌دهند. بانک اطلاعاتی STRING به‌منظور جمع‌آوری، نمره‌دهی و ادغام کلیه منابع در دسترس اطلاعات اثر متقابل پروتئین-پروتئین و تکمیل این موارد با پیش‌بینی‌های محاسباتی ارائه شده است.

نتایج و بحث

با الکتروفورز ژل دو بعدی (2D-GE)، در مجموع ۳۸۹ لکه پروتئینی روی ژل‌ها مشاهده شد. طبقه‌بندی عملکردی لکه‌های پروتئینی هر لاین بعد از MS/MS نشان داد که پروتئین‌های بیان شده دارای فعالیت‌های متابولیکی مختلف هستند (شکل ۳). مشخصات لکه‌های پروتئینی شناسایی شده با استفاده طیف‌سنج جرمی در جدول ۱ ارائه شده است.

براساس نتایج حاصل از نرم‌افزار ملانی (Image Master 6.02) در لاین متحمل R10 تحت تنش شوری، ۱۴۸ لکه پروتئینی و در نمونه شاهد (نرمال) ۱۲۴ لکه شناسایی گردید و از این بین، لکه‌های شماره ۱۴، ۸۰، ۱۲۸، ۱۳۴ و ۱۶۴ تحت تنش شوری افزایش بیان نشان دادند که به ترتیب پروتئین پیرووات‌ارتوفسفات‌دیکیناز (PPDK)^۶، واحد بتا ATP سینتاز^۷، Germin-like protein، پروتئین باندشونده به کلروفیل a و b^۸ (لکه ۱۳۴)، تریوز فسفات ایزومراز^۹ (لکه ۱۳۴) و پروتئین ۴۰S ریبوزومال^{۱۰} می‌باشند.

همچنین در لاین حساس S46 در شرایط شاهد (نرمال)، ۱۲۰ لکه پروتئینی شناسایی گردید و از این بین، لکه شماره ۹۹ افزایش بیان نشان داد که پروتئین‌ها زیر واحد بتا^{۱۱} می‌باشد. در این لاین (حساس S46) تحت تنش شوری، ۱۲۱ لکه پروتئینی شناسایی گردید (شکل ۴) و از این بین، لکه‌های شماره ۱۱۱ و ۱۲۴ کاهش بیان نشان دادند که به ترتیب پروتئین باند شونده به کلروفیل a و b و ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز^{۱۲} می‌باشند (شکل ۴).

6. Pyruvate orthophosphate dikinase

7. ATP synthase subunit beta

8. Chlorophyll a-b binding protein

9. Triosephosphate isomerase

10. 40S ribosomal protein

11. Proteasome subunit beta

12. Ribulose biphosphate carboxylase small chain

1. Singular enrichment analysis (SEA)

2. Parametric analysis of gene set enrichment (PAGE)

3. Direct acyclic graph (DAG)

4. Search tool for the retrieval of interacting genes

5. Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/ Proteins

پروتئین‌های با اثر متقابل با پروتئین‌های شناسایی شده را فراهم می‌کند (Bhattacharjee *et al.*, 2020). این تجزیه، اطلاعات ما را در خصوص پروتئین‌های با عملکرد مرتبط که به طور مستقیم با پروتئین‌های شناسایی شده در این مطالعه در ارتباط هستند، را افزایش می‌دهد. همچنین به ما اجازه می‌دهد تا پروتئین‌های دیگری که امکان دارد با پروتئین‌های شناسایی شده در این مطالعه، کنش متقابل داشته باشند، شناسایی کنیم. این اطلاعات به ما کمک می‌کند تا بتوانیم نقش پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش در ارتباط با پروتئین‌های دیگر، را پیش‌بینی نماییم.

لیستی از پروتئین‌ها با عملکرد مرتبط^۶ و نقش احتمالی آن‌ها در تنش شوری با استفاده از آنالیز STRING در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که در جدول ۲ مشخص شده است بسیاری از این پروتئین‌های با عملکرد مرتبط در پاسخ به تنش دخیل هستند. بنابراین طبق تجزیه انجام شده، پروتئین‌های با بیان افتراقی در این مطالعه با دیگر پروتئین‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی، تحمل به تنش، تولید انرژی کنش متقابل دارند که نشان‌دهنده نقش شبکه گسترده‌تر پروتئینی در پاسخ‌های گیاه به تنش شوری است.

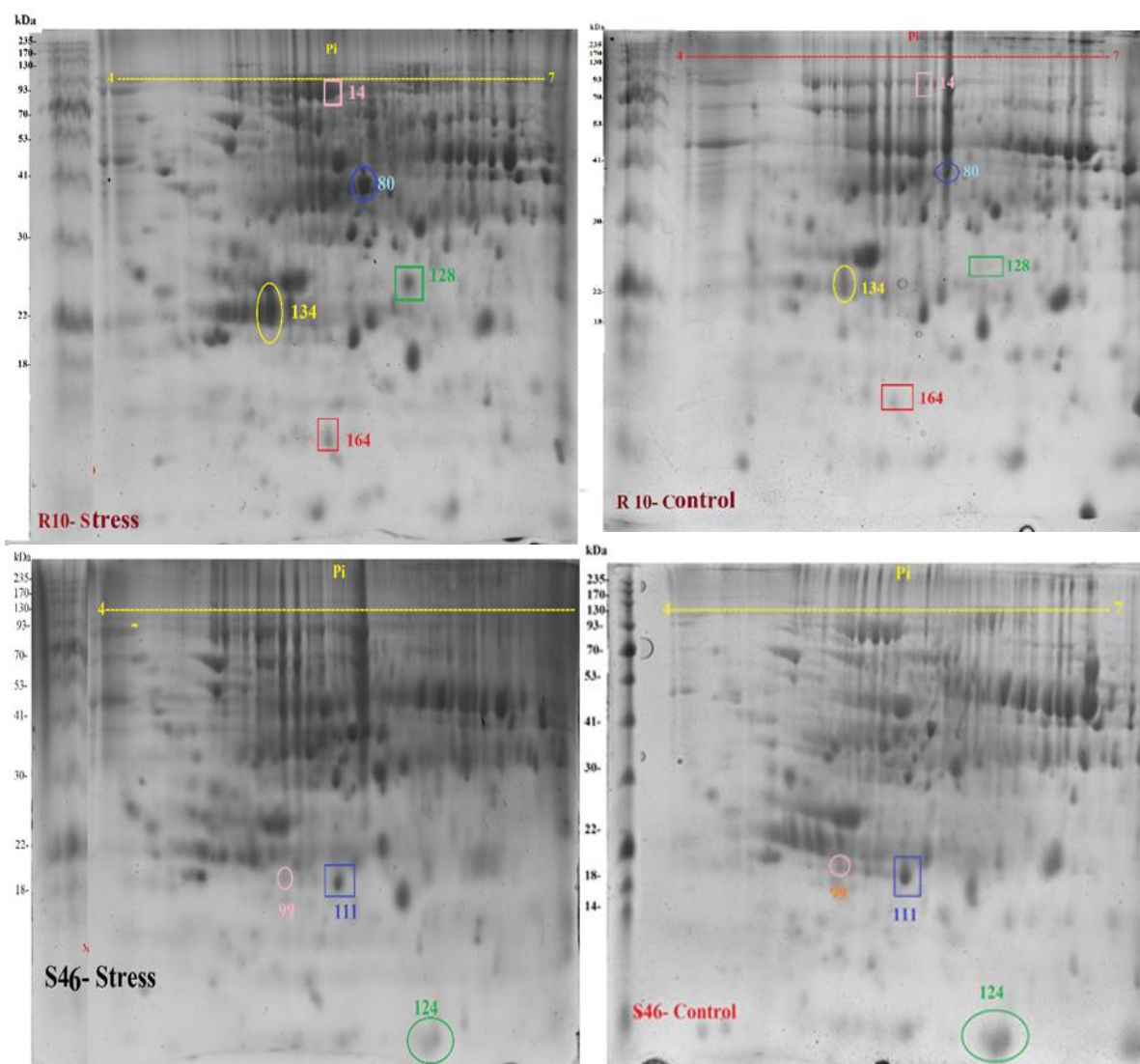
در آزمایش‌های پروتئومیکس انجام شده در شرایط تنش‌های مختلف، بافت‌ها، اندامک‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است (Kosová *et al.*, 2011; Ghosh and Xu, 2014; Jorrín-Novo *et al.*, 2015; Janmohammadi *et al.*, 2015).

در مطالعه حاضر مسیر Brassicaceae در AgriGOv2.0 برای تجزیه هستی‌شناسی ژن^۱ به کار گرفته شد و مسیرهایی که به طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) با پاسخ به تنش شوری دارای همبستگی بودند، مشخص شدند (نمودار DAG، شکل ۵). همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، مسیرهای فرآیندهای متابولیکی^۲ (GO: 0008152)، فرآیندهای سلولی^۳ (GO: 0009987) و پاسخ به محرک‌ها^۴ (GO: 0050896) با پاسخ به تنش شوری دارای همبستگی هستند (شکل ۵). همچنین در این شکل اصطلاحات GO (هستی‌شناسی ژن) معنی‌دار ($P \leq 0.05$) با رنگ مشخص شده است، در حالی که اصطلاحات GO غیرمعنی‌دار به صورت کادر سفید نشان داده شده است.

