

بررسی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با تنش ناشی از سمیت آهن در دو واریته از گیاه برنج (*Oryza sativa*)

رسول واحدی¹، محمد محسن‌زاده گلفزانی^{1*}، مریم پسندیده ارجمند³، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی⁴

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

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

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

4. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: 1398/3/12 - تاریخ پذیرش: 1398/9/20)

Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of Rice (*Oryza sativa*)

Rasool Vahedi¹, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani^{2*}, Maryam Pasandideh Arjmand³,
Habibollah Samizadeh Lahiji⁴

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

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

3. M.Sc, 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.

(Received: Jun. 2, 2019 - Accepted: Dec. 11, 2019)

Abstract

Iron toxicity lead to increasing of free oxygen radicals, oxidative stresses and sever yield reduction of Rice. One of the plant responses for physiochemical and biochemical regulation to stresses is change of antioxidant enzyme contents. In this study the effect of five treatments of iron (Fe-EDTA) (0, 100, 250, 400 and 500 mg/li⁻¹) on relative expression of *glutaredoxin* (*GRX*), *thioredoxin* (*TRX*), *peroxiredoxin* (*PRX*) and *catalase* (*CAT*) genes of IR64 (susceptible) and Pokkali (tolerant) genotypes of Rice in Yoshida hydroponic media by Real time-PCR technique investigated. The results showed that the relative expression level of *CAT* gene in different levels of iron in Pokkali genotype was higher than IR64 genotype. The relative expression level of *PRX* in IR64 genotype in all of the levels was similar. The relative expression level of *TRX* in Pokkali genotype was not significant. The relative expression level of *GRX* in the most of stress levels in Pokkali genotype was higher than IR64 genotype. Low level iron result in increasing of relative expression level of *CAT*, *GRX* and *TRX* in IR64 genotype. But with increasing level of iron was not significant change in expression of genes. Also in the most of the iron level relative expression of genes in Pokkali was higher than IR64. Probably lose of change in gene expression levels in high level iron and low gene expression in IR64 is one of the reasons of its susceptibility to iron stress.

Keywords: Peroxiredoxin, Thioredoxin, Catalase, IR64, Pokkali,

چکیده

سمیت آهن سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، تنش اکسیداتیو و کاهش شدید عملکرد برنج می‌شود. یکی از پاسخ‌های گیاه برای تنظیم شرایط فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به تنش‌ها، تغییر در محتوای آنتی‌اکسیدان است. در این پژوهش اثر پنج تیمار آهن (FeEDTA) (صفر، 100، 250، 400 و 500 میلی‌گرم در لیتر) بر بیان نسبی ژن‌های گلوئارِدوکسین (*GRX*)، تیوردوکسین (*TRX*)، پروکسی‌ردوکسین (*PRX*) و کاتالاز (*CAT*) با استفاده از تکنیک Real time-PCR در دو ژنوتیپ Pokkali (متحمل) و IR64 (حساس) برنج در شرایط هیدروپونیک محلول یوشیدا مطالعه شد. نتایج نشان داد میزان بیان نسبی ژن *CAT* در سطوح مختلف تنش در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. میزان بیان نسبی ژن *PRX* در ژنوتیپ IR64 در تمامی سطوح تنش تقریباً مشابه بود. با افزایش سطح تنش میزان بیان نسبی ژن *TRX* در ژنوتیپ Pokkali تفاوت معناداری نداشت. بیان نسبی ژن *GRX* در ژنوتیپ Pokkali در اکثر سطوح تنش بیش‌تر از IR64 بود. اعمال سطوح کم تنش سبب افزایش بیان *CAT*، *GRX* و *TRX* در ژنوتیپ IR64 شد، اما با افزایش سطح تنش تفاوت معناداری در بیان ژن‌ها ایجاد نشد. این درحالی است که در اکثر سطوح تنش میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. احتمالاً عدم تغییر بیان نسبی ژن‌ها در سطوح بالای تنش و کم‌تر بودن میزان بیان در ژنوتیپ IR64 یکی از دلایل حساسیت این ژنوتیپ به تنش آهن است.

واژه‌های کلیدی: پروکسی‌ردوکسین، تیوردوکسین، کاتالاز، IR64، Pokkali

مقدمه

آهن عنصری حیاتی برای رشد و بقای گیاهان است و در عملکرد صحیح متابولیک‌ها و فرآیندهای فیزیولوژیکی آن‌ها نقش دارد (Grillet *et al.*, 2014). اگرچه آهن یک ماده غذایی ضروری برای گیاهان محسوب می‌شود، اما تجمع زیاد آن در سلول می‌تواند ایجاد سمیت نموده و مانع رشد شود (Connolly and Guerinot, 2002). سمیت آهن یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های تولید برنج در خاک‌های اسیدی است (Thongbai and Goodman, 2000). با توجه به میزان مقاومت ارقام و شرایط محیطی، مقدار آهنی که می‌تواند سبب ایجاد سمیت شود از کمتر از 10 میلی‌گرم در لیتر تا بیش از 500 میلی‌گرم در لیتر می‌تواند متفاوت باشد. محدوده بحرانی ایجاد سمیت آهن در خاک‌های بسیار اسیدی حدود 100 میلی‌گرم در لیتر و در خاک‌های کم‌تر اسیدی حدود 300 میلی‌گرم در لیتر است (Sahrawat, 2004). جذب بیش از حد آهن توسط ریشه‌های برنج و انتقال آن به برگ منجر به افزایش میزان رادیکال‌های اکسیژن (ROS) و آسیب‌رساندن به اجزای تشکیل‌دهنده سلول و در نتیجه کاهش ضریب عملکرد فیزیولوژیکی می‌شود (Becker and Asch, 2005). آهن آزاد می‌تواند در واکنش فنتون به‌عنوان کاتالیزور تولید رادیکال هیدروکسیل و گونه‌های اکسیژن فعال عمل کند (Becana *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2002). یکی از پاسخ‌های گیاه برای تنظیم شرایط فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به تنش‌ها، تغییر در محتوای آنتی‌اکسیدان است (Ali *et al.*, 2007). با افزایش مقدار آهن محیط میزان تقسیم سلولی کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد این کاهش به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد توسط فلز آهن باشد. در حقیقت فلز آهن با شرکت در واکنش فنتون باعث تولید رادیکال هیدروکسیل می‌گردد که این رادیکال بسیار فعال و مخرب است (Xiaoling and

