



تحقیقات غلات

دوره نهم / شماره سوم / پاییز ۱۳۹۸ (۲۲۰-۲۰۷)

 اثر سمیت آهن بر برخی صفات مرفولوژیک، بیان نسبی ژن *G6PDH* و فعالیت آنزیم
 پراکسیداز در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل برنج (*Oryza sativa* L.)

 محمد محسن‌زاده گلفزانی^{۱*}، مریم پسندیده ارجمند^۲، سیدحسن حسنی کومله^۳، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^۴،
 رسول واحدی^۵ و سحر رمضان‌زاده بیشه‌گاهی^۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱

چکیده

تحت شرایط سمیت آهن، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید برنج در زمین‌های کشاورزی، افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن و در نتیجه کاهش رشد و نمو گیاه است. در این پژوهش، اثر سمیت ناشی از آهن در سطوح صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن (Fe-EDTA) بر برخی صفات مرفولوژیک، بیان نسبی ژن فتوسنتزی *G6PDH* و فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو ژنوتیپ Pokkali (متحمل) و IR64 (حساس) برنج در مرحله چهاربرگی تحت شرایط هیدروپونیک با محلول غذایی یوشیدا بررسی شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو فاکتور ژنوتیپ و غلظت آهن (به‌ترتیب با دو و پنج سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که برهمکنش سمیت آهن و ژنوتیپ بر تمامی صفات مطالعه شده به‌جز وزن خشک ریشه، تاثیر معنی‌داری داشت. تجزیه خوشه‌ای با روش پیوستگی کامل (دورترین همسایه‌ها)، ده تیمار مورد مطالعه را در دو گروه مجزا قرار داد. تجزیه به‌عامل‌ها نیز نشان داد که ۶۶ درصد از تنوع کل صفات به‌وسیله دو عامل مستقل توجیه شد. اعمال تنش سبب کاهش بیان نسبی ژن *G6PDH* در هر دو ژنوتیپ شد، با این تفاوت که در ژنوتیپ Pokkali میزان بیان نسبی این ژن با اعمال سطوح کم تنش کاهش یافت، اما در ژنوتیپ IR64 کاهش بیان این ژن فقط در سطوح بالای تنش اتفاق افتاد. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن و بیش‌ترین میزان فعالیت آن به‌ترتیب در سطوح ۴۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد کاهش بیان ژن *G6PDH* در سطوح کم تنش و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل می‌تواند میزان پراکسیدهیدروژن ناشی از سمیت آهن را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: IR64, Pokkali, Real-Time-PCR

- ۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۵- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۶- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com

گیاه را کاهش می‌دهد. افزایش فعالیت پراکسیدازها به سم‌زدایی اکسیژن‌های فعال و پراکسید هیدروژن کمک می‌کند و از این‌رو تحمل تنش آهن را ممکن می‌سازد (Mehraban and Abdolzadeh, 2012). در مطالعه دیگری، بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پنج ژنوتیپ حساس و متحمل برنج نشان داد که افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با مقاومت ژنوتیپ به آهن مرتبط است (Bin et al., 1997).

گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز (G6PDHase, EC 1.1.1.49) محدود کننده سرعت و اولین آنزیم در مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات است که برای کنترل جریان کربن و تولید NADPH جهت رفع نیازهای سلولی در واکنش‌های بیوسنتز و حفظ حالت احیا سلولی ضروری است (Kletzien et al., 1994). نقش مهم G6PDH در تنش در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است (Liu et al., 2007; Wang et al., 2008; Li et al., 2011). در گیاهان عالی، تولید NADPH در کلروپلاست با احیا $NADP^+$ در نور همراه است که توسط جریان الکترونی فتوسنتز انجام می‌شود و یا در تاریکی در بافت‌های غیرفتوسنتزی به وسیله مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات صورت می‌گیرد. در طول دوره روشنائی، کلروپلاست دارای فعالیت فتوسنتزی فعال برای حفظ NADPH به‌عنوان یک متابولیت کلیدی است (Pessaraki, 2019). دوره تاریکی و همچنین در بافت غیرفتوسنتزی، تولید NADPH داخل پلاستیدها به‌طور مستقیم به مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات مرتبط است. در مرحله اول از طریق دو واکنش متوالی، گلوکز-۶-فسفات (Glc6P) به ربوبلوز-۵-فسفات (Rub5P) تبدیل می‌شود که با تولید خالص NADPH همراه است. مرحله دوم مسیر غیراکسیداتیو را در بر می‌گیرد و شامل تبادلات پنتوز-فسفات، هگزوز-فسفات، و تریوز-فسفات برای بازسازی Glc6P در چرخه و اتصال آن با گلیکولیز است (Anderson and Advani, 1970; Eicks et al., 2002; Kruger and von Schaewen, 2003). اکسیداسیون گلوکز ۶ فسفات توسط G6PDH سبب تبدیل گلوکز ۶ فسفات به ۶ فسفوجلوکونولاکتون و تولید یک NADPH می‌شود. لاکتون توسط یک لاکتوناژ خاص به ۶ فسفوجلوکونات هیدرولیز می‌شود که سپس توسط دهیدروژناژ خاص به نام ۶ فسفوجلوکونات دهیدروژناژ دچار اکسیداسیون و دکربوکسیلاسیون می‌شود و ربوبوز ۵ فسفات

برنج مهم‌ترین غله در جهان است که یک سوم منبع کربوهیدرات‌های بدن انسان را تامین می‌کند (Kibria et al., 2017). سمیت آهن یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید برنج در خاک‌های اسیدی است (Finatto et al., 2015). با این‌که آهن عنصری ضروری برای گیاهان محسوب می‌شود و نقش مهمی در فتوسنتز، انتقال الکترون و واکنش‌های اکسایشی دارد (Finatto et al., 2015)، اما افزایش بیش از حد آن می‌تواند سبب ایجاد سمیت در گیاهان شود (De Dorlodot et al., 2005). گیاهان پس از فرارگیری در شرایط تنش‌های محیطی می‌توانند سیگنال‌هایی را از طریق ریشه و بخش شاخساره هدایت کنند. پاسخ به این پیام‌ها می‌تواند در نهایت سبب سازگاری با عامل تنش‌زا شود. کاهش رشد شاخساره و ریشه و تغییر در نحوه توزیع مواد توسط آن، سبب تغییر پیام‌های فرستاده شده بین ریشه و شاخساره می‌شود (Lipiec et al., 2013).

پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند (Bowler et al., 1992). این گروه از آنزیم‌ها در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند (Kjalke et al., 1992). آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن در سلول می‌شود و بنابراین از تولید ROSها جلوگیری می‌کند و در نتیجه با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کم‌تر دچار آسیب خواهد شد. به‌عبارت دیگر، آنزیم پراکسیداز با تجزیه H_2O_2 به آب و O_2 می‌تواند آثار مخرب آن‌را خنثی کند (Bowler et al., 1992). فعالیت پراکسیداز را به آسانی می‌توان در تمام طول عمر گیاهان مختلف از مراحل اولیه جوانه‌زنی تا مرحله پیری از طریق کنترل طول‌شدن یاخته‌ای، مکانیسم‌های دفاعی و چندین عملکرد دیگر تشخیص داد. این آنزیم در بسیاری از فرایندهای سلولی از قبیل متابولیسم اکسین، تشکیل چوب، اتصالات عرضی در دیواره سلول گیاهی، پاسخ به تنش‌های محیطی و نظایر آن شرکت می‌کند (Yamasaki et al., 1997).

