

اثر سمیت آهن بر میزان بیان نسبی ژن‌های *SOD*، *MDHR* و *GPXI* در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل برنج

محمد محسن‌زاده گلفزانی^{۱*}، مریم پسندیده ارجمند^۲، مجتبی کردروستامی^۳، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^۴، سیدحسن حسنی کومله^۵، محمدحسین رضادوست^۶

۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. دانش‌آموخته دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۵. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۶. مربی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۹/۱۸)

The effect of iron stress on the relative expression level of *SOD*, *MDHR* and *GPXI* genes in tolerant and sensitive genotypes of Rice

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani^{1*}, Maryam Pasandideh Arjmand², Mojtaba Kordrostami³, Habibollah Samizadeh Lahiji⁴, Hassan Hassani Kumle⁵, Mohammad Hossein Rezaadost⁶

1. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. M.Sc., Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Ph. D, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

4. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

6. Instructor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: May 31, 2018 - Accepted: Dec. 9, 2018)

Abstract

Increasing of reactive oxygen species (ROS) under iron toxicity is considered as one of the major constraints to rice production. In this study the alterations of *SOD*, *GPXI* and *MDHR* expression level in two genotypes of rice, Pokkali (as tolerant) and IR64 (as sensitive) were monitored under different concentrations of iron levels [(0) (nonstress)], 100, 250, 400 and 500 mg/lit⁻¹Fe-EDTA). The treatments were done when the plants were at 4-leaf stage and lasted for two weeks. Results showed that the expression levels of genes in Pokkali were higher than IR64. The expression level of *SOD* in IR64, increased at iron concentration increased, while it decreased at higher Fe-level. The expression level of *GPXI* was increased in IR64, but decreased in Pokkali. The expression level of *MDHR* in IR64 was decreased at early stage of Fe-treatment, but then increased. Inversely, in Pokkali *MDHR* expression reduced constantly under Fe stress. Overall, the relative over expression of genes in Pokkali and presence of different expression levels of them between different concentrations of Fe in tolerant and sensitive genotypes indicate that the gene could remarkably effect on the tolerant level of pokkali by reducing ROS production under Fe-toxicity.

چکیده

افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در سطح سلولی در شرایط سمیت ناشی از آهن یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید برنج در زمین‌های کشاورزی است. در این پژوهش، تغییرات میزان بیان نسبی ژن‌های سوپراکسیددیسموتاز (*SOD*)، گلوکاتایون پراکسیداز (*GPXI*) و مونوهدیدروآسکوربات ردوکتاز (*MDHR*) در دو ژنوتیپ Pokkali (متحمل) و IR64 (حساس) برنج در سطوح ۰ (شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آهن (Fe-EDTA) در شرایط هیدروپونیک به مدت ۲ هفته در مرحله چهاربرگی بررسی شد. نتایج نشان داد بیان نسبی همه ژن‌های مورد بررسی در همه سطوح تنش در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. با افزایش سطح تنش میزان بیان ژن *SOD* در IR64 افزایش و سپس کاهش یافت. همچنین با افزایش تنش میزان بیان ژن *GPXI* در ژنوتیپ IR64 روندی صعودی و در ژنوتیپ Pokkali روندی نزولی داشت. بیان ژن *MDHR* در ژنوتیپ IR64 در ابتدا روند نزولی و سپس صعودی داشت. در حالی که بیان این ژن در ژنوتیپ Pokkali دارای روند کاهشی بود. به نظر می‌رسد که بیش بیانی نسبی ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali نسبت به IR64 و همچنین تفاوت در روند تغییرات بیان ژن در سطوح مختلف تنش آهن می‌تواند از طریق کاهش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن اثر چشمگیری بر میزان مقاومت گیاه به سمیت ناشی از آهن داشته باشد.

Keywords: Hydroponic, IR64, *Oryza sativa*, Pokkali

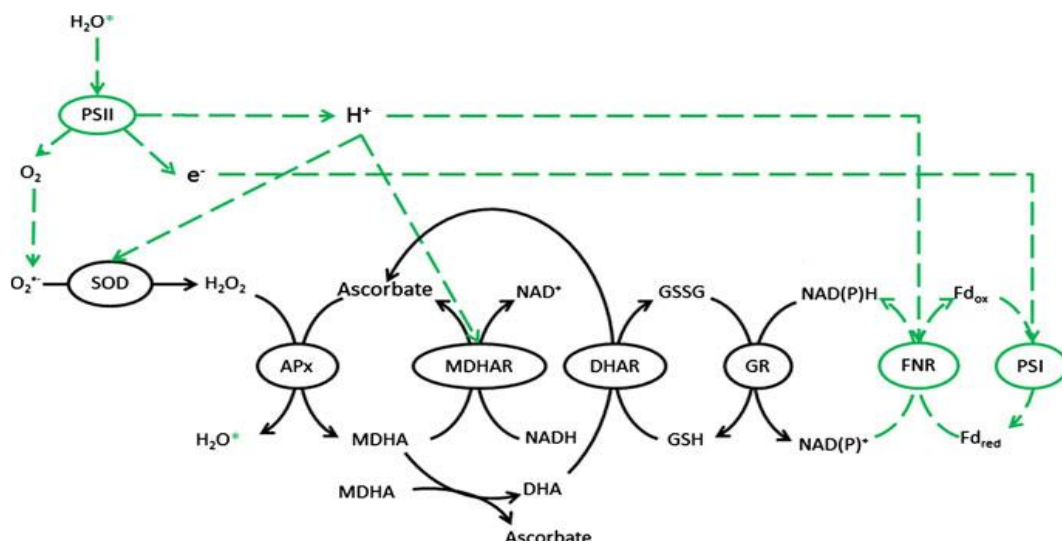
واژه‌های کلیدی: هیدروپونیک، IR64، *Oryza sativa*، Pokkali

