

بررسی اثر بیماریگر *Fusarium verticillioides* روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پروتئین-های برگ دو لاین ذرت با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بُعدی

افسانه رضایی^۱، علی اصغری^۱، سجاد محرم نژاد^۲، وحید نصراله‌زاده اصل^۳، مه‌ری یوسفی^۳

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. ^۱بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مغان، ایران. ^۲گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. ^۳sm.chakherlo@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۹

بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۱۸

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۶

چکیده

به منظور ارزیابی اثر فوزاریوم *Fusarium verticillioides* بروی وزن تر، شاخص کلروفیل، فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز روی ژل پلی آکریلامید و پروتئین‌های برگ به روش الکتروفورز دو بُعدی در لاین‌های ذرت، آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار تحت شرایط گلخانه‌ای به اجرا در آمد. عامل اول دو لاین ذرت B73 و MO17 و عامل دوم آلودگی به *F. verticillioides* در دو سطح بدون آلودگی و آلودگی در مرحله گیاهچه‌ای بودند. نتایج حاصل نشان داد که اثر بیماریگر *F. verticillioides* روی وزن تر گیاهچه‌های ذرت غیرمعنی‌دار بود ولی میزان شاخص کلروفیل به طور معنی‌دار در لاین‌های ذرت تیمار شده با عامل بیماری کاهش یافت. تجزیه الکتروفورزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که سه ایزوفرم روی ژل پلی آکریلامید هشت درصد وجود داشت. فعالیت ایزوفرم‌های سوپر اکسید دیسموتاز تحت بیماری فوزاریومی افزایش معنی‌داری داشت. تجزیه پروتئوم برگ لاین‌های ذرت نشان داد که هشت لکه تکرارپذیر معنی‌دار تحت آلودگی بیماری فوزاریومی تغییر بیان داشتند. پروتئین‌های کاندید جزء پروتئین‌های دخیل در سیستم دفاعی و تنظیم بودند. بیشترین اثر پروتئین‌ها در لاین‌های ذرت مربوط به پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی از قبیل Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase 12 و Peroxiredoxin-2E، Chloroplastic بودند. براساس نتایج حاصل چنین به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت ایزوفرم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و پروتئین‌های دخیل در سیستم دفاعی احتمالاً بتوانند اثر بیماری فوزاریومی را در گیاهچه‌های ذرت کاهش دهد.

کلمات کلیدی: آنالیز پروتئومی، بیماریگر، شاخص کلروفیل، گیاهچه، مقاومت میزبانی

Impact of *Fusarium verticillioides* on superoxide dismutase activity and leaf proteins of two corn lines by two-dimensional gel electrophoresis

Afsaneh Rezaei¹, Ali Asghari¹, Sajjad Moharramnejad², Vahid Nasrollahzadeh Asl³, Mehri Yusefi³

¹Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. ²Department of Crop and Horticultural Science Research, Agricultural and Natural Resources and Education Center of Ardabil, AREEO, Moghan, Iran. ³Department of Agricultural Sciences, University of Payame Noor, Tehran, Iran. [✉]sm.chakherlo@yahoo.com

Received: 15 April 2022

Revised: 9 August 2022

Accepted: 20 August 2023

Abstract

To evaluate the effect of *Fusarium verticillioides* on fresh weight, chlorophyll index, the activity of superoxide dismutase isoforms, and leaf proteins using two-dimensional gel electrophoresis in two corn lines, a factorial experiment based on a completely randomized design with five replications was performed with two corn lines B73 and MO17, infected with and without *F. verticillioides* under greenhouse conditions. The results showed that the effect of *F. verticillioides* on fresh weight was not significant, but it was significant on chlorophyll index in both corn lines. Electrophoretic analyses were carried out using 8% slab polyacrylamide gels. Superoxide dismutase was observed in three isoforms into polyacrylamide gels, and also these isoform activities were increased in plants infected by *F. verticillioides*. Leaf tissue proteome analysis of two corn lines showed that eight reproducible protein spots had significant alterations under *F. verticillioides*. These eight differentially expressed proteins were involved in the defense system and regulation processes. Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase 12 and Peroxiredoxin-2E, chloroplastic proteins involved in the defense system had overexpression under *F. verticillioides* in both corn lines. It seems that increased superoxide dismutase isoforms and proteins involved in the defense system can reduce *F. verticillioides* damage in the corn seedlings.

Keywords: Chlorophyll index, Conferring host, Pathogen, Proteome analysis, Seedling

How to cite:

Rezaei A, Asghari A, Moharramnejad S, Nasrollahzadeh Asl V, Yusefi M, 2023. Impact of *Fusarium verticillioides* on superoxide dismutase activity and leaf proteins of two corn lines by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12 (1): 59-69.

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) از تیره غلات، گیاهی یک ساله، تک لپه و ساقه بلند است که به منظور تولید دانه و علوفه زراعت می‌شود و در سطح جهانی نیز یک محصول غله‌ای مهم در تغذیه انسان و حیوان به شمار می‌رود (Akhtar *et al.* 2019). با توجه بالا بودن سطح زیر کشت ذرت، این گیاه در معرض آفات و بیماری‌های متعددی قرار می‌گیرد که برخی از آن‌ها در ایران از درجه اهمیت بالاتری برخوردار می‌باشد. از جمله مهم‌ترین بیماریگر در قسمت بلال ذرت می‌توان گونه‌های مختلف فوزاریوم را نام برد (Akhtar *et al.* 2019)، که علاوه بر خسارت‌های کمی و کیفی به محصول، با تولید مایکوتوکسین‌های مختلف، سلامت انسان و دام را نیز به خطر می‌اندازد (Pizzolitto *et al.* 2020). تاکنون گونه‌های مختلفی از فوزاریوم به عنوان عامل این بیماری معرفی شده‌اند ولی گونه *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماریزای بلال، ساقه، ریشه و گیاهچه ذرت شناخته شده است (Blacutt *et al.* 2018). علایم آلودگی در بلال، ابتدا به صورت لکه‌ها و مناطق تغییر رنگ یافته صورتی عنابی تا قرمز قهوه‌ای روی نوک دانه‌ها ظاهر می‌شود. این لکه‌ها ممکن است به صورت پراکنده یا پیوسته روی دانه‌ها در قسمت نوک بلال به وجود بیایند. در صورت پیشرفت بیماری کپک پودر مانند یا پنبه‌ای صورتی رنگ روی دانه‌های آلوده رشد می‌نماید. عامل این بیماری می‌تواند یک متابولیت ثانویه از خانواده مایکوتوکسین به نام مونیلی فرمین (Moniliformin) بسازد که یک ماده سرطان زاست و با ایجاد اختلال در سیستم عصبی انسان و بیماری شدید در دام ارتباط داده می‌شود (Pizzolitto *et al.* 2020). گیاهان دارای سازوکارهایی هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد با تنش‌های مختلف، مانند محدودیت مواد غذایی، حضور اکسیدان‌ها در محیط و آسیب ناشی از مواد شیمیایی یا عوامل فیزیکی، مقابله نمایند. سلول‌ها در برابر این تنش‌ها، سریعاً پاسخ داده و متابولیسم خود را با شرایط محیطی وفق می‌دهند (Cacique *et al.* 2020).