در آزمایشی الگوی الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز در برگ برنج بررسی و مشاهده شد که تنش آهن با افزایش پراکسید هیدروژن سبب کاهش پروتئین و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شود و در نتیجه رشد

و بررسی بیان نسبی ژن *G6PDH* و فعالیت آنزیم پراکسیداز انجام شد.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک

طول اندام هوایی و ریشه

طول ساقه از یقه تا انتهای ساقه و طول ریشه از یقه تا انتهای ریشه برای نمونه‌های تحت سمیت آهن و شاهد در سه تکرار با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و مقادیر آن بر اساس سانتی‌متر گزارش شد.

وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه

وزن تر اندام هوایی و ریشه برای هر کدام از نمونه‌های تحت سمیت آهن و شاهد در سه تکرار توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه، نمونه‌ها به‌طور جداگانه در ورقه‌های کاغذی بسته‌بندی و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس توزین شدند.

اختلاف وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه

پس از اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی بر حسب گرم، وزن آب موجود در نمونه‌ها (WW) با تفریق وزن خشک (DW) از وزن تر (FW) ریشه و اندام هوایی به‌طور جداگانه در سه تکرار با استفاده از رابطه (۱) محاسبه و یادداشت شد:

$$WW = FW - DW \quad (1)$$

محاسبه ضریب آلومتریکی

نسبت طول ریشه‌چه (RL) به طول اندام هوایی (SL) نمونه‌های تحت سمیت آهن و شاهد در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل به‌عنوان ضریب آلومتریکی (AC) از طریق رابطه (۲) محاسبه شد:

$$AC = \frac{RL}{SL} \quad (2)$$

اندازه‌گیری سطح برگ

سطح برگ نمونه‌های تحت سمیت آهن و شاهد با استفاده از دستگاه سطح برگ‌سنج (Leaf Area Meter, Delta T Device UK) در سه تکرار اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، بافر استخراج عصاره آنزیمی تهیه شد (Mohsenzadeh *et al.*, 2017). ابتدا ۰/۶۸ گرم نمک پتاسیم دی‌هیدروژن

و NADPH را تولید می‌کند (Nelson and Cox, 2000). اکسیداسیون Glc6P توسط Glc6PDHase یک نقطه کنترل استراتژیک است که آنزیم تحت تاثیر نسبت NADPH به NADP، pH، غلظت Mg^{2+} و سطوح Glc6P قرار می‌گیرد. با توجه به نقش فیزیولوژیک Glc6PDHase در کلروپلاست، این آنزیم فقط در مرحله تاریکی و زمانی فعال می‌شود که منبع NADPH به وسیله جریان الکترون فتوسنتزی متوقف می‌شود (Pessaraki, 2019).

با توجه به اهمیت بررسی مکانیسم‌های سم‌زدایی در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل برنج، این پژوهش انجام شد که هدف از آن، بررسی اثر سمیت آهن بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیک، بیان نسبی ژن فتوسنتزی *G6PDH* و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان پراکسیداز تحت شرایط تنش و بدون تنش آهن بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، شرایط رشدی و سمیت آهن

به‌منظور بررسی و مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کل، بذر دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 برنج به‌ترتیب به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس (Dufey *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2009) از موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه و با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر شسته شد. بذرهای جوانه‌زنی در پتری‌دیش مرطوب استریل در اتاقک کشت قرار گرفتند. پس از گذشت چهار روز، بذرهای جوانه‌زده به محیط کشت هیدروپونیک با محلول غذایی یوشیدا انتقال داده شدند (Yoshida *et al.*, 1976). در طول دوره رشد، دما و روشنایی اتاقک رشد به‌ترتیب ۲۳ درجه سلسیوس و ۵۵۰۰ لوکس بود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ (حساس و متحمل) و سطوح آهن (صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر Fe-EDTA) و جمعاً ده تیمار بود و اعمال تیمارها در مرحله چهاربرگی انجام شد (Mehraban *et al.*, 2008). تعویض محلول یوشیدا و تنظیم اسیدیته آن به‌صورت روزانه بین ۵/۵ تا ۶ با اسید سولفوریک (H_2SO_4) و پتاسیم هیدروکسید (KOH) انجام شد. پس از دو هفته تیماردهی با آهن، نمونه‌برداری از برگ‌های سالم گیاه برنج به‌طور هم‌زمان جهت اندازه‌گیری برخی صفات مورفولوژیک

بررسی بیان نسبی ژن *G6PDH*

به‌منظور مطالعه بیان نسبی ژن *G6PDH* برگ‌های سالم، جوان و کاملاً توسعه‌یافته از گیاهان برنج که به‌مدت دو هفته تحت تیمارهای مختلف آهن (۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر Fe-EDTA) قرار داشتند و نیز نمونه‌های شاهد که محیط رشد آن‌ها فاقد سمیت آهن بود، انتخاب شدند. نمونه‌های برگ‌گی از گیاهان جدا شدند و پس از قرار گرفتن در ورقه‌های آلومینیومی با ضخامت متوسط، در ازت مایع غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها به فریزر -۸۰ درجه سلسیوس منتقل و تا زمان استخراج در فریزر نگهداری شدند. به‌منظور استخراج RNA از کیت ستون‌دار دنازیست (S-1010) مطابق با دستورالعمل مربوطه استفاده شد. جهت حذف DNA باقیمانده، پس از اضافه کردن مقدار ۲ میکرولیتر بافر و آنزیم DNase به RNA استخراج شده، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در دستگاه PCR قرار داده شد. سپس مقدار ۲ میکرولیتر EDTA به آن اضافه شد و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه PCR قرار داده شد. سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت سنتز فرمنتاز (Fermntas LIFE SCIENCE-K1621) انجام شد. کنترل سنتز cDNA نیز با استفاده از ژن اکتین برای همه نمونه‌ها انجام شد. به‌منظور بررسی وجود آلودگی در cDNA سنتز شده از واکنش کنترل منفی که شامل همه مواد موردنیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌غیر از cDNA بود، استفاده شد. به‌منظور کنترل کیفیت و کمیت cDNA به‌ترتیب از الکتروفورز افقی (۲ درصد) با نشانگر اندازه bp ۱۵۰۰-۵۰ سیناژن (SL7021-PR901633) و نانودراپ استفاده شد. توالی ژن‌های *G6PDH* و اکتین از بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از برنامه Tcoffee و Primer3 طراحی شد (جدول ۱). در نهایت جهت اطمینان از صحت طراحی آغازگرهای اختصاصی، BLAST آغازگرها صورت گرفت.

