



تأثیر تنش خشکی بر خصوصیات مورفو-فیزیولوژیک و بیان ایزوفرم A ژن کاتالاز (*OsCat A*) در گیاهچه برنج

راحله پناه آبادی^۱، اسدالله احمدی خواه^{۲*}، حسین عسکری^۲

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران

^۲ استادیاران گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۸

چکیده

تنش خشکی یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تولید گیاهان زراعی در ایران و جهان می‌باشد. به منظور بررسی واکنش لاین موتانت MT149 به شرایط تنش خشکی و مقایسه‌ی آن با رقم والدی ندا در مرحله گیاهچه‌ای، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. تنش خشکی (۶- بار) با استفاده از محلول پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ اعمال شد و دینامیک رشد برگ و میزان کلروفیل‌های a و b در زمان‌های مختلف پس از تنش (۰، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت بعد از اعمال تنش) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ، زمان و تیمار بر تمامی خصوصیات مورد بررسی معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که لاین موتانت نسبت به رقم والدی خود از نظر همه خصوصیات مورد مطالعه برتری داشت. همچنین بررسی بیان ایزوفرم A ژن کاتالاز (*OsCat A*) در زمان‌های مختلف بعد از تنش نشان داد که رقم والدی ندا در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش کاهش معنی‌داری (۷- برابر) در بیان ژن کاتالاز نشان داد، اما لاین موتانت MT149 در همین زمان افزایش بسیار معنی‌داری (۱۵/۸ برابر) در بیان ژن کاتالاز نشان داد. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً یکی از دلایل تحمل بالاتر رقم موتانت MT149 به تنش خشکی، افزایش بیان ژن *OsCat A* برای رفع اثرات سمی ROS می‌باشد.

کلمات کلیدی: برنج، بیان، تنش خشکی، کاتالاز.

مقدمه

شدت تنش و دوام آن، ژنوتیپ گیاه و مرحله رشد و همچنین عوامل محیطی ایجاد کننده تنش بستگی دارند (Lisar et al., 2002; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). پژوهشی Mamnoei and Seyed Sharifi (2010) گزارش کردند که تنش خشکی منجر به کاهش مقدار سبزینگی گیاه و کلروفیل می شود. نتایج مطالعات نشان می دهد در شرایط تنش و حتی تحت غلظت های بالای CO₂ محیطی، باز هم فتوستتز کاهش می یابد که نشان می دهد دستگاه فتوستتز صرف نظر از بسته شدن روزنه ها، تحت تاثیر قرار گرفته است. در شرایط تنش کمبود آب، روزنه های برگ بسته می شوند و متعاقب آن غلظت CO₂ در بافت مزوفیل کاهش می یابد و به دنبال این وضعیت واکنش های تاریکی فتوستتز مختل شده و محصولات حاصل از واکنش های روشنایی، که شامل ATP و NADPH است، مصرف نمی شوند. در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف NADP⁺ جهت دریافت الکترون کاهش می یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده ی جانشین الکترون عمل می کند و منجر به شکل گیری رادیکال سوپر اکسید (O₂⁻)، پر اکسید هیدروژن (H₂O₂) و رادیکال هیدروکسیل (OH⁻) می گردد (Sairam and Saxena, 2000; Turkan et al., 2005). اولین گام در اکسید شدن اکسیژن تولید گونه های اکسیژن فعال نسبتاً کوتاه عمر مثل هیدروکسیل HO₂⁻ و سوپراکسید O₂⁻

بر اساس گزارش سازمان خوار و بار کشاورزی (FAO) میزان سطح زیرکشت برنج در جهان در سال ۲۰۱۲، ۱۹۳/۷ میلیون هکتار یعنی ۳۰ میلیون هکتار بیشتر از کل مساحت کشور ایران می باشد (FAO, 2012). سطح زیر کشت برنج در ایران حدود ۵۷۰۰۰۰۰ هکتار است و بیش از ۸۰ درصد از اراضی زیر کشت برنج در ۳ استان شمالی کشور یعنی گیلان مازندران و گلستان قرار دارد. بنابراین با توجه به کمبود آب و محدودیت سطح قابل کاشت در کشور لازم است میزان تولید برنج در واحد سطح افزایش یابد. از آنجایی که بخش وسیعی از زمین های زیر کشت دنیا و ایران در شرایط آب و هوایی نیمه خشک قرار دارند، لزوم توجه به روش های نوین جهت کاهش خسارات ناشی از تنش خشکی، امری ضروری به نظر می آید. تنش خشکی اثرات مضر بر روی فرآیندهای متابولیکی شامل آسیب های سلولی شدید، ممانعت از فتوستتز، تنظیم اسمزی، القای ترمیم سلول ها و کارکرد چابرون ها و تغییر در بیان ژن و متابولیسم، تنظیم بسته شدن روزنه ها، جذب مواد مغذی و تولید آسیمیلات های فتوستتزی دارد که در نهایت می تواند منجر به کاهش عملکرد گیاه شود (Sarangi et al., 2011).

تنش خشکی باعث ایجاد مجموعه ای از واکنش های پیچیده می شود که به صورت تغییرات در سطح مولکولی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ظاهر می شوند. البته این مجموعه واکنش ها به

مولکول‌های آلی مثل DNA و در نتیجه اختلال در DNA می‌گردد (Mittler 2002; Rerksiri *et al.*, 2004; Habibi *et al.*, 2013).