نمودار، میزان اشباع رنگ یک جعبه با سطح غنی سازی اصطلاح رابطه مثبت دارد. خطوط ممتد، خط-چین‌ها و خطوط نقطه چین به ترتیب سطح غنی-سازی دو، یک و صفر اصطلاح GO را نشان می‌دهند. جهت رتبه‌بندی نمودار از بالا به پایین تنظیم شده است (Du *et al.*, 2010). بر طبق این نمودار به-ترتیب مسیر فرآیندهای متابولیکی^۵ (GO: 0044237) و سپس پاسخ به تنش‌های غیرزیستی/زیستی با کمترین مقدار P-value، معنی‌دارترین مسیرهای زیستی مرتبط با پاسخ به تنش شوری در این پژوهش بودند که نشان‌دهنده نقش مهم این مسیرها در پاسخ به تنش شوری در ذرت می‌باشد. مطالعات بسیاری نقش پروتئین‌های این مسیرها را در پاسخ به تنش شوری نشان داده‌اند.

از پایگاه داده STRING برای ایجاد نقشه شبکه پروتئین-پروتئین استفاده شد که امکان تشخیص

1. Gene ontology analyses
2. Metabolic process
3. Cellular process
4. Response to stimulus
5. Cellular metabolic process



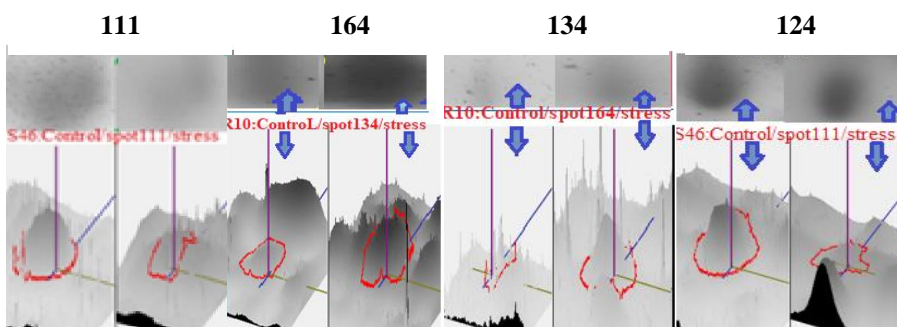
شکل ۳. الگوی پروتئینی لاین متحمل R10 (شکل‌های بالا) و الگوی پروتئینی لاین حساس S46 (شکل‌های پایین) تحت تنش شوری. شماره‌های Spot ID با نرم‌افزار ملانی به هر لکه پروتئینی نسبت داده شده است.

جدول ۱. مشخصات لکه‌های پروتئینی شناسایی شده با استفاده طیف‌سنجی جرمی در لاین‌های ذرت تحت تنش شوری.

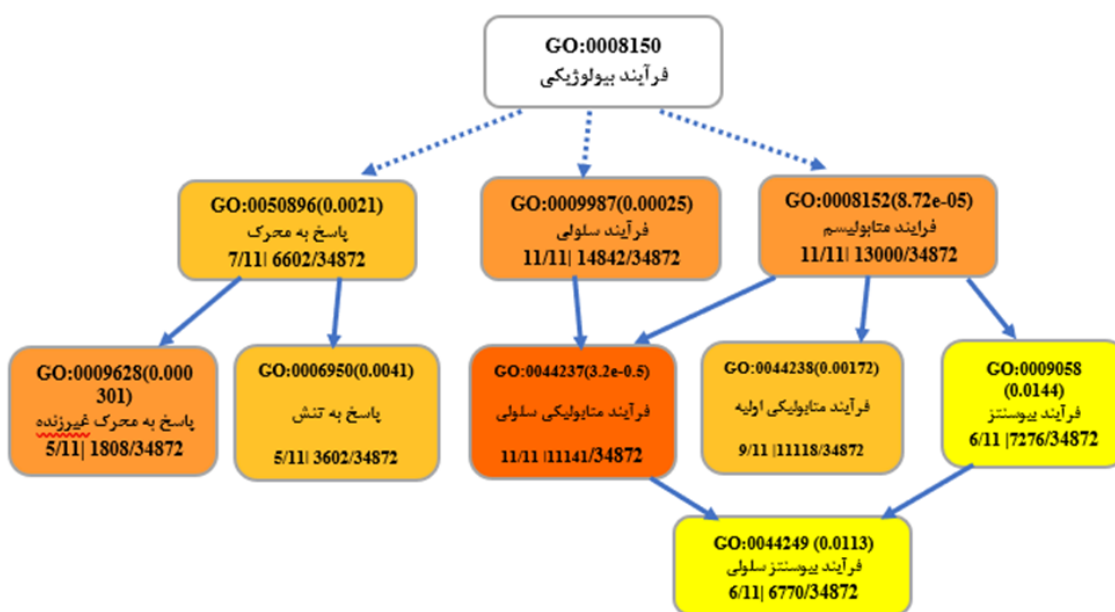
پروتئین شناسایی شده ^۱	Organism	شناسه لکه ^۲	شماره دسترسی ^۳	متحمل (Tolerant)	حساس (Susceptible)	MW (kDa) -pl ^۴	پوشش (% Coverage)	توالی پپتیدهای همسان ^۴	
				Expression ratio (\pm SE) ^{d)}	Expression ratio (\pm SE) ^{d)}	MW (kDa) -pl ^{f)}	MW (kDa) Theor.		
Pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)	Maize	14	O23404	+6.13 (\pm 0.65)	NS	170-5.7	104.1	57.2	AGLDYVSCSPFRVPIAR AMDGLPVTIR DQVIATGLPASPAAVGGQVV FTAEDAEAWHSQGK
ATP synthase subunit beta (atpB)	Trida (Tripsacum dactyloides)	80	P19366	+3.51 (\pm 0.48)	NS	52-5.8	42.5	94.99	AHGGVSVFGGVGER AINLEEEK AVAMSATEGLMR
Germin-like protein	Maize	128	P94072	+4.86 (\pm 0.22)	NS	25-6	42.8	41.5	AAVTPAFVGGQFPVGNLGLIS AAR LTQDFCVADLTCSDTAGYP CK SNTVYTK
Chlorophyll a-b binding protein	Ensve (Ensete ventricosum)	134	P04778	+1.78 (\pm 0.54)	NS	22-5	26.17	45.5	AAASGSPWYGPDR AAASGSPWYGPDRVK ELEVHSR
40S ribosomal protein	Orysj (Oryza sativa Japonica)	164	Q9SF35	+2.72 (\pm 0.13)	NS	12-5.5	11.9	59.4	ALCAEHNHLVTVPSAK DFGESEGLNIVQDYVK HAAQLCVLAEDCDQPDYVK
Triosephosphate isomerase	Maize	134	P48491	1.78 (\pm 0.54)	NS	22-5	26.17	57.6	APDFATHINSVTAKHIIGENDE FIGK IEVSAQNVWIGK
Chlorophyll a-b binding protein	Orybr (Oryza brachyantha)	111	P04778	NS	-3.6 (\pm 0.12)	22-5.5	9	27.9	KFEYK KYPGGAFD KYPGGAFDPLGFSK
Proteasome subunit beta	Maize	99	P42742	NS	+1.5 (\pm 0.22)	23-5	20	24.5	DMKPETFASLVSALLYEK LYIGLSGLATDAQTLYQR
Ribulose biphosphate carboxylase small chain	Maize	124	P10795	NS	-3.3 (\pm 0.23)	8-6	9	68.8	LPMFGCTDATQVYK QTQCVSFIAYKPPGSE*

(a) شماره لکه پروتئینی مطابق با تصویر ژل دو بعدی. (b) شماره دسترسی از پایگاه NCBI اختصاص داده شد به هر پروتئین. (c) قسمتی از توالی پپتیدی مطابقت داده شده با توالی مورد نظر (Conf ۹۹٪). (d) تغییر بیان برای هر لکه پروتئینی (که از تقسیم میانگین درصد حجمی لکه پروتئینی در تیمار نسبت به کنترل آن به دست می‌آید) در نقطه زمانی مورد نظر. هنگامی که مقدار تغییرات بیان برابر یا بیشتر از ۱/۵ باشد، پاسخ‌ها به عنوان پاسخگویی به شوری در نظر گرفته می‌شوند. (SE) نشان‌دهنده خطای استاندارد تغییرات بیان است. f) جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده که از نتایج جستجوی Mascot به دست آمده است، جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک روی ژل که از تجزیه و تحلیل تصویر ژل 2-DE توسط نرم‌افزار Imagemaster به دست آمده است.

1. Protein identity
2. Spot ID
3. Accession No.
4. Sequence of matched peptides



شکل ۴. بخشی از نمای نزدیک و نمای سه بعدی لکه‌های ۱۳۴ و ۱۶۴ در لاین R10 (لاین متحمل) و لکه‌های ۱۱۱ و ۱۲۴ در لاین S46 (لاین حساس) ذرت تحت شرایط نرمال و تنش شوری که تغییرات بیان نشان می‌دهند. نوع پروتئین در جدول ۱ بیان شده است.



شکل ۵. تجزیه هستی‌شناسی ژن، پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری. هر جعبه نشان‌دهنده شماره GO (GO number)، اصطلاح GO (GO term) و اطلاعات آماری (p-value) می‌باشد.

جدول ۲. لیستی از پروتئین‌های با عملکرد مرتبط^۱ که با تجزیه STRING در *Arabidopsis thaliana* مشخص شده است.

