

## ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیان برخی از ژن‌های مسیر اکسیداتیو تحت شرایط تنش شوری در برنج (*Oryza sativa* L.)

مجتبی کردرستمی<sup>۱</sup>، بابک ربیعی<sup>۲\*</sup> و سید حسن حسنی کومله<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۹

### چکیده

در این مطالعه، بیان ژن‌های گلوکاتایون پراکسیداز (*OsGpx*) و پراکسی ردوکسین (*OsPrx*)، میزان  $H_2O_2$  و میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) در ارقام بومی (حسنی و عنبربو) و اصلاح شده (خزر و نعمت) برنج ایرانی در واکنش به شوری ۱۰۰ میلی‌مولار ارزیابی و با دو رقم شناخته شده و بین‌المللی متحمل (FL478) و حساس (IR29) به شوری به‌عنوان شاهد‌های آزمایش مقایسه شدند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در زمان‌های مختلف در ارقام مورد مطالعه متفاوت و تحت شرایط تنش شوری، فعالیت آن در ارقام حساس نسبت به ارقام متحمل بیش‌تر بود. علاوه بر آن، فعالیت این آنزیم در ارقام متحمل در ساعات ابتدایی تنش و در ارقام حساس در ساعات انتهایی تنش به حداکثر میزان خود رسید. مطالعه بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز نیز نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در ریشه ارقام متحمل در ۶ ساعت پس از اعمال تنش مشاهده شد و سپس در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش، میزان بیان این ژن به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. در مقابل، بیان این ژن در ارقام حساس در تمامی زمان‌های مورد مطالعه افزایش نشان داد، اگرچه بیشترین میزان بیان آن در ۶ و ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد. مطالعه ژن پراکسی ردوکسین نشان داد که میزان بیان این ژن در ارقام متحمل در ساعات اولیه پس از اعمال تنش هیچ تغییری نکرد، اما در ساعات پایانی اعمال تنش (۷۲ ساعت) بیان این ژن به نحو چشم‌گیری افزایش یافت. در مقابل، الگوی ثابتی برای بیان این ژن در ارقام حساس مشاهده نشد. نتایج نشان داد که در ارقام متحمل، رابطه مستقیمی بین کاهش میزان  $H_2O_2$  با افزایش بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت وجود داشت. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که کارکرد مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌تواند منجر به سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن شود و از این‌رو جهت درک هر چه بهتر عوامل سم‌زدای ROS بایستی مطالعه جامعی روی کل سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه انجام شود.

**واژه‌های کلیدی:** پراکسی ردوکسین، گایاکول پراکسیداز، گلوکاتین پراکسیداز،  $H_2O_2$

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

\* نویسنده مسئول: [rabiei@guilan.ac.ir](mailto:rabiei@guilan.ac.ir)

## مقدمه

برنج متعلق به خانواده Gramineae و جنس *Oryza* و شامل بیست گونه متفاوت است که در این میان تنها دو گونه *O. sativa* و *O. glaberrima* زراعی هستند و از بین آنها گونه *O. sativa* به دلیل تولید محصول بالاتر، بیشتر کشت می‌شود. برنج پس از گندم دومین غله مهم دنیا محسوب می‌شود.

محیط‌های طبیعی در بردارنده تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای گیاهان هستند. گیاهان دائماً در برابر تغییرات محیطی قرار دارند و چنانچه این تغییرات شدت و سرعت زیادی داشته باشند، آنها را به‌عنوان تنش تلقی می‌کنند (Ciarmiello et al., 2011). در گزارش سال ۲۰۰۷ فائو ذکر شده است که تنها ۳/۵ درصد از مناطق دنیا تحت تأثیر فشارهای محیطی قرار ندارند (FAO, 2007). کرامر و همکاران (Crammer et al., 2011) تنش را به‌عنوان عامل محیطی غیرمطلوب برای موجودات زنده و مقاومت را به‌عنوان توانایی ادامه حیات موجود زنده در این شرایط نامساعد تعریف نموده‌اند، هر چند که در گیاهان زراعی علاوه بر ادامه حیات، توانایی تولید بخش قابل برداشت یا محصول نهایی نیز حائز اهمیت است (Crammer et al., 2011).

شوری پس از خشکی مهم‌ترین و متداول‌ترین تنش‌های محیطی در سطح جهان و از جمله ایران است. بخش قابل توجهی از اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی دنیا تحت تنش شوری قرار دارند. در ایران معادل ۲۵ درصد از مساحت زمین‌های کشور دارای شوری است (Choukr, 1996). امروزه به علت استفاده بی‌رویه از منابع طبیعی و به‌کارگیری روش‌های نامناسب در تولید محصولات کشاورزی به ویژه در رابطه با آب آبیاری، بخش قابل توجهی از زمین‌های کشاورزی در مناطق خشک با پدیده شوری مواجه هستند (Puri and Williams, 1985). در ایران، شوری یک مسئله فراگیر و محدود کننده تولید پایدار کشاورزی است، به طوری که قسمت‌های زیادی از مناطق خشک و نیمه خشک کشور، به ویژه فلات مرکزی، دشت‌های ساحلی جنوب و دشت خوزستان، مبتلا به سطوح مختلف شوری هستند (Momeni, 2010). ایران به دلیل موقعیت جغرافیایی در محدوده‌ای از کره زمین واقع شده است که بیشتر مناطق آن خشک و نیمه خشک است. در کشور مناطقی وجود دارند که میزان تبخیر در آنها بیش از ۸ برابر میزان بارندگی است. از این‌رو استفاده

از آب‌های با کیفیت پایین همانند آب‌های شور جهت تولید محصولات زراعی در اکثر نقاط کشور دور از انتظار نیست (Kamali et al., 2011). در ایران به علت وجود مقادیر زیاد رسوبات نمکی در عمق کم خاک‌ها، شوری در خاک‌ها و آب‌های زیر زمینی به وفور وجود دارد و هم چنین شوری ثانویه نیز در ایران اتفاق افتاده و به کرات گزارش شده است (Van Weert et al., 2009). بر خلاف بزرگی و گستردگی مسئله شوری، تاکنون برنامه جامعی برای مهار آن در نظر گرفته نشده است (Momeni, 2010).