گیاهان وقتی با شرایط تنش مواجه می‌شوند مکانیزم‌های مختلفی را در سطوح مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به کار می‌گیرند (Covarrubias and Reyes, 2010). برای حفاظت سلول از آسیب گونه‌های فعال اکسیژن، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای فعال می‌شوند که شامل سه جزء هستند: ۱- لیپید محلول و توکوفرول‌های همراه غشاء، ۲- اجزای غیر حل شونده در آب مثل گلوتاتیون و توکوفرول، ۳- آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Morita *et al.*, 2011; Evaristo de Deus *et al.*, 2015). آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که مانع از فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شوند و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این مواد می‌توانند با دادن الکترون به رادیکال آزاد، آن را به شکل پایدار خود تبدیل کنند و مانع از اثرات مخرب آن شوند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپر اکسید دیسموتاز^۱ (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز^۲ (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) هستند (Blokhin *et al.*, 2003).

کاتالاز اولین آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که کشف و شناسایی شده است. آنزیم کاتالاز از سلول‌ها در برابر پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. کاتالاز برای برخی انواع سلول‌ها تحت شرایط طبیعی ضروری بوده و نقش مهمی در

است که نیمه عمر O_2^- ، ۲ تا ۴ میکرو ثانیه است (Knox and Dodge, 1985).

دومین مرحله احیای اکسیژن، ایجاد H_2O_2 است که یک مولکول با نیمه عمر بالا (۱ میلی ثانیه) است که می‌تواند از محل تولید به فاصله‌های بیشتری انتشار یابد (Levine *et al.*, 1994). سمیت بیولوژیکی H_2O_2 ناشی از اکسید شدن گروه SH است که در حضور کاتالیست‌های فلزی از طریق واکنش‌های هابرویس یا فتون افزایش پیدا می‌کند. گونه نهایی ایجاد شده به وسیله این واکنش‌ها رادیکال هیدروژن (OH) می‌باشد که پتانسیل خیلی قوی دارد و نیمه عمر آن کمتر از یک میکرو ثانیه است و در نتیجه میل ترکیبی بالایی برای مولکول‌های بیولوژیکی در محل تولید دارد. به خوبی مشخص شده که کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم اصلی‌ترین منابع تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROSها) در گیاهان می‌باشند. دیگر منابع تشکیل ROS واکنش‌های سمیت‌زدایی در سیتوکروم P450 در سیتوپلاسم و شبکه آندوپلاسمی است (Gill *et al.*, 2010).

فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) سبب بروز صدماتی همچون اکسید شدن لیپیدها (که منجر به تغییر ساختار غشاء و در نتیجه از هم پاشیدگی یکپارچگی آن می‌شود)، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروه‌های سولفیدریل (SH)، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، بی رنگ شدن و یا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزه‌ای و هم‌چنین حمله مداوم به

این تحقیق، بررسی تاثیر تنش خشکی بر دینامیک رشد برگ و محتوی کلروفیل و مطالعه بیان ایزوفرم A ژن کاتالاز (*OsCat A*) در رقم موتانت برنج MT149 در مقایسه با رقم والدی آن (ندا) بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار تنش

ژنوتیپ‌های استفاده شده در این پژوهش شامل دو رقم ندا و لاین موتانت MT149 بودند. رقم ندا از ارقام پر عملکرد، نیمه پاکوتاه و غیر متحمل به تنش خشکی می‌باشد و لاین موتانت MT149 حاصل جهش‌زایی رقم ندا با موتاژن اتیل متیل سولفونات (EMS) می‌باشد که در مطالعات قبلی به عنوان یک موتانت متحمل به خشکی در مرحله‌ی گیاهچه‌ای شناسایی شد (Ahmadikhah *et al.*, 2015). بذور برنج پس از ضد عفونی سطحی در ظروف پتری جوانه‌دار شده و سپس به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) منتقل شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد که در آن دو ژنوتیپ در دو سطح تنش خشکی (نرمال و تنش ۶- بار) و ۴ زمان نمونه‌برداری (۰، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از اعمال تنش) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از دو هفته (مرحله ۴-۳ برگگی) تنش خشکی (تنش اسمزی ۶- بار) با پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ اعمال شد. محاسبه فشار اسمزی بر اساس فرمول (Michel and Kaufmann, 1973) انجام شد.

کسب مقاومت در برابر تنش اکسایشی در فرآیندهای سازگاری سلول‌ها ایفاء می‌کند (Yang and Poovaiah, 2002). کاتالاز یک آنزیم محتوی هم است که تبدیل دو مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند. کاتالاز بالاترین و سریع‌ترین پتانسیل از بین بردن پراکسید هیدروژن را در بین آنزیم‌ها دارا است و با همکاری پراکسیداز و دیگر آنزیم‌ها، پراکسید هیدروژن تولید شده در شرایط تنش را از بین می‌برد (Foyer *et al.*, 1994). فعالیت کاتالاز متناسب با کمبود آب در برگ‌ها و ریشه‌ها، در برگ‌ها تقریباً پایدار باقی مانده و در طی کمبود شدید آب در ریشه‌ها کاهش می‌یابد (Feierabend *et al.*, 1992). تداوم فعالیت کاتالاز در برگ‌های گیاهان تنش دیده، امکان حذف H₂O₂ تولید شده در طی تنش خشکی در مرحله تنفس نوری v_h فراهم می‌نماید. جایگاه این آنزیم در پراکسی‌زوم‌ها و گلی‌اکسی‌زوم‌ها می‌باشد و نقش کلیدی در مواجهه با تنش‌های اکسیداتیو دارد (Noctor *et al.*, 2000). سه کلاس کاتالاز Cat A و Cat B و Cat C در پاسخ به تنش‌های محیطی در برنج دخیل هستند (Joo *et al.*, 2014).