Jinyao, 2010). فلزات سنگین از طریق تولید انواع مختلف گونه‌های اکسیژن فعال موجب آسیب به پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شوند (Zhang *et al.*, 2009). این ترکیبات همچنین روی بیان ژن‌ها تأثیر گذاشته و موجب تغییر در بسیاری از فرایندها مانند رشد، چرخه سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و زیستی می‌شوند (Gill and Tuteja, 2010). کاتالاز (CAT) پروتئین‌های حاوی هم هستند که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن را کاتالیز و از سلول در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن محافظت می‌کنند (Kim *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2011). علاوه بر این، CAT ممکن است برخی از گروه‌های هیدروپراکسید از جمله پراکسید متیل هیدروژن (MeOH) را احیا کند. CAT با کنترل ترکیب H_2O_2 سلول‌های دیواره سلولی را از تولید لیپید و آسیب‌های غشایی محافظت می‌کند، همچنین در فتوسنتز درگیر شده و از تخریب کلروفیل جلوگیری می‌کند (Khelifa *et al.*, 2011). با افزایش سطح تنش و طولانی‌تر شدن زمان تنش میزان فعالیت آنزیم CAT در گندم افزایش یافت (Zarin *et al.*, 2017). تیوردوکسین (TRX) خانواده بزرگی از اکسیدوردوکتازها هستند (Meyer *et al.*, 2012). تیوردوکسین‌ها، پروتئین‌های کوچکی با وزن مولکولی 12-14 کیلودالتون هستند، که به‌واسطه وجود سیستم‌ها در جایگاه فعال خود در احیای باندهای دی‌سولفیدی پروتئین‌های هدف شرکت‌کننده در فرآیندهای مختلف سلولی نقش مهمی را در سلول ایفا می‌کنند و با دادن الکترون به پراکسی‌ردوکسین‌ها به‌عنوان یکی از پروتئین‌های هدف نقش مهمی در حذف سمیت پراکسید هیدروژن در سلول دارند (Holmgren, 1985; Chae *et al.*, 1999; Arnér and Holmgren, 2000). پروکسی‌ردوکسین (PRX) پروتئین نسبتاً کوچک (حدود 20-30 کیلو دالتون)

کلی 10 تا 15 کیلو دالتون است (Fomenko and Gladyshev, 2002). گلوٹاردوکسین با استفاده از NADPH، گلوٹاتیون ردوکتاز (GR) و گلوٹاتیون (GSH) احیا می‌یابد (Holmgren, 1979). احیای گلوٹاردوکسین‌ها وابسته به گلوٹاتیون است. GRXs در بسیاری از عملکردهای متابولیکی از جمله کنترل برنامه‌های رشد گیاهان و نقش مولکول‌های علامت‌دهی کلیدی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Rouhier *et al.*, 2015). با توجه به اهمیت محدودیت تولید برنج در شرایط سمیت آهن و نقش کلیدی ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش، تفاوت بیان نسی برخی از ژن‌های آنتی‌اکسیدان در دو ژنوتیپ متحمل و حساس برنج در تیمارهای مختلف آهن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای دو ژنوتیپ حساس (IR64) و متحمل (Pokkali) به سمیت آهن (Dufey *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014) برنج از مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) تهیه شدند و با استفاده از هیپوکلیت سدیم 2/5 درصد ضدعفونی شدند. بذرهای جوانه‌زنی در داخل پتری‌دیش استریل مرطوب در اتاقک کشت قرار گرفتند. محلول یوشیدا با استفاده از مواد و ترکیبات شیمیایی (جدول 1) و براساس دستورالعمل (Yoshida *et al.*, 1976) تهیه شد. پس از گذشت چهار روز، بذرهای جوانه‌زده به محیط کشت هیدروپونیک یوشیدا انتقال داده شدند. برای آماده‌سازی استوک اولیه، هر کدام از ترکیبات درشت‌مغذی در یک لیتر آب حل شد. برای آماده سازی استوک ریزمغذی‌ها، همه ریزمغذی‌ها به‌طور جداگانه در 50 سی‌سی آب مقطر حل و سپس به حجم 100 سی‌سی رسانده شدند. استوک‌های اصلی در ظروف شیشه‌ای که با فویل پوشانده شده بود، در یخچال قرار داده شد.

متعلق به گروه پراکسیداز است که بر روی انواع سوبسترا مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، آلکال هیدروپراکسید (ROOH) و پروکسی‌نیتريت (ONOOH) عمل می‌کند. پروکسی ردوکسین می‌تواند به صورت مستقیم با پراکسید هیدروژن واکنش داده و هیدروژن مورد نیاز آن را برای تبدیل به آب و احیا فراهم کند. عمل احیا نیز به کمک تیوردوکسین و گلوٹاردوکسین انجام می‌شود (Aoyama and Nakaki, 2015). بنابراین بازایی PRXs پس از یک واکنش پراکسیداسیون، آنها را از رقابت با سایر پروتئین‌های هدف جهت اهدای الکترون باز می‌دارد. این ویژگی به‌عنوان حسگر اکسیداسیون و احیا در نظر گرفته شده است. PRXs به‌عنوان حسگرهای اکسیداسیون و احیای درون سلولی عمل می‌کنند و عمل انتقال اطلاعات میزان ROS سلولی را به شبکه اکسیداسیون و احیا انجام می‌دهند (Foyer and Noctor, 2005). این آنزیم‌ها کنترل و آغاز علامت‌دهی سلولی مؤثر بر فتوسنتز، بیان ژن‌های هسته‌ای وابسته به کلروپلاست و میتوکندری و فعال‌سازی آنزیم‌های چرخه کالوین را بر عهده دارند (Dietz, 2008). برای PRXs نقش‌های مختلفی در سلول‌هایی که در معرض تنش قرار گرفته‌اند تعیین شده است. به‌طور خاص، عملکرد آنها، دفاع آنتی‌اکسیدانی، سم‌زدایی ROS، القای علامت در حین تنش اکسیداتیو و دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی است (Rouhier and Jacquot, 2005; Tripathi *et al.*, 2009). گلوٹاردوکسین‌ها (GRXs) آنزیم‌های کلیدی تیول (thiol) هستند. آنها به‌عنوان آنزیم‌های احیاکننده متابولیکی و سیستم‌های جاروب ROS عمل می‌کنند، همچنین تغییرات احیا پس از رونویسی در پروتئین‌ها را بر پایه تیول تنظیم می‌کنند. گلوٹاردوکسین و تیوردوکسین گروه‌های اصلی ردوکتازهای تیول هستند (Meyer *et al.*, 2012). اندازه این پروتئین‌ها به‌طور