شماره لکچر ^۷	شناسه پروتئین ^۵ و اسم آن ^۶	شماره دسترسی Uniprot و شناسه STRING ^۴ <i>Arabidopsis thaliana</i>	تعداد کل اثرات متقابل	عملکرد مرتبط پیش‌بینی شده با نقش احتمالی در دفاع و برچسب مکان آن‌ها ^۳	نمونه در تجزیه STRING	پیش‌بینی عملکرد مرتبط ^۲	منبع
14	Pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)	Accession No: O23404 STRING ID: AT4G15530.5	100	NAD-dependent malic enzyme [NAD-ME2] (AT4G00570.1)	0.980	یکی از آنزیم‌های مهم که در متابولیسم گیاه و در فرآیندهای متابولیسمی متعدد نقش دارد. همچنین در رشد، نمو و پاسخ به تنش در گیاهان مؤثر است.	Sun <i>et al.</i> (2019)
80	ATP synthase subunit beta (atpB)	Accession No: P19366 STRING ID: ATC G00480.1	120	ATP synthase subunit delta [ATPD] (AT4G09650.1)	0.998	گیاهان از انرژی نوری برای عبور دادن الکترون و انتقال پروتئین از طریق غشای تیلاکوئید استفاده می‌کنند و در نتیجه سنتز ATP و NADPH رخ می‌دهد. این فرایندها شامل سیستم‌های فتوسنتز I (PSI) و II (PSII)، سیتوکروم b6/f (Cytb6/f) و کلروپلاست ATP سنتز (cpATPase) است.	Maiwald <i>et al.</i> (2003)
128	Germin-like protein	Accession No: P94072 STRING ID: AT4G14630.1	40	Calmodulin-lysine N-methyltransferase [CaMKMT] (AT4G35987.1)	0.644	شناسایی و ارتباط خصوصیات پروتئین‌های تعدیل‌شده CaM ^۸ در ارتباط با تنش‌های غیرزنده مختلف، برای درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تحمل گیاهان به تنش غیرزنده ضروری می‌باشد.	Virdi <i>et al.</i> (2015)
111 and 134	Chlorophyll a-b binding protein	Accession No: P04778 STRING ID: AT1G29920.1	120	Chlorophyll a-b binding protein 2.2 [LHCB2.2] (AT2G05070.1)	0.961	کلروفیل a/b II جمع‌آوری‌کننده نوری (LHCB) ^۹ ، از اجزای مهم مجموعه عمده برداشت نوری است. پروتئین‌های آنتن خارجی LHCB PSIIها شاید فراوان‌ترین پروتئین‌های غشایی در طبیعت باشد.	Xu <i>et al.</i> (2012)
164	40S ribosomal protein	Accession No: Q9SF35 STRING ID: AT1G57540	14	Pentatricopeptide repeat-containing protein (At1g80270)	0.581	پروتئین‌های باندشونده RNA (RBPs) نقش مهمی در تنظیم عملکرد و سرنوشت RNA ایفا می‌کنند.	Bach-Pages <i>et al.</i> (2020)
134	Triosephosphate isomerase	Accession No: P48491 STRING ID: AT2G21170.1	100	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [GAPC2] (AT1G13440.1)	0.999	گلیسرالدهید-۳-فسفات دهیدروژناز پلاستی ^{۱۰} (GAPDH, GAPCp)، پروتئین‌های فراگیری هستند که نقش اصلی را در متابولیسم گیاه دارند و در پاسخ به تنش نقش دارند.	Li <i>et al.</i> (2019)
99	Proteasome subunit beta	Accession No: P42742 STRING ID: AT1G56450.1	120	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 homolog [RPN10] (AT4G38630.1)	0.999	پروتازوم 26S یک مجموعه پروتازوم ضروری است که مسئول از بین بردن اکثر پروتئین‌های داخل سلولی با عمر کوتاه است؛ به ویژه آن‌هایی که با زنجیره‌های پلی‌یوپی کوتین تغییر یافته-اند. RPN10-1 نسبت به اسیدآسیزیک (ABA)، تنش ساکارز و شوری و عوامل آسیب‌رسان به DNA حساسیت بیشتری دارند اما نسبت به سیتوکینین و اکسین حساسیت کمی دارند.	Smalle <i>et al.</i> (2003)
124	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	Accession No: P10795 STRING ID: AT5G38420.1	120	Phosphoglycerate kinase1 [PGK1] (AT3G12780.1)	0.913	در گیاهان، PGKها نه تنها در گلیکولیز/ گلوکونوژنز، بلکه در متابولیسم کربن فتوسنتز نقش دارند. نشان داده شده است که PGK2 plastidial در تحمل تنش‌های غیر زنده و زنده نقش دارد.	Ouibrahim <i>et al.</i> (2014); Liu <i>et al.</i> (2015); Joshi <i>et al.</i> (2016); Rosa-Téllez <i>et al.</i> (2018)

1. Functional Partners

2. Predicted Functional Partners

3. Predicted Functional Partners with probable role in defense and their locus tag

4. Uniprot accession number and STRING ID with *Arabidopsis thaliana*

5. Protein ID, unique protein identifying number in the UniProt database

6. Gene name/ID; name or ID number of the corresponding gene of the identified differentially abundant protein in the UniProt database

7. Spot ID

8. Calmodulin (CaM)- modulated

9. The light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHCB)

10. Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

حالی که در لاین حساس S46 این پروتئین دیده نشد. بنابراین احتمالاً ژن PPKDK نقش مهمی در سازگاری با تنش شدید ناشی از شوری دارد. PPKDK در پیری برگ ذرت نیز ممکن است نقشی در گلوکونئوژنز در سیتوزول داشته باشد (Smart *et al.*, 1995; Omoto *et al.*, 2012). افزایش PPKDK سیتوزولی طی تنش شوری نیز ممکن است به این پاسخ‌های دفاعی کمک کند (Smart *et al.*, 1995; Omoto *et al.*, 2012). Zhang و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که PPKDK برای زنده ماندن ذرت تحت تنش‌ها ضروری است. پروتئین ATP سنتاز زیرواحد بتا کلروپلاستی^۴ (EC:7.1.2.2) از پروتئین‌های درگیر در متابولیسم انرژی و انتقال پروتون می‌باشد. زیر واحد بتا (β) ATP سنتاز متشکل از یک واحد کاتالیزوری و اتصال‌دهنده ADP است که با تبدیل ADP به ATP در حضور شیب پروتون غشایی نقش مهمی در متابولیسم انرژی دارد (Ye *et al.*, 2013). تنظیم فعالیت ATP سنتاز کلروپلاستی تا حد زیادی توسط سیستم تیوردوکسین کلروپلاست (سیستم اصلی تنظیم ردوکس در کلروپلاست‌ها) انجام می‌شود که مستقیماً با واکنش فتوسنتز همراه است (Hisabori *et al.*, 2013). ATPases دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که نقش مهمی در انتقال یون و پاسخ تحمل به تنش شوری دارند (Zhang *et al.*, 2014). افزایش سنتز ATP^۵ در گیاهان تحت تنش شوری فرآیندهای شیمیایی مورد نیاز جهت تحمل تنش؛ مانند تعدیل هموستازی یونی در سلول‌های گیاهی را به جریان می‌اندازند (Gao *et al.*, 2011). بنابر گزارش Aliyari Rad و همکاران (۲۰۱۹) در تأمین انرژی در کلروپلاست و میتوکندری

یکی از پروتئین‌های کلروپلاستی که تحت تنش شوری شناسایی گردید پروتئین پیرووات ارتوفسفات دیکناز^۱ (PPDK; EC:2.7.9.1) است. PPKDK که توسط هسته رمز می‌شود و بوفور در کلروپلاست‌های سلول‌های مزوفیلی وجود دارد، آنزیمی مهم برای محدود کردن سرعت مسیر C₄ می‌باشد (Edwards *et al.*, 1985; Hatch, 1987; Yadav *et al.*, 2020). این پروتئین در برگ گیاهان C₄ فراوان بوده و شامل ۱۰ درصد از کسر پروتئین محلول^۲ می‌باشد (Edwards *et al.*, 1985; Chastain *et al.*, 2011). آرابیدوپسیس تالیانا^۳، بیش بیان PPKDK در طی پیری برگ باعث انتقال مجدد ازت از برگ‌ها با سرعت قابل ملاحظه می‌شود (Taylor *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019). PPKDK همچنین نقش کلیدی در مکانیسم‌های دفاعی میزبان در مقابل تنش دارد، زیرا تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف مانند خشکی، شوری، فلزات سنگین، غوطه‌وری، اکسیژن کم و سرما (Doubnerová and Ryšlavá, 2011; Hýsková *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018b) و تنش زیستی از جمله عفونت‌های ویروسی (Spoustová *et al.*, 2015) القا می‌گردد. بر طبق اظهار Yadav و همکاران (۲۰۲۰)، ژن C₄-PPDK برای بهبود جذب کربن مناسب است و همچنین در سازگاری با تنش شوری و نیز خشکی شدید نقش مهمی ایفا می‌کند. در بررسی حاضر، به طور قابل توجهی در لاین متحمل R10، بیان پروتئین پیرووات ارتوفسفات دیکیناز در برگ ذرت (*Zea mays* L.) تحت تنش شوری نسبت به شاهد (نرمال) (۶/۱۳ ± ۰/۶۵) برابر افزایش بیان نشان داد در

4. ATP synthase subunit beta, chloroplastic
5. ATP synthesis

1. Pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)
2. Soluble protein fraction
3. *Arabidopsis thaliana*

حقیقت تنش شوری با کاهش فعالیت ریبولوز ۱،۵- بیس فسفات کربوکسیلاز/ اکسیژناز، از بین بردن رنگدانه‌های فتوسنتزی و تخریب پروتئین‌های غشایی در دستگاه فتوسنتز باعث مهار فتوسنتز می‌شود (Mittal *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2018). افزایش میزان روییسکو می‌تواند برای بقای گیاهان در شرایط سخت محیطی سودمند باشد (Gong *et al.*, 2018). در آزمایش حاضر بیان پروتئین زنجیره کوچک ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز در برگ ذرت (*Zea mays L.*) لاین S46 حساس تحت تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) نسبت به شاهد (شرایط نرمال)، به‌طور قابل توجهی به میزان $3/3 \pm 0/23$ برابر کاهش بیان نشان داد، در حالی که در لاین متحمل R10 تغییر در بیان این پروتئین دیده نشد. براساس نتایج Yasmeen و همکاران (۲۰۱۶) در گندم، فراوانی زنجیره کوچک ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز/ اکسیژناز در رقم متحمل به خشکی بیشتر از رقم متحمل به شوری بود.