بررسی واکنش تنش نشان دهنده وجود شبکه‌ای گسترده از سیستم‌های نظارتی هماهنگ می‌باشد. این سازوکارها عمدتاً با مشارکت تعداد بسیار زیادی از متابولیت‌های ثانویه متنوع به همراه آنزیم‌ها، آنتی بیوتیک‌ها و سموم انجام می‌شود (Lanubile *et al.* 2017). اشکال واکنش پذیر اکسیژن از قبیل سوپر اکسید، رادیکال هیدرواکسیل و هیدروژن پراکسید توسط عوامل محیطی و متابولیسم‌های هوازی طبیعی در سیستم

انتقال الکترون تولید می‌شوند این اشکال که به اصطلاح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نامیده می‌شوند می‌توانند به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی حمله‌های اکسایشی نمایند و منجر به جهش، مهار رشد و مرگ سلولی شوند. با این حال، سلول‌های گیاهی دارای اجزای آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که می‌توانند سلول‌ها را از خسارت اکسید کننده محافظت کنند (Moharramnejad & Valizadeh 2019). گیاهان با توسعه یک سیستم دفاعی ضد میکروبی خود را در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) در حذف ROS تولید شده در طی حمله بیماریگر شرکت می‌کنند (Lanubile *et al.* 2017). همچنین ممکن است انواع ROS در اثر زهرابه‌های فوزاریومی ایجاد شوند (Maschietto *et al.* 2016). تجمع پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در داخل بافت‌های گیاهی آلوده یکی از اولین مراحل پاسخ به بیماری است (Gao *et al.* 2018). تخریب اکسایشی H_2O_2 در داخل بافت‌های گیاهی آلوده به فوزاریوم در پنج روز اول اتفاق می‌افتد. به نظر می‌رسد H_2O_2 با فعال کردن برخی ژن‌های مرتبط با تنش در بهبود مقاومت گیاهان به آلودگی فوزاریومی مؤثر باشد (Baghbani *et al.* 2019a).

پروتئین‌ها می‌توانند بهترین توصیف برای عمل تک تک ژن‌ها در سطح مولکولی باشند. از طرف دیگر توجه به این نکته که واکنش به عوامل محیطی از طریق پروتئین‌ها انجام می‌شود، بر اهمیت نقش پروتئین‌ها در سلول می‌افزاید (Rossignol *et al.* 2006). با توجه به اینکه پروتئین‌ها به طور مستقیم در پاسخ گیاه به تنش دخالت دارند، مطالعات پروتئومیکس می‌تواند به طور چشمگیری ارتباطات موجود بین سطوح پروتئین‌ها و سازش گیاه به تنش را آشکار نمایند (Kosová *et al.* 2013). پروتئومیکس با دارا بودن توانایی کشف پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش از پتانسیل مطلوبی جهت استفاده در فرآیند اصلاح مقاومت برای تنش‌ها از جمله بیماری فوزاریوم برخوردار است. مطالعات پروتئوم در برگ‌های ذرت تحت بیماری *F. verticillioides* نشان داد که پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاع آنتی اکسیدان خصوصاً آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و پروتئین‌های مرتبط با بیماریگر افزایش بیان معنی‌داری داشتند (Maschietto *et al.* 2016). در این راستا هدف از انجام این پژوهش، بررسی نحوه فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، تغییرات پروتئینی توسط الکتروفورز دو بعدی و میزان فعالیت

دور و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ شد. عصاره آنزیمی با قطعات بریده شده کاغذ واتمن شماره سه و مناسب با ابعاد چاهک، جذب و در ژل پلی آکرلامید هشت درصد با ابعاد $15 \times 12 \times 0.6$ سانتی‌متر بارگذاری شد. حدود چهار ساعت پس از راه اندازی دستگاه الکتروفورز با آمپر کمتر از ۳۰ میلی‌آمپر، حرکت رنگ بروموفنول بلو با حرکت ۸-۱۰ سانتی‌متری به انتهای ژل رسید و ژل برای برش از وسط برش داده شد و برای رنگ آمیزی آنزیم SOD، $1/5$ میلی‌گرم نیترو بلو تترازولیوم (NBT)، ۱ میلی‌گرم EDTA و $0/1$ میلی‌گرم ریبوفلاوین در داخل ۵۰ میلی‌لیتر محلول حاوی تریس (Tris-HCl) با pH ۸ به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار داده سپس برای رویت نوارهای باند SOD به مدت نیم ساعت در مقابل نور شدید قرار داده شد (Moharramnejad & Valizadeh 2019).

الکتروفورز دو بُعدی

به‌منظور استخراج محتوای پروتئین برگ ذرت از روش TCA/acetone استفاده شد (Bandehagh et al. 2021a). برای انجام الکتروفورز بعد اول از ژلهای لوله‌ای دست ساز استفاده شد که حاوی آب دیونیزه، NP-40، محلول آکرلامید ۳۰ درصد، آمفولیت‌های با pH بین سه تا ۱۰ و پنج تا هشت، APS ۱۰ درصد و محلول TEMED می‌باشد. برای تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌های برگ، از روش بردفورد (Bradford 1979) استفاده گردید. محلول پروتئینی بر حسب غلظت پروتئین‌های بافت برگ بر روی ژل بعد اول بارگذاری شد. برای جداسازی پروتئین‌ها براساس نقطه ایزوالکتریک آن‌ها، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه ولتاژ ۲۰۰ ولت، به مدت ۱۶ ساعت ولتاژ ۴۰۰ ولت و به مدت یک ساعت ولتاژ ۶۰۰ ولت اعمال شد. برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی آن‌ها از روش SDS-PAGE استفاده شد. رنگ آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی طبق دستورالعمل مربوطه رنگ آمیزی شد (Bandehagh et al. 2021b). برای تصویربرداری از ژل‌ها دستگاه Bio-Rad GS-800 مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار MCID برای کمی سازی (مساحت \times شدت) نوار آنزیمی به‌عنوان فعالیت دنسیتومتریکی ایزوفرم‌های آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز روی ژل پلی‌آکرلامید استفاده شد. تصاویر به‌دست آمده الکتروفورز دو بُعدی توسط نرم افزار PD-quest 6.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ژل‌ها به‌همراه تکرار آن