سلولی باعث ایجاد خسارت گردد. گیاهان برای کاهش اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد سنتز آنزیم‌ها و برخی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی دیگر را افزایش می‌دهند (Ozden et al., 2009). چرخه گلوتاتیون - آسکوربات (شکل ۱) در اکثر اندامک‌های سلولی نظیر میتوکندری، کلروپلاست و سیتوپلاسم اجرا می‌شود که از همکاری آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و اسکوربات پراکسیداز و آنتی‌اکسیدان‌های اسکوربات و گلوتاتیون تشکیل شده است (Jiménez et al., 1997). چرخه یاد شده یکی از مهم‌ترین راه‌های تجزیه پراکسید هیدروژن به آب می‌باشد. هیدروژن لازم جهت احیای پراکسید هیدروژن توسط H^+ ، NADPH تأمین می‌گردد، به این ترتیب با اجرای این چرخه نسبت NADPH به $NADP^+$ در اکثر اندامک‌های سلولی Carvalho and Amâncio, (2002) تعدیل می‌شود.

در شرایط تنش اکسیداتیو افزایش بیان MDHR در احیای گلوتاتیون و آسکوربات نقش مهمی را ایفا می‌کند (Kwon et al., 2002). گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در پاسخ به تنش‌های محیطی دخالت دارد.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa*) به عنوان یک محصول استراتژی غذای بیش از ۳ میلیارد انسان در ۱۰۰ کشور جهان را تأمین می‌کند (Birla et al., 2015). آهن یکی از عناصر ضروری در گیاهان است که نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند نمو و بیوسنتز کلروپلاست، ریونوکلئوتیدها و واکنش‌های انتقال الکترون در تنفس و فتوسنتز ایفا می‌کند (Hell and Stephan, 2003). سمیت آهن یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید برنج در زمین‌های جلگه‌ای است. جذب بیش از اندازه آهن توسط ریشه گیاهان و انتقال آن به برگ‌ها سبب تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد و در نتیجه آسیب به ترکیبات ساختاری و فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌شود (Becker and Asch, 2005). یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهد، اختلال در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشا و سایر اجزای سلولی می‌شود (Fu and Huang, 2001). افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌تواند در سطح



شکل ۱. چرخه گلوتاتیون - آسکوربات و نقش آن در کاهش تنش اکسیداتیو (Smirnoff, 2008)

است و فعالیت آن در کل توسط مشارکت انواع ایزوفرم‌های مختلف تصریح‌شده، مطالعه تغییرات منحصربه‌فرد از فعالیت‌های آن تحت تنش‌های محیطی بسیار مهم است (Huseynova et al., 2014). ارقام نیشکر مقاوم به خشکی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از طریق SOD نشان دادند که در ژنوتیپ حساس به خشکی مشاهده نشد (Sales et al., 2013). در بررسی که روی *Agastache foeniculum* انجام دادند مشاهده کردند میزان فعالیت آنزیم SOD به طور مداوم با افزایش سطوح تنش افزایش یافته است (Saeedfar et al., 2015). در مطالعه‌ای اظهار کردند که با افزایش تنش غیرزیستی پس از ۲۴ ساعت میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاه رز افزایش می‌یابد (Jin et al., 2006). افزایش فعالیت این آنزیم در تیمار تنش به خاطر نقش مهم این آنزیم جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده در اثر تنش می‌باشد، بنابراین SOD به‌عنوان یکی از اجزای مهم مکانیسم دفاعی گیاه در نظر گرفته می‌شود (Sairam et al., 2001). این پژوهش به منظور بررسی و درک بهتر تغییرات میزان بیان نسبی برخی از ژن‌های درگیر در تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ حساس و متحمل برنج در شرایط تنش و بدون تنش آهن انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذر دو ژنوتیپ Pokkali (متحمل) و IR64 (حساس) برنج (Dufey et al., 2009; Wu et al., 2014) به منظور بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، مونودهدروآسکوربات ردوکتاز (MDHR) و گلوکاتیون پراکسیداز (GPX1) از مؤسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید و با استفاده از هیپوکلیت سدیم ۲/۵ درصد

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که تنش‌های اکسیداتیو، پاتوژن‌ها، فلزات، سرما، خشکی و شوری سبب افزایش رونویسی از ژن گلوکاتیون پراکسیداز می‌شود (Diao et al., 2014; Fu, 2014; Gao et al., 2014). در آزمایشی افزایش میزان پراکسیددهیدروژن و تنش سرما سبب افزایش میزان گلوکاتیون پراکسیداز در برنج شد (Passaia et al., 2013). در آزمایش دیگری تنش سرما در کالوس سیب سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز شد (Kuroda et al., 1992). همچنین انتقال ژن GPX به گیاه گوجه فرنگی سبب افزایش مقاومت گیاه ترانسژنیک به تنش‌های غیرزیستی شد (Herbette et al., 2011). رادیکال سوپراکسید در تمام بخش‌های زنجیره انتقال الکترون و در اندامک‌های مختلف شامل کلروپلاست، میتوکندری، پراکسیزوم، گلی اکسیزوم، آپوپلاست و سیتوزول به وجود می‌آید (Elstner, 1991). سوپراکسیددیسموتاز برای تخریب رادیکال‌های سوپراکسید در این اندامک‌ها ضروری به نظر می‌رسد (Takahashi and Asada, 1983). نتایج تحقیقات فاهی و ساندکوویست نشان داد که ارتباط تکاملی مهمی بین گلوکاتیون و آسکوربات وجود دارد و سلول‌ها را در برابر سمیت ناشی از اکسیژن فعال حفاظت می‌کنند (Fahey and Sundquist, 1991). گلوکاتیون سبب تبدیل دهمیدروآسکوربات به آسکوربات و همچنین سبب تبدیل ریبونوکلوئوتید به دئوکسی ریبونوکلوئوتید می‌شود. بنابراین گلوکاتیون برای سنتز و ترمیم DNA و همچنین فولدینگ پروتئین‌های سنتز شده اهمیت دارد (Meister, 1994). بیان مضاعف SOD سیتوسولی و آسکوربات پراکسیداز (APX) تحمل به تنش خشکی را می‌افزاید (Lee et al., 2011; Faize et al., 2007). با توجه به اینکه SOD به‌عنوان خط اول از سیستم حفاظتی آنزیمی

دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شد. سنجش کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز افقی ژل آگارز در دستگاه ژل داگ (BIORAD) تحت نور UV و نانودراپ انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Revert Aid Reverse Transcriptase و M-MLV مطابق با دستورالعمل کیت سنتز فرمنتاز (Fermntas LIFE SCIENCE-K1621) انجام شد. کنترل سنتز cDNA با استفاده از آغازگر ژن اکتین برای همه نمونه‌ها انجام شد. به منظور بررسی وجود آلودگی در cDNA سنتز شده یک واکنش کنترل منفی که شامل همه مواد مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به غیر از cDNA بود، انجام شد. توالی ژن‌های مذکور از بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری گردید. آغازگرهای اختصاصی با استفاده از برنامه Tcoffee، Primer3 و Oligo طراحی شد (جدول ۱). BLAST آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط بانک اطلاعاتی NCBI به منظور اطمینان از صحت آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. طراحی پرایمر از روی یک بخش اگزونی و طول پرایمرهای پیشرو و پسرو برای همه ژن‌ها بین ۱۸ تا ۲۰ نوکلئوتید بود. دمای ذوب (TM) پرایمر پیشرو و پسرو نزدیک به هم و درصد GC بیش از ۵۰ درصد در نظر گرفته شد. همچنین 3'th. any th و hairpin seq برای همه پرایمرها صفر و طول محصول PCR کم‌تر از ۲۰۰ bp بود.

ضد عفونی شد. بذرها برای جوانه زنی در پتری‌دیش مرطوب استریل در اتاقک کشت قرار داده شدند (Mehraban and Abdolzadeh, 2011). پس از گذشت چهار روز، بذره‌های جوانه زده با ۳ تکرار به محیط کشت هیدروپونیک با محلول غذایی یوشیدا انتقال داده شدند (Yoshida *et al.*, 1976). در طول دوره رشد، دما و روشنایی اتاقک رشد به ترتیب ۲۳ درجه سلسیوس و ۵۵۰۰ لوکس بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ (حساس و متحمل) و سطوح آهن (۰ (شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر Fe-EDTA) و اعمال تیمارها در مرحله چهاربرگی در نظر گرفته شد (Mehraban *et al.*, 2008). تعویض محلول یوشیدا و تنظیم اسیدیته آن به صورت روزانه بین ۵/۵ تا ۶ با اسید سولفوریک (H₂SO₄) و پتاسیم هیدروکسید (KOH) انجام شد. پس از دو هفته تیماردهی با آهن، از برگ‌های سالم، سبز و کاملاً توسعه یافته گیاه برنج به طور هم‌زمان نمونه‌برداری شد. به منظور استخراج RNA از کیت ستون‌دار دناریست (S-1010) مطابق با دستورالعمل مربوطه استفاده شد. جهت حذف DNA باقیمانده در RNA استخراج شده، پس از اضافه کردن مقدار ۲ ماکرولیت بافر و آنزیم DNase به RNA استخراج شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شد. سپس مقدار ۲ ماکرولیت EDTA به آن اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱۰

جدول ۱. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها در واکنش Real time PCR

Gene	Primer sequence	Melting Tem (°C)	PCR production length	NCBI accession number
Actin-F	AGCAACTGGGATGACATGGA	58	176	AF-111812
Actin-R	GCRACATACATRCWGGGAC			
SOD-F	CTGGGAATCAATGCAGCCAG	59	154	GI-1002276304
SOD-R	CAAGACAAGCCAAACCCAGC			
GPX1-F	AAGCGGAAAAGACGTGAACC	59	180	AY100689
GPX1-R	TCCTGCCCTCCAAACTGATT			
MDHR-F	GTATACGCCATTGCCGAC	59	174	XM-015794451
MDHR-R	GGAGTAGAAGTAGGGCAGG			

بیولوژیکی، میزان بیان نسبی دو برابر در نظر گرفته شد. برای مقایسه از Standard error بر اساس میانگین تکرارها برای هر نمونه استفاده گردید.

نتایج و بحث

در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر میزان بیان نسبی ژن SOD در ژنوتیپ Pokkali تفاوت معناداری نداشت. اعمال تنش در سطح ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش معنادار بیان نسبی این ژن نسبت به سطح ۱۰۰ میلی گرم در لیتر شد. میزان بیان نسبی این ژن در تمامی سطوح تنش در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میزان بیان نسبی ژن SOD تقریباً ۲۱ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. در سطوح ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali به ترتیب تقریباً ۷ و ۵ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر میزان بیان نسبی ژن SOD در ژنوتیپ Pokkali حدوداً ۱۰ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر در ژنوتیپ IR64، بیان نسبی ژن SOD به ترتیب ۲ و ۴ برابر افزایش یافت. افزایش سطح تنش به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش بیان نسبی ژن SOD در ژنوتیپ IR64 شد (شکل ۲).