تجزیه داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو عامل ژنوتیپ و سطوح تنش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل‌شده انجام شد. تجزیه داده‌ها شامل تجزیه واریانس، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به‌عامل‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS انجام شد. همچنین برای پیش‌بینی نقاط دیگر جهت بررسی فعالیت آنزیم،

فسفات به‌همراه ۲ گرم PVPP و Na-EDTA در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۸۷ گرم نمک پتاسیم مونو هیدروژن فسفات به‌همراه ۲ گرم PVPP و Na-EDTA در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در هر بار آزمایش، ۳۹ میلی‌لیتر از محلول اول با ۶۱ میلی‌لیتر از محلول دوم مخلوط و اسیدیته آن با استفاده از pH متر و با کمک پتاسیم هیدروکسید (KOH) و اسید فسفریک (H_3PO_4) در محدوده ۶/۸ تا ۷/۲ تنظیم شد. برگ‌های فریزشده در هاون چینی محتوای ازت مایع به خوبی ساییده شد. سپس ۰/۵ گرم از پودر برگ آسیاب شده به میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، با شیکر لوله (ورتکس) به‌خوبی مخلوط شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی محلول برداشته شد و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. مجدداً فاز رویی محلول به میکروتیوپ دیگری منتقل و در فریزر -۷۰ قرار داده شد. از این عصاره آنزیمی برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده شد. برای این منظور ابتدا بافر آب اکسیژنه به‌عنوان سوبسترای آنزیم با غلظت‌های مختلف از پراکسید هیدروژن شامل ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰، ۲۲۵، ۲۵۰ و ۲۷۵ میلی‌مولار در هر بار اندازه‌گیری تهیه و با کمک بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸ تا ۷/۲ به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. همچنین بافر گایکول ۴۵ میلی‌مولار نیز به‌عنوان سوبسترای دوم تهیه و توسط بافر فسفات به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom, 80-2115-20) در طول موج ۴۷۰ نانومتر برای مدت دو دقیقه انجام شد. بلانک با حجم ۹۰۰ میکرولیتر حاوی ۸۹۱ میکرولیتر از بافر اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و ۹ میکرولیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه‌ها، از ۸۹۱ میکرولیتر بافر آب اکسیژنه و ۹ میکرولیتر از عصاره آنزیمی استفاده و در نهایت، سرعت واکنش آنزیمی نیز به‌صورت تغییرات جذب طی زمان (OD/min) در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دو دقیقه ثبت شد (Mohsenzadeh, et al., 2017).

تجزیه خوشه‌ای

جهت تعیین میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین تیمارهای مورد مطالعه و گروه‌بندی آن‌ها از نظر کلیه صفات، تجزیه خوشه‌ای تیمارها با روش‌های مختلف شامل متوسط فاصله بین و درون گروه‌ها، نزدیک‌ترین و دورترین همسایه‌ها و روش حداقل واریانس "وارد" انجام شد و گروه‌بندی حاصل از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که روش پیوستگی کامل (دورترین همسایه‌ها) بهترین نتیجه را در گروه‌بندی تیمارهای مورد مطالعه ارائه داد، بنابراین تنها نتایج این روش گزارش شد (شکل ۱). بررسی گروه‌های حاصل نشان داد که گروه اول شامل تیمارهای مختلف Pokkali و گروه دوم شامل تیمارهای مختلف IR64 می‌باشد که نشان‌دهنده یکسان بودن پاسخ این ژنوتیپ‌ها به تیمارهای مختلف آهن است.

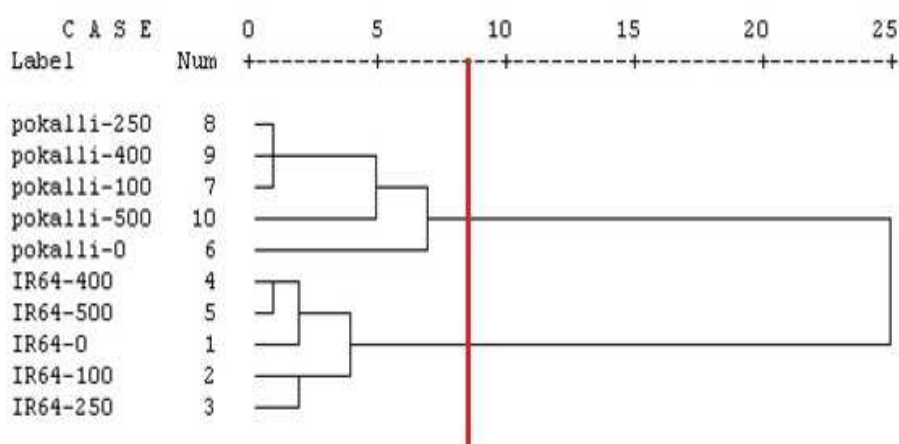
تجزیه رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) انجام و نمودار رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار Excell رسم شد (Mohsenzadeh *et al.*, 2017). برای مقایسه حداکثر فعالیت آنزیمی از خطای معیار میانگین (Standard Error) استفاده شد. به‌منظور بررسی بیان ژن و فعالیت آنزیم در تیمارهای مختلف و مقایسه آن‌ها نیز سطح معنی‌دار بیولوژیک برابر با دو برابر فعالیت آنزیمی و بیان ژن در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در تمامی صفات مورد مطالعه به‌جز وزن خشک ریشه، برهمکنش ژنوتیپ و غلظت آهن در سطح احتمال پنج درصد و برای وزن خشک ریشه، اثر ساده غلظت آهن و برهمکنش ژنوتیپ و غلظت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (نتایج نشان داده نشده است).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن‌های اکتین و G6PDH در پاسخ به سمیت آهن در برنج
Table 1. Primer sequences used for relative expression of actin and G6PDH genes in response to iron toxicity stress in rice

Gene	Sequence	Annealing temperature (°C)	Size (bp)
<i>Actin-F</i>	AGCAACTGGGATGACATGGA	58	176
<i>Actin-R</i>	GCRACATACATRGCGGSAC		
<i>G6PDH-F</i>	GTCGATGTGGTGAGATCTGC	60	188
<i>G6PDH-R</i>	TTCTCAACCAGCTCCTTCCC		



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه بر اساس معیار ضریب تطابق ساده و روش پیوستگی کامل (دورترین همسایه‌ها)
Figure 1. Cluster analysis of the studied rice genotypes using simple matching coefficient and complete linkage (farthest neighbors) method

تجزیه عاملی

بر اساس نتایج تجزیه عاملی، تعداد سه عامل اصلی و مستقل با مقادیر ویژه بیش از یک استخراج شدند که در مجموع توانستند ۸۶/۴۳ درصد از تنوع کل داده‌ها را توجیه کنند (جدول ۲). ضرایب عاملی صفات مورد مطالعه در هر یک از این عامل‌ها پس از چرخش و ریمکس همراه با واریانس مشترک (Communality) و مقادیر ریشه‌های مشخصه، درصد واریانس هر عامل و درصد واریانس تجمعی هر سه عامل در توجیه واریانس کل در جدول ۲ ارایه شده است. بالا بودن واریانس مشترک بیش‌تر صفات نشان‌دهنده انتخاب تعداد مناسب عامل‌ها می‌باشد، زیرا واریانس مشترک در حقیقت قسمتی از واریانس یک صفت است که به وسیله عامل‌های شناسایی شده توجیه می‌شود و بالا بودن آن، دقت بالای انتخاب عامل‌ها و برآورد واریانس صفت را نشان می‌دهد. در این مطالعه، ضرایب عاملی بیش‌تر از ۰/۵ به‌عنوان ضرایب معنی‌دار و موثر بر مدل در نظر گرفته شدند.

در عامل اول، طول اندام هوایی، طول ریشه و اختلاف وزن تر از وزن خشک اندام هوایی دارای ضرایب منفی و بالا و نسبت طول ریشه به اندام هوایی دارای ضریب مثبت بالایی بودند. بنابراین انتخاب این عامل که به‌عنوان طول گیاه (اندام هوایی و ریشه) در نظر گرفته شد، جهت بهبود یا اصلاح گیاه از نظر ارتفاع کارآیی لازم را خواهد داشت.