فتوسنتز در لاین‌های ذرت تحت آلودگی بیماری فوزاریوم *F. verticillioides* بود.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش و نحوه تیمار با بیمارگر *F. verticillioides* آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار در گلخانه دانشگاه پیام نور استان آذربایجان شرقی در سال ۱۳۹۹ به اجرا درآمد. یکی از عامل‌ها دو لاین MO17 و B73 ذرت و عامل دوم تلقیح در دو سطح آلودگی در مرحله گیاهچه‌ای و عدم آلودگی (به‌عنوان شاهد) بودند. جدایه‌های قارچ فوزاریوم *F. verticillioides* از بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و بذر لاین‌های ذرت از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل تهیه شدند. این جدایه‌ها برای رشد در محیط کشت (20 g dextrose + 20 g agar + PDA (25 g potato extract) با شرایط ۱۲ ساعت نور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در زمان ظهور برگ چهارم گیاهان، قارچ‌های رشد داده شده در محیط PDA روی برگ لاین‌های ذرت توسط دیسکی با لبه تیز قرار داده و آلودگی صورت گرفت (Baghbani et al. 2019a).

اندازه‌گیری وزن تر و محتوای کلروفیل

یک هفته بعد از تلقیح با قارچ عامل بیماری کل گیاهچه‌ها از گلدان‌ها خارج شده بعد وزن تر گیاهچه‌ها با استفاده از ترازو حساس توزین شدند (Baghbani et al. 2019a) و همچنین برای اندازه‌گیری شاخص کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه اسپد (SPAD-502; Minolta konica) بعد از یک هفته تلقیح با عامل بیماری از جوان‌ترین و کامل‌ترین برگ بوته انتخابی از هر گلدان استفاده گردید.

استخراج و رنگ آمیزی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

بعد از نمونه برداری، برگ‌ها در داخل یخ خشک قرار داده شد و سپس یک گرم از برگ تازه در بافر استخراج (تریس ۵۰ میلی‌مولار، پنج درصد ساکاروز، ۵۰ میلی‌مولار اسکوربیک اسید، ۲۰ میلی‌مولار سدیم متا بی سولفیت و دو درصد پلی‌اتیلن گلیکول) با pH برابر $7/5$ حاوی $0/1$ درصد ۲-مرکاپتواتانول با نسبت وزنی یک از برگ و یک از بافر استخراج، به خوبی هموزنیزه و سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در 10000

وزن تر و شاخص کلروفیل

تجزیه واریانس داده‌ها برای وزن تر و شاخص کلروفیل نشان داد که فقط اثر لاین برای وزن تر و اثر آلودگی فوزاریومی برای شاخص کلروفیل به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). اثر متقابل لاین × آلودگی فوزاریوم برای صفات وزن تر و شاخص کلروفیل غیرمعنی‌دار بود.

ها بررسی و لکه‌های مشترک بین تکرارها توسط نرم افزار علامت‌گذاری شدند. به منظور شناسایی احتمالی لکه‌های پروتئینی از دو معیار نقطه ایزوالکتریک (pI) و وزن مولکولی (MW) در نرم افزار آنلاین Expasy Tag-Ident داده پایگاه UniprotKB استفاده شد. همچنین تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت.

نتایج و بحث

جدول ۱. تجزیه واریانس تیمار با بیماریگر *Fusarium verticillioides* و لاین‌های ذرت روی وزن تر، شاخص کلروفیل و فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز.

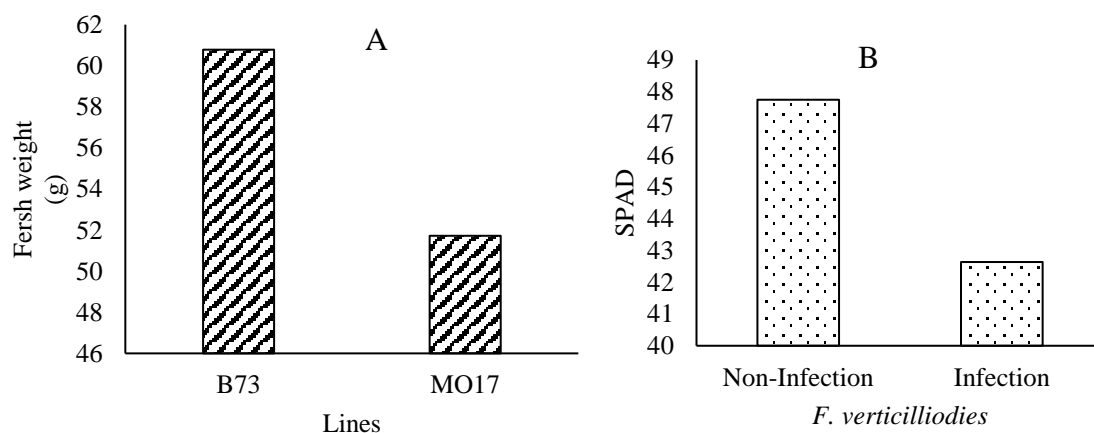
Table 1. Analysis of variance of *Fusarium verticillioides* and maize lines in the fresh weight, chlorophyll index (SPAD), and superoxide dismutase isoform activities.

Sources of variations	D F	Mean squares				
		Fresh weight	SPAD	SOD1	SOD2	SOD3
Line	1	410.7*	23.7 ^{ns}	3.7 ^{ns}	3.6 ^{ns}	1.1 ^{ns}
Disease	1	120.3 ^{ns}	121.2**	68.7*	6.9 ^{ns}	20.8*
Line× Disease	1	1.4 ^{ns}	1.7 ^{ns}	0.4 ^{ns}	72.3*	0.4 ^{ns}
Error	16	64.9	9.8	3.2	5.6	2.3
CV(%)		12.3	8.5	7.7	6.8	5.9

^{ns}, * and ** are non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

نتایج حاصل از تحقیقات (Baghbani et al. 2019a)، تنش فوزاریوم (*F. verticillioides*) باعث کاهش ۱۵/۲۲ درصد عملکرد دانه شد. (Baghbani et al. 2019b) با ارزیابی غلظت رنگدانه‌های برگ ذرت تحت آلودگی بیماری *F. verticillioides* اظهار کردند که این بیماری باعث کاهش معنی‌دار غلظت رنگدانه‌های کلروفیلی شد.