میزان بیان نسبی ژن GPX1 در تمامی سطوح تیمار آهن در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. بیان نسبی ژن GPX1 در ژنوتیپ Pokkali با افزایش سطح تیمار آهن کاهش یافت. بالعکس میزان بیان نسبی این ژن با افزایش سطح تنش در ژنوتیپ IR64 افزایش یافت. با اعمال تنش در سطوح ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر آهن تفاوت معناداری در بیان این ژن در ژنوتیپ‌ها وجود نداشت.

واکنش Real time-PCR با استفاده از دستگاه واکنش Bio-Rad (CFX Manager™) و در حجم نهایی ۱۲/۷ ماکرولیتر انجام شد. در این آزمایش از مستر Real Time (Syber green Master mix) شرکت Bioron life science استفاده شد. سنتز شده مناسب برای هر نمونه در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی به طور جداگانه اضافه گردید. برای بررسی هر ژن یک کنترل منفی حاوی همه مواد مورد نیاز واکنش Real time-PCR به غیر از cDNA به منظور کنترل صحت تکثیر ژن اختصاصی موردنظر، مورد استفاده قرار گرفت. چرخه حرارتی شامل واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۹ سیکل واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، پس از آن اتصال آغازگر بر اساس دمای اتصال به مدت ۲۰ ثانیه، سپس مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017). با توجه به این‌که در این مطالعه تعداد مطلق کپی ژن‌ها موردنظر نبود، برای کمی‌سازی بیان نسبی ژن‌های موردنظر و نرمال سازی داده‌ها در فرایند Real time-PCR از معادله لیواک Livak and Schmittgen (2001) استفاده شد (رابطه ۱). استفاده از معادله لیواک یک روش ساده به منظور تحلیل میزان بیان نسبی ژن‌های موردنظر در Real time PCR می‌باشد (Dorak, 2007).

$$(1) \quad 2^{-\Delta\Delta CT} = \text{میزان تغییر نسبی بیان ژن}$$

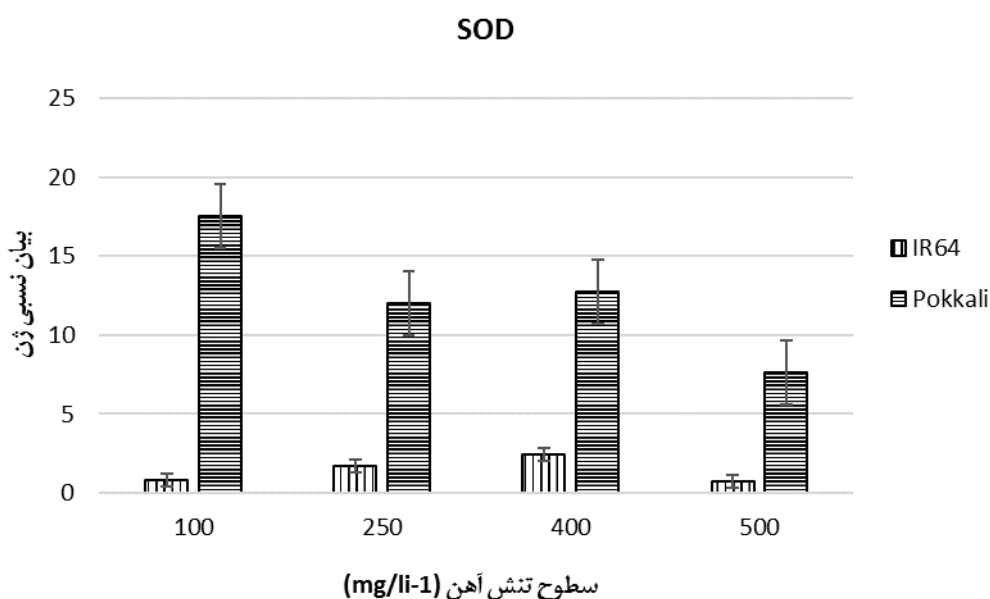
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{treated}} - \Delta CT_{\text{untreated}}$$

$$\Delta CT = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{reference gene}}$$

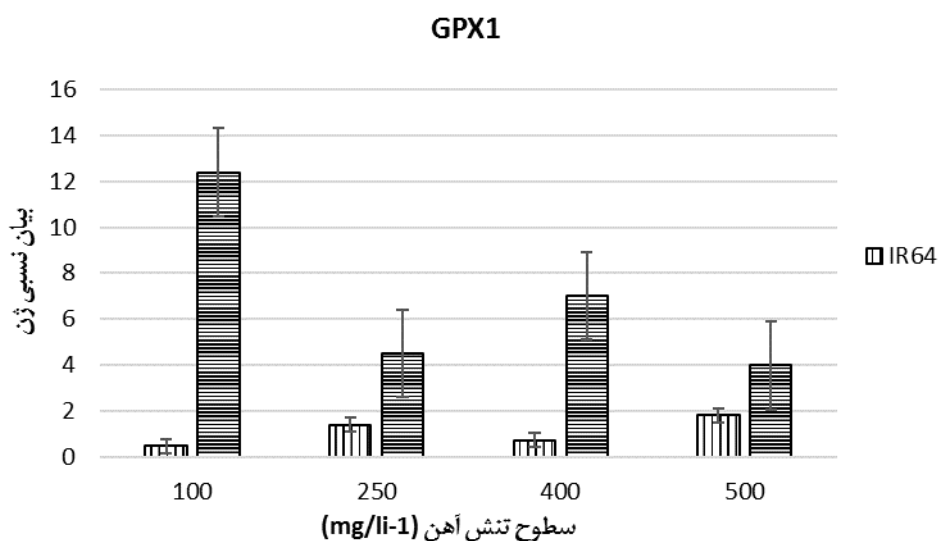
مقدار CT نمونه‌های کالیبره‌کننده و نمونه‌های موردنظر مطابق با رابطه ۱ از یکدیگر کسر و نمودارها در نرم افزار اکسل (۲۰۱۶) رسم شد. سطح معناداری

بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش به ۲۵۰ میلی گرم در لیتر میزان تفاوت بیان نسبی این ژن در دو ژنوتیپ کاهش یافت و به حدوداً ۳ برابر بیان نسبی بیش‌تر رسید. در سطوح ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali به‌ترتیب حدوداً ۱۰ و ۲ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود (شکل ۳).

افزایش سطح تنش از ۴۰۰ به ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن سبب افزایش ۲ برابر میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 شد. بیش‌ترین میزان تفاوت بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali و IR64 در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بود. به‌طوری‌که در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی ژن *GPX1* در ژنوتیپ Pokkali حدوداً ۲۷ برابر



شکل ۲. الگوی بیان ژن *SOD* در دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 برنج با روش RT-PCR

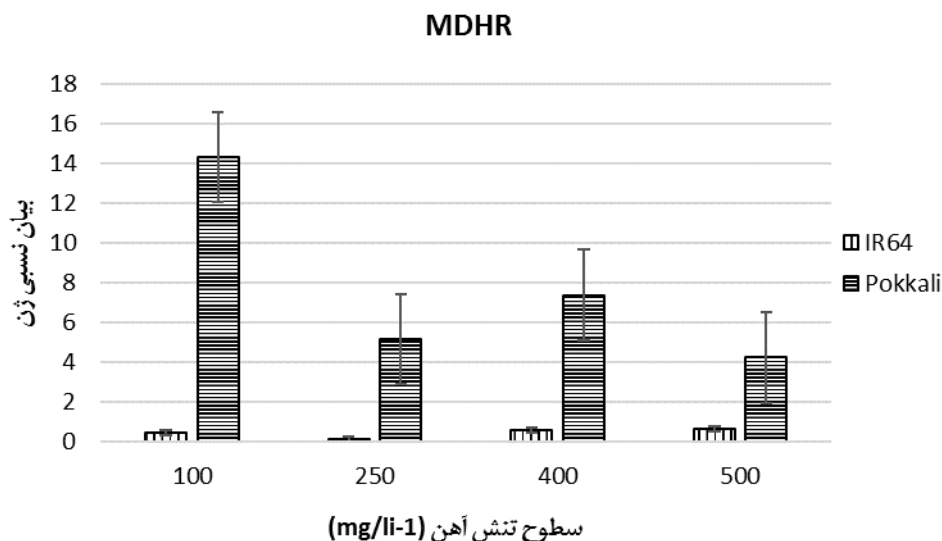


شکل ۳. الگوی بیان ژن *GPX1* در دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 برنج با روش RT-PCR

این ژن افزایش یافت. اعمال تنش در سطح ۴۰۰ و سپس ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن تفاوت معناداری در بیان این ژن در ژنوتیپ IR64 ایجاد نکرد. میزان بیان نسبی ژن MDHR در ژنوتیپ Pokkali در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن تفاوت معناداری از نظر بیولوژیکی نداشت (شکل ۴).

میزان بیان نسبی ژن SOD در سطوح مختلف ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali تقریباً ثابت بود. اعمال تنش در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش معنادار بیان نسبی این ژن نسبت به سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر شد. سوپراکسید دیسموتاز سد اولیه در برابر رادیکال‌های آزاد است (Alscher et al., 2002). میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بیش‌ترین تفاوت را نسبت به ژنوتیپ IR64 داشت. احتمالاً در سطح پایین تنش، بیش‌تر بودن میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali نسبت به ژنوتیپ IR64 سبب تبدیل بیش‌تر مولکول سوپر اکسید به اکسیژن و پراکسید هیدروژن شده و در نتیجه سبب دفاع اولیه در برابر رادیکال‌های اکسیژن می‌شود (Pazoki et al., 2010).

بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن MDHR در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بود. با افزایش سطح تنش میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali حدوداً ۳ برابر کاهش یافت. میزان بیان نسبی ژن MDHR در تمام سطوح تنش در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود، به‌طوری‌که میزان بیان نسبی ژن MDHR در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن حدوداً ۳۳ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. میزان بیان نسبی این ژن در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali حدوداً ۳۷ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. همچنین میزان بیان نسبی این ژن در سطوح ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ژنوتیپ Pokkali به‌ترتیب حدوداً ۱۳ و ۷ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. میزان بیان نسبی این ژن با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر در هر دو ژنوتیپ تقریباً ۳ برابر کاهش یافت. میزان بیان نسبی این ژن با افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ژنوتیپ Pokkali تقریباً ثابت بود. در حالی‌که در ژنوتیپ IR64 با افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان بیان نسبی



شکل ۴. الگوی بیان ژن MDHR در دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 برنج با روش RT-PCR