اخیراً یک لاین موتانت از غربال لاین‌های موتانت حاصل از جهش‌زایی برنج (رقم ندا) با موتاژن اتیل متان سولفونات (EMS) جداسازی و معرفی شده است که در بررسی‌های اولیه تحمل به تنش خشکی در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه بالغ نشان داده است (Ahmadikhah *et al.*, 2015). از این‌رو، هدف

خصوصیات اندازه‌گیری شده

پس از اعمال تنش، نمونه‌برداری در زمان‌های صفر، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت انجام شد. در هر بار نمونه‌گیری دینامیک رشد (طول بلندترین برگ) اندازه‌گیری شد و سرعت گسترش طولی برگ (LER) (بر حسب میلی‌متر) با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$LER = (LE_t - LE_{t-1}) / LE_t$$

که در آن، LE_t طول برگ در زمان t و LE_{t-1} طول برگ در زمان $t-1$ می‌باشد. بر اساس این خصوصیت، درصد گسترش طولی برگ نیز محاسبه گردید. همچنین در شروع و پایان آزمایش میزان کلروفیل اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کلروفیل مقدار ۲۵ میلی‌گرم از نمونه برگ با ۲ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ابتدا ورتکس شد و سپس برای ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جذب با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۶۳/۶ و ۴۶۶/۶ نانومتر اندازه‌گیری شد و محتوی کلروفیل با استفاده از فرمول‌های زیر (Porra, 2002) محاسبه شد.

$$Chl.a \text{ mg/g F.W} = 12.25(A_{663.6}) - 2.55(A_{646.67}) \times [v/1000 \times W]$$

$$Chl.b \text{ mg/g F.W} = 20.31(A_{646.6}) - 2.55(A_{663.6}) \times [v/1000 \times W]$$

که در این فرمول‌ها $F.W$ وزن برگ، A جذب در طول موج خاص، V حجم کلروفیل از عصاره در استون ۸۰ درصد و W وزن کل بافت می‌باشد.

بررسی بیان ژن

نمونه‌های برگ از هر کرت آزمایشی در ازت مایع پودر گردیده و تا زمان استخراج RNA

در دمای ۷۰- نگه داری شدند. استخراج RNA بوسیله کیت RNX-plus (شرکت سیناکلون) از نمونه‌های پودر شده برگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. تیمار DNase I قبل از ساخت cDNA اعمال شد و cDNAهای تک رشته‌ای با کیت شرکت آریاطوس ساخته شدند. DNA ژنومی با روش تغییر یافته CTAB (Ahmadikhah, 2009) استخراج شد. برای بررسی بیان ایزوفرم A ژن کاتالاز (*OsCat A*) با شماره دسترسی JX393051.1 در بانک ژن دو آغازگر اختصاصی طراحی شدند. این آغازگرها با توالی (-5'-CCATCTGGCTCTCCTACTGG-3' برای آغازگر مستقیم و -5'-AGA ACTTGGACGACGGCCCTGA-3' برای آغازگر معکوس) واقع در ناحیه 5'-UTR با برنامه Primer 3.v5 طراحی و سپس سنتز گردیدند (شرکت سیناکلون). از ژن خانه‌دار بتا اکتین برنج (آغازگرهای مربوطه با توالی -5' GTCGGTGAAGGGGACTTACA-3' برای آغازگر مستقیم و -5' TTCATACAGCAGGCAAGCAC-3' برای آغازگر معکوس) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. از ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی در تحقیقات مختلف استفاده شده است (Tohidi و Nezhad et al., 2014; Zinati et al., 2015) در آزمایشی که اخیراً انجام شده نشان داده شد که ژن بتا اکتین یکی از بهترین ژن‌های خانه‌دار جهت استفاده در آزمایشات بیان ژن می‌باشد (Tian et al., 2015). آزمایشات بیان ژن با استفاده از کیت CYBR GREEN شرکت

مقایسه اثر تیمار تنش بر سرعت و درصد گسترش طولی برگ نشان داد که در شرایط تنش خشکی، به طور کلی سرعت و درصد گسترش طولی برگ به طور معنی داری کمتر از شرایط بدون تنش بوده است (شکل ۱). در پژوهشی (Jnandabhiram, 2012) گزارش کرد که تنش خشکی به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر حالت های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان تاثیر گذار است. مقایسه میانگین کلی ژنوتیپها (شکل ۲) تفاوت دو ژنوتیپ را از نظر سرعت رشد برگ و درصد رشد برگ نشان داد که در این میان لاین موتانت سرعت رشد برگ و همچنین درصد رشد برگ بیشتری در مقایسه با رقم والدی ندا داشت. تعدادی از پارامترهای رشد در برنج شدیداً تحت تاثیر تنش آب قرار می گیرند. رشد طولی گیاه یکی از پارامترهای مهمی است که شدیداً تحت تاثیر تنش خشکی قرار می گیرد. نتایج مطالعات متعدد نشان می دهد که رشد گیاه بر اثر کمبود آب قابل استفاده کاهش می یابد. به طور مثال، مطالعات (Hsiao et al., 1984) نیز حاکی از آن است که تنش خشکی به طور مستقیم بر روی رشد برنج تاثیر گذار است و باعث کاهش ارتفاع بوته و تعداد پنجه در هر گیاه می شود؛ علت آن است که گیاه قادر به جذب آب از خاک به دلیل وقوع خشکی نیست و در نتیجه عناصر ضروری نیز برای گیاه غیر قابل دسترس می شوند که در نتیجه آن، تقسیم و بزرگ شدن سلول کاهش یافته و در نتیجه رشد گیاه کم می شود