مقایسه میانگین وزن تر در لاین‌های ذرت مورد مطالعه نشان داد که لاین B73 بیشترین وزن تر را به خود اختصاص داده است (شکل ۱ A). بیماری فوزاریوم به‌طور معنی‌دار باعث کاهش ۱۲ درصد شاخص کلروفیل در لاین‌های ذرت مورد مطالعه شد (شکل ۱ B). که نشان از تأثیر *F. verticillioides* روی سیستم فتوسنتزی در لاین‌های ذرت می‌باشد. براساس

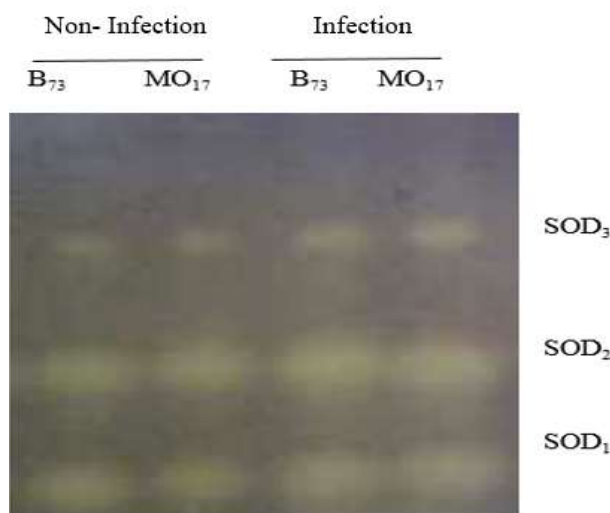


شکل ۱. میانگین وزن تر (A) و شاخص کلروفیل (B).

Fig 1. Mean of fresh weight (A) and chlorophyll index (B).

متقابل لاین \times آلودگی با *F. verticillioidea* فقط برای ایزوفرم SOD2 در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل نشان داد که آلودگی فوزاریوم در لاین‌های ذرت باعث افزایش معنی‌دار فعالیت ایزوفرم‌های SOD شد (شکل ۳). چنین به نظر می‌رسد که ایزوفرم‌های SOD ممکن است با افزایش فعالیت‌ها، اثرات ناشی از بیماری فوزاریوم را در لاین‌های ذرت کاهش می‌دهد. مقایسه میانگین اثر برهمکنش لاین \times آلودگی بیماری فوزاریوم برای ایزوفرم SOD2 نشان داد که لاین MO17 دارای بیشترین فعالیت SOD2 داشت (شکل ۳ B).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ تازه گیاهچه‌های ذرت روی ژل پلی‌آکریلامید هشت درصد، سه ایزوفرم قابل مشاهده بود (شکل ۲). Moharramnejad & Valizadeh 2019 با بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روی ژل آکریلامید در هیبریدهای ذرت سه ایزوفرم SOD₁ (Fe-SOD)، SOD₂ (Cu/Zn-SOD) و SOD₃ (Mn-SOD) را گزارش کردند که با نتایج حاضر مطابقت دارد. براساس تجزیه واریانس داده‌ها، اثر آلودگی با *F. verticillioidea* برای ایزوفرم‌های SOD1 و SOD3 در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین اثر



شکل ۲. ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز در لاین‌های ذرت تحت آلودگی بیماری *F. verticillioidea*

Fig 2. Isoforms of superoxide dismutase in maize lines under *F. verticillioidea* infection.

SAR می‌شود مورد نیاز است (Gao *et al.* 2018). ROS به- عنوان یکی از اولین رویدادهای مرتبط با مقاومت گیاه در برابر بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. در شرایط عادی میزان تولید ROS توسط سیستم‌های مختلف بیوشیمیایی در تمام سلول‌های زنده نسبتاً کم است و باعث آسیب کمی می‌شود چون از طریق سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی به‌طور مناسب حذف می‌شود (Cacique *et al.* 2020). در مطالعه آیارکایالی و همکاران (Ayar-Kayali *et al.* 2002) فعالیت SOD در پاسخ به آلودگی با *F. acuminatum* به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