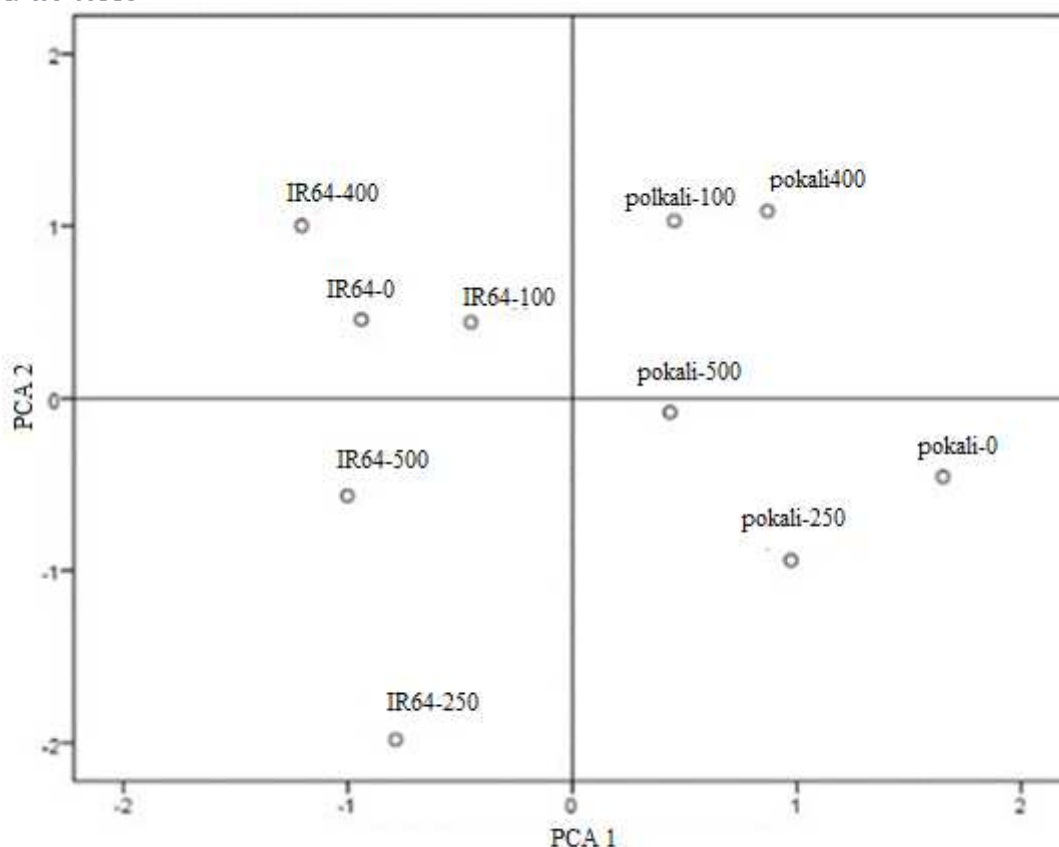
عامل دوم به‌عنوان ویژگی ریشه نام‌گذاری شد و در آن صفات وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و اختلاف وزن تر از وزن خشک ریشه به همراه سطح برگ دارای ضرایب مثبت و بالا بودند. ضرایب بالای این صفات در عامل دوم نشان می‌دهد که این صفات دارای همبستگی بالایی با هم هستند و انتخاب بر اساس این عامل می‌تواند در بهبود وزن ریشه و حتی سطح برگ مفید واقع شود. در عامل سوم نیز که به‌عنوان ویژگی وزن اندام هوایی نام‌گذاری شد، سه صفت وزن تر و خشک اندام هوایی و اختلاف وزن تر و وزن خشک اندام هوایی دارای ضرایب معنی‌دار و مثبت بودند و بنابراین امکان بهبود ویژگی‌های وزن اندام هوایی بر اساس این عامل وجود دارد.

تجزیه به عامل‌ها، علاوه بر تفسیر ضرایب همبستگی و گروه‌بندی صفات در قالب عامل‌های مشترک، به‌منظور گروه‌بندی تیمارها نیز استفاده شد. پراکنش دوگانه بر اساس عامل‌های اول و دوم در شکل ۲ ارایه شده است. از آن جایی که ویژگی‌های مورفولوژیک برنج از اهمیت زیادی برخوردار است، بنابراین تیمارهایی که دارای مقادیر بالای عامل‌های اول و دوم هستند، مطلوب می‌باشند. بنابراین ناحیه اول به‌عنوان ناحیه مطلوب و ناحیه سوم به‌عنوان ناحیه نامطلوب است. نتایج این آزمایش تحت شرایط تنش آهن نیز نشان داد که ژنوتیپ Pokkali عملکرد بهتری داشته و برتر از ژنوتیپ IR64 بوده است.

جدول ۲- نتایج تجزیه به عامل‌ها برای کلیه صفات مطالعه شده در این تحقیق

Table 2. The results of principal component analysis for all studied traits in in this study

Characteristics	Factors			Communality
	1	2	2	
Shoot length	-0.882	-0.205	0.226	0.872
Root length	-0.755	-0.074	0.375	0.716
Root/Shoot length ratio	0.976	-0.005	-0.035	0.953
Root fresh weight	0.028	0.970	0.071	0.948
Root dry weight	0.328	0.899	0.103	0.926
Difference of root fresh and dry weight	-0.216	0.921	-0.163	0.923
Shoot fresh weight	-0.417	-0.172	0.854	0.932
Shoot dry weight	0.256	0.131	0.919	0.928
Difference of shoot fresh and dry weight	-0.725	-0.035	0.619	0.909
Leaf area	0.481	0.543	-0.101	0.536
Eigen value	3.450	2.988	2.204	
Variance (%)	34.520	29.875	22.037	
Cumulative variance (%)	34.520	64.395	86.432	



شکل ۲- نمودار بای پلات تجزیه به عامل‌ها بر اساس مولفه‌های اول و دوم جهت گروه‌بندی تیمارهای مورد مطالعه. اعداد صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ در جلوی ژنوتیپ‌ها، غلظت‌های آهن را نشان می‌دهند.

Figure 2. Scatter plot of factor analysis based on first and second factors for grouping studied treatments. The numbers 0, 100, 250, 400 and 500 along with the genotypes indicate iron concentrations.

کاهش رشد برنج به عوامل مختلفی از جمله تنش ناشی از سمیت مواد غذایی بستگی دارد. مسمومیت آهن یکی از اصلی‌ترین اختلالات تغذیه‌ای است که عملکرد برنج را محدود می‌کند (Fageria *et al.*, 2008). به غیر از صفات طول ریشه، طول ریشه‌چه به ساقه‌چه و وزن تر ریشه، سایر صفات در تیمار شاهد معنی‌دار نبودند. ژنوتیپ Pokkali در صفات وزن تر و وزن خشک اندام هوایی در تمامی سطوح نسبت به شاهد خود اختلاف معنی‌داری نشان داد. همچنین این ژنوتیپ در صفات وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و اختلاف وزن تر از وزن خشک اندام هوایی در تمامی تیمارها به جز تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. اختلاف وزن تر از وزن خشک اندام هوایی در تمامی سطوح در ژنوتیپ Pokkali نسبت به ژنوتیپ دیگر کم‌تر بود، اما در صفت سطح برگ، به جز تیمار شاهد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن، در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن دارای سطح برگ بیش‌تری نسبت به ژنوتیپ IR64 بود. وزن خشک ریشه نیز در هر دو ژنوتیپ با اعمال سطوح تنش ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن کاهش یافت. با اعمال تنش، رشد ریشه و در نتیجه آن وزن خشک ریشه کاهش می‌یابد. گیاه در برابر تنش ترجیح می‌دهد بیش‌تر فتوسنتز خود را به تجمع ماده خشک در ریشه اختصاص دهد تا این ماده را در ساقه و اندام هوایی ذخیره کند، زیرا با این کار توانایی خود را برای جذب مقدار بیش‌تری از آب موجود در خاک حفظ خواهد کرد (Asseng *et al.*, 1998). از این‌رو، محققان گزارش کردند که نسبت بالاتر ریشه (اندام جذب‌کننده) به اندام هوایی (اندام مصرف‌کننده) توان گیاه را برای تحمل شرایط تنش بهبود می‌بخشد (Puangbut *et al.*, 2009; Ganjeali *et al.*, 2011). بنابراین، در کل IR64 به‌عنوان ژنوتیپ حساس و Pokkali به‌عنوان ژنوتیپ مقاوم در نظر گرفته شد (Wu *et al.*, 2014).