آریاطوس در دستگاه Real-Time PCR (شرکت ABI) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برنامه تکثیر به صورت زیر تنظیم گردید: یک چرخه در 94°C به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۵ چرخه به صورت 94°C به مدت ۱۵ ثانیه، 60°C (برای ژن OsCat A) یا 56°C (برای ژن بتا اکتین) به مدت ۳۵ ثانیه، 72°C به مدت ۴۵ ثانیه.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه داده های مورفو-فیزیولوژیک (از قبیل تجزیه واریانس و مقایسه میانگینها) از نرم افزار SPSS V.19 استفاده شد. برای محاسبه بیان نسبی ژن از روش $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) استفاده شد. محاسبه چرخه آستانه (C_T) در هر نمونه cDNA با استفاده از نرم افزار LINREG انجام شد. آزمون معنی داری داده های بیان ژن با روش تغییر یافته فافل (Pfaffl, 2001) و با استفاده از نرم افزار REST انجام شد.

نتایج و بحث

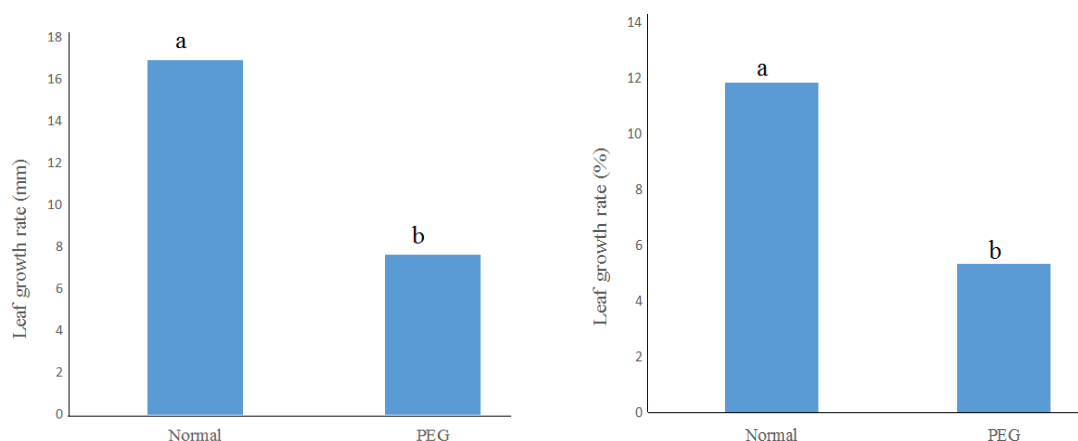
بررسی دینامیک رشد برگ

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات تیمار تنش، زمان و ژنوتیپ در سطح یک درصد اختلاف معنی داری برای سرعت گسترش طولی برگ و درصد گسترش طولی برگ داشتند (جدول ۱). نتایج مشابهی در تحقیقات گذشته به دست آمد (Rezaei and Nahvi, 2007). هیچ یک از اثرات متقابل (دوگانه و سه گانه) تفاوت معنی داری را نشان ندادند.

جدول ۱- خلاصه نتیجه تجزیه واریانس مربوط به سرعت رشد برگ و درصد رشد برگ در شرایط تنش خشکی در زمان‌های مختلف پس از تنش.

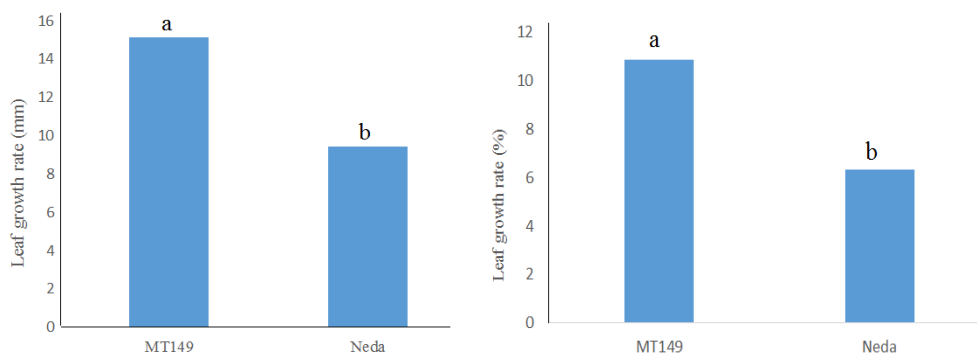
Table 1- Summary of analysis of variance for leaf growth rate and leaf expansion percentage under drought stress in different times after stress.