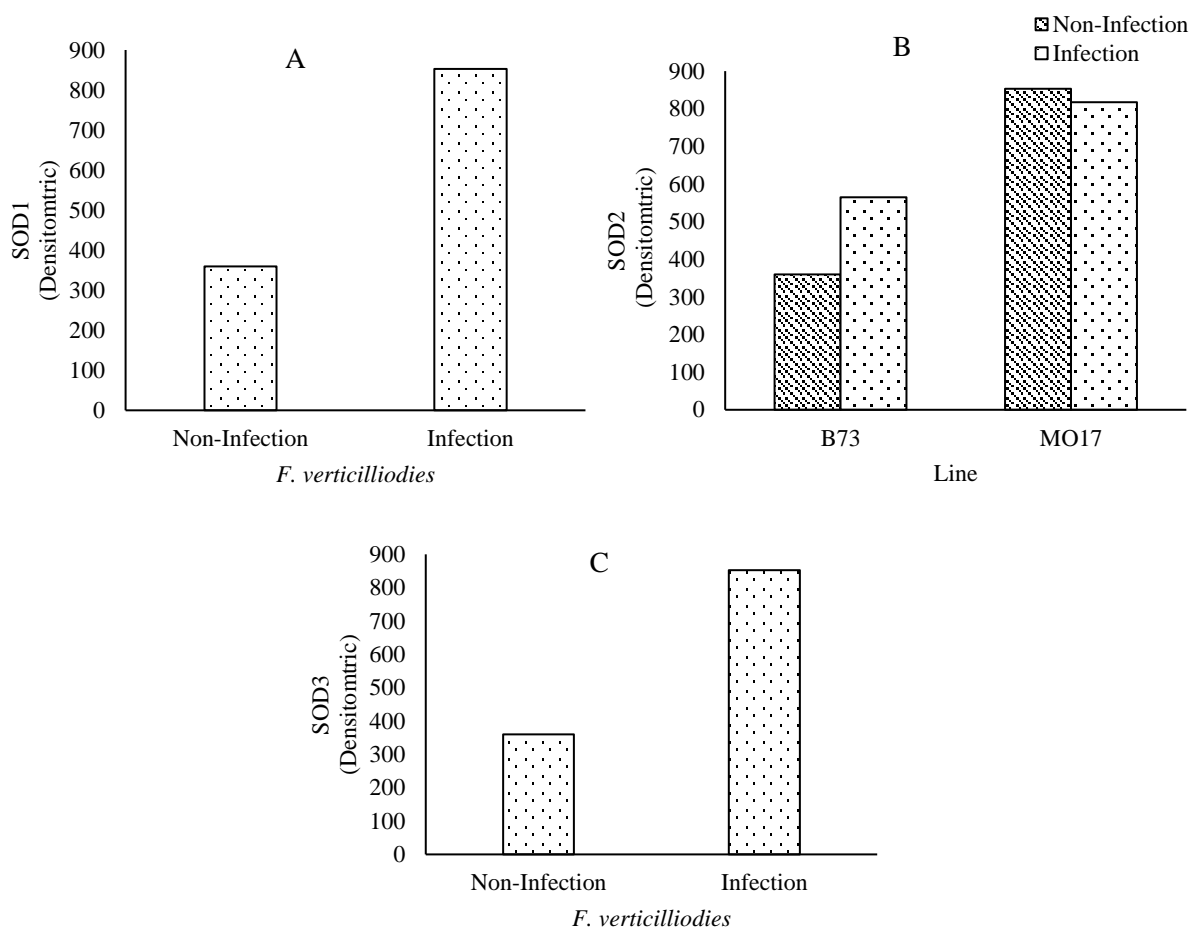
الگوی الکتروفوریتیکی پروتئین کل

تجزیه عکس‌های ژل دو بُعدی نشان داد (شکل ۴) که از

استرس‌های زیست محیطی و فیزیولوژیکی اثرات مختلفی بر تمام موجودات زنده دارد. برای مقابله با اثرات زیان آور تنش، سلول‌ها برای تعمیر آسیب و محافظت از سلول‌ها برای بیش‌تر در معرض قرار نگرفتن به همان استرس و یا دیگر اشکال استرس، با پاسخ‌های سریع مولکولی توسعه پیدا کرده‌اند (Lanubile *et al.* 2017; Maschietto *et al.* 2016). ممکن است نتیجه این استرس‌ها، افزایش تولید ROS توسط زنجیره تنفسی شود. ROSها بسیار واکنش‌پذیر هستند و می‌توانند باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند. H₂O₂ نقش مهمی در مکانیسم مقاومت، تقویت دیواره سلول‌های گیاهی، تولید فیتوالکسین و تحریک چندین ژن گیاهی در حفاظت و دفاع سلولی دارد، H₂O₂ همچنین برای شروع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده که منجر به

سه گروه قرار گرفتند (جدول ۲). گروه‌های عملکردی شامل پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی (۷۵٪) و پروتئین‌های تنظیم کننده (۲۵٪) دارای تغییر بیان بودند. بیشترین و کمترین تغییرات پروتئوم در اثر آلودگی فوزاریوم به ترتیب به پروتئین‌های دفاعی و پروتئین فتوسنتزی بودند (شکل ۵).

۶۷ لکه پروتئینی ظاهر شده تکرارپذیر، هشت لکه پروتئینی در اثر آلودگی فوزاریومی تغییر فراوانی داشتند. از این هشت لکه پروتئینی، چهار لکه افزایش بیان و چهار لکه کاهش بیان داشتند (شکل ۵). پس از شناسایی احتمالی، پروتئین‌ها براساس عملکرد در



شکل ۳. فعالیت ایزوفرم سوپراکسید دیسموتاز یک (A)، ایزوفرم سوپراکسید دیسموتاز دو (B) و ایزوفرم سوپراکسید دیسموتاز سه (C)، در لاین‌های ذرت تحت بیماری *F. verticillioides*

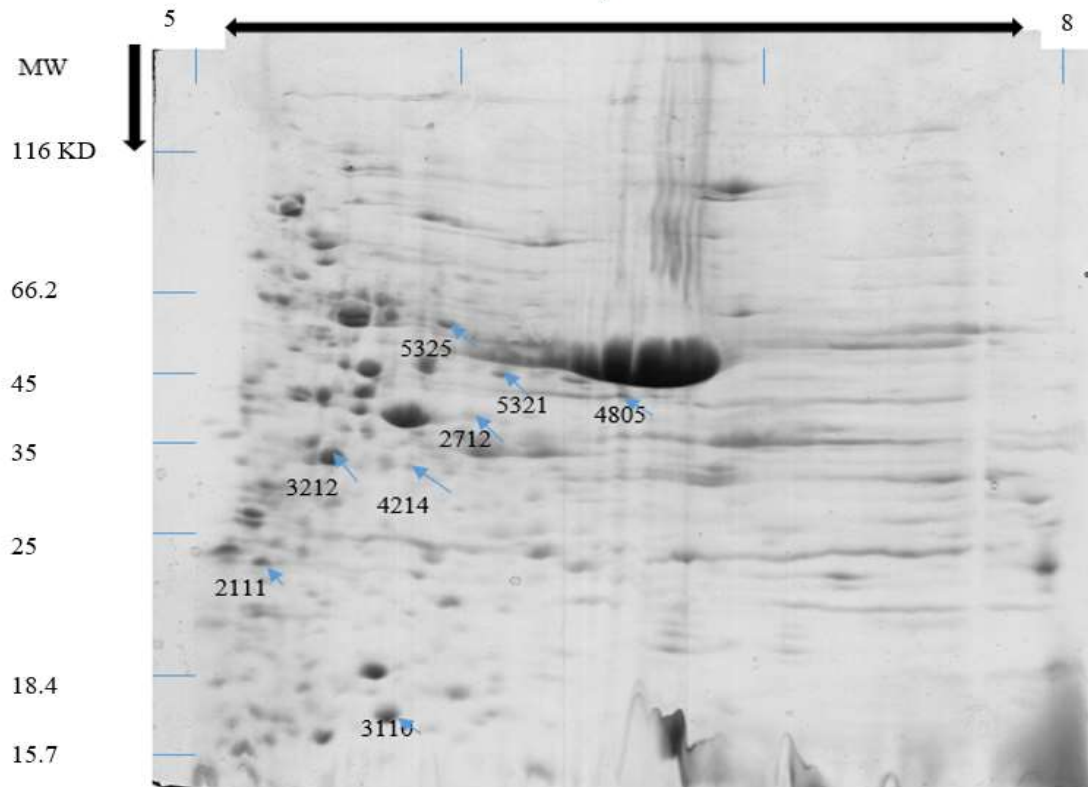
Fig 3. Superoxide dismutase isoform activities as A; SOD1, B; SOD2, and C; SOD3 in the maize lines under *F. verticillioides*.