جدول 1. ترکیبات مورد استفاده برای تهیه محلول غذایی یوشیدا

| عنصر مورد نظر | ماده مورد نیاز | مقدار مورد نیاز (g/Lit) |
|---------------|---|-------------------------|
| | NH_4NO_3 | 91.4 |
| N | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 40.3 |
| P | K_2SO_4 | 71.4 |
| K | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 88.6 |
| Ca | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 324 |
| Mg | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.5 |
| Mn | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.074 |
| Mo | H_3BO_3 | 0.934 |
| B | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.035 |
| Zn | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.031 |
| Cu | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 7.7 |
| Fe | Citric acid mono hydrate | 11.9 |
| | H_2SO_4 | 50 |

(2018). محیط کشت به صورت روزانه تعویض شد و اسیدیته آن با استفاده از دستگاه pH متر Jenway-3505 و از طریق تیتراسیون با استفاده از پتاسیم هیدروکسید (KOH) 6 مولار (56g/Li^{-1}) و اسید سولفوریک (H_2SO_4) 2 نرمال بر روی 5/5 تا 6 تنظیم شد. در مرحله چهاربرگی تیماردهی با آهن (Fe-EDTA) آغاز شد. با توجه به میزان مقاومت ارقام و شرایط محیطی، تنش آهن در سطوح مختلف (100، 250، 400 و 500 میلی‌گرم در لیتر) به شکل Fe-EDTA در گلدان‌های حاوی محلول یوشیدا اعمال شد (Sahrawat, 2004; Mehraban and Abdolzadeh, 2011). همچنین برای هر نمونه از سطح صفر آهن به‌عنوان شاهد استفاده شد. به‌طوری که گیاهان شاهد در شرایط محلول غذایی یوشیدا و فاقد هرگونه تیمار آهن بودند. به‌منظور مطالعه بیان نسی ژن‌های گلووتاردوکسین (GRX)، تیوردوکسین (TRX)، پروکسی‌ردوکسین (PRX) و کاتالاز (CAT) نمونه‌برداری از اندام هوایی سالم گیاه برنج که به مدت دو هفته در شرایط سمیت آهن قرار داشتند و همچنین به‌طور همزمان از نمونه‌های شاهد انجام شد (Mehraban and Abdolzadeh, 2011). پس از قرارگرفتن در ازت مایع، به فریزر -80°C درجه سلسیوس منتقل و در آن‌جا تا زمان استخراج نگه‌داری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت ستون‌دار دنازیست (S-1010) مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام شد (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2018). به‌منظور حذف DNA باقیمانده از آنزیم DNase و سپس EDTA استفاده شد. سنجش کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از عکس‌برداری ژل آگارز 1٪ توسط دستگاه ژل داگ (BIO RAD) تحت نور UV و سنجش کمیت آن با استفاده از نانودراپ انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Revert Aid Reverse Transcriptase و M-MLV کیت فرمنتاز (Fermntas LIFE SCIENCE # K) مطابق با دستورالعمل مربوطه اجرا شد. cDNA

در هر بار تعویض محلول یوشیدا از استوک اصلی درشت مغذی و ریزمغذی‌ها براساس حجم گلدان‌ها (5 سی‌سی به‌ازای هر 4 لیتر) برداشته شد. برای یکسان بودن شرایط همه گلدان‌ها، محلول یوشیدا به اندازه تعداد کل گلدان‌ها آماده شد. برای کشت بذور از صفحه‌های یونولیت با ابعاد $12 \times 28 \times 18$ سانتی‌متر که متناسب با سایز گلدان‌هایی به حجم 1 لیتر بود، استفاده شد. ابتدا بر روی هر صفحه یونولیت سوراخ به قطر حدود 1 سانتی‌متر ایجاد و پس از آن برای استقرار کامل بذر، پشت صفحه‌های یونولیت با یک شبکه نایلونی (لایه مشبکی از جنس پلاستیک با سوراخ‌های ریز که ریشه‌ها از آن عبور دادند)، پوشانده شد و برای هوادهی مناسب از پمپ هوا استفاده شد. برای کشت در مجموع از 15 عدد گلدان استفاده شد که در هر گلدان دو ژنوتیپ کشت شدند و به این ترتیب که گلدان‌ها به دو قسمت مساوی تقسیم شدند و جوانه برای هر ژنوتیپ در گلدان‌ها قرار گرفت. بر اساس تعداد و حجم گلدان‌های مورد استفاده، تا پایان آزمایش هر روز 15 لیتر محلول یوشیدا با استفاده از استوک‌های اصلی تهیه شد. گلدان‌ها در شرایط دمایی 23°C درجه سلسیوس و روشنایی 5500 لوکس قرار گرفتند. در طول دوره رشد 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی اعمال شد (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2018).

با افزایش سطح تنش به 250 میلی گرم در لیتر آهن روند افزایشی داشت. به طوری که بیان نسبی ژن *CAT* در این ژنوتیپ تقریباً 2 برابر افزایش یافت. در سطوح تنش 250، 400 و 500 میلی گرم در لیتر آهن تفاوت معناداری در میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 وجود نداشت. بیشترین میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در سطح 100 میلی گرم در لیتر آهن بود. در این ژنوتیپ با افزایش سطح تنش از 100 به 250 و 400 میلی گرم در لیتر آهن، میزان بیان روندی کاهشی داشت. سپس با افزایش سطح تنش به 500 میلی گرم در لیتر بیان نسبی ژن *CAT* در این ژنوتیپ تقریباً 5 برابر افزایش یافت. میزان بیان نسبی ژن *CAT* در تمامی سطوح تنش در ژنوتیپ Pokkali بیشتر از IR64 بود. به طوری میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در سطوح 100، 250، 400 و 500 میلی گرم در لیتر آهن به ترتیب تقریباً 91، 10، 2، 14 برابر بیش تر از ژنوتیپ IR64 بود. همان طور که در شکل 2 مشاهده می شود، بیشترین میزان بیان نسبی ژن *PRX* در سطح 100 میلی گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali بود. به طوری که میزان بیان این ژن در ژنوتیپ Pokkali تقریباً 22 برابر بیش تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش از 100 به 250 میلی گرم در لیتر آهن بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali تقریباً 3 برابر کاهش یافت.