کاهش رشد برنج به عوامل مختلفی از جمله تنش ناشی از سمیت مواد غذایی بستگی دارد. مسمومیت آهن یکی از اصلی‌ترین اختلالات تغذیه‌ای است که عملکرد برنج را محدود می‌کند (Fageria *et al.*, 2008). به غیر از صفات طول ریشه، طول ریشه‌چه به ساقه‌چه و وزن تر ریشه، سایر صفات در تیمار شاهد معنی‌دار نبودند. ژنوتیپ Pokkali در صفات وزن تر و وزن خشک اندام هوایی در تمامی سطوح نسبت به شاهد خود اختلاف معنی‌داری نشان داد. همچنین این ژنوتیپ در صفات وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و اختلاف وزن تر از وزن خشک اندام هوایی در تمامی تیمارها به جز تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. اختلاف وزن تر از وزن خشک اندام هوایی در تمامی سطوح در ژنوتیپ Pokkali نسبت به ژنوتیپ دیگر کم‌تر بود، اما در صفت سطح برگ، به جز تیمار شاهد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن، در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن دارای سطح برگ بیش‌تری نسبت به ژنوتیپ IR64 بود. وزن خشک ریشه نیز در هر دو ژنوتیپ با اعمال سطوح تنش ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن کاهش یافت. با اعمال تنش، رشد ریشه و در نتیجه آن وزن خشک ریشه کاهش می‌یابد. گیاه در برابر تنش ترجیح می‌دهد بیش‌تر فتوسنتز خود را به تجمع ماده خشک در ریشه اختصاص دهد تا این ماده را در ساقه و اندام هوایی ذخیره کند، زیرا با این کار توانایی خود را برای جذب مقدار بیش‌تری از آب موجود در خاک حفظ خواهد کرد (Asseng *et al.*, 1998). از این‌رو، محققان گزارش کردند که نسبت بالاتر ریشه (اندام جذب‌کننده) به اندام هوایی (اندام مصرف‌کننده) توان گیاه را برای تحمل شرایط تنش بهبود می‌بخشد (Puangbut *et al.*, 2009; Ganjeali *et al.*, 2011). بنابراین، در کل IR64 به‌عنوان ژنوتیپ حساس و Pokkali به‌عنوان ژنوتیپ مقاوم در نظر گرفته شد (Wu *et al.*, 2014).

بیان نسبی ژن *G6PDH*

بیشترین میزان بیان نسبی ژن *G6PDH* در ژنوتیپ Pokkali در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن مشاهده شد. با افزایش غلظت تنش آهن از ۱۰۰ به ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان بیان نسبی ژن *G6PDH* در ژنوتیپ Pokkali کاهش یافت، اما اعمال سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ IR64 تفاوت معنی‌داری در بیان این ژن ایجاد نکرد و فقط با افزایش بیش‌تر تنش به ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن سبب کاهش بیان این ژن در این ژنوتیپ شد (شکل ۳). افزایش میزان بیان ژن‌های دیگر در ژنوتیپ Pokkali نسبت به IR64 قبلاً توسط پژوهش‌گران دیگری نیز گزارش شده است (Mohsenzadeh Golfazani et al., 2018; Vahedi et al., 2019).

با توجه به نقش فیزیولوژیک Glc6PDHase در کلروپلاست، این آنزیم فقط در تاریکی و زمانی که منبع NADPH به‌وسیله جریان الکترون فتوسنتزی متوقف شود، فعال می‌شود (Pessaraki, 2019). تحت شرایط تنش، به‌دلیل توقف واکنش کالوین و عدم مصرف ATP و NADPH، میزان آن در سلول افزایش می‌یابد و گیاه با اجرای مکانیزم‌های مختلف سعی بر کاهش NADPH دارد تا از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش NADPH جلوگیری کند و اگر میزان بیان این ژن زیاد باشد، گیاه با تنش اکسیداتیو رو به رو می‌شود. احتمالاً در ژنوتیپ متحمل برای کاهش خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو، میزان بیان نسبی این ژن در حدود سه برابر کاهش می‌یابد.

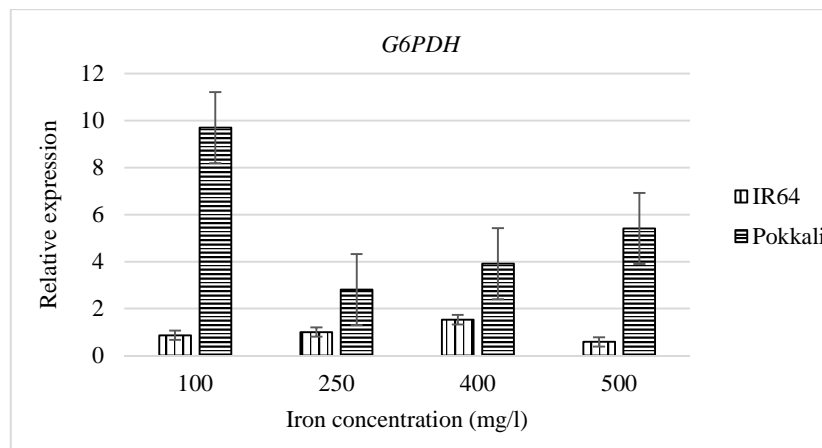
به‌طور کلی، اعمال تنش آهن سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن *G6PDH* در هر دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 شد. میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن زیاد بود، اما با افزایش غلظت تنش، میزان بیان نسبی این ژن کاهش یافت. به هر حال، میزان بیان نسبی ژن *G6PDH* در غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali به‌ترتیب در حدود ۱۱ و ۹ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 و در سطوح ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در حدود سه برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. این در حالی بود که

اعمال تنش سبب کاهش معنی‌دار بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ شد، با این تفاوت که در ژنوتیپ Pokkali با اعمال سطوح کم تنش میزان بیان نسبی این ژن کاهش یافت تا از خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو ممانعت به‌عمل آید، در حالی که در ژنوتیپ IR64 غلظت بالاتر تنش، بیان این ژن کاهش یافت. احتمالاً ژنوتیپ IR64 با کاهش بیان این ژن در سطوح بالای تنش آهن سعی در رفع تنش‌های ناشی از تنش اکسیداتیو دارد. با این تفاوت که کاهش بیان این ژن فقط در سطوح بالای تنش ایجاد می‌شود که این می‌تواند یکی از دلایل حساسیت این ژنوتیپ به سمیت ناشی از تنش آهن باشد (Ho et al., 2007).