از پروتئین‌های دخیل در واکنش نوری فتوسنتز، پروتئین باندشونده به کلروفیل a/b (Chlorophyll a/b binding) می‌باشد. کلروفیل به عنوان یک عامل ضروری برای فتوسیستم I و II، نقشی اساسی در فتوسنتز دارد (Komenda and Sobotka, 2019). پروتئین‌های "جمع‌کننده نور باند شونده به کلروفیل a/b" (LHCB)، مجموعه آپوپروتئین‌های جمع‌کننده نور در فتوسیستم II (PSII) هستند که به‌طور معمول با کلروفیل و گزانتوفیل‌ها کمپلکس می‌شوند و به عنوان مجموعه آنتن عمل می‌کنند (Jansson, 1994, 1999; Xu *et al.*, 2012). بررسی اخیر، بیان پروتئین Chlorophyll a/b binding، در برگ لاین ذرت متحمل R10، در پاسخ به تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) نسبت

آنزیم سنتز ATP دارای نقش اصلی می‌باشد. همچنین در بررسی پروتئوم برگ ذرت تحت تنش شوری توسط Aliyari Rad و همکاران (۲۰۱۹)، پروتئین ATP کلروپلاستی؛ Synthase epsilon chain شناسایی گردید. در بررسی حاضر، به‌طور قابل توجهی بیان پروتئین زیرواحد بتا ATP سنتاز، در برگ ذرت (*Zea mays L.*) لاین متحمل R10 تحت تنش شوری نسبت به شاهد (شرایط نرمال) $3/51 \pm 0/48$ برابر افزایش بیان نشان داد که احتمالاً با کاهش اثرات سوء تنش شوری به حفظ رشد ذرت در شرایط تنش کمک می‌کند در حالی که در لاین حساس S46 بیان این پروتئین دیده نشد. همچنانچه در بالا اشاره شد ATPases دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که نقش مهمی در انتقال یون و پاسخ تحمل به تنش شوری دارند (Zhang *et al.*, 2014). افزایش فراوانی این لکه پروتئینی شاید برای مقابله با تنش شوری و حفاظت از تخریب غشاء تیلاکوئید و کلروپلاست باشد (Aliyari Rad *et al.*, 2019).

زنجیره کوچک^۱ ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز (EC:4.1.1.39) از پروتئین‌های درگیر در چرخه کالوین کلروپلاستی می‌باشد. ریبولوز ۱،۵- بیس فسفات کربوکسیلاز/ اکسیژناز اکتیواز^۲ (RCA) یک ژن هسته‌ای است که پروتئینی کلروپلاستی را رمزگذاری می‌کند که آن پروتئین نقش مهمی در فتوسنتز دارد (Chen *et al.*, 2015). برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که این پروتئین ممکن است در سازگاری با تنش‌های مختلف غیر زیستی نقش داشته باشد (Chen *et al.*, 2015). تنش شوری با کاهش مقدار یا فعالیت روییسکو باعث مهار سریع فتوسنتز می‌شود (Lu *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2018; Bota *et al.*, 2004).

1. Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic
2. Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase (RCA)

3. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHCB)

به شاهد (شرایط نرمال) به میزان $1/78 \pm 0/54$ برابر افزایش اما در لاین حساس S46 تحت تنش شوری نسبت به شاهد (شرایط نرمال) به میزان $3/6 \pm 0/12$ کاهش بیان نشان داد. بر اساس مرور Wang و همکاران (۲۰۱۶)، افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در واکنش‌های نوری و چرخه کالوین در برگ گیاهان تحت تنش خشکی مشاهده می‌شود. برای مثال بیان پروتئین‌های جمع‌کننده نور باند شونده به کلروفیل a/b در ژنوتیپ‌های متحمل *Z. mays* (Benesova et al., 2012) و *M. domestica* (Zhou et al., 2015) افزایش یافت، اما در ژنوتیپ‌های حساس میزان بیان پروتئین کاهش یا بدون تغییر بود (Wang et al., 2016).

از لکه‌های پروتئینی شناسایی شده، پروتئین شبه‌جرمین (Germin-like) می‌باشد. این پروتئین جزء پروتئین‌های دیواره‌ی سلولی است. پروتئین‌هایی با توالی مشابه با Germinها در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده‌اند و به آن‌ها "پروتئین‌های شبیه Germin" گفته می‌شود (El-Sharkawy et al., 2010). پروتئین‌های Germin و شبیه Germin (GLPs) توسط یک خانواده معروف از ژن‌ها رمزگذاری می‌شوند (Dunwell et al., 2008). این پروتئین‌ها همراه با پروتئین‌های متصل به ساکارز و گلوبولین‌های دانه، یک فوق‌خانواده از پروتئین‌ها به نام "کوپین"^۳ را تشکیل می‌دهند (Ilyas et al., 2016). GLP نه تنها در رشد گیاه، بلکه در پاسخ‌های دفاعی گیاه به تنش‌ها (شوری، سرما/سرما، خشکی، مواد مغذی و فلز) نقش حیاتی دارند (Wang et al., 2013). Germinها و GLPها به عنوان محصول ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌ها هستند (Mahmood et al., 2013). این پروتئین‌ها همچنین در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی (ویروس‌ها، باکتری‌ها، میکوبریزا، قارچ‌ها، حشرات، نماتدها و گیاهان انگلی) نقش دارند (Dunwell et al., 2008). در واقع این گونه بیان می‌شود که GLPهای گیاهی در اندام‌های مختلف

از لکه‌های پروتئینی شناسایی شده دیگر، تریوز فسفات ایزومراز سیتوزولی^۱ (EC:5.3.1.1) است. آنزیم تریوز فسفات ایزومراز^۲ درگیر در مسیر گلیکولیز می‌باشد که مرحله اولیه تولید انرژی در سیتوزول است. این آنزیم کاتالیزکننده‌ی ایزومریزاسیون dihydroxyacetone phosphate و D-glyceraldehyde-3-P می‌باشد (Cui et al., 2005; Khalili and Naghavi, 2017). در تجزیه و تحلیل پروتئومیک پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در ریشه برنج Yan و همکاران (۲۰۰۵) آنزیم تریوز فسفات ایزومراز را به همراه آنولاز شناسایی کردند که آنزیم‌هایی درگیر در گلیکولیز هستند. همچنین Naghavi (۲۰۱۴) در تجزیه پروتئوم ارقام متحمل و حساس ارقام گندم بهاره تحت تنش خشکی، میزان بیان این پروتئین را در رقم حساس کمتر از بیان آن در رقم متحمل گندم مشاهده کرد. در بررسی اخیر، بیان پروتئین تریوز فسفات ایزومراز سیتوزولی، در برگ لاین ذرت متحمل R10، در پاسخ به تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) در مقایسه با شاهد (شرایط نرمال) به میزان

۱. Triosephosphate isomerase, cytosolic
۲. Triosephosphate isomerase

3. Germin-like proteins (GLPs)
4. Cupin

پروتئازوم ۲۰S به صورت یک دسته استوانه‌ای متشکل از چهار حلقه هپتامریک با دو حلقه داخلی از واحدهای فرعی نوع b و دو حلقه بیرونی از زیر واحد نوع a سازمان یافته است (Pena *et al.*, 2007). پروتئازوم نقشی اساسی در تخریب پروتئین‌های سیتوهسته‌ای^۲ در طی تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان دارد (Kovács *et al.*, 2017). تحت تأثیر محیط توسعه، تغییرات در فراوانی پروتئازوم اتفاق می‌افتد که برای رشد و بقای گیاهان در شرایط نامساعد حیاتی است (Kurepa *et al.*, 2009; Sarafat Ali and Baek, 2020). سلول‌های گیاهی ممکن است مکانیسم‌های مولکولی تکامل یافته‌تری^۳ را تحت تنش توسعه دهند و ممکن است فعالیت پروتئازوم ۲۶S را در پاسخ به تغییرات شرایط محیطی تغییر دهند. کاهش فعالیت پروتئازوم ۲۶S برای بقای گیاهان زیان‌آور است (Sarafat Ali and Baek, 2020). پروتئین‌های ۲۶S / یوبی‌کیوتین^۴ نقش مهمی در بروز پاسخ‌های سلولی متعدد از جمله تحمل تنش غیرزنده (Lyzenga and Stone, 2012)، سیگنالینگ هورمون (Zhang *et al.*, 2005)، مورفوژن^۵ (Yang *et al.*, 2005) و دفاع در برابر پاتوژن‌ها (Luo *et al.*, 2010) و تبدیل / تغییر کروماتین (Weake and Workman, 2008) دارد (Kang *et al.*, 2017). عملکرد اصلی هستک با بیوژنز^۵ ریبوزوم و با متابولیسم سلول، تکثیر و پاسخ به تنش مرتبط است (Lam *et al.*, 2005; Saez-Vasquez and Medina, 2008; Boulon *et al.*, 2010; Pederson and Powell, 2015; Montacé *et al.*, 2017). فعل و انفعال (اثر متقابل) عملکردی بین فعالیت‌های پروتئازوم و نوکلئولار^۶، با هماهنگی هستک در مسیرهای متعدد با نقش