سم‌زدایی از الکیل هیدروپروکسیدها و پروکسی‌نیتريت را نیز انجام می‌دهند با وجود این که تفاوت‌های بارزی در اختصاصیت سوپسترا و ویژگی‌های کینتیکی وجود دارد. به‌واسطه این عملکرد، پروکسی‌ردوکسین‌ها احتمالاً در تنظیم پیام‌رسانی وابسته به اگزولپید و پیام‌رسانی مرتبط با NO نقش دارد (Dreyer et al. 2021). شواهد تجربی در ارتباط با نقش سه‌گانه پروکسی‌ردوکسین‌ها در زیست‌شناسی سلول گیاهی شامل الف) فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ب) تنظیم کننده مسیرهای پیام‌رسانی سلولی و ج) Redox sensor می‌باشد. این پروتئین در مقایسه با

ATP سنتتاز (لکه شماره ۴۲۱۴) آنزیمی می‌باشد که گرادیان الکتروشیمیایی را در عرض غشای تیلاکوئیدی تنظیم کرده و به‌طور مستقیم بر میزان انتقال الکترون فتوسنتزی تأثیر می‌گذارد، بنابراین نمایانگر فاکتور کلیدی در تنظیم تبدیل انرژی در کلروپلاست‌ها می‌باشد (Yang et al. 2020). بیان این لکه در تیمار با قارچ فوزاریوم کاهش بیان نشان داده است. پروکسی‌ردوکسین‌ها (لکه شماره ۲۱۱۱) گروهی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تجزیه کننده H_2O_2 می‌باشند که در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند. علاوه بر تجزیه H_2O_2 ، این پروتئین‌ها

cleaning عمل می‌کنند، در صورتیکه آنزیم‌های دیگر سطوح سوبستراهای این آنزیم‌ها را برای حفظ هموستازی فیزیولوژیکی دریافت و تنظیم نمایند.

شاهد افزایش بیان یافته است. نودیکس هیدرولازها (لکه شماره ۳۲۱۲) خانواده بزرگی از پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند که هیدرولیز مشتقات نوکلئوزید دی‌فسفات‌ها را برعهده دارند. بعضی از نودیکس هیدرولازها به‌عنوان آنزیم‌های House pI



شکل ۴. الگوی الکتروفورز دو بُعدی پروتئوم برگ لاین‌های ذرت تحت آلودگی *Fusarium verticillioides* (pI: ایزوالکتریک و MW: وزن مولکولی).

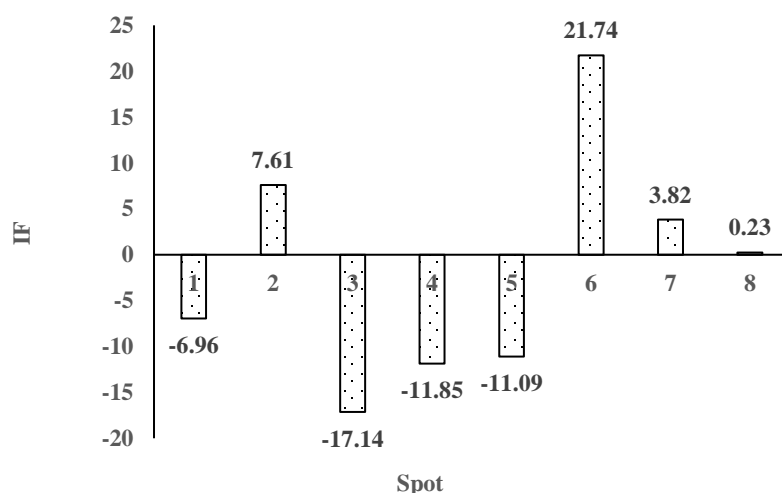
Fig 4. A pattern of the 2-DE proteome of maize line leaves under *Fusarium verticillioides* diseases (pI: Isoelectric and MW: Molecular weight).

جدول ۲. مطالعات پروتئین‌های شناسایی شده در لاین‌های ذرت تیمار شده با *Fusarium verticillioides*

Table 2. Identification of proteins in the maize lines inoculated with *Fusarium verticillioides*.

شماره No.	لکه Spot	اسم پروتئین Protein name	شماره دسترسی Accession number ^a	عملکرد Performance
1	4214	ATP synthase subunit gamma, chloroplastic	P0C1M0	تنظیمی
2	2111	Peroxiredoxin-2E, chloroplastic	Q949U7	دفاعی
3	3212	Nudix hydrolase 6	Q9SJC4	تنظیمی
4	3110	Putative defensin-like protein 188	P82756	دفاعی
5	5325	Fatty acid amide hydrolase	Q7XJJ7	دفاعی
6	5321	Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase 12	Q5Z9J0	دفاعی
7	2712	Heat shock protein 90	gi 110270510	تنظیمی
8	4805	Nonribosomal peptide synthetase VLMS	A0A024F910	دفاعی

a: Accession number in NCBI



شکل ۵. میزان بیان لکه‌های شناسایی شده در برگ لاین‌های ذرت تیمار شده با *Fusarium verticillioides* (IF: فاکتور القاء)

Fig 5. Expression of protein identifications in the maize line leaves inoculated with *Fusarium verticillioides* (IF: Induction factor)

تعداد متعددی از گزارش‌ها نشان می‌دهند که این مولکول‌ها بخش جدایی ناپذیر سیستم ایمنی ذاتی گیاه می‌باشند. بسیاری از دفنسین‌های گیاهی در پاسخ به حمله بیماریگرها، زخم و برخی تنش‌های غیرزیستی افزایش بیان نشان می‌دهند این مولکول‌ها در برگ‌ها، غده‌ها، گل‌ها، غلاف و دانه‌ها شناسایی شده و نقش مهمی در جلوگیری از جوانه‌زنی بذرها و گیاهچه-های توسعه یافته ایفا می‌کنند (De Beer & Vivier 2011). این پروتئین نیز کاهش بیان نشان داده است. پروتئین Fatty acid amide hydrolase (لکه شماره ۵۳۲۵) باعث تجزیه به روش بیواکتیو آمیدهای اسیدهای چرب به اسیدهای تشکیل دهنده آن می‌شود که در نتیجه آن توالی‌های سیگنالی عملکردی این ملکول‌ها به پایان می‌رسد این پروتئین N-استیل تانول آمین (NAE) را به اتانول آمین تبدیل می‌کند و همچنین ممکن است در سیگنال دهی آپسیک اسید و مکانیسم‌های دفاع گیاه به‌جز فعالیت‌های کاتالپکی نقش داشته باشد (Faure et al. 2015). طبق گزارش کانگ و همکاران (Kang et al. 2008) پروتئین فوق در گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش سوبه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1904 افزایش بیان داشته است. پروتئین Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase 12 (لکه شماره ۵۳۲۱) احتمالاً در مسیر سیگنال‌دهی دفاع مشارکت می‌کند. در شرایط آزمایشگاهی آنزیم رونویسی را فعال می‌کند و باعث افزایش خاصیت اتصال به DNA آنزیم رونویسی به پروموتور جعبه GCC در ژن‌های مرتبط با بیماری زایی (PR) می‌شود (Banerjee et al. 2020). طبق تحقیقات خو و ژانگ (Xu & Zhang 2015)