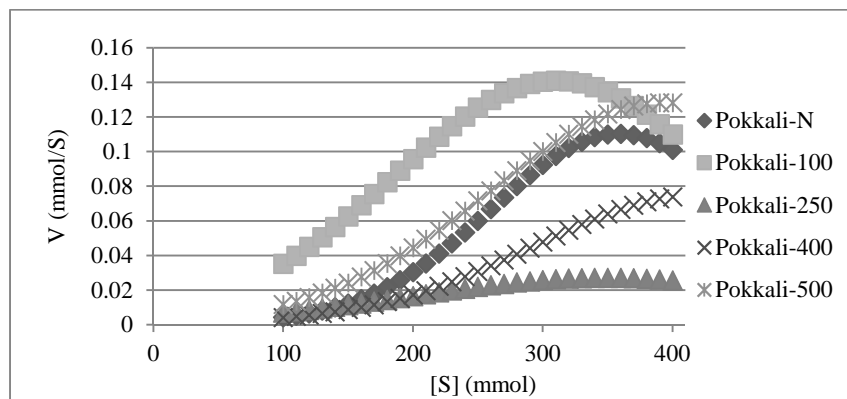
فعالیت آنزیم پراکسیداز

کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن مشاهده شد، اما بیش‌ترین میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ Pokkali در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن و در ژنوتیپ IR64 در سطح شاهد و سپس ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن صورت گرفت (شکل‌های ۴ و ۵). بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌های شاهد Pokkali و IR64 به‌ترتیب در غلظت ۳۶۰ و ۳۷۰ میلی‌مولار بود. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح تنش ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali کم‌تر از نمونه شاهد بود و به‌ترتیب در غلظت-های ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار پراکسیدهدیروژن به حالت اشباع رسید، اما سطوح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali به‌ترتیب در غلظت‌های ۳۱۰ و ۳۹۰ میلی‌مولار پراکسیدهدیروژن به بیش‌ترین حد خود رسید (شکل ۴).

ژنوتیپ IR64 که تحت تیمار ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بود، زودتر از نمونه‌های شاهد به نقطه اشباع آنزیمی رسید به طوری که بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیمی آن‌ها به ترتیب در ۳۳۰، ۴۰۰ و ۳۶۰ میلی‌مولار پراکسیدهدیروژن بود. این در حالی است که تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن ژنوتیپ IR64 در ۳۵۰ میلی‌مولار پراکسیدهدیروژن به حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز رسید (شکل ۵).

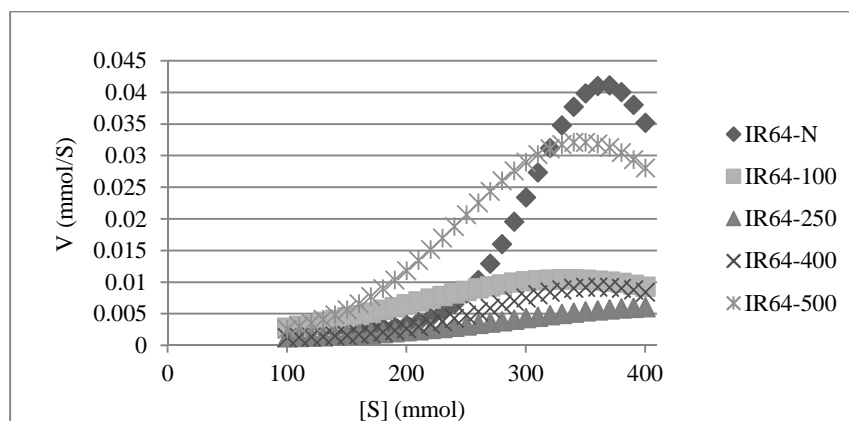


شکل ۳- الگوی بیان ژن *G6PDH* با روش Real time PCR تحت تنش سمیت آهن در گیاهچه‌های IR64 و Pokkali
 Figure 3. Expression pattern of *G6PDH* gene using real-time PCR under iron toxicity stress in IR64 and Pokkali seedlings



شکل ۴- سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ Pokkali در غلظت‌های مختلف پراکسیدهیدروژن و سطوح مختلف آهن. اعداد صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ در جلوی ژنوتیپ‌ها، غلظت‌های آهن را نشان می‌دهند.

Figure 4. Reaction rate of the peroxidase (POD) enzyme in Pokkali genotype at different H_2O_2 and iron concentrations. The numbers 0, 100, 250, 400 and 500 along with the genotypes indicate iron concentrations.



شکل ۵- سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ IR64 در غلظت‌های مختلف پراکسیدهیدروژن و سطوح مختلف آهن. اعداد صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ در جلوی ژنوتیپ‌ها، غلظت‌های آهن را نشان می‌دهند.

Figure 5. Reaction rate of the peroxidase (POD) enzyme in IR64 genotypes at different H_2O_2 and iron concentrations. The numbers 0, 100, 250, 400 and 500 along with the genotypes indicate iron concentrations.

این ژنوتیپ زودتر به حالت اشباع آنزیمی رسیدند (شکل ۵). بنابراین میزان فعالیت آنزیمی با وجود تیمارهای آهن در این سطوح کم تر از شاهد بود. احتمالاً تحت تیمار آهن، ژنوتیپ IR64 نسبت به ژنوتیپ Pokkali پاسخ کندتری در برابر سمیت آهن برای تولید آنزیم پراکسیداز دارد. اعمال تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی، نور بیش از حد و فلزات سنگین نیز سبب افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی شدند (Caverzan *et al.*, 2012).

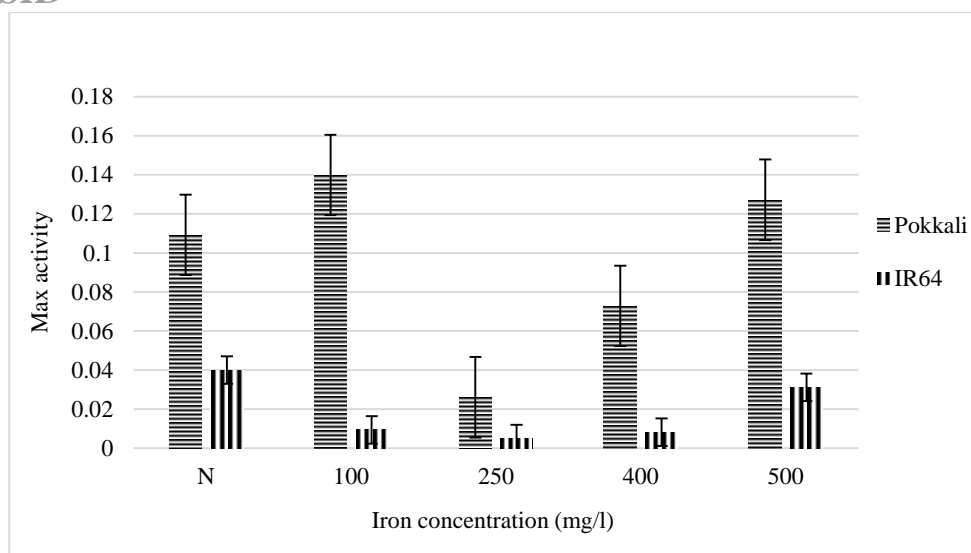
فعالیت آنزیمی در ژنوتیپ IR64 در بین سطوح مختلف تیمار با آهن، فقط در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن نسبت به شاهد افزایش یافت و حداکثر فعالیت آنزیم در غلظت ۳۵۰ میلی‌مولار H_2O_2 مشاهده شد. این در حالی بود که حداکثر فعالیت آنزیمی در تیمار شاهد در غلظت ۳۷۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۵). نتایج تحقیقات فانگ و کائو (Fang and Kao, 2000) نشان داد که سمیت ناشی از آهن سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ برنج می‌شود. در آزمایش دیگری، اعمال تنش شدید آهن به مدت ۷۲ ساعت در برنج سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد (Majerus *et al.*, 2007). احتمالاً یکی از دلایل تحمل ژنوتیپ Pokkali نسبت به سمیت آهن، افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح بیش تر سمیت آهن است. در آزمایشی با اعمال تنش آهن در برنج، فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ متحمل (IR97) حدوداً دو برابر بیش تر از ژنوتیپ حساس (IR64) گزارش شد (Bode *et al.*, 1995). در واقع، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز سبب کاهش اثر مخرب پراکسید هیدروژن تحت شرایط سمیت آهن می‌شود (Mehraban *et al.*, 2008).