(برگ‌ها، ریشه‌ها و گل‌ها) و در شرایط مختلف فیزیولوژیکی (جوانه‌زنی بذر، تنش و حمله پاتوژن‌ها) یافت شده‌اند (El-Sharkawy *et al.*, 2010). در این بررسی بیان پروتئین Germin-like، در برگ لاین ذرت متحمل R10، در پاسخ به تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) نسبت به شاهد (شرایط نرمال) طور قابل توجهی به میزان $4/86 \pm 0/22$ برابر افزایش نشان داد، درحالی‌که در لاین S46 حساس اثری از این پروتئین دیده نشد. بر اساس گزارش Valleeian Bindschedler و همکاران (۱۹۹۸) در جو، GLPها به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند و بیان آن‌ها تحت تنش اسمزی در ریشه‌ها افزایش می‌یابد. در مطالعه دیگری در تجزیه و تحلیل الکتروفور دو بعدی و طیف‌سنجی جرمی نشان داده شد که در *Nicotiana tabacum* بیان GLP پس از تنش شوری در مایع آپوپلاستی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Dani *et al.*, 2005). بررسی Banerjee و همکاران (۲۰۱۷)، اولین گزارشی است که نشان دهنده دخالت ژن GLPبرنج (*OsGLP1*) در تنش شوری است. خاموشی ژن *OsGLP1* در لاین‌های ترانسژنیک برنج، اهمیت بیولوژیکی *OsGLP1* تحت تنش NaCl را نشان داد. در بررسی پروتئوم ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به نمک تحت تنش شوری طولانی‌مدت توسط Fatehi و همکاران (۲۰۱۲)، افزایش GLP در هر دو ژنوتیپ تحت تنش شوری مشاهده شد و اعتقاد مذکور بر این است که GLPها در طی جنین‌زایی و در شرایط تنش زنده و غیرزنده نقش دارند.

از لکه‌های پروتئینی شناسایی شده دیگر، زیر واحد بتا پروتئازوم^۱ (EC:3.4.25.1) می‌باشد. پروتئازوم دارای فعالیت پروتئولیتیک وابسته به ATP است.

2. Cytonuclear
3. Elaborate
4. Ubiquitin
5. Biogenesis
6. Nucleolar

1. Proteasome subunit beta

پروتئین‌های ریوزومی^۳ (RP) به دلیل نقش خود در سنتز پروتئین و حفظ ثبات کمپلکس ریوزومی که شامل زیر واحدهای کوچک و بزرگ هستند، مورد توجه هستند (Moin et al., 2016). ریوزوم‌ها کمپلکس‌های ریو نوکلئوپروتئین ریز (۲۰۰-۳۰۰ درجه) هستند که به طور معمول با دو واحد فرعی با اندازه نابرابر در تمام ارگانیسم‌ها حضور دارند و ۲۵-۳۰ درصد از توده سلول را تشکیل می‌دهند (Alberts et al., 2002; Moin et al., 2016). کمپلکس ریوزوم، به عنوان یک کل، سنتز پروتئین را با هدایت mRNA انجام می‌دهد (Moin et al., 2016). RP‌ها علاوه بر نقش‌شان در ایجاد ثبات در کمپلکس ریوزومی و فراهم‌سازی سنتز پلی‌پپتید، دارای عملکردهای خارج ریوزومی از قبیل درگیری در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز هستند (Warner and McIntosh, 2009; Sormani et al., 2011; Moin et al., 2016). افزایش بیان ژن‌های RPL تحت طیف گسترده‌ای از تیمارهای تنش‌زا از جمله شرایط زنده و غیرزنده نشان می‌دهد که ژن‌ها و پروتئین‌های مربوطه اهداف بالقوه مناسب برای دستکاری جهت نیل به تحمل تنش در برنج و همچنین سایر غلات مرتبط باشند (Moin et al., 2016). در مطالعه اخیر بیان پروتئین 40S ریوزومال، در برگ لاین ذرت متحمل R10، در پاسخ به تنش شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) نسبت به شاهد (شرایط نرمال) به طور قابل توجهی به میزان $2/72 \pm 0/13$ برابر افزایش نشان داد در حالی که در لاین حساس S46 بیان این پروتئین تغییر معنی‌داری نداشته است. هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر در مطالعه Fatehi و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی پروتئوم *Hordeum spontaneum* (جو وحشی) تحت تنش شوری نیز پروتئین‌های ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (Rubisco)، پروتئین‌های ریوزومی (Ribosomal proteins) و سوپراکسید

تعیین‌کننده آن به عنوان حسگر تنش مطابقت دارد (Boulon et al., 2010; Tsai and Pederson, 2014; Pederson and Powell, 2015; Montacié et al., 2017). در بررسی اخیر بیان زیر واحد بتا پروتئازوم، در لاین حساس S46 ذرت در نمونه شاهد (شرایط نرمال) در مقایسه با نمونه‌ی تیمار (تنش شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر) به میزان $1/5 \pm 0/22$ افزایش نشان داد؛ در حقیقت بیان آن تحت تنش شوری کاهش نشان داد، در حالی که در لاین متحمل R10 تغییری در فعالیت پروتئین دیده نشد. اختلال در عملکرد پروتئازوم ۲۶S، توانایی گیاهان در پاسخگویی مؤثر و کارآمد و تحمل به عوامل تنش‌زای محیطی را کاهش می‌دهد (Sarafat Ali and Baek, 2020). فقدان عملکرد پروتئازوم ۲۶S، منجر به کاهش رشد ریشه می‌شود (Kurepa et al., 2008; Sarafat Ali and Baek, 2020). در تجزیه و تحلیل سیستم‌های پروتئولیتیک یوبی‌کوئین- پروتئازوم^۱ برگ ذرت تحت تنش کادمیوم، همراه با مهار فعالیت پروتئازوم افزایش کمی در تجمع پروتئین‌های متصل به یوبی‌کوئین مشاهده شد (۲۵ درصد نسبت به شاهد) (Pena et al., 2007). محققین مذکور بیان کردند که غلظت بالاتر کادمیوم باعث کاهش فعالیت پروتئازوم ۲۰S با تجمع همزمان پروتئین‌های اکسید و یوبی‌کوئین شده می‌گردد که این امر در نهایت منجر به توقف مسیرهای متابولیکی در گیاه و افزایش حساسیت گیاه به تنش می‌شود.

پروتئین 40S ریوزومال^۲ از پروتئین‌هایی هستند که جز پروتئین‌های ریوزومی هستند. ریوزوم‌های یوکاریوتی دارای ضریب رسوب ۸۰S با زیر واحد ۶۰S بزرگ دارای rRNA ۲۵S، ۵/۸S، و ۵S و زیر واحد کوچک ۴۰S متشکل از rRNA ۱۸S هستند (Ben-Shem et al., 2010; Moin et al., 2016).

1. Ubiquitin-proteasome
2. 40S ribosomal protein

3. Ribosomal proteins (RPs)

نمودند. در مطالعه ایشان لکه‌های پروتئینی در رقم مقاوم در مقایسه با شاهد افزایش بیان و در رقم حساس در اکثر موارد کاهش بیان داشتند. در تجزیه پروتئوم ارقام متحمل و حساس گندم تحت تنش شوری توسط Khalili و Naghavi (۲۰۱۸)، تعداد ۵ لکه پروتئینی در رقم متحمل و حساس تحت تنش شوری تغییر بیان معنی‌داری نشان دادند. همچنین در بررسی ایشان پروتئین‌های مشترک شناسایی شده، عمدتاً از گروه‌های عملکردی شامل دفاع آنتی‌اکسیداتی و چرخه کالوین بودند. براساس مطالعه Feng و همکاران (۲۰۱۷) پروتئین‌های بیان شده در ذرت، در فتوسنتز، متابولیسم کربن و چرخه سیترات دخیل بودند. در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۸) در مجموع ۶۸۱ و ۱۳۷۴ پروتئین بیان شده متفاوت^۱ به ترتیب در برگ و ریشه ذرت شناسایی شدند که عمدتاً در متابولیسم، انتقال یون و پاسخ به تنش دخیل بودند. همچنین ایشان ۶۹ DEPs را در برگ و ۱۱۶ DEPs را در ریشه شناسایی کردند.

نتیجه‌گیری کلی

شوری یک تنش اصلی غیر زنده است که رشد، بهره‌وری و توزیع جغرافیایی گیاهان را محدود می‌کند. در حال حاضر، پروتئومیکس یک فناوری با توان عملیاتی بالا در تحقیقات بیولوژیکی است که می‌تواند برای روشن کردن عملکردهای بیولوژیکی استفاده شود. پروتئومیکس می‌تواند به طور قابل توجهی به درک ما از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی اتخاذ شده توسط گیاه در جهت تحمل تنش کمک کند. در این مطالعه تغییرات پروتئوم برگ در دو لاین ذرت با واکنش متفاوت به تنش شوری بررسی گردید. از بین لکه‌های پروتئینی شناسایی شده در لاین متحمل R10 تحت تنش شوری، ۵ لکه

دسموتاز (SOD) شناسایی گردیدند. نتایج Moin و همکاران (۲۰۱۶) نشان می‌دهد که خانواده ژن‌های RPL (Ribosomal protein large) منبع ارزشمندی برای دستکاری جهت نیل به تحمل تنش در برنج و سایر محصولات است که ممکن است با بیش بیان و توسعه گیاهان تراریخته مستقل؛ حامل ژن‌هایی که فوری و به طور قابل توجه تنظیم می‌شوند، حاصل شود.