درصد گسترش طولی برگ Leaf expansion percent	سرعت گسترش طولی برگ (mm) Leaf expansion rate	درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V
183.470**	292.790**	1	ژنوتیپ Genotype
378.957**	780.892**	1	تیمار تنش Stress treatment
233.339**	487.274**	2	زمان Time
0.577 ^{ns}	0.454 ^{ns}	2	ژنوتیپ×زمان Time×Genotype
12.104 ^{ns}	11.864 ^{ns}	1	ژنوتیپ×تیمار تنش Stress×Genotype
17.570 ^{ns}	39.848 ^{ns}	2	زمان×تیمار تنش Time×Stress
0.187 ^{ns}	0.751 ^{ns}	2	ژنوتیپ×زمان×تیمار Stress×Time×Genotype
11.191	20.675	24	خطا Error



شکل ۱- مقایسه اثرات تیمار تنش بر سرعت گسترش طولی برگ (چپ) و درصد گسترش طولی برگ (راست).

Figure 1- Comparison of stress effects on leaf expansion rate (left) and leaf expansion percent (right).



شکل ۲- مقایسه میانگین کلی ژنوتیپ‌ها از نظر سرعت رشد برگ (چپ) و درصد رشد برگ (راست).

Figure 2- Comparison of genotypic effects on leaf expansion rate (left) and leaf expansion percent (right).

کلروفیل بیشتری در مقایسه با رقم مادری ندا داشت.

کلروفیل *b* جز اساسی فتوسنتز است، بنابراین محتوای کلروفیل شاخص مناسبی برای ارزیابی فتوسنتز است. گزارشات متعدد نشان داده که تنش خشکی می‌تواند باعث کم شدن مقدار فتوسنتز شود (Chaves et al., 2003). Akram et al. (2013) نشان دادند که مقدار فتوسنتز و به تبع آن محتوی کلروفیل *a* تحت تنش خشکی به شدت کاهش پیدا می‌کند. همچنین گزارش Jnandabhiram and Sailen (2012) کردند که در شرایط بدون آبیاری مقدار کلروفیل *a* و *b* کلروفیل کل کاهش چشمگیری نشان داد که با نتایج این تحقیق مبنی بر کاهش کلروفیل‌های *a* و *b* در شرایط تنش در رقم والدی ندا (غیر متحمل) تطابق دارد.

در پژوهشی Yang and Luo (2002)

تولید برنج را تحت سطوح متفاوت تنش خشکی مطالعه کردند و گزارش کردند که خشکی باعث کاهش عملکرد دانه، کاهش رشد ساقه، ریشه و برگ و کاهش ارتفاع گیاه می‌شود.

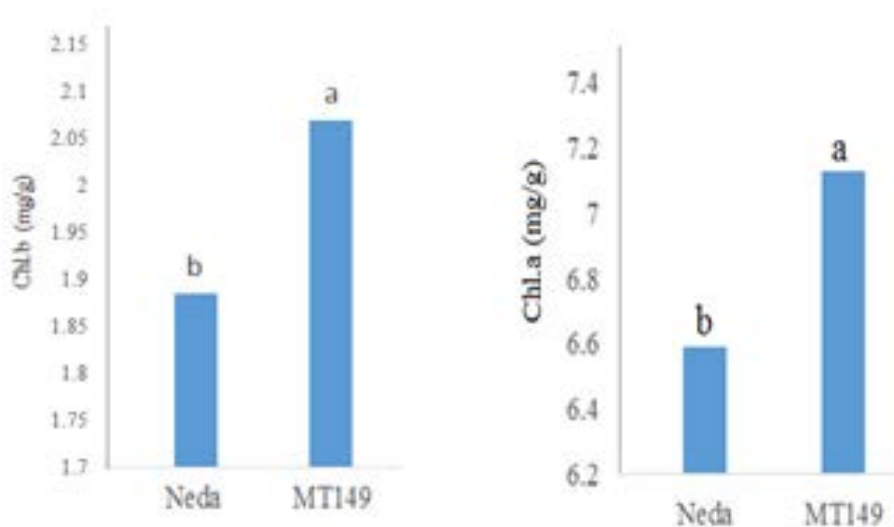
واکنش به خشکی در سطح کلروفیل

نتیجه‌ی تجزیه واریانس مربوط به انواع کلروفیل در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، اثر زمان و ژنوتیپ بر هر دو نوع کلروفیل در سطح یک یا پنج درصد معنی دار بود، اما اثر تیمار تنش و اثرات متقابل تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

در شکل ۳ محتوی کلروفیل‌های *a* و *b* دو ژنوتیپ در شرایط تنش (۳۶ ساعت پس از شروع تنش) با هم مقایسه شده است که نشان می‌دهد لاین موتانت در شرایط تنش، محتوای

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات اصلی و متقابل برای کلروفیل های *a* و *b*Table 2- ANOVA of main and interaction effects for chlorophylls *a* and *b*.

منبع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>
S.O.V	df	Chl.a	Chl.b
ژنوتیپ Genotype	1	2.490**	0.280*
تیمار تنش Stress treatment	1	0.087 ^{ns}	0.030 ^{ns}
زمان Time	1	25.607**	3.689**
ژنوتیپ×زمان Time×Genotype	1	0.073 ^{ns}	0.001 ^{ns}
ژنوتیپ×تیمار تنش Stress×Genotype	1	0.066 ^{ns}	0.006 ^{ns}
زمان×تیمار تنش Time×Stress	1	0.087 ^{ns}	0.030 ^{ns}
ژنوتیپ×زمان×تیمار Stress×Time×Genotype	1	0.066 ^{ns}	0.006 ^{ns}
خطا Error	16	0.136	0.036

شکل ۳- واکنش دو ژنوتیپ به تنش خشکی از نظر محتوی کلروفیل های *a* و *b*.Figure 3- Response of two genotype to drought stress in chlorophyll *a* and *b* contents.