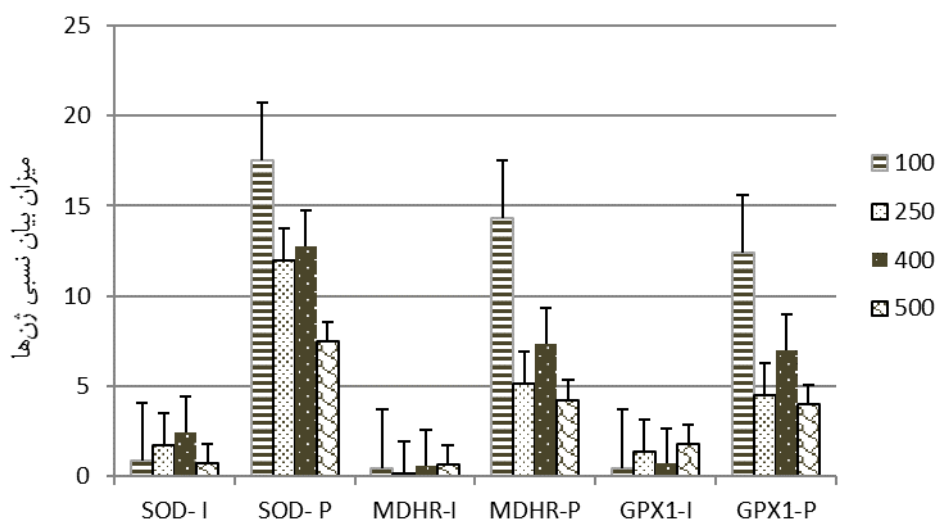
است سبب افزایش مقاومت گیاه به تنش شود. زیرا افزایش بیش از حد فعالیت SOD می‌تواند سبب تولید مازاد پراکسید هیدروژن و آسیب به بافت شود. احتمالاً گیاه متحمل با ثابت نگه داشتن میزان بیان SOD و کاهش بیان نسبی این ژن در سطح ۵۰۰ نسبت به سطوح کم‌تر تنش، مانع از خسارات ناشی از بیش‌بیانی SOD در سطوح بالای تنش می‌شود. این در حالی است که افزایش سطح تنش در ابتدا سبب افزایش و سپس سبب کاهش بیان ژن SOD در ژنوتیپ حساس شد. این می‌تواند یکی از دلایل حساسیت این ژنوتیپ به تنش آهن باشد. احتمالاً اعمال تنش در گیاه حساس سبب فعالیت بیش‌تر SOD و در نتیجه تولید بیش‌تر پراکسید هیدروژن می‌شود. ممکن است افزایش بیش‌تر تنش سبب کاهش بیان این ژن شده است تا از اثرات ناشی از افزایش پراکسید هیدروژن ممانعت بعمل آورد. افزایش سطوح درونی SODها در طول تنش به‌طور گسترده‌ای گزارش شده است (Bowler *et al.*, 1994; Bowler, *et al.*, 1992). اعمال سطح پایین تنش آهن در ژنوتیپ Pokkali سبب حداکثر بیان نسبی ژن *GPXI* شد. با افزایش سطح تنش آهن در این ژنوتیپ بیان نسبی این ژن روند نزولی یافت. بیان ژن *GPXI* سبب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب می‌شود (Smirnoff, 2008). در نتیجه افزایش بیان این ژن از پراکسید هیدروژن ناشی از افزایش فعالیت SOD می‌کاهد. بیش‌تر بودن میزان بیان نسبی این ژن در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali سبب کاهش بیش‌تر پراکسید هیدروژن نسبت به سایر سطوح تنش می‌شود. اما با افزایش سطح تنش از میزان بیان این ژن در ژنوتیپ Pokkali کاسته می‌شود. احتمالاً سایر مسیرهای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پروکسی ردوکسین، آلترناتیو اکسیداز و کاتالاز به منظور کاهش رادیکال آزاد فعال می‌شوند. همزمان با کاهش بیان نسبی ژن SOD از سطح ۴۰۰ به ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ژنوتیپ IR64، میزان بیان نسبی ژن *GPXI* افزایش یافت. با

روند تغییرات بیان این ژن در ژنوتیپ IR64 متفاوت است. به‌طوری‌که با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی این ژن افزایش یافت. اعمال بیش‌ترین سطح تنش در این پژوهش سبب کاهش معنادار بیان ژن SOD در ژنوتیپ IR64 شد. با وجود افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ IR64، میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در همه سطوح تنش بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. به‌طوری‌که در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بیان نسبی ژن SOD حدوداً ۱۰ برابر بیش‌تر بود. به‌طور کلی بیان مضاعف SODهای کلروپلاستی به‌عنوان راهی موفق برای بهبود پاسخ‌های گیاه به منابع مختلف تنش اکسیداتیو معرفی و ثابت شده است (Perl *et al.*, 1993; Van Camp *et al.*, 1996). در آزمایشی انتقال ژن Cu/Zn-SOD و افزایش بیان آن در توتون ترانسژنیک سبب افزایش میزان مقاومت گیاه به تنش‌های اکسیداتیو شد (Gupta *et al.*, 1993). نقش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در از بین بردن سوپراکسید بسیار مهم است و از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی در مقابل گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر است. زیرا غشای فسفولیپیدی نسبت به رادیکال سوپر اکسید نفوذناپذیر است. بنابراین به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن گفته می‌شود، در واقع این آنزیم به عنوان آنتی‌اکسیدان و حفاظت‌کننده اجزای سلولی عمل می‌کند (Alscher *et al.*, 2002). بیش‌تر بودن میزان بیان آن در ژنوتیپ Pokkali می‌تواند مرتبط با تحمل به تنش این ژنوتیپ باشد. در آزمایشی اعمال تنش‌هایی همچون شرایط خشکی، دمای بالا و شوری باعث افزایش SOD در ژنوتیپ‌های گندم شد (Sairam *et al.*, 2001). با افزایش سطح تنش به ۵۰۰ نسبت به سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali کاهش یافت. ثبات بیان نسبی ژن SOD در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ ممکن