بهره‌وری فتوسنتزی در گیاهان C₄ به طور کلی حدود ۱/۵ تا ۲ برابر بیشتر از گیاهان C₃ است (Doubnerová and Ryslava, 2011). برخی از فرآیندهای زیست‌شناختی و مسیرهای متابولیکی که در پاسخ به تنش شوری و تحمل آن دخیل هستند، یا آن‌هایی که تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرند، در مطالعات بیان ژن شناسایی شده‌اند (Ngara et al., 2012). در طی شروع و ایجاد تنش شوری در یک گیاه، تمام فرآیندهای اصلی شامل فتوسنتز، سنتز پروتئین، متابولیسم لیپید و تولید انرژی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تحمل تنش شوری یک فرآیند پیچیده در گیاهان است که از سطح سلولی تا کل سطح گیاه رخ می‌دهد (Chen et al., 2019). پروتئین‌های شناسایی شده تحت تنش آن‌هایی هستند که در فرآیندهای فتوسنتز، تنفس نوری، انتقال، متابولیسم، دفاع در برابر تنش اکسیداتیو، کنترل کانال‌های یونی و تاشدگی پروتئین‌ها نقش دارند (Joseph and Zörb و همکاران (۲۰۰۹) قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض تنش شوری بر روی الگوی پروتئینی کلروپلاست ذرت تأثیر می‌گذارد به طوری که مقدار کمی ۱۲ پروتئین کلروپلاستی پاسخ‌دهنده به تنش شوری در مقایسه با گیاهان تیمار نشده افزایش و مقدار کمی ۸ پروتئین کاهش یافت. Farhadi و همکاران (۲۰۱۱) با تجزیه پروتئوم دو رقم گندم نان تحت تنش شوری، پروتئین‌های مختلفی شناسایی

1. Different Expressed Proteins (DEPs)

R10 تحمل‌پذیری بهتری در شرایط تنش شوری دارد. پروتئین‌های شناسایی‌شده در این مطالعه و مسیرهای بیوشیمیایی احتمالی مرتبط، اطلاعات جدیدی را در پاسخ لاین‌های ذرت (R10 and S46) به تنش شوری ارائه می‌دهند. در این بررسی پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری، بخشی از کل پروتئوم گیاه ذرت می‌باشند که نیازمند به تحقیق و بررسی بیشتر می‌باشد.

سپاسگزاری

از حمایت دانشگاه ارومیه، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهران (NIGEB) و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه برای در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

افزایش بیان داشته‌اند که مرتبط با پروتئین‌های پیرووات ارتوفسفات دیکیناز، واحد بتا ATP سینتاز، Germin-like protein، پروتئین باندشونده به کلروفیل a و b، تریوز فسفات ایزومراز و پروتئین ۴۰S ریپوزومال می‌باشند. در صورتی که در لاین حساس S46 تحت تنش شوری، از بین لکه‌های پروتئینی شناسایی شده، ۲ لکه کاهش بیان نشان دادند که به ترتیب مرتبط با پروتئین باند شونده به کلروفیل a و b و ریپولوز بیس فسفات کربوکسیلاز می‌باشند. همچنین در لاین حساس S46 در شرایط شاهد (نرمال)، از بین لکه‌های پروتئینی شناسایی شده، فقط یک لکه افزایش بیان نشان داد که با پروتئین باندشونده به کلروفیل a و b و پروتازوم زیرواحد بتا^۱ مرتبط می‌باشند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات در سطح مورفولوژیکی و تغییرات بیان ژن و پروتئومیکس، می‌توان بیان داشت که لاین متحمل

REFERENCES

- Abd Elgawad H, Zinta G, Hegab MM, Pandey R, Asard H, Abuelsoud W (2016) High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Frontiers in Plant Science* 7: 276.
- Abreu IA, Farinha AP, Negrão S, Gonçalves N, Fonseca C, Rodrigues M, Saibo NJM and Oliveira MM (2013) Coping with abiotic stress: proteome changes for crop improvement. *Journal of Proteomics* 93: 145-168.
- Ahmad P, Abdel Latef AAH, Rasool S, Akram NA, Ashraf M, Guzel S (2016) Role of Proteomics in Crop Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7: 1336.
- Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Hatami F, Abdshah H, Kazemiyan A (2020) *Agricultural Statistics, Crop year 2018-2019. First volume Crops*, pp 13.
- Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, NY: Garland Science.
- Aliyari Rad S, Bandehagh A, Dezhsetan S, Behnamian M, and moharramnejad S (2019). Leaf proteome analysis of maize hybrid SC704 under salinity stress. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 8(1): 39-50.
- Ambede JG, Netondo GW, Mwai GN and Musyimi, DM (2012) NaCl salinity affects germination, growth, physiology, and biochemistry of *Bambara groundnut*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24: 151-160.
- Appel RD, Hochstrasser DF, Roch C, Funk M, Muller AF, Pellegrini C (1988) Automatic classification of two-dimensional gel electrophoresis pictures by heuristic clustering analysis: A step toward machine learning. *Electrophoresis* 9: 136-142.

- Ashraf M, Foolad MR (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59(2): 206-216.
- Bach-Pages M, Homma F, Kourelis J, Kaschani F, Mohammed S, Kaiser M, Hoorn RALvd, Castello A, Preston GM (2020) Discovering the RNA-Binding Proteome of Plant Leaves with an Improved RNA Interactome Capture Method. *Biomolecules*, 10, 661. doi:10.3390/biom10040661.
- Banerjee J, Gantait S, Maiti M K (2017) Physiological role of rice germin-like protein 1 (OsGLP1) at early stages of growth and development in *indica* rice cultivar under salt stress condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 131: 127-137.
- Benesova M, Hola D, Fischer L, Jedelsky PL, Hnilicka F, Wilhelmova N, Rothova O, Kocova M, Prochazkova D, Honnerova J, Fridrichová L, Hnilíčková H (2012) The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: Early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PLoS ONE* 7:1706.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330: 1203-1209. doi:10.1126/science.1194294.
- Bensimon A, Heck AJR, Aebersold R (2012) Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annual Review of Biochemistry* 81: 379-405.
- Bhattacharjee M, Dhar S, Handique PJ, Acharjeel S, Sarmah BK (2020) Defense response in chickpea pod wall due to simulated herbivory unfolds differential proteome profile. *The Protein Journal* 39: 240-257.
- Bota J, Medrano HJ (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist* 162(3): 671-681.
- Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI (2010) The nucleolus under stress. *Molecular Cell* 40: 216-227.
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brogliè R, Coruzzi G, Keith B, Chua NH (1984) Molecular biology of C 4 photosynthesis in *Zea mays*: differential localization of proteins and mRNAs in the two leaf cell types. *Plant Molecular Biology* 3: 431-444.
- Capriotti AL, Borrelli GM, Colapicchioni V, Papa R, Piovesana S, Samperi R., Stampachiacchiere S, Laganà A (2014) Proteomic study of a tolerant genotype of durum wheat under salt-stress conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406: 1423-1435.
- Carpici EB, Celik N, Bayram G (2009) Effects of salt stress on germination of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 8(19): 4918-4922.
- Castillejo MA, Kirchev HK, Jorin JV (2010) Differences in the triticale (X Triticosecale Wittmack) flag leaf 2-DE protein profile between varieties and nitrogen fertilization levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5698-5707.
- Ghafari Azar A, Darvishzadeh R, Aghaali Z, Kahrizi D, Darvishi B (2019) Assessment of genetic diversity and grouping of maize lines (*Zea mays* L.) using ISSR markers. *Cell and Molecular Researches* 32(2): 194-204.
- Chastain ChJ, Failing ChJ, Manandhar L, Zimmerman MA, Lakner MM, Nguyen THT (2011) Functional evolution of C4 pyruvate, orthophosphate dikinase. *Journal of Experimental Botany* 62(9): 3083-3091.
- Chen Y, Wang XM, Zhou L, He Y, Wang D, Qi YH, and Jiang DA (2015) Rubisco Activase Is Also a Multiple