فتوستنز، کلروفیل های *a*، *b* و همچنین محتوی کاروتنوئید تاثیرگذار است و نشان دادند که تحت تنش خشکی میزان کلروفیل کاهش می یابد. در پژوهشی دیگر (Maisura et al (2014) گزارش کردند که تنش خشکی تاثیر زیادی بر میزان

در پژوهشی (Sairam et al (1997) نیز مشاهده کردند که تحت شرایط تنش محتوای کلروفیل و شاخص پایداری کلروفیل در گیاه گندم کاهش می یابد. (Muhammad et al (2013) نیز گزارش کردند که تنش خشکی روی میزان

موتانت نسبت به رقم والدی خود احتمالاً به خاطر افزایش بیان ژن *OsCat A* می‌باشد، این در حالی است که سرکوب بیان این ژن در رقم والدی ندا باعث حساسیت آن به تنش خشکی شده است.

مطالعات نشان می‌دهد که بیان و فعالیت ژن کاتالاز معمولاً به وسیله تنش فعال می‌شود (Rerksiri et al., 2013; Xing et al., 2007). در مطالعه دیگری نشان داده شد که فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز طی تنش خشکی در برنج افزایش می‌یابد (Xue et al., 2011). در پژوهشی Kumar et al (2013) نشان دادند که کاهش میزان تبخیر و تعرق و همچنین فتوسنتز و افزایش سطح پرولین و افزایش فعالیت کاتالاز طی تنش خشکی می‌تواند باعث تحمل به خشکی در برنج شود. کاهش در بیان می‌تواند به علت ممانعت از سنتز آنزیم یا تغییر در تجمع زیرواحدهای آنزیم تحت شرایط تنش باشد (Abedi and Pakniyat, 2010). مقایسه نحوه پاسخ به تنش خشکی در دو ژنوتیپ در ۲۴ ساعت پس از تنش (کاهش بیان ژن در رقم والدی حساس و افزایش بیان ژن در لاین موتانت متحمل) حاکی از آن است که افزایش رونویسی ژن کاتالاز A در لاین موتانت احتمالاً ناشی از وقوع جهش مفید در سیستم تنظیمی این ژن می‌باشد، طوری که اتصال فاکتورهای رونویسی به ناحیه پرموتر موجب تقویت سرعت رونویسی از این ژن می‌گردد.

کلروفیل a در برنج دارد. همچنین این محققان گزارش کردند که رشد برگ و محتوی کلروفیل کاهش بارزی در ارقام حساس تحت شرایط تنش نشان می‌دهد.

بررسی‌های بیان ژن

همانگونه که در جدول ۳ و همچنین شکل ۴ دیده می‌شود، دوازده ساعت پس از شروع تنش، بیان ژن کاتالاز A در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت (هرچند این کاهش معنی‌دار نبود). از آنجایی که تنش به صورت ناگهانی اعمال شده بود، این پاسخ کاهشی مورد انتظار بود، چنانچه در مطالعات گذشته بر این نکته تاکید شده است که نحوه پاسخ گیاه چه در سطح مورفولوژی و چه در سطح بیان ژن در شرایط تنش ناگهانی با تنش تدریجی تفاوت دارد، به طوری که در شرایط تنش خشکی ناگهانی گیاه ابتدا با یک شوک شدید کم‌آبی روبرو می‌شود، در حالی که در شرایط تنش خشکی تدریجی که تنش از سطح کم شروع شده و به تدریج افزایش می‌یابد، گیاه فرصت سازگار شدن با شرایط تنش را دارد و بنابراین دچار کاهش ناگهانی در خصوصیات رشدی نمی‌شود (Zhang et al., 2014). رقم ندا در زمان ۲۴ ساعت پس از شروع تنش، کاهش بیان شدید ژن کاتالاز A را نشان داد، در حالی که لاین موتانت حدود ۱۶ برابر افزایش بیان ژن را نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که یکی از دلایل سطح بالاتر تحمل به خشکی در لاین

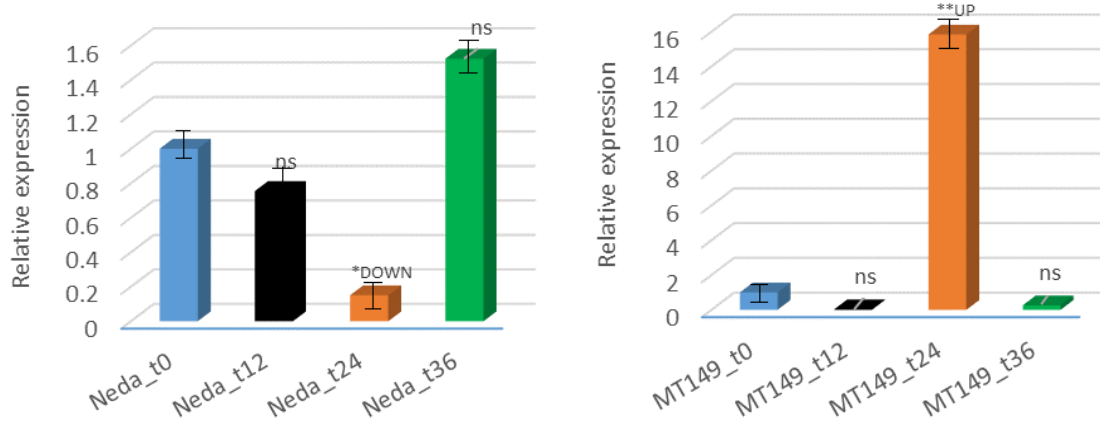
جدول ۳- نحوه پاسخ ژن *OsCat A* در دو ژنوتیپ نسبت به تنش خشکی در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش با PEG.