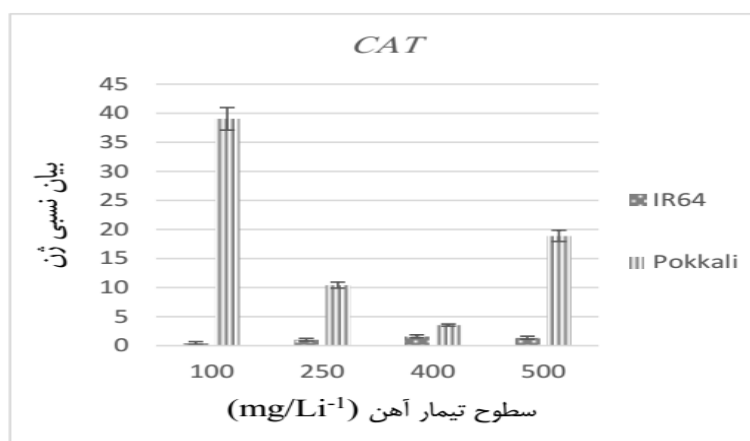
سنتز شده در فریزر -80 درجه سلسیوس نگهداری شد. کنترل سنتز cDNA با استفاده از آغازگر ژن اکتین برای همه نمونه ها انجام شد. به منظور بررسی وجود آلودگی در cDNA سنتز شده از واکنش کنترل منفی که شامل همه مواد مورد نیاز واکنش زنجیره ای پلیمرز به غیر از cDNA بود، استفاده شد. به منظور بررسی بیان نسبی ژن ها، از دستگاه Real time-PCR (مدل LightCycler 96) و مستر Syber Bioron life (green) شرکت science استفاده شد. توالی ژن های مذکور از بانک اطلاعاتی NCBI جمع آوری گردید. آغازگرهای اختصاصی با استفاده از برنامه Tcoffee (<http://coffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>) و (http://primer3.ut.ee/version_4.1.0) طراحی شدند (جدول 2). به منظور مقایسه بیان نسبی ژن های مورد نظر در فرایند Real time-PCR از معادله لیواک (Livak and Schmittgen, 2001) استفاده شد. نمودارها با استفاده از اکسل 2016 رسم شد. برای مقایسه ستون ها از Standard error استفاده شد. همچنین سطح معناداری بیولوژیکی 2 برابر بیان نسبی در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

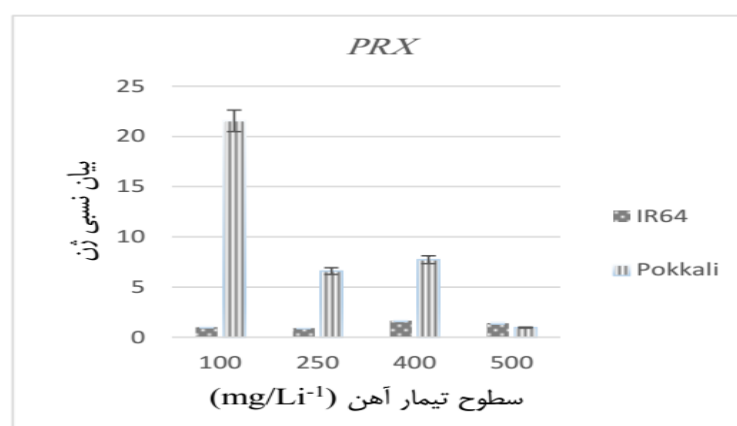
با توجه به شکل 1 کمترین میزان بیان نسبی ژن *CAT* در ژنوتیپ IR64 مربوط به سطح 100 میلی گرم در لیتر آهن بود. در این ژنوتیپ میزان بیان

جدول 2. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن ها در واکنش Real time-PCR

| Gene | Primer sequence | Annealing temperature (°C) | PCR production length | NCBI accession number |
|----------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Actin-F</i> | TCCCGAGTATTGTTGGTCGT | 58 | 176 | AF111812 |
| <i>Actin-R</i> | TCCATGTCATCCCAGTTGCT | | | |
| <i>CAT-F</i> | TTCATCCAGACCATCGACCC | 52 | 200 | XM_015774263 |
| <i>CAT-R</i> | CTCCTTCAGCAGCAAGTGAG | | | |
| <i>PRX-F</i> | AGGCGGAGTTAGACAGGTTC | 58 | 162 | XM_015771919 |
| <i>PRX-R</i> | CGGCTTCTTCCATGTGTCTG | | | |
| <i>TRX-F</i> | AGATCTCGTGTCACTTGCC | 59 | 196 | XM_015781169 |
| <i>TRX-R</i> | CAACAGCTTGCATCACCGAG | | | |
| <i>GRX-F</i> | TGTTGACTGAGACTACGGCC | 61 | 195 | XM_015770519 |
| <i>GRX-R</i> | AGCTCCAATCACTCCACAG | | | |



شکل 1. الگوی بیان نسبی ژن *CAT* کلروپلاستی در دو ژنوتیپ IR64 و Pokkali برنج با روش Real Time-PCR



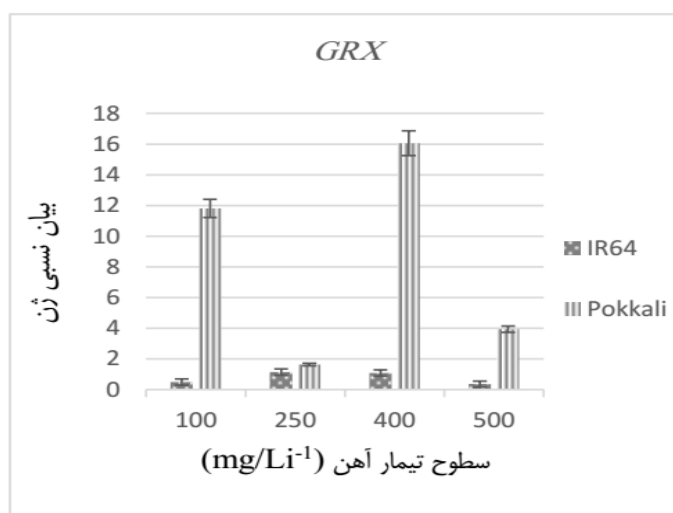
شکل 2. الگوی بیان نسبی ژن *PRX* کلروپلاستی در دو ژنوتیپ IR64 و Pokkali برنج با روش Real Time-PCR

لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali تقریباً 25 برابر بیش-تر از ژنوتیپ IR64 بود. در ژنوتیپ IR64 افزایش سطح تنش از 100 به 250 میلی‌گرم در لیتر آهن سبب افزایش بیان نسبی ژن *GRX* شد. بیان نسبی این ژن در سطوح 250 و 400 میلی‌گرم در لیتر آهن در این ژنوتیپ تفاوت معناداری نداشت. اما اعمال تنش در سطح 500 میلی‌گرم در لیتر آهن سبب کاهش 3 برابری میزان بیان نسبی این ژن شد. با توجه به شکل 4 بیش‌ترین تفاوت میزان بیان نسبی ژن *TRX* در ژنوتیپ‌ها در سطح 100 میلی‌گرم در لیتر آهن مشاهده شد، به‌طوری‌که میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali حدوداً 14 برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش میزان بیان نسبی ژن *TRX* در ژنوتیپ

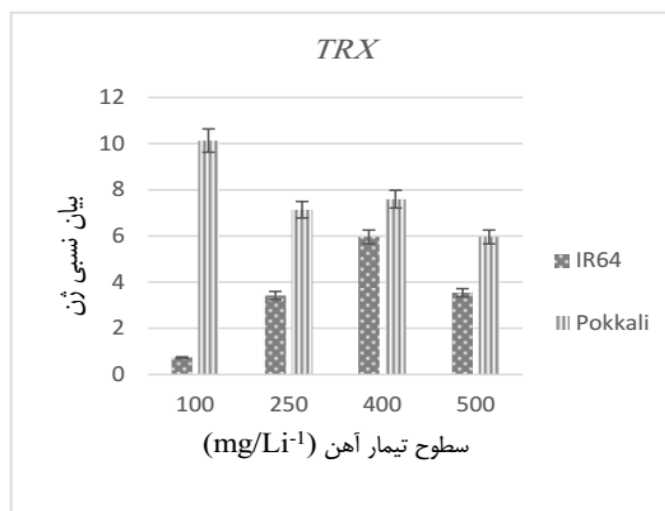
بیان نسبی این ژن در سطوح 250 و 400 میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali تفاوت معناداری نداشت. با افزایش سطح تنش از 400 به 500 میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی این ژن حدوداً 8 برابر کاهش یافت. میزان بیان نسبی ژن *PRX* در ژنوتیپ IR64 در تمامی سطوح تنش تقریباً مشابه بود. چنانچه در شکل 3 مشاهده می‌شود، میزان بیان نسبی ژن *GRX* در ژنوتیپ Pokkali با افزایش سطح تنش از 100 به 250 میلی‌گرم در لیتر آهن تقریباً 7 برابر کاهش یافت و سپس با افزایش سطح تنش به 400 میلی‌گرم در لیتر آهن تقریباً 10 برابر افزایش و در نهایت در سطح 500 میلی‌گرم در لیتر آهن حدوداً 4 برابر کاهش یافت. میزان بیان نسبی این ژن در سطح 100 میلی‌گرم در

در سطوح 400 و 500 میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ‌ها تفاوت معناداری نداشت. بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در سطح 100 میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali بود. در سطوح تنش 250، 400 و 500 میلی‌گرم در لیتر آهن تفاوت معناداری در میزان بیان نسبی ژن CAT در ژنوتیپ IR64 وجود نداشت.

Pokkali تفاوت معناداری نداشت. میزان بیان این ژن در ژنوتیپ IR64 با افزایش سطح تنش به 250 میلی‌گرم در لیتر آهن حدوداً 5 برابر افزایش یافت. در سطوح 250، 400 و 500 میلی‌گرم در لیتر آهن بیان نسبی ژن TRX در این ژنوتیپ تفاوت معناداری نداشت. میزان بیان نسبی ژن TRX در سطح 250 میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali تقریباً 2 برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. بیان نسبی این ژن



شکل 3. الگوی بیان نسبی ژن GRX کلروپلاستی در دو ژنوتیپ IR64 و Pokkali برنج با روش Real Time-PCR



شکل 4. الگوی بیان نسبی ژن TRX کلروپلاستی در دو ژنوتیپ IR64 و Pokkali برنج با روش Real Time-PCR

Ranieri *et al.*, 2005; Hasan *et al.*, 2008;)
 Gill and Tuteja, 2010). در پژوهشی میزان بیان
 ژن‌ها و فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان در دو ژنوتیپ
 حساس (BR-IRGA 409) و متحمل (EPAGRI 108 و
 EPAGRI 109) در شرایط سمیت آهن
 بررسی شد. بیش‌ترین میزان بیان ژن‌های آنتی
 اکسیدان و فعالیت آنزیمی در رقم متحمل
 EPAGRI 109 وجود داشت (Stein *et al.*,
 2014). اعمال تنش آهن در سطوح 100، 200 و
 300ppm در سه ژنوتیپ Ranjit، Mahsuri و
 Siyal Sali برنج سبب افزایش فعالیت کاتالاز در
 Ranjit و Siyal Sali شد. همچنین بیش‌ترین
 میزان فعالیت کاتالاز در ژنوتیپ Mahsuri مشاهده
 شد (Saikia and Baruah, 2012). در پژوهش
 دیگری اعمال تنش آلومینیوم در ژنوتیپ‌های
 HUR-105 و Vandana برنج سبب افزایش میزان
 آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز در ژنوتیپ
 Vandana شد (Bhoomika *et al.*, 2013).
 اعمال سطوح مختلف تنش آهن سبب ایجاد تغییر
 معناداری در بیان PRX در ژنوتیپ IR64 نشد. اما
 بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali با وجود روند
 کاهشی، بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. در آزمایشی
 بیش‌بینانی ژن PRX سبب مقاومت گیاه آراییدوپسیس
 به تنش‌های غیر زیستی مانند سرما و شوری شد
 (Jing *et al.*, 2006). در پژوهش دیگری بیان ژن
 PRX سبب افزایش مقاومت برنج به شوری شد
 (Kim *et al.*, 2013). گیاه با بیان این ژن می‌تواند
 میزان H₂O₂ را کاهش دهد و برای ادامه فعالیت این
 چرخه لازم است فرم اکسید پروکسی ردوکسین دوباره
 به فرم احیا تبدیل شود. این عمل توسط TRX و PRX
 صورت می‌گیرد. یکی از سوبستراهای پروکسی
 ردوکسین، پراکسید هیدروژن است که با تأمین
 هیدروژن مورد نیاز، آن را به آب تبدیل می‌کند. به
 این ترتیب گیاه بوسیله افزایش بیان ژن قادر به
 مقابله با تنش اکسیداتیو در سطوح بالای سمیت آهن