همه سطوح تنش میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. در سطح پایین تنش میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از سایر سطوح تنش بود. ممکن است در سطوح کم‌تر تنش آهن بیان این ژن افزایش یافته تا در نهایت سبب کاهش خسارات پراکسیدهایدروژن ناشی از فعالیت SOD شود. اما با افزایش سطح تنش میزان بیان این ژن ثابت باقی می‌ماند تا از مصرف بیش از حد NADH در شرایط تنش ممانعت به‌عمل آید. در صورتی که در ژنوتیپ IR64 افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش میزان بیان MDHR برای جلوگیری بیش‌تر از افزایش پراکسیدهایدروژن می‌شود و از طرف دیگر مصرف بیش‌تر NADH را در پی خواهد داشت. احتمالاً تفاوت روند بیان این ژن در سطوح بالاتر تنش اثر مهمی بر میزان مقاومت گیاه به سمیت ناشی از آهن دارد.

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود روند تغییرات بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش نشان داد که با افزایش سطح تنش بیان ژن SOD در IR64 افزایش و سپس کاهش می‌یابد. افزایش بیان SOD با تولید بیش‌تر پراکسیدهایدروژن همراه خواهد بود. احتمالاً با اعمال تنش آهن و تولید رادیکال سوپراکسید ناشی از تنش، بیان ژن SOD در ژنوتیپ حساس افزایش می‌یابد. ممکن است برای ممانعت از آسیب بیش‌تر ناشی از افزایش پراکسیدهایدروژن که از فعالیت SOD تولید می‌شود، میزان بیان نسبی این ژن در سطوح بالاتر تنش کاهش یافته باشد. احتمالاً به همین دلیل بیان نسبی ژن SOD در تمامی سطوح تنش در ژنوتیپ متحمل در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر ثابت باقی می‌ماند و سپس اعمال تنش در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش بیان نسبی این ژن می‌شود. بیان ژن GPX1 در ژنوتیپ حساس روندی صعودی و در ژنوتیپ متحمل روندی نزولی دارد.

وجود روند نزولی بیان ژن GPX1 در ژنوتیپ Pokkali، در همه سطوح تنش میزان بیان نسبی این ژن بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. از آنجایی که افزایش بیان ژن GPX1 می‌تواند سبب کاهش خسارت ناشی از پراکسیدهایدروژن شود، بنابراین بیش‌تر بودن میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali قابل انتظار است. این تفاوت در میزان بیان ژن در ژنوتیپ‌ها در سطح پایین تنش بسیار بیش‌تر از سایر سطوح بود. احتمالاً در سطح پایین‌تر تنش آهن افزایش بیان این ژن نقش مؤثری در کاهش خسارات ناشی از پراکسیدهایدروژن در ژنوتیپ متحمل ایفا می‌کند. نتایج تحقیقات کانگ و همکاران نشان داد که اعمال تنش محیطی سبب افزایش بیان ژن GPX1 می‌شود (Kang et al., 2013). در هر دو ژنوتیپ میزان بیان نسبی ژن MDHR با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن با وجود بیش‌تر بودن میزان بیان این ژن در Pokkali روند مشابهی داشت. اما بیش‌تر شدن سطح تنش تفاوت بیولوژیکی معناداری در بیان این ژن در Pokkali ایجاد نکرد و میزان بیان نسبی این ژن در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن تقریباً مشابه بود. در ژنوتیپ IR64 با افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی این ژن حدوداً ۴ برابر افزایش یافت. اعمال تنش خشکی در گندم سبب افزایش میزان بیان ژن MDHR در تمام طول مدت تنش شد (Kang et al., 2013). افزایش بیان ژن MDHR سبب مصرف NADH و تبدیل مونودهایدروآسکوربات به آسکوربات می‌شود. با افزایش بیان این ژن و تأمین آسکوربات لازم برای چرخه گلوتاتیون-آسکوربات این چرخه ادامه می‌یابد. آسکوربات پراکسیداز از این آسکوربات استفاده نموده تا سبب کاهش پراکسیدهایدروژن ناشی از فعالیت SOD شود (Smirnov, 2008). با وجود روند صعودی بیان ژن MDHR با افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ژنوتیپ IR64، در



شکل ۵. بیان نسبی ژن‌های *SOD*، *MDHR* و *GPX1* در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ‌های Pokkali(P) و IR64(I) برنج

تنش آهن ممکن است اثر مهمی بر میزان مقاومت گیاه به سمیت ناشی از آهن داشته باشد.