Table 3- Response of *OsCat A* to drought stress in two genotypes in different times after stress induced by PEG.

حدود اطمینان ۹۵٪ 95% confidence interval	بیان نسبی Relative expression	زمان Time	ژنوتیپ Genotype
0.17-4.59	0.755 ^{ns}	T12	Neda
0.09-0.27	0.150 [*]	T24	
0.64-5.33	1.522 ^{ns}	T36	
0.01-0.09	0.028 ^{ns}	T12	MT149
5.79-16.03	15.835 ^{**}	T24	
0.11-0.48	0.261 [*]	T36	

ns * و ** به ترتیب نشان دهنده تغییر غیرمعنی‌دار، تغییر معنی‌دار در سطح ۵٪ و تغییر معنی‌دار در سطح ۱٪.

ns, * and ** indicating non-significant change, significant change at 5% and significant change at 1% level, respectively.



شکل ۴- روند تغییر در بیان ژن *OsCat A* در موتانت MT149 (راست) و رقم والدی آن (چپ) پس از اعمال تنش خشکی.

Figure 4- The trend of change in *OsCat A* expression in mutant MT149 (right) and its parental cultivar (left) after drought stress.

طور معنی‌داری بالاست. نتایج تحقیقات دیگر نیز موید آن است که جهش در نواحی داخل ژنی یا نواحی تنظیمی ممکن است بر اتصال فاکتورهای رونویسی به DNA یا حتی پیریش mRNA اثر

طبق یافته‌های مطالعات Kamanu *et al* (2012) که بر روی ناحیه پروموتور حدود ۲۵ هزار ژن انسانی انجام شد، احتمال وقوع جهش در نواحی تنظیمی ژن‌های رمزکننده پروتئین‌ها به

معنی داری کمتر از رقم والدی آن بوده است. بیش‌بیان ژن *OsCat A* احتمالاً در کسب تحمل بالاتر لاین موتانت به تنش خشکی نقش دارد. از اینرو، می‌توان لاین موتانت MT149 را به عنوان یک کاندیدای مناسب برای کاهش مصرف آب معرفی نمود.

بگذارند (Heckmann *et al.*, 2010; Kasowski *et al.*, 2010). بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تنش خشکی به طور کلی موجب افت مقادیر خصوصیات مورفو-فیزیولوژیک گیاهچه برنج گردید، ولی این افت در لاین موتانت جدید MT149 به طور

منابع

- Abedi T, Pakniyat H (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46: 27-34.
- Ahmadikhah A, Shojaeian H, Pahlevani MH, Nayyeripasand L (2015). Assessment of EMS-induced variations in rice mutant lines using ISSR marker. *Biotechnology in Agriculture* 5: 53-61.
- Ahmadikhah A. (2009). A rapid mini-prep DNA extraction method in rice (*Oryza sativa*). *African Journal of Biotechnology* 8: 234-238.
- Akram, HM, Ali A, Sattar A, Rehman HSU, Bibi A (2013). Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal Animal Plant Science* 23: 1415-1423.
- Blokhin O, Virolainen E, Fagerstedt K (2003). Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annual Review Botany* 91: 179-194.
- Chaves MM, Maroco J, Pereira J (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Covarrubias AA, Reyes JL (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ.* 33: 481-489.
- Evaristo de Deus K, Lanna AC, Abreu FRM, Dias Silveira RD, Jacinto Pereira W, Brondani C, Pereira Vianello R (2015). Molecular and biochemical characterization of superoxide dismutase (SOD) in upland rice under drought. *Australian Journal of Crop Science* 9: 744.
- FAO (2012). *FAO statistical year book*. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Feierabend J, Schaan C, Hertwig B (1992). Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology* 100: 1554-1561.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994). Oxidative stress in plants. *Physiology Plant* 92: 696-717.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Habibi D, Mashdi Akbar Boojari M, Mahmoudi A, Ardakani MR and Taleghani D (2004). Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 September-1 October pp. 1-4.
- Heckmann JM, Uwimpuhwe H, Ballo R, Kaur M, Bajic VB, Prince S (2010). A functional SNP in the regulatory region of the decay-accelerating factor gene associates with extraocular muscle pareses in myasthenia gravis. *Genes and immunity* 11: 1-10.