- Responder to Abiotic Stresses in Rice. PLoS ONE 10(10): e0140934.
- Chen F, Fang P, Peng Y, Zeng W, Zhao X, Ding Y, Zhuang Z, Gao Q, Ren B (2019) Comparative proteomics of salt-tolerant and salt-sensitive maize inbred lines to reveal the molecular mechanism of salt tolerance. International Journal of Molecular Sciences 20: 4725.
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics 5(12): 3162-3172.
- Cui D, Wu D, Liu J, Li D, Xu C, Li S, Li P, Zhang H, Liu X, Jiang Ch, Wang L, Chen T, Chen H, Zhao L (2015) Proteomic analysis of seedling roots of two maize inbred lines that differ significantly in the salt stress response. PLoS ONE 10(2): e0116697.
- Dani V, Simon WJ, Duranti M, Croy RR (2005) Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. Proteomics 5: 737-745.
- Doubnerová V, Ryšlavá H (2011) What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? Plant Science 180: 575-583.
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. Nucleic Acids Research, Vol. 38, 64-70. doi:10.1093/nar/gkq310.
- Dunwell JM, Gibbing JG, Mahmood T, Saqlan Naqvi S. (2008) Germin and Germin-like Proteins: Evolution, Structure, and Function. Critical Reviews in Plant Sciences 27: 342-375.
- 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.
- Edwards GE, Nakamoto H, Burnell JN, Hatch MD (1985) Pyruvate Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C4 photosynthesis. Properties and mechanism of light/dark regulation. Annual Review of Plant Biology 36: 255-286.
- El-Sharkawy I, Mila I, Bouzayen M, Jayasanka S (2010) Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development. Journal of Experimental Botany 61(6): 1761-1770.
- Farhadi F, Naghavi MR, Zeinali Khaneghah, H, Postini K, Aboui Mehri F, Yazdi Samadi B, Alizadeh H (2011) Proteome analysis of two varieties of wheat bread (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. Modern Genetics Journal 6(1): 87-96.
- Farooq M, Hussain M, Wakeel A, Siddique KHM (2015) Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review. Agronomy for Sustainable Development 35: 461-481.
- Fatehi F, Hosseinzadeh A, Alizadeh H, Brimavandi T, Struik PC (2012) The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. Molecular Biology Reports 39: 6387-6397.
- Feng D, Wang Y, Lu T, Zhang Z, Han X (2017) Proteomics analysis reveals a dynamic diurnal pattern of photosynthesis-related pathways in maize leaves. PLoS ONE 12(7): e0180670.
- Food and Agriculture Organization (2017) Statistics: FAOSTAT agriculture. Retrieved from <http://fao.org/crop/statistics>.
- Fortmeier R, Schubert S (1995) Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): the role of sodium exclusion. Plant, Cell & Environment 18: 1041-1047.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hua Y, Mac W, Yan Y (2011) Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). Phytochemistry 72: 1180-1191. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.12.008.
- Ghosh D, Xu J, (2014) Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. Frontiers in Plant Science 5: 6. doi: 10.3389/fpls.2014.00006.

- Gong DH, Wang GZ, Si WT, Zhou Y, Liu Z, Jia J (2018) Effects of salt stress on photosynthetic pigments and activity of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *Kalidium foliatum*. Russian Journal of Plant Physiology 65(1): 98-103.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R and Weiss W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 21:1037-1053.
- Hashiguchi A, Ahsan N, Komatsu S (2010) Proteomics application of crops in the context of climatic changes. Food Research International 43: 1803-1813.
- Hatch MD (1987). C4 photosynthesis: a unique elend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics 895: 81-106.
- Hisabori T, Sunamura EI, Kim Y, Konno H (2013) The Chloroplast ATP Synthase Features the Characteristic Redox Regulation Machinery. Antioxidants & Redox Signaling 19(15): 1846-1854.
- Hossain Z, Khatoon A, Komatsu S (2013) Soybean proteomics for unraveling abiotic stress response mechanism. Journal of Proteome Research 12: 4670-4684.
- Hýsková DV, Miedzińska L, Dobra J, Vankova R, Ryslava H (2014) Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. Journal of Plant Physiology 171: 19-25.
- Ilyas M, Rasheed A, Mahmood T (2016) Functional characterization of germin and germin-like protein genes in various plant species using transgenic approaches. Biotechnology Letters 38: 1405-1421.
- Janmohammadi M, Zolla L, Rinalducci S (2015) Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. Phytochemistry 117: 76-89.
- Jansson S (1994) The light-harvesting chlorophylla/b-bindingproteins. Biochimica et Biophysica Acta 1184: 1-19.
- Jansson S (1999) A guide to theLhcggenes and their relatives in Arabidopsis. Trends in Plant Science 4: 236-240.
- Jorrín-Novo JV, Pascual J, Sánchez-Lucas R, Romero-Rodríguez MC, Rodríguez-Ortega MJ, Lenz C, Valledor L (2015) Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. Proteomics 15: 1089-1112.
- Joseph B, Jini D (2010) Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. Asian Journal of Plant Sciences 9: 307-313. doi:10.3923/ajps.2010.307.313.
- Joshi R, Karan R, Singla-Pareek SL, Pareek A (2016) Ectopic expression of Pokkali phosphoglycerate kinase-2 (OsPGK2-P) improves yield in tobacco plants under salinity stress. Plant Cell Reports 35: 27-41.
- Kang M, Lee S, Abdelmageed H, Reichert A, Lee HK, Fokar M, Mysore KS, Allen RD (2017) Arabidopsis stress associated protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway. Plant, Cell & Environment 40: 702-716.
- Khalili M, Naghavi MR (2017) Assessment of changes in protein expression pattern in tolerant and sensitive cultivars of rapeseed under salt stress. Iranian Journal of Field Crop Science 48(3): 721-735.
- Khalili M, Naghavi MR, Yousefzadeh S (2018) Protein pattern analysis in tolerant and susceptible wheat cultivars under salinity stress conditions. Acta agriculturae Slovenica 111(3): 545-558.
- Komenda J, Sobotka R (2019) Chlorophyll-binding subunits of photosystem I and II: Biosynthesis, chlorophyll incorporation and assembly.

- Advances in Botanical Research 91: 195-223.
- Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT, Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress-Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* 74: 1301-1322.
- Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P (2013) Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 6757-6789.
- Kovács J, Poór P, Kaschan Fi, Chandrasekar B, Hong TN, Misas-Villamil JC, Xin BT, Kaiser M, Overkleeft HS, Tari I, Hoorn RALvd (2017) Proteasome activity profiling uncovers alteration of catalytic $\beta 2$ and $\beta 5$ subunits of the stress-induced proteasome during salinity stress in tomato roots. *Frontiers in Plant Science* 8: 107.
- Kurepa J, Toh-e A, Smalle JA (2008) 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *Plant Journal* 53: 102-114.
- Kurepa J, Wang S, Li Y, Smalle J (2009) Proteasome regulation and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 4: 924-927.
- Lam YW, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI (2005) The nucleolus. *Journal of Cell Science* 118: 1335-1337. doi: 10.1242/jcs.01736.
- Li X, Wei W, Li F, Zhang L, Deng X, Liu Y, Yang S (2019) The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for abiotic stress response in wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1104.
- Liu D, Li W, Cheng J, Hou L (2015) *AtPGK2*, a member of PGKs gene family in Arabidopsis, has a positive role in salt stress tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 251-262.
- Lu KX, Cao BH, Feng XP, He Y, Jiang DA (2009) Photosynthetic response of salt-tolerant and sensitive soy-bean varieties. *Photosynthetica* 47(3): 381-387.
- Luo H, Laluk K, Lai Z, Veronese P, Song F, Mengiste T (2010) The Arabidopsis Botrytis Susceptible1 Interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses. *Plant Physiology* 154: 1766-1782.
- Lyzenga WJ, Stone SL (2012) Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *Journal of Experimental Botany* 63: 599-616.
- Mahmood T, Yasmin T, Haque MI, Naqvi SMS (2013). Characterization of a rice germin-like protein gene promoter. *Genetics and Molecular Research* 12(1): 360-369.
- Maiwald D, Dietzmann A, Jahns P, Pesaresi P, Joliot P, Joliot A, Levin JZ, Salamini F, Leister D (2003) Knock-Out of the Genes Coding for the Rieske Protein and the ATP-Synthase δ -Subunit of Arabidopsis. Effects on Photosynthesis, Thylakoid Protein Composition and Nuclear Chloroplast Gene Expression. *Plant Physiology* 133: 191-202.
- Mass EV (1986) Crop tolerance to saline soil and water. *Proe. US Pak Biosaline Res. Workshop, Karachi, Pakistan*, pp. 205-219.
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49(1): 69-76.
- Mertins P, Qiao JW, Patel J, Udeshi ND, Clauser KR, Mani DR, Burgess MW, Gillette MA, Jaffe JD, Carr SA (2013) Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature Methods* 10: 634-637. doi: 10.1038/nmeth.2518.
- Mittal S, Kumari N, Sharma V (2012) Differential response of salt stress on Brassica juncea: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry* 54: 17-26.