با افزایش غلظت تنش تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ IR64 افزایش یافت و احتمالاً به دلیل حساسیت این ژنوتیپ به سمیت آهن، با افزایش آن فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش یافت، اما ژنوتیپ Pokkali در سطوح کم تر تنش آهن دارای فعالیت آنزیمی کم تر نسبت به شاهد بود. به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت آهن، فعالیت آنزیم پراکسیداز در این ژنوتیپ برای جاروب کردن H_2O_2 ناشی از سمیت آهن افزایش یافته است (Saikia and Baruah, 2013).

مقایسه بیش ترین میزان فعالیت آنزیمی در تیمارهای ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن با شاهد در ژنوتیپ IR64 نشان داد که کاربرد آهن سرعت فعالیت آنزیمی را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. همچنین مقایسه سطوح تیمار ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن با شاهد در ژنوتیپ Pokkali نشان داد که میزان سرعت فعالیت آنزیمی نسبت به شاهد کاهش یافته است، اما میزان سرعت فعالیت آنزیمی نمونه‌هایی که تحت تیمار ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن قرار گرفتند، نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۶).

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلیه سطوح آهن در ژنوتیپ Pokkali بیش تر از ژنوتیپ IR64 بود، به طوری که بیش ترین میزان فعالیت آنزیمی در ژنوتیپ IR64 در شاهد و تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن به ترتیب ۳۷۰ و ۳۵۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن بود و پس از آن کاهش یافت، در صورتی که فعالیت آنزیمی در ژنوتیپ Pokkali تحت تیمار ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن، در غلظت ۳۱۰ و ۳۵۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به اشباع رسید. در تیمار ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن، ژنوتیپ Pokkali نسبت به ژنوتیپ IR64 در غلظت بیش تری از پراکسید هیدروژن دارای حداکثر فعالیت بود. نقطه اشباع آنزیمی در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64 در سطوح مختلف آهن، متفاوت بود، به طوری که در سطوح ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali کم تر از ژنوتیپ IR64 بود (شکل‌های ۴ و ۵). ژنوتیپ Pokkali که تحت تیمار با سطوح ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن قرار داشت در مقایسه با شاهد، با غلظت کم تری از پراکسید هیدروژن به نقطه اشباع آنزیمی رسید (شکل ۴). احتمالاً میزان فعالیت آنزیمی در این سطوح کم تر از نمونه‌های شاهد بوده است. اما نمونه‌هایی از این ژنوتیپ که تحت تیمار ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن قرار گرفتند، نسبت به تیمار شاهد در غلظت بالاتری از پراکسید هیدروژن به حالت اشباع رسیدند. احتمالاً با افزایش غلظت آهن میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بیش تر شد تا تولید H_2O_2 ناشی از سمیت آهن را کاهش دهد (Sadeghipour *et al.*, 2008).

در ژنوتیپ IR64 وضعیت متفاوت بود و سطوح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن نسبت به نمونه‌های شاهد



شکل ۵- فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های مختلف آهن (میلی‌گرم بر لیتر) در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
Figure 5. Activity of peroxidase enzyme at different iron concentrations (mg/l) in Pokkali and IR64 genotypes

ژنوتیپ IR64 نسبت به ژنوتیپ Pokkali پاسخ کندتری در برابر سمیت آهن برای تولید آنزیم پراکسیداز دارد. همچنین، نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال تنش سبب کاهش بیان نسبی ژن *G6PDH* در هر دو ژنوتیپ شد، با این تفاوت که در ژنوتیپ Pokkali با اعمال سطوح کم تنش، میزان بیان نسبی این ژن کاهش یافت، در حالی که در ژنوتیپ IR64 کاهش بیان این ژن فقط در سطوح بالای تنش مشاهده شد. کاهش بیان نسبی این ژن در سطوح کم‌تر تنش احتمالاً می‌تواند نشان‌دهنده مکانیزم سم‌زدایی با کمک کاهش NADPH باشد تا از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش NADPH جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که اعمال تنش آهن در سطوح مختلف سبب تغییرات مورفولوژیک در هر دو ژنوتیپ شد، اما این تغییرات در ژنوتیپ حساس و متحمل متفاوت بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز و بیان نسبی ژن *G6PDH* نیز تحت شرایط تنش در ژنوتیپ‌های مورد بررسی متفاوت بود. همان‌طور که در این پژوهش مشاهده شد، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ Pokkali با افزایش غلظت آهن بیش‌تر شد تا احتمالاً از میزان H_2O_2 تولیدی ناشی از سمیت آهن بکاهد. در مقابل، میزان فعالیت آنزیمی در ژنوتیپ IR64 تحت تیمارهای مختلف آهن کم‌تر از تیمار شاهد بود. احتمالاً تحت تیمار آهن،

References

- Anderson, L. E. and Advani, V. R. 1970. Chloroplast and cytoplasmic enzymes: Three distinct isoenzymes associated with the reductive pentose phosphate cycle. *Plant Physiology* 45 (5): 583-585.
- Asseng, S., Ritchie, J. T., Smucker, A. J. M. and Robertson, M. J. 1998. Root growth and water uptake during water deficit and recovering in wheat. *Plant and Soil* 201 (2): 265-273.
- Bin, H., Jingming, Z., Yunrong, W., Ancheng, L. and Ping, W. 1997. Effect of POD on tolerance to ferrous iron toxicity in rice. *Journal of Zhejiang Agricultural University* 23 (5): 557-560.
- Bode, K., Döring, O., Lüthje, S., Neue, H. U. and Böttger, M. 1995. The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Protoplasma* 184 (1-4): 249-255.
- Bowler, C., Montagu, M. V. and Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 43 (1): 83-116.
- Briat, J. F., Fobis-Loisy, I., Grignon, N., Lobréaux, S., Pascal, N., Savino, G., Thoiron, S., von Wiren, N. and van Wuytswinkel, O. 1995. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell* 84: 69-81. doi:10.1016/0248-4900(96)81320-7.

- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F. and Margis-Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Journal of Genetics and Molecular Biology* 35 (4): 1011-1019.
- De Dorlodot, S., Lutts, S. and Bertin, P. 2005. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *Journal of Plant Nutrition* 28 (1): 1-20.
- Dufey, I., Hakizimana, P., Draye, X., Lutts, S. and Bertin, P. 2009. QTL mapping for biomass and physiological parameters linked to resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. *Euphytica* 167 (2): 143-160.
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.-I. and Fischer, K. 2002. The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiology* 128 (2): 512-522.
- Fageria, N. K., Santos, A. B., Barbosa Filho, M. P. and Guimarães, C. M. 2008. Iron toxicity in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition* 31 (9): 1676-1697.
- Fang, W. C. and Kao, C. H. 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Journal of Plant Science* 158 (1-2): 71-76.
- Finatto, T., de Oliveira, A. C., Chaparro, C., Da Maia, L. C., Farias, D. R., Woyann, L. G., Mistura, C. C., Soares-Bresolin, A. P., Llauro, C., Panaud, O. and Picault, N. 2015. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. *Rice* 8: 13. doi: 10.1186/s12284-015-0045-6.
- Ganjeali, A., Porsa, H. and Bagheri, A. 2011. Response of yield and morphophysiological characteristics of earliness chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Pulses Research* 2 (1): 65-80. (In Persian with English Abstract).
- Heidarvand, L., Amiri, R. M., Naghavi, M. R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B. and Alizadeh, K. 2011. Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58 (1): 157-163.
- Ho, H. Y., Cheng, M. L. and Chiu, D. T. 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: From oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report* 12 (3): 109-118.
- Kibria, M. G., Hossain, M., Murata, Y. and Hoque, M. A. 2017. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science* 24 (3): 155-162.
- Kjalke, M., Andersen, M. B., Schneider, P., Christensen, B., Schüle, M. and Welinder, K. G. 1992. Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1120 (3): 248-256.
- Kletzien, R., Harris, P. and Foellmi, L. 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: A "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *The FASEB Journal* 8 (2): 174-181.
- Kruger, N. J. and von Schaewen, A. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology* 6 (3): 236-246.
- Kukreja, S., Nandwal, A. S., Kumar, N., Sharma, S. K., Unvi, V. and Sharma, P. K. 2005. Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum* 49 (2): 305-308.
- Li, J., Chen, G., Wang, X., Zhang, Y., Jia, H. and Bi, Y. 2011. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-dependent hydrogen peroxide production is involved in the regulation of plasma membrane H⁺-ATPase and Na⁺/H⁺ antiporter protein in salt-stressed callus from *Carex moorcroftii*. *Physiologia Plantarum* 141 (3): 239-250.
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A. and Kondracka, K. 2013. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review. *Journal of International Agrophysics* 27 (4): 463-477.
- Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G. and Bi, Y. 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant and Cell Physiology* 48 (3): 511-522.
- Majerus, V., Bertin, P., Swenden, V., Fortemps, A., Lobréaux, S. and Lutts, S. 2007. Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: Ferritin regulation and antioxidative responses. *Journal of Biologia Plantarum* 51 (2): 303-312.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press, London.
- Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 565-572.

- Mehraban, P. and Abdolzadeh, A. 2012.** Effects of iron excess on the antioxidant activity and patterns of protein electrophoresis in *Oryza sativa* var. Shafagh. **Journal of Plant Production** 19 (1): 85-106.
- Mehraban, P., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H. R. 2008.** Iron toxicity in rice (*Oryza sativa*), under different potassium nutrition. **Asian Journal of Plant Sciences** 7 (3): 251-259.
- Mohsenzadeh Golfazane, M., Samizadeh Lahiji, H. and Hassani Kumleh, H. 2017.** Investigation of guaiacol peroxidase (GPx) activity in two canola genotype under non-stress and osmotic conditions. **Iranian Journal of Field Crop Science** 48 (1): 71-80. (In Persian with English Abstract).
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., Kordrostami, M., Samizadeh Lahiji, H., Hassani Kumle, H. and Rezadoost, M. H. 2018.** The effect of iron stress on the relative expression level of SOD, MDHR and GPX1 genes in tolerant and sensitive genotypes of rice. **Crop Biotechnology** 8 (24): 1-13. (In Persian with English Abstract).
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2000.** Lehninger principles of biochemistry. Third Edition. W. H. Freeman Publications.
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Vatansever, R., Kurtoglu, K. Y., Koc, I., Öztürk, M. X. and Anjum, N. A. 2016.** Identification and comparative analysis of H₂O₂-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. **Frontiers in Plant Science** 7: 301.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T. and Reddy, M. K. 2017.** Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. **Frontiers in Plant Science** 8: 581. doi: 10.3389/fpls.2017.00581.
- Pessarakli, M. 2019.** Handbook of plant and crop stress. Fourth Edition. Boca Raton, FL, CRC Press, Tylor and Fransis Group.
- Puangbut, D., Jogloy, S., Vorasoot, N., Akkasaeng, C., Kesmla, T., Rachaputi, R. C. and Patanothai, A. 2009.** Association of root dry weight and transpiration efficiency of peanut genotypes under early season drought. **Agricultural Water Management** 96 (10): 1460-1466.
- Ribeiro, C. W., Korbes, A. P., Garighan, J. A., Jardim-Messeder, D., Carvalho, F. E., Sousa, R. H. and Margis-Pinheiro, M. 2017.** Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence. **Plant Science** 263: 55-65.
- Sadeghipour, H. R., Abdolzadeh, A. and Mehraban Joubani, P. 2008.** Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. **Asian Journal of Plant Sciences** 7 (3): 251- 259.
- Saikia, T. and Baruah, K. K. 2013.** Iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa*) and its ssociation with anti-oxidative enzyme activity. **Journal of Crop Science** 3 (3): 90-94.
- Vahedi, R., Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M. and Samizadeh Lahiji, H. 2019.** Investigation of relative expression of some genes related to iron-induced toxicity in two varieties of rice (*Oryza sativa*). **Crop Biotechnology** 9 (27): 15-28. (In Persian with English Abstract).
- Wang, X., Ma, Y., Huang, C. Wan, Q., Li, N. and Bi, Y. 2008.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. **Planta** 227 (3): 611-623.
- Wu, L. B., Shhadi, M. Y., Gregorio, G., Matthus, E., Becker, M. and Frei, M. 2014.** Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. **Rice** 7 (1): 8. doi: 10.1186/s12284-014-0008-3
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Ikehara, N. 1997.** Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. **Plant Physiology** 115 (4): 1405-1412.
- Yoshida, S., Fomo, D. A. and Cock, J. H. 1976.** Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.

The effect of iron toxicity on some of morphological traits, relative gene expression of *G6PDH* and peroxidase enzyme activity in resistant and susceptible genotypes of Rice (*Oryza sativa*)

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani^{1*}, Maryam Pasandideh Arjmand², Hassan Hassani Kumleh³, Habibollah Samizadeh Lahiji⁴, Rasool Vahedi⁵ and Sahar Ramezanzadeh Bishegahi⁶

Received: September 23, 2019

Accepted: December 3, 2019

Abstract

Under the iron toxicity conditions, one of the most important limiting factors of rice production in agricultural lands is the increase of active oxygen radicals and thus decrease of plant growth and development. In this study, the effect of iron induced toxicity at 0 (control), 100, 250, 400 and 500 mg/l (Fe-EDTA) levels were investigated on some morphological traits, relative expression of *G6PDH* photosynthetic gene and activity of peroxidase enzyme in two rice genotypes, Pokkali (tolerant) and IR64 (susceptible), at four-leaf growth stage under hydroponic conditions with Yoshida nutrient solution. The experiment was carried out as factorial with two factors, genotype and iron concentration (two and five levels, respectively), in a completely randomized design with three replications. The results showed that the interaction of iron toxicity and genotype had significant effect on all studied traits except root dry weight. Cluster analysis using farthest neighbor divided the ten studied treatments into two separate groups. Principal component analysis showed also that 66% of the total variation was explained by two principal components. Applying iron toxicity stress reduced the relative expression of *G6PDH* gene in both genotypes, except that the relative expression of this gene in the Pokkali genotype decreased with the application of low stress levels, but in the IR64 genotype, the decrease in expression of this gene observed only at high stress levels. The lowest activity of peroxidase enzyme was observed in both Pokkali and IR64 genotypes at 100 mg/l iron and the highest activity were observed at 400 and 250 mg/l, respectively. It seems that decreasing the expression of *G6PDH* gene at low stress levels and increasing the activity of peroxidase enzyme in the tolerant genotype can reduce the amount of hydrogen peroxide induced by iron toxicity.

Keywords: IR64, Pokkali, Real-Time-PCR

1. Assist. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Ph. D. Student, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assoc. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
5. M. Sc. Graduated, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
6. M. Sc. Graduated, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* Corresponding author: mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com