با وجود افزایش بیان نسبی ژن CAT از سطح
 100 به 250 میلی‌گرم در لیتر در ژنوتیپ IR64،
 میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در
 همه سطوح تنش بسیار بیش‌تر بود. افزایش بیان ژن
 CAT در شرایط تنش آهن سبب افزایش مقاومت
 گیاه به تنش‌های محیطی می‌شود (Sinha and
 Saxena, 2006). در سطوح کم تنش بیان نسبی
 این ژن در ژنوتیپ IR64 افزایش یافت. اما در سطوح
 بالاتر تنش بیان نسبی این ژن تفاوت معناداری
 نداشت. احتمالاً یکی از دلایل حساسیت ژنوتیپ
 IR64 به تنش آهن عدم تغییر بیان نسبی ژن CAT
 در سطوح بالای سمیت آهن است. این در حالی است
 که بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali بسیار
 بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. فعالیت آنزیم CAT در
 بسیاری از گیاهان بررسی شده است (Nagamiya
et al., 2007). بررسی فعالیت این آنزیم در برنج
 نشان داد که در شرایط تنش فعالیت این آنزیم
 افزایش می‌یابد (Milone *et al.*, 2003). در سطح
 پایین تنش بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64
 بیش‌تر از سایر سطوح بود. احتمالاً علت کاهش
 فعالیت آنزیم CAT، برهمکنش پروتئین‌های دخیل
 در ساختار آن با ROS، کاهش تولید آنزیم CAT و
 تغییر ساختار پیش‌واحد‌های پروتئینی مورد نیاز آن
 است (Feierabend and Engel, 1986; Hertwig *et al.*,
 1992; León *et al.*, 2002).
 به‌طور کلی در پژوهش‌های مختلفی که به بررسی تأثیر
 تنش اکسیداتیو بر فعالیت آنزیم CAT پرداخته‌اند،
 نتایج مختلفی از افزایش و کاهش فعالیت این آنزیم
 گزارش شده است. به‌عنوان مثال در برخی از
 پژوهش‌ها مشخص شد که فعالیت آنزیم CAT در
 گیاهان تحت تنش از جمله رازیانه، سویا و فلفل
 کاهش یافت (Lagriffoul *et al.*, 1998; Balestrasse
et al., 2001; Cho and Seo, 2005; Khan *et al.*,
 2007). در حالی که سایر پژوهشگران
 افزایش فعالیت این آنزیم را گزارش کرده‌اند

بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. به‌نظر می‌رسد که در ژنوتیپ Pokkali این چرخه به‌طور هماهنگ انجام شده است و *PRX* و *GRX* به‌عنوان پیش‌ماده برای پروکسی‌ردوکسین عمل کرده و باعث ایجاد فرم فعال این ژن شده است. بنابراین احتمالاً اعمال تنش در سطوح کم سبب افزایش بیان این ژن شده است تا گیاه از میزان پراکسید هیدروژن کاسته و دوباره برای ادامه فعالیت از فرم اکسید به فرم احیای خود تبدیل شود که این مسیر به‌صورت یک چرخه انجام می‌شود. در ژنوتیپ IR64 این روند افزایشی در ژن *TRX* و *GRX* از سطح 100 به 250 میلی‌گرم در لیتر به صورت محسوس قابل مشاهده است. به‌نظر می‌رسد تیوردوکسین با بیان بیش‌تر در ژنوتیپ Pokkali تأثیر بیش‌تری در احیای پروکسی‌ردوکسین داشته است. گلوآریدوکسین نیز در چرخه احیای پروکسی‌ردوکسین نقش دارد. نتایج آزمایش حاکی از آن است بیان ژن *PRX* مرتبط با بیان دو ژن *TRX* و *GRX* است. *PRX* می‌تواند با احیای پراکسید هیدروژن سبب کاهش حالت تنش اکسیداتیو به‌وجودآمده از طریق سمیت آهن شده و گیاه را با این شرایط سازگار کند. از طرفی دو ژن *TRX* و *GRX* نیز با احیای *PRX* منجر به فعال‌شدن آن می‌شوند. *GRX* به‌وسیله گلوآریدوکسین فعال و احیا می‌شود، درحالی‌که *TRX* نیاز به یک ردوکتاز دارد (Zagorchev et al., 2013). به این ترتیب برنج با سازگاری خود از طریق افزایش و کاهش میزان بیان نسبی ژن‌های مربوط به گونه‌های اکسیژن فعال، در مقابل سطوح مختلف تنش اکسیداتیو مقابله می‌کند. به‌نظر می‌رسد این مقابله با تنش در ژنوتیپ Pokkali مشهودتر است. بررسی الگوی بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در ژنوتیپ Pokkali نشان داد که ژن‌های مقاومت به تنش‌ها در این ژنوتیپ افزایش می‌یابند. احتمالاً این ژنوتیپ از طریق

خواهد بود (Kiba et al., 2005; Gao et al., 2012). احتمالاً بیش‌تر بودن میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali سبب کاهش H_2O_2 و کاهش اثرات ناشی از سمیت آهن می‌شود. سیستم گلوآریدوکسین شامل *NADPH*، *GSH* و *GR* است. الکترون‌ها از *NADPH* به گلوآریدوکسین سپس به گلوآریدوکسین و در نهایت به مولکول *GRX* جریان می‌یابند و باعث احیای گلوآریدوکسین می‌شوند. گلوآریدوکسین با استفاده از این سیستم چرخه‌ای خود را به حالت فعال می‌رساند تا بتواند پراکسید هیدروژن‌های ایجادشده را تجزیه کند. بررسی پروفایل بیان ژنی در آراییدوپسیس با اعمال تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف نشان داد که ژن‌های *GRX* و *TRX* نقش مهمی را در مقاومت به تنش ایفا می‌کنند (Belin et al., 2015). در آزمایش دیگری انتقال ژن *GRX* به آراییدوپسیس سبب افزایش مقاومت گیاه به سرما شد (Hu et al., 2015). در پژوهشی بیش‌بینی ژن *GRX* در شرایط گرما (45 درجه سلسیوس)، سرما (4 درجه سلسیوس) و شوری (150 میلی‌مولار $NaCl$)، سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و آبسزیک اسید سبب افزایش مقاومت گیاه برنج شد (Ning et al., 2018). در ژنوتیپ Pokkali در سطح 100 و 400 میلی‌گرم در لیتر آهن بیش‌ترین میزان بیان *GRX* مشاهده شد که به‌نظر می‌رسد میزان تجزیه پراکسید هیدروژن در این تیمارها به مراتب بالاتر از تمام سطوح مورد بررسی است. افزایش سطح تنش از 100 به 250 میلی‌گرم در لیتر آهن سبب افزایش بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 شد. احتمالاً ژنوتیپ IR64 در سطوح کم‌تر تنش با افزایش میزان بیان نسبی این ژن سبب افزایش تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود. در سطوح بیش‌تر تنش تغییرات بیان این ژن بی‌معنی یا دارای روندی کاهشی بود. در اکثر سطوح تنش مورد بررسی میزان