بیان ژن *AtNUDT7* توسط تنش‌های چندگانه از جمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی القا می‌شود (Sun et al. 2020). این ژن به‌عنوان تنظیم کننده منفی در ارتباط با پاسخ‌های دفاعی شناخته شده است. جهش یافته‌هایی که ژن *AtNUDT7* را از دست داده‌اند، مقاومت گیاه در برابر بیماری تقویت شده و موجب می‌گردد گیاه در برابر عوامل محرک از قبیل میکرو-ارگانیسم‌های بیماریگر و غیربیمارگر پاسخگویی شدیدی (Hyper response) از خود نشان دهد (Ge & Xia 2008). چنگ و همکاران (Cheng et al. 2006) دریافتند که نودیکیس هیدرولاز ۱۳ از مرحله تماس با بیمارگر تا مرحله دوره بیماری طی دوره آلودگی با بیمارگر افزایش بیان یافت. چنگ و همکاران (Cheng et al. 2006) دریافتند که این پروتئین احتمالاً به‌عنوان یک تنظیم کننده پاسخ دفاعی منفی و تقویت مقاومت در برابر بیماری عمل کرده و باعث می‌شود گیاهان در برابر عوامل محرک از قبیل بیمارگرها شدیداً پاسخگو باشد. این پروتئین هم تحت تنش بیماری کاهش بیان داشته است. پروتئین Putative defensin-like protein 188 (لکه شماره ۳۱۱۰) پپتیدهای کاتیونی کوچک با ۴۵ تا ۵۴ آمینواسید، با ترتیب‌های حفاظت شده از آمینواسیدهای سیستمین بوده که قادر به تشکیل سه الی چهار پیوند دی‌سولفیدی می‌باشند. دفنسین‌های گیاهی ساختمانی سوم محافظت شده‌ای از خود نشان می‌دهند که شامل رشته‌های سه‌گانه ناموازی صفحه بتا و یک ساختار پیچ آلفا می‌باشند که به‌شکل فشرده‌ای با پروند-های دی‌سولفیدی تثبیت شده‌اند (Zhu et al. 2005). نقش دفنسین‌ها در پاسخ دفاعی گیاهان به‌خوبی گزارش شده است.

اسید می‌باشند. و رلامین A هیدروکسیلاسیون موقعیت کربن ۵ تترادکانوئیک اسید تولید شده در متابولیسم اولیه را برعهده دارد در حالیکه نقش و رلامین B هنوز بخوبی درک نشده است (Ishidoh et al. 2014). این لکه در اثر تیمار قارچی افزایش بیان قابل توجهی از خود نشان نداد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آلودگی به بیماری فوزاریومی با *F. verticillioides* اثر معنی‌دار روی وزن تر گیاهچه‌های لاین‌های ذرت مورد مطالعه نداشت. ولی میزان شاخص کلروفیل در تمیاری‌های تلخ شده با *F. verticillioides* به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. فعالیت ایزوفورم‌های آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز روی ژل پلی‌آکرلامید هشت درصد در تمیاری‌های تلخ شده با *F. verticillioides* در لاین‌های ذرت افزایش معنی‌دار نشان داد. تجزیه الکتروفورز دو بُعدی پروتئین‌های برگ لاین‌های ذرت تیمار شده با *F. verticillioides* هشت لکه پروتئینی تکرارپذیر تغییر بیان معنی‌دار نشان داد. این هشت لکه پروتئین بیشتر در گروه پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که احتمالاً لاین‌های ذرت مورد مطالعه از طریق سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی، صدمات ناشی از *F. verticillioides* را بتوانند کاهش دهند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از جناب آقای دکتر علی بنده حق به خاطر کمک و راهنمایی در اجرای این پژوهش ابراز می‌نمایند.

پروتئین فوق در گیاه گندم و تحت تنش قارچ *Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous) حتی در شرایطی که قارچ هنوز به‌صورت عمیق در گیاه نفوذ نکرده بود افزایش بیان داشته که با نتایج ما مطابقت داشت. پروتئین‌های Hsp-90 (لکه شماره ۲۷۱۲) چپرون‌های مولکولی با فراوانی بالا و توالی بسیار محافظت شده می‌باشند. خصوصیات بیان این مولکول‌ها نشان می‌دهد که اگر چه بعضی اعضای خانواده Hsp-90 در اثر تنش القا می‌شوند، اما برخی دیگر از اعضای این خانواده مولکولی به‌طور اساسی بیان می‌شوند. پروتئین‌های Hsp-90 دارای دو دومین بسیار محافظت شده می‌باشند که یکی از آن‌ها دومین متصل شونده به آدنوزین‌تری فسفات در انتهای آمینی بوده و دیگری ناحیه اتصال با شارژ بالا می‌باشد (Kadota & Shirasu 2012). پروتئین‌های Hsp-90 در بخش‌های مختلفی از سلول یافت می‌شود و مسئول بازسازی پروتئین‌های دناتوره شده و تا کردن پروتئین‌های تازه تشکیل شده می‌باشند. همچنین، این پروتئین‌ها در تنظیم مولکول‌های پیام‌رسان سلولی مختلف نقش دارند (Kadota & Shirasu 2012). از میان Hsp های سیتوزولی، نقش Hsp-90 در مقاومت به بیماری از طریق تعامل با پروتئین‌های مقاومت R، به‌عنوان گیرنده بیمارگر، تأیید شده است و این تعامل برای فعالیت R پروتئین ضروری می‌باشد. همچنین وجود Hsp-90 برای پایداری و تجمع R پروتئین‌ها ضروری است (Li et al. 2020). با توجه به گزارش‌های ذکر شده، افزایش بیان این لکه در اثر القای حاصل از تلقیح با قارچ قابل توجه می‌باشد. پروتئین پپتید سنتتاز غیرریبوزومی (لکه شماره ۴۸۰۵) آنزیمی می‌باشد که در بیوسنتز و رلامین، لیوپروتئینی که فعالیت ضد قارچی در برابر قارچ‌های بیمارگر گیاهی دارد، دخیل می‌باشد، و رلامین A و B در مجموع به‌عنوان اجزای ضروری در بیوسنتز ۵- هیدروکسی تترادکانوئیک