- Hsiao TC, O'Toole JC, Yambao EB, Turner NC (1984). Influence of osmotic adjustment on leaf rolling and tissue death in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* 75: 338-341.
- Jnandabhiram C, Sailen Prasad B (2012). Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* L.) genotypes of Assam, India II. Protein and proline status in seedlings under peg induced water stress. *American Journal of Plant Sciences* 2012.
- Joo J, Lee YH, Song SI (2014). Rice CatA, CatB, and CatC are involved in environmental stress response, root growth, and photorespiration, respectively. *Journal of Plant Biology*, 57: 375-382.
- Kamanu FK, Medvedeva YA, Schaefer U, Jankovic BR, Archer JA, Bajic VB (2012). Mutations and binding sites of human transcription factors. *Frontiers in genetics* 3: 1-6.
- Kasowski M, Grubert F, Heffelfinger C, Hariharan M, Asabere A, Waszak SM, Habegger L, Rozowsky J, Shi M, Urban AE, Hong MY (2010). Variation in transcription factor binding among humans. *Science* 328: 232-5.
- Knox JP, Dodge AD (1985). Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24: 889-896
- Kumar P, Prasad S, Srivastava AK, Kumar A, Singh RP (2013). Characterization of drought tolerance traits in rice (*Oryza sativa* L.) by physiobiochemical approaches under drought stress environment. *Trends in Biosciences* 6: 520-522.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Lisar SYS, Motafakkerzad R, Hossain MM, Rahman IMM (2002). Water stress in plants: causes, effects and responses. *InTech Open*.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Maisura CM, Lubis I, Junaedinand A, Ehara H. (2014). Some physiological character responses of rice under drought conditions in a paddy system. *Journal of International Society of Southeast Asian Agricultural Sciences* 20: 104-114.
- Mamnoei E, Seyed Sharifi R (2010). Study the effects of water deficit on chlorophyll fluorescence indices and the amount of proline in six barley genotypes and it's relation with canopy temperature and yield. *Journal Plant Biology* 5: 51-62.
- Michel BE, Kaufmann MR (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Annual Review Plant Science* 7: 405-415.
- Morita S, Nakatani S, Koshiha T, Masumura T, Ogihara Y, Tanaka K (2011). Differential expressions of two cytosolic ascorbate peroxidase and two superoxide dismutase genes in response to abiotic stress in rice. *Rice Science* 18: 157-166.
- Muhammad S, Zainab M, Fatima A, Atifa M. (2013). Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)? *Scientia Horticulturae* 164: 507-511.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45-e45.
- Porra RJ (2005). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. In *Discoveries in Photosynthesis* (pp. 633-640). Springer Netherlands.
- Rerksiri W, Zhang X, Xiong H, Chen X (2013). Expression and promoter analysis of six heat stress-inducible genes in rice. *The Scientific World Journal* 2013.
- Rezaei M, Nahvi M (2007). Effect of different irrigation management methods on water use efficiency and rice yield. *Agricultural Science* 1: 15-25.

- Sairam RK, Saxena DC (2000). Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal Agronomy and Crop Science* 184: 55-61.
- Sarangi S, Ghosh J, Bora A, Das S, Mandal AB (2011). Agrobacterium-mediated genetic transformation of indica rice varieties involving Am-SOD gene. *Indian Journal of Biotechnology* 10: 9-18.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221-227.
- Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang GL, Xu ZS, Xiong AS (2015). Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS One* 10: e0117569.
- Tohidi Nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2014). Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 38-50.
- Turkan I, Bor M, Ozdemir F, Koca H (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-231.
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2007). AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of 403 *CAT1* catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 58: 2969-2981
- Xue L; Anjum SA; Wang L; Saleem MF, Liu X; Ijaz MF; Billal MF (2011). Influence of straw mulch on yield, chlorophyll contents, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities of soybean under drought stress. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9: 699-704.
- Yang T, Luo B. (2002). Classification of drought injury and enhancement of rice drought tolerance in central and southern China. In: Saxena NP, O'Toole JC. (Eds.), *Field screening for drought tolerance in crop plants with emphasis on rice*. ICRISAT, The Rockefeller Foundation, New York, pp. 25-40.
- Yang T, Poovaiah BW (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of National academy of Science of US (PNAS)* 99: 4097-4102.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice*. IRRI, Manila. Philippines.
- Zhang LX, Lai JH, Liang ZS, Ashraf M (2014). Interactive Effects of Sudden and Gradual Drought Stress and Foliar Accumulation and Antioxidant Defence System in Two Maize Cultivars Differing in Drought Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 200: 425-433.
- Zinati Z, Alemzadeh A, Ebrahimie E, Niazi A (2015). Assessment of the expression pattern of a gene encoding plasma membrane pump under salt stress in the shoots of resistant and sensitive wheat cultivars and its wild relative, *Aegilops crassa*. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7: 133-147.

-applied Glyc

The effects of drought stress on morpho-physiological characters and expression of *OsCat A* in rice seedling

Panahabadi R.¹, Ahmadikhah A.^{*2}, Askari H.²

¹ Former M.Sc. student of Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

² Associate Professors, Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Abstract

Drought stress is one of the most important limiting factors of crop plants in Iran and worldwide. To assess the response of mutant line MT149 to drought stress in comparison to parental cultivar Neda, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design. Drought stress (-6 bar) was induced using poly ethylene glycol 6000 and leaf growth dynamics and chlorophyll *a* and *b* contents were evaluated in different time series (0, 12, 24 and 36 hours after stress treatment). Results showed that effects of genotype, time and stress were significant on all investigated characters. Also, mean`s comparisons showed that mutant line MT149 was superior over than itself parental counterpart. Furthermore, assessment of catalase gene isoform A (*OsCat A*) in different times after stress showed that parental cultivar Neda experienced a significant down-regulation of catalase A gene, while MT149 experienced a significant up-regulation of the gene in the same time. Based on the results of this research it can be concluded that one of evidences on a higher drought tolerance of MT149 is probably up-regulation of *OsCat A* to scavenge the ROS toxicities.

Keywords: Rice, Drought stress, Expression, Catalase.

* Corresponding Author: Ahmadikhah A.

Tel: 02129903244

Email: a_ahmadikhah@sbu.ac.ir