دهد. به این ترتیب برای کارکرد پروکسی‌ردوکسین باید به فرم احیای خود تبدیل شود، که احیای آن توسط تیوردوکسین یا گلوئاردوکسین انجام می‌شود. اعمال سطوح کم تنش سبب افزایش بیان *CAT*، *GRX* و *TRX* در ژنوتیپ IR64 شد. با افزایش سطح تنش تفاوت معناداری در بیان ژن‌ها ایجاد نشد. احتمالاً عدم تغییر بیان نسبی این ژن در سطوح بالای تنش یکی از دلایل حساسیت این ژنوتیپ به تنش آهن است. این در حالی است که بیان همه ژن‌های مورد بررسی با اعمال سطح 100 میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali بسیار بیش‌تر از IR64 بود و سپس با افزایش سطح تنش با وجود روند کاهشی، بیان نسبی ژن‌ها در اکثر سطوح تنش در Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. احتمالاً یکی از دلایل تحمل ژنوتیپ Pokkali بیان بالای ژن‌های آنتی‌اکسیدان در سطوح پایین تنش و سپس حفظ نسبی بیان است. با توجه به تغییراتی که در روند بیان ژن‌های پروکسی‌ردوکسین، تیوردوکسین و گلوئاردوکسین در دو ژنوتیپ مورد مطالعه به‌نظر می‌رسد تعدیل پراکسیدهای هیدروژن در ژنوتیپ IR64 مانند ژنوتیپ Pokkali عمدتاً به‌عده سیستم تنظیمی *PRX*، *TRX* و *GRX* است با این تفاوت که میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali اکثراً بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 است. فقدان تعادل در بین کارکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، منجر به کاهش توانمندی سیستم‌های جاروب‌کننده ROS می‌شود. تنش سمیت آهن که نتیجه آن افزایش و تجمع ROS در نقاط مختلف سلول از جمله نقاط مربوط به فعالیت‌های متابولیسمی و دفاعی سلول حساس و خطر ساز است. هرچه مقدار بیان این ژن‌ها در شرایط تنش سمیت آهن بیش‌تر باشد، سلول از پتانسیل بالایی برای احیا برخوردار خواهد شد و می‌توان بیان نمود که تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو و سمیت آهن افزایش می‌یابد.

فعال‌سازی مسیرهای SOS، در شوری و مسیرهای اسمتیک-اکسیداتیو و علامت‌دهی وابسته به یون Ca^{2+} در سایر تنش‌ها قادر به تحمل تنش‌های محیطی است (Vaidyanathan *et al.*, 1999). بررسی خصوصیات بیوشیمیایی در برنج نشان داد که میزان پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ Pokkali کم‌تر از IR64 است و این به‌دلیل بیش‌تر بودن میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ Pokkali است. به‌طوری که سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدتری دارد و هموستازی گلوکاتیون و آسکورات و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در Pokkali مناسب‌تر است. بنابراین بررسی میزان رادیکال‌های آزاد مؤثر در آسیب به DNA و بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در تشخیص میزان مقاومت و حساسیت ارقام به تنش‌های محیطی مؤثر واقع شود (El-Shabraw *et al.*, 2010).

در اکثر سطوح تنش میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. به‌ویژه این افزایش بیان در سطح 100 میلی‌گرم در لیتر آهن قابل توجه بود. به‌نظر می‌رسد گیاه برنج با افزایش بیان ژن‌های *TRX* و *GRX* برای احیای *PRX* بهره می‌برد. افزایش بیان *CAT* باعث کاهش اثر تجمعی پراکسید هیدروژن شده و گیاه را در برابر سطوح مختلف و بالای آهن مقاوم می‌کند. با وجود روند افزایشی بیان این ژن در ژنوتیپ IR64 با افزایش سطح تنش از 100 به 250 میلی‌گرم در لیتر آهن، میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 بود. بیش‌تر بودن بیان نسبی این ژن ممکن است عامل مهمی در بالا بردن میزان تحمل گیاه برنج به تنش سمیت آهن باشد. احتمالاً توقف فعالیت *PRX* سبب تجمع پراکسید هیدروژن در سیتوسل IR64 می‌شود. در این حالت افزایش سمیت و عدم افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در جاروب ROS می‌تواند میزان آسیب به غشاهای اندامک‌ها را به‌طور قابل‌توجهی افزایش

REFERENCES

- Ahmad P, Prasad MNV (2011) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer Science & Business Media. London.
- Ali B, Rani I, Hayat S, Ahmad A (2007) Effect of 4-Cl-indole-3-acetic acid on the seed germination of *Cicer arietinum* exposed to cadmium. Journal of Acta Botanica Croatica. 66(1): 57-65.
- Aoyama K, Nakaki T (2015) Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). Journal of Molecules. 20 (5): 8742-8758.
- Arnér ES, Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. European Journal of Biochemistry. 267 (20): 6102-6109.
- Balestrasse KB, Gardey L, Gallego SM, Tomaro ML (2001) Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. Journal of Functional Plant Biology. 28 (6): 497-504.
- Becana M, Aparicio TP, Sánchez-Díaz M (1988) Nitrate and hydrogen peroxide metabolism in *Medicago sativa* nodules and possible effect on leghaemoglobin function. Journal of Physiologia Plantarum. 72(4): 755-761.
- Becker M, Asch F (2005) Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 168 (4): 558-573.
- Belin C, Bashandy T, Cela J, Delorme-Hinoux V, Riondet C, Reichheld JP (2015) A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant, Cell & Environment. 38(2): 299-314.
- Bhoomika K, Pyngrope S, Dubey RS (2013). Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar. Journal of Plant Growth Regulation. 71(3): 235-252.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. Journal of Methods in Enzymology. 300: 219-226.
- Cho UH, Seo NH (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Journal of Plant Science. 168 (1): 113-120.
- Comba ME, Benavides MP, Tomaro ML (1998) Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. Journal of Functional Plant Biology. 25 (6): 665-671.
- Connolly EL, Guerinet ML (2002) Iron stress in plants. Journal of Genome Biology. 3(8): 1-4.
- Dietz KJ (2008) Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. Journal of Physiologia Plantarum. 133(3): 459-468.
- 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.
- El-Shabrawi H, Kumar B, Kaul T, Reddy MK, Singla-Pareek SL, Sopory SK (2010) Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. Journal of Protoplasma. 245(1-4): 85-96.
- Feierabend J, Engel S (1986) Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. Journal of Archives of Biochemistry and Biophysics. 251(2): 567-576.
- Fomenko DE, Gladyshev VN (2002) CxxS: Fold-independent redox motif

- revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Journal of Protein Science*. 11(10): 2285-2296.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Journal of Plant, Cell & Environment*. 28(8): 1056-1071.
- Gao C, Zhang K, Yang G, Wang Y (2012) Expression analysis of four peroxiredoxin genes from *Tamarix hispida* in response to different abiotic stresses and exogenous abscisic acid (ABA). *International Journal of Molecular Sciences*. 13(3): 3751-3764.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 48 (12): 909-930.
- Grillet L, Mari S, Schmidt W (2014) Iron in seeds—loading pathways and subcellular localization. *Journal of Frontiers in Plant Science*. 4: 1-8.
- Hasan SA, Hayat S, Ali B, Ahmad A (2008) 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Journal of Environmental Pollution*. 151(1): 60-66.
- Hertwig B, Streb P, Feierabend J (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Journal of Plant Physiology*. 100 (3): 1547-1553.
- Holmgren A (1979) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 254 (9): 3664-3671.
- Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Journal of Annual review of biochemistry*. 54 (1): 237-271.
- Hu Y, Wu Q, Sprague SA, Park J, Oh M, Rajashekar CB, Koiwa H, Nakata PA, Cheng N, Hirschi KD, White FF (2015) Tomato expressing Arabidopsis glutaredoxin gene *AtGRXS17* confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Journal of Horticulture Research*. 2: 1-11
- Jing LW, Chen SH, Guo XL, Zhang H, Zhao YX (2006) Overexpression of a Chloroplast-located Peroxiredoxin Q Gene, SsPrxQ, Increases the Salt and Low-temperature Tolerance of Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48(10): 1244-1249.
- Khan NA, Samiullah Singh S, Nazar R (2007) Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 193(6): 435-444.
- Khelifa S, M'hamdi M, Rejeb H, Belbahri L, Souayah N (2011) Relation between catalase activity, salt stress and urban environment in *citrus aurantium* L. *Journal of Horticulture and Forestry*. 3(6): 186-189.
- Kiba A, Nishihara M, Tsukatani N, Nakatsuka T, Kato Y, Yamamura S (2005) A peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. *Journal of Plant and Cell Physiology*. 46(6): 1007-1015.
- Kim IS, Kim YS, Yoon HS (2013) Expression of salt-induced 2-Cys peroxiredoxin from *Oryza sativa* increases stress tolerance and fermentation capacity in genetically engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(8): 3519-3533.
- Kim YH, Khan AL, Waqas M, Shim JK, Kim DH, Lee KY, Lee IJ (2014) Silicon application to rice root zone influenced the phytohormonal and antioxidant responses under salinity

- stress. *Journal of Plant Growth Regulation*. 33(2): 137-149.
- Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S (1993) Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 59(3): 867-873.
- León AM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, Romero-Puertas MC, Chatterjee D, Mateos RM, Luis A, Sandalio LM (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 40(10): 813-820.
- 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, 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.
- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C (2012) Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Journal of Antioxidants & Redox Signaling*. 17 (8): 1124-1160.
- Milone MT, Sgherri C, Clijsters H, Navari-Izzo F (2003) Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Journal of Environmental and Experimental Botany*. 50 (3): 265-276.
- Mohsenzadeh Golfazani M, Pasandideh arjmand M, Kordrostami M, Samizadeh Lahiji H, Hassani kumleh H, Rezadoost MH (2018) The effect of iron stress on the relative expression level of *SOD*, *MDHR* and *GPXI* genes in tolerant and sensitive genotypes of rice. *Journal of Crop Biotechnology*. 24:1-13.
- Nagamiya K, Motohashi T, Nakao K, Prodhan SH, Hattori E, Hirose S, Ozawa K, Ohkawa Y, Takabe T, Komamine A (2007) Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an *Escherichia coli* catalase gene, *katE*. *Journal of Plant Biotechnology Reports*. 1(1): 49-55.
- Ning X, Sun Y, Wang C, Zhang W, Sun M, Hu H, Liu J, Yang L (2018) A rice CPYC-type glutaredoxin *OsGRX20* in protection against bacterial blight, methyl viologen and salt stresses. *Journal of Frontiers in Plant Science*. 9(111): 1-12.
- 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*. 17: 31-42.
- Ranieri A, Castagna A, Scebba F, Careri M, Zagnoni I, Predieri G, Pagliari M, di Toppi LS (2005) Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 43 (1). 45-54.
- Rouhier N, Jacquot JP (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*. 38(11): 1413-1421.
- Saikia T, Baruah KK (2012) Iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa*) and its association with anti-oxidative enzyme activity. *Journal of Crop Science*. 3(3): 90-94.
- Sahrawat KL (2004) Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. *Journal of Plant Nutrition*. 27:1471-1504.
- Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Journal of*

- Chemosphere. 62 (8): 1340-1350.
- Stein RJ, Lopes SIG, Fett JP (2014) Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. *Journal of Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 26(2): 135-146.
- Thongbai P, Goodman BA (2000) Free radical generation and post anoxic injury in an iron toxic soil. *Journal of Plant Physiol*. 23:1887-1990.
- Tripathi BN, Bhatt I, Dietz KJ (2009) Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Journal of Protoplasma*. 235 (1-4): 3-15.
- Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Journal of Plant Science*. 140(1): 21-30.
- 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. *Journl of Rice*. 7(8): 1-12.
- Yoshida S, Fomo DA, Cock JH (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Banos (Philippines) International Rice Research Institute.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GKS, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Journl of Science*. 296 (5565): 79-92.
- Zagorchev L, Seal C, Kranner I, Odjakova M (2013) A central role for thiols in plant tolerance to antibiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(4): 7405-7432.
- Zarin J, Motesharezadeh B, Ahmadi A (2017) evaluating activity of some antioxidant enzymes under cadmium toxicity in two wheat cultivars. *Journal of Soil Management and Sustainable*. 6 (4): 21-37.
- Zhang F, Zhang H, Wang G, Xu L, Shen Z (2009) Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*. 168 (1): 76-84