سپاسگزاری

هزینه پژوهش حاضر با حمایت مالی از طرح شماره ۱۰۷۵۶/پ۱۵ مورخ ۱۳۹۶/۰۲/۰۳ و کد شماره ۱۳۵۰ مصوب معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه گیلان اجرا شده است. از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان که تأمین هزینه این پژوهش را متقبل شدند و همچنین مسئولین دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان که ما را در اجرای این مهم یاری رساندند، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (*SODs*) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53(372): 1331-1341.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*. 50(1): 601-639.
- Becker M, Asch F (2005) Iron toxicity in rice-condition and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 168: 558-573.
- Birla DS, Malik K, Sainger M, Chaudhary D, Jaiwal RK, Jaiwal P (2015) Progress and challenges in improving the nutritional quality of

- rice (*Oryza sativa*). Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 57(11): 2455-2481.
- Bowler C, Montagu MV, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Biology. 43(1): 83-116.
- Diao Y, Xu H, Li G, Yu A, Yu X, Hu W (2014) Cloning a glutathione peroxidase gene from *Nelumbo nucifera* and enhanced salt tolerance by overexpressing in rice. Journal of Molecular Biology Reports. 41: 4919-4927.
- Dorak M (2007) Real-time PCR. Taylor, Francis Group Press. 333.
- Dufey I, Hakizimana P, Draye X, Lutts S, Bertin P (2009) QTL mapping for biomass and physiological parameters linked to resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. Journal of Euphytica. 167(2): 143-160.
- Elstner EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. Journal of Food and Agriculture Organization of the United Nations. 13-25.
- Fahey RC, Sundquist AR (1991) Evolution of glutathione metabolism. Journal of Advances in Enzymology. 64: 1-53.
- Faize M, Burgos L, Faize L, Piqueras A, Nicolas E, Barba-Espin G, Clemente-Moreno M, Alcobendas R, Artlip T, Hernandez J (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. Journal of Experimental Botany. 62(8): 2599-2613.
- Fu J, Huang B (2001) Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Journal of Environment and Experimental Botany. 45: 105-114.
- Fu JY (2014) Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses. Journal of Botanical studies. 55(1): 7.
- Gao H, Liu CP, Song SQ, Fu J (2016) Effects of dietary selenium against lead toxicity on mRNA levels of 25 selenoprotein genes in the cartilage tissue of broiler chicken. Journal of Biological Trace Element Research. 172(1): 234-241.
- Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences. 90(4): 1629-1633.
- Hell R, Stephan UW (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. Journal of Planta. 216: 541-551.
- Herbette S, de Labrouhe DT, Drevet JR, Roedel-Drevet P (2011) Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses. Journal of Plant Sciences. 180: 548-553.
- Huseynova IM, Aliyeva DR, Aliyev JA (2014) Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 81: 54-60.
- Jiménez A, Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F (1997) Ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves: changes induced by leaf senescence. Journal of Phyton-Horn. 37:101-108.
- Jin J, Shan N, Ma N, Bai J, Gao J (2006) Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.)

- cv. Samantha. *Journal of Postharvest Biology and Technology*. 40(3): 236-243.
- Kang GZ, Li GZ, Liu GQ, Xu W, Peng XQ, Wang CY, Zhu YJ, Guo TC (2013) Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle. *Journal of Biologia Plantarum*. 57(4): 718-724.
- Kuroda H, Sagisaka S, Chiba K (1992) Collapse of peroxide-scavenging systems in apple flower-buds associated with freezing injury. *Journal of Plant and Cell Physiology*. 33(6): 743-750.
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*. 25(7): 873-882.
- Lee SH, Ahsan N, Lee KW, Kim DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SY, Kim TH, Lee BH (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*. 164(12): 1626-1638.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Journal of Methods*. 25(4): 402-408.
- Mehraban P, Abdol Zadeh A, Sadeghipour HR (2008) Iron Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.), under Different Potassium Nutrition. *Asian Journal of Plant Sciences*. 7(3): 251-259.
- Mehraban P, Abdolzadeh A (2011) Effects of iron toxicity on growth four rice varieties highlighted some biochemical aspects in resistant variety. *Electronic Journal Crop Production*. 4(3): 103-120.
- Meister A (1994) Glutathione, Ascorbate, and Cellular Protection. *Journal of Cancer Research*. 4:1969-1975.
- Ozden M, Demirel U, Kahraman A (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera*) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Journal of Scientia Horticulturae*. 119(2): 163-168.
- Pasandideh Arjmand M, Samizadeh Lahiji H, Mohsenzadeh Golfazani M (2017) The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). *Journal of Crop Biotechnology*. 7(17): 31-42.
- Passaia G, Fonini LS, Caverzan A, Jardim-Messeder D, Christoff AP, Gaeta ML (2013) The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Journal of Plant Sciences*. 208: 93-101.
- Pazoki A, Rad AS, Habibi D, Paknejad F, Kobraee S, Hadayat N (2010) Effect of drought stress and selenium spraying on superoxide dismutase activity of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *World Academy of Science, Journal of Engineering and Technology*. 44: 688-691.
- Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S, Galun E (1993) Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Journal of Theoretical and Applied Genetics*. 85(5): 568-576.
- Saeedfar S, Negahban M, Soorestani MM (2015) The Effect of Drought Stress on the Essential Oil Content and Some of the Biochemical Characteristics of Anise Hyssop (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze). *European Journal of Molecular Biotechnology*. 8(2): 103-

- 114.
- Sairam R, Chandrasekhar V, Srivastava G (2001) Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Journal of Biologia Plantarum*. 44(1): 89-94.
- Sales CR, Ribeiro RV, Silveira JA, Machado EC, Martins MO, M Lagôa AM (2013) Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 73: 326-336.
- Smirnov NE (2008) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. John Wiley & Sons.
- Takahashi MA, Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Journal of Archives of Biochemistry and Biophysics*. 226: 558-566.
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inze D, Slight L (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology*. 112(4): 1703-1714.
- Wu LB, Shhadi MY, Gregorio G, Matthus E, Becker M, Frei M (2014) Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. *Journal of Rice*. 7(1): 8.
- Yoshida S, Fomo DA, Cock JH (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Banos (Philippines) International Rice Research Institute.