References

- Akhtar S, Li G, Nazir A, Razzaq A, Ullah R, Faisal M, RehmanNaseer MA, HaseebRaza M, 2019. Maize production under risk: The simultaneous adoption of off-farm income diversification and agricultural credit to manage risk. *Journal of Integrative Agriculture* 18: 460-470.
- Ayar-Kayali H, Ozer N, Tarhan L, 2002. Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400: 265-272.
- Baghbani F, Moharramnejad S, Lotfi R, Bandehhagh A, Karbalaee H, 2019a. Study of catalase activity and photosynthetic efficiency of maize lines under fusarium contamination (*Fusarium verticillioides*). *Journal of Applied Research in Plant Protection* 8: 13-23. (In Persian with English Summary).
- Baghbani F, Lotfi R, Moharramnejad S, Bandehhagh A, Roostaei M, Rastogi A, Kalaji HM, 2019b. Impact of *Fusarium verticillioides* on chlorophyll

- fluorescence parameters of two maize lines. *European Journal of Plant Pathology* 154: 337–346.
- Bandehagh A, Dehghanian Z, Moharramnejad S, Aliyari Rad S, Shirmohammadi S, Ashraf M, 2021a. Assessment of heterosis proteins in maize (*Zea mays* L.) leaves by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Gene* 28: 100331.
- Bandehagh A, Dorani I, Aliyari Rad S, Khalili Korani N, Moharramnejad S, 2021b. Effect of salinity stress on protein profile of susceptible and tolerance (*Zea mays* L.) inbred lines. *Iranian Journal of Crop Sciences* 23: 157–172. (In Persian with English Summary).
- Banerjee G, Singh D, Sinha AK, 2020. Plant cell cycle regulators: Mitogen-activated protein kinase, a new regulating switch? *Plant Science* 301: 110660.
- Blacutt AA, Gold SE, Voss KA, Gao M, Glenn AE, 2018. *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology* 108: 312–326.
- Bradford MM, 1979. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Cacique IS, Pinto LF, Aucique-Pérez CE, Wordell Filho AW, Rodrigues FA, 2020. Physiological and biochemical insights into the basal level of resistance of two maize hybrids in response to *Fusarium verticillioides* infection. *Plant Physiology and Biochemistry* 152: 194–210.
- Chen Y, Dai X, Zhao Y, 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20: 1790–1799.
- De Beer A, Vivier MA, 2011. Four plant defensins from an indigenous South African *Brassicaceae* species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research Notes* 4: 459.
- Dreyer A, Treffon P, Basiry D, Jozefowicz AM, Matros A, Mock HP, Dietz KJ, 2021. Function and regulation of chloroplast peroxiredoxin IIE. *Antioxidants* 10: 152.
- Faure L, Cavazos R, Khan BR, Petros RA, Koulen P, Blancaflor EB, Chapman KD, 2015. Effects of synthetic alkamides on *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase activity and plant development. *Phytochemistry* 110: 58–71.
- Gao S, Gold SE, Glenn AE, 2018. Characterization of two catalase-peroxidase-encoding genes in *Fusarium verticillioides* reveals differential responses to *in vitro* versus *in planta* oxidative challenges. *Molecular Plant Pathology* 19: 1127–1139.
- Ge X, Xia Y, 2008. The role of AtNUDT7, a Nudix hydrolase, in the plant defense response. *Plant Signaling and Behavior* 3: 119–120.
- Ishidoh KI, Kinoshita H, Ihara F, Nihira T, 2014. Efficient and versatile transformation systems in entomopathogenic fungus *Lecanicillium* species. *Current Genetics* 60: 99–108.
- Kadota Y, Shirasu K, 2012. The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1823: 689–697.
- Kang L, Wang YS, Uppalapati SR, Wang K, Tang Y, Vadapalli V, Venables BJ, Chapman KD, Blancaflor EB, Mysore KS, 2008. Overexpression of a fatty acid amide hydrolase compromises innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 56: 336–349.
- Kosová K, Vítámvás P, Urban MO, Prášil IT, 2013. Plant proteome responses to salinity stress—comparison of glycophytes and halophytes. *Functional Plant Biology* 40: 775–786.
- Lanubile A, Maschietto V, Borrelli VM, Stagnati L, Logrieco AF, Marocco A, 2017. Molecular basis of resistance to *fusarium* ear rot in maize. *Frontiers in Plant Science* 8: 1774.
- Li W, Chen Y, Ye M, Wang D, Chen Q, 2020. Evolutionary history of the heat shock protein 90 (Hsp90) family of 43 plants and characterization of Hsp90s in *Solanum tuberosum*. *Molecular Biology Reports volume* 47: 6679–6691.
- Maschietto V, Lanubile A, DeLeonardis S, Marocco A, Paciolla C, 2016. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxidant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Physiology* 200: 53–61.

- Moharramnejad S, Valizadeh M, 2019. A key response of grain yield and superoxide dismutase in maize (*Zea mays* L.) to water deficit stress. *Journal of Plant Physiology and Breeding* 9: 77–84.
- Pizzolitto RP, Jacquat AG, Usseglio VL, Achimón F, Cuello AE, Zygadlo JA, Dambolena JS, 2020. Quantitative-structure-activity relationship study to predict the antifungal activity of essential oils against *Fusarium verticillioides*. *Food Control* 108: 106831.
- Rossignol M, Peltier JB, Mock H, Matros A, Maldonado A, Jorin J, 2006. Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. *Proteomics* 6: 5529–5548.
- Sun P, Dégut C, Réty S, Caissard JC, Hibrand-Saint Oyant L, Bony A, Paramita SN, Conart C, Magnard JL, Jeuffre J, Abd-El-Haliem AM, Marie-Magdelaine J, Thouroude T, Baltenweck R, Tisé C, Foucher F, Haring M, Huguency P, Schuurink RC, Baudino S, 2020. Functional diversification in the Nudix hydrolase gene family drives sesquiterpene biosynthesis in *Rosa × wichurana*. *Plant Journal* 104: 185–199.
- Xu J, Zhang S, 2015. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20: 56–64.
- Yang JH, Williams D, Kandiah E, Fromme P, Chiu PL, 2020. Structural basis of redox modulation on chloroplast ATP synthase. *Communications Biology* 3: 482.
- Zhou WC, Kolb FL, Riechers DE, 2005. Identification of proteins induced or upregulated by fusarium head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 48: 770–780.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)