- Moin M, Bakshi A, Saha A, Dutta M, Madhav SM, Kirti PB (2016) Rice ribosomal protein large subunit genes and their spatio-temporal and stress regulation. *Frontiers in Plant Science* 7: 1284. doi: 10.3389/fpls.2016.01284.
- Moller AL, Pedas P, Andersen B, Svensson B, Schjoerring JK, Finnie C (2011) Responses of barley root and shoot proteomes to longterm nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant, Cell & Environment* 34(12): 2024-2037.
- Montacié, C, Durut N, Opsomer A, Palm, P. Comella, D., Picart, C., Carpentier, M. C, Pontvianne, F., Carapito, C., Schleiff, E. and Sáez-Vásquez, J. (2017). Nucleolar proteome analysis and proteasomal activity assays reveal a link between nucleolus and 26S proteasome in *A. thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 8: 1815.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Naghavi MR (2014) Evaluation of spring wheat cultivars under drought stress and proteome analysis for the most tolerant and sensitive ones. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Iran. (In Farsi).
- Naghavi MR, Khalili M (2018) study morpho-physiological change and protein pattern of tolerant and susceptible wheat cultivars under salinity stress by using proteome analysis. *Crop Biotechnology* 24: 71-93.
- Nam MH, Huh SM, Kim KM, Park WJ, Seo JB, Cho K, Kim DY, Kim BG, Yoon II (2012) Comparative proteomic analysis of early salt stress- responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. *Proteome Science* 10: 25.
- Ngara R, Ndimba R, Borch-Jensen J, Jensen ON, Ndimba B (2012) Identification and profiling of salinity stress-responsive proteins in Sorghum bicolor seedlings. *Journal of Proteomics* 75: 4139- 4150.
- Niu L, Zhang H, Wu Z, Wang Y, Liu H, Wu X, Wang, W (2018) Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLoS one*, 13(12), p.e0202238.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021.
- Omoto E, Taniguchi M, Miyake H (2012) Adaptation responses in C4 photosynthesis of maize under salinity. *Journal of Plant Physiology* 169: 469– 477. doi: 10.1016/j.jplph.2011.11.009.
- Ouibrahim L, Mazier M, Estevan J, Pagny G, Decroocq V, Desbiez C, Moretti A, Gallois JL, Caranta C (2014) Cloning of the Arabidopsis *rwml* gene for resistance to *Watermelon mosaic virus* points to a new function for natural virus resistance genes. *Plant Journal* 79: 705-716.
- Passamani LZ, Barbosa, RR, Reis RS, Heringer AS, Rangel, PL, Santa-Catarina C, Grativol C, Veiga CFM, Souza-Filho GA, Silveira V (2017) Salt stress induces changes in the proteomic profile of micropropagated sugarcane shoots. *PLoS ONE* 12(4): e0176076.
- Pederson T, Powell K (2015) Thoru Pederson: spotting novel roles for the nucleolus. *Journal of Cell Biology* 208: 384-385. doi: 10.1083/jcb.2084pi.
- Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML, Gallego SM (2007) 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 1139-1146.
- Perez- Clemente RM, Vives V, Zandalinas SI, Lopez- Climent MF, Munoz V, Cadenas A (2013) Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed Research International*

- 2013: Article ID: 654120. doi: 10.1155/2013/654120.
- Prinsi B, Negri AS, Pesaresi P, Cocucci M, Espen L (2009) Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by twodimensional gel electrophoresis analysis. *BMC Plant Biology* 9: 113.
- Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 64: 509-516.
- Rosa-Téllez S, Anoman AD, Flores-Tornero M, Toujani W, Alseek S, Fernie AR, Nebauer SG, Muñoz-Bertomeu J, Segura J, Ros R (2018) Phosphoglycerate Kinases Are Co-Regulated to Adjust Metabolism and to Optimize Growth. *Plant Physiology* 176: 1182-1198.
- Saez-Vasquez J, Medina FJ (2008) "The plant nucleolus," in *Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathol.* Vol. 47, eds J.-C. Kader and M. Delseny (San Diego, CA: Elsevier Academic Press Inc.), 1-46.
- Sakamoto A, Murata N (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* 25: 163-171.
- Sarafat Ali Md, Baek KH (2020) Protective Roles of Cytosolic and Plastidal Proteasomes on Abiotic Stress and Pathogen Invasion. *Plants* 9: 832.
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, Emborg TJ, Babychuk E, Kushnir S, Vierstra RD (2003) The Pleiotropic Role of the 26S Proteasome Subunit RPN10 in *Arabidopsis* Growth and Development Supports a Substrate-Specific Function in Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell* 15: 965-980.
- Smart CM, Hosken SE, Thomas H, Greaves JA, Blair BG, Schuch W (1995) The timing of maize leaf senescence and characterisation of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum* 93: 673-82.
- Sormani R, Masclaux-Daubresse C, Daniele-Vedele F, Chardon F (2011) Transcriptional regulation of ribosome components are determined by stress according to cellular compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 6: e28070. doi: 10.1371/journal.pone.0028070.
- Spoustová P, Hyskova V, Muller K, Schnablova R, Ryslava H, Čerovská N, Malbecka J, Cvikrová M, Synková H, (2015). Tobacco susceptibility to Potato Virus Y-NTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content. *Plant Science* 235: 25-36.
- Sun Y, Mu Ch, Liu X (2018) Key factors identified by proteomic analysis in maize (*Zea mays* L.) seedlings response to long-term exposure to different phosphate levels. *Proteome Science* 16: 19.
- Sun X, Hana G, Menga Z, Lin L, Sui N (2019) Roles of malic enzymes in plant development and stress responses. *Plant Signaling & Behavior* 14(10): e1644596.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering Ch (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47(D1): D607-D613.
- Taylor L, Nunes-Nesi A, Parsley K, Leiss A, Leach G, Coates S, Wingler A, Fernie AR, Hibberd JM (2010) Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *Plant Journal* 62: 641-652.
- Tsai RY, Pederson T (2014) Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB Journal* 28: 3290-3296.

- Tuteja N, Gill SS, Tuteja R (2012) Improving crop productivity in sustainable agriculture. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- VallelianBindschedler L, Mosinger E, M'etraux JP, Schweizer P (1998) Structure, expression and localization of a germinlike protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. *Plant Molecular Biology* 37: 297-308.
- Virdi AS, Singh S, Singh P (2015) Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. *Front. Plant Science* 6: 809.
- Wang T, Chen X, Zhu F, Li H, Li L, Yang Q, Chi X, Yu S, Liang X (2013) Characterization of Peanut Germin-Like Proteins, *AhGLPs* in Plant Development and Defense. *PLoS One* 8(4): e61722.
- Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S (2016) Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 1706.
- Wang WQ, Jensen ON, Møller IM, Hebelstrup KH, Rogowska-Wrzesinska A. (2018 a) Evaluation of sample preparation methods for mass spectrometry-based proteomic analysis of barley leaves. *Plant Methods* 14: 72.
- Wang H, Liu C, Ma PA, Lu C, Li K, Wang W (2018 b) Functional characterization of cytosolic pyruvate phosphate dikinase gene (*MecyPPDK*) and promoter (*MecyPPDKP*) of cassava in response to abiotic stress in transgenic tobacco. *Crop Science* 58; 2002-2009.
- Wang X, Gao J, Gao S, Song Y, Yang Z, Kuai B (2019) The H3K27me3 demethylase REF6 promotes leaf senescence through directly activating major senescence regulatory and functional genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 15: e1008068.
- Wakeel A, Asif AR, Pitann B, Schubert S (2011) Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress. *Journal of Plant Physiology* 168: 519-526.
- Warner JR., McIntosh KB (2009) How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Molecular Cell* 34: 3–11.doi: 10.1016/j.molcel.2009.03.006.
- Weake VM, Workman JL (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol. Cell.* 29, 653-663.
- Witzel K, Weidner A, Surabhi G, Borner A, Mock H (2009) Salt stress- induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany* 60: 3545–3557.
- Xu YH, Liu R, Yan L, Liu ZQ, Jiang ShCh, Shen YY, Wang XF, Zhang DP (2012) Light-harvesting chlorophylla/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63(3): 1095-1106.
- Xiong J, Sun J, Yang Q, Tian H, Zhang H, Liu Y, Chen M (2017) Proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in alfalfa roots and shoots. *Proteome Science* 15: 19.
- Yadav S, Rathore MS, Mishra A (2020) The Pyruvate-Phosphate Dikinase (*C4-SmPPDK*) Gene from *Suaeda monoica* enhances photosynthesis, carbon assimilation, and abiotic stress tolerance in a C_3 plant under elevated CO_2 conditions. *Frontiers in Plant Science* 11: 345.
- Yan S, Tang Z, Su W, Sun W (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5: 235-244.
- Yan J, Warburton M, Crouch J (2011) Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement. *Crop Science* 51:433-449.
- Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng XW, Wang H (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light

- signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 804-821.
- Yasmeen F, Iqbal Raja N, Razzaq A, Komatsu S (2016) Gel-free/label-free proteomic analysis of wheat shoot in stress tolerant varieties under iron nanoparticles exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1864: 1586-1598.
- Ye J, Wang Sh, Zhang F, Xie D, Yao Y (2013) Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG 6000 stress and rewatering. *Plant Omics* 6(4): 286-294.
- Zang X, Komatsu S (2007) Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry* 68: 426-437.
- Zhang X, Garreton V, Chua NH (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes & Development* 19: 1532-1543.
- Zhang XH, Li B., Hu, Y.-G., Chen L., and Min D.-H. (2014). The wheat E subunit of V-Type H⁺-ATPase is involved in the plant response to osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 16196-16210.
- Zhang Y, Giuliani R, Zhang Y, Zhang Y, Luiz Araujo W, Wang B, Liu P, Sun Q, Cousins A, Edwards G, Fernie A, Brutnell TP, Li P (2018) Characterization of maize leaf Pyruvate Orthophosphate Dikinase using high throughput sequencing. *Journal of Integrative Plant Biology* 60(8): 670-690.
- Zahoor M, Khaliq R, Zafar ZU, Athar HR (2011) Degree of salt tolerance in some newly developed maize (*Zea mays* L.) varieties. *Iranian Journal of Plant Physiology* 1(4): 223-232.
- Zhou S, Li M, Guan Q, Liu F, Zhang S, Chen W, Yin L, Qin Y, Ma F (2015) Physiological and proteome analysis suggest critical roles for the photosynthetic system for high water-use efficiency under drought stress in *Malus*. *Plant Science* 236: 44-60.
- Zörb C, Schmitt S, Neeb A, Karl S, Linder M, Schubert S (2004) The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science* 167: 91-100.
- Zörb Ch, Herbst R, Forreiter Ch, Schubert S (2009) Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics* 9: 4209-4220.
- Zörb C, Geilfus CM, Dietz KJ (2019) Salinity and Crop Yield. *Plant Biology* 21: 31-38.