استان گیلان به‌عنوان یکی از قطب‌های مهم تولید برنج در ایران از مشکل آب‌های شور رنج می‌برد. رودخانه سفیدرود به‌عنوان مهم‌ترین منبع آبیاری مزارع استان گیلان، در اثر کاهش حجم مخزن سد سفیدرود، افزایش برداشت از سرشاخه‌ها، خشک‌سالی‌های پایایی و ورود پسماندهای مختلف به رودخانه، دچار روند افزایش شوری و کاهش دبی شده است. این مشکل می‌تواند گیاهان زراعی (از جمله برنج) را در مراحل مختلف رشد با مشکل جدید خشک شدن و نابودی مواجه سازد (Navvabian and Aghajani, 2012). شناسایی ارقام متحملی که با وجود مواجه شدن با تنش بتوانند به رشد خود ادامه داده و عملکرد قابل قبولی تولید کنند، از اهمیت زیادی برخوردار است. انتخاب و جدا کردن ژنوتیپ‌های متحمل به تنش می‌تواند به دو روش مستقیم (سنجش عملکرد) و غیر مستقیم (بر اساس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک که با تحمل به تنش همبستگی دارند) انجام شود.

پاسخ‌های پیچیده گیاهان به تنش‌های غیرزیستی با بیان ژن‌های متعدد و مسیرهای مولکولی و بیوشیمیایی گوناگونی همراه است. بسیاری از این ژن‌ها به صورت مشترک در تنش‌های مختلف بیان می‌شوند. به‌عنوان مثال، بسیاری از ژن‌های دخیل در تنش شوری در تنش خشکی و سرما هم بیان می‌شوند که بیانگر وجود مکانیزم‌های مشابه در پاسخ به این تنش‌ها است. از لحاظ تئوری، تنش شوری تولید ROS در گیاهان را افزایش می‌دهد. اول اینکه: گیاهان با کاهش هدایت روزنه‌ای برای جلوگیری از کاهش بیش از حد آب گیاه، به تنش شوری پاسخ می‌دهند. این کار به نوبه خود باعث کاهش غلظت CO<sub>2</sub> داخلی (Ci) و احیاء آهسته‌تر CO<sub>2</sub> توسط چرخه کالوین می‌شود. این پاسخ منجر به تخلیه NADP<sup>+</sup> اکسیدشده (که به‌عنوان یک پذیرنده نهایی الکترون در PSI عمل می‌کند) و افزایش نشت الکترون به O<sub>2</sub> و تشکیل O<sub>2</sub><sup>-</sup>

(2003). GPXs و Prxs آنزیم‌های جایگزین برای حذف  $H_2O_2$  هستند. شواهد اخیر نشان داده است که برخی از GPXها نیز ممکن است در القای اکسیداسیون و احیاء در شرایط تنش نقش داشته باشد (Miao *et al.*, 2006). در گیاهان Prxs به پنج زیرگروه طبقه‌بندی می‌شوند که یکی از آنها به اشتباه به نام GPXs طبقه‌بندی شده است. Prxs به طور عمده در اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست و میتوکندری مکان‌یابی شده‌اند، در حالی که هم‌تایان آنها را نیز می‌توان در سیتوزول یافت. Prxsها پراکسیدازهای مبتنی بر تیول هستند که قادر به مهار  $H_2O_2$  می‌باشند (Horling *et al.*, 2002). بنابراین، باززایی 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 احیاء در نظر گرفته شده است، بنابراین مشخص شده است که Prxs همراه با GPXs به‌عنوان حسگرهای اکسیداسیون و احیاء درون سلولی عمل می‌کنند و عمل انتقال اطلاعات میزان ROS سلولی را به شبکه اکسیداسیون و احیاء انجام می‌دهند (Foyer and Noctor, 2005). این آنزیم‌ها کنترل و آغاز سیگنال‌دهی سلولی موثر بر فتوسنتز، بیان ژن‌های هسته‌ای وابسته به کلروپلاست و میتوکندری و فعال‌سازی آنزیم‌های چرخه کالوین را بر عهده دارند (Dietz, 2008). تصور می‌شود که همه این موارد با شبکه‌های تنظیم‌کننده اکسیداسیون و احیاء ارتباط و تداخل داشته باشد.

با توجه به اهمیت تنش شوری و نقش آن در کاهش عملکرد دانه گیاهان، مهندسی مقاومت یا تحمل به شوری در گیاهان دارای مزایای بسیار مهم اقتصادی است. به این دلیل ضروری است مکانیزم‌های مولکولی موثر بر تحمل به شوری در گیاهان مورد بررسی و تحلیل قرار گیرند. استراتژی اصلی مهندسی ژنتیک برای تحمل به شوری، معرفی ژن‌هایی است که به طور مستقیم در این وقایع دخیل هستند. از این‌رو، معرفی ژن‌های عمده موثر در مقاومت به تنش شوری در مراحل مختلف رشد گیاه برنج و نیز شناسایی ارقام مقاوم به شوری در برنج‌های بومی می‌تواند گام موثری در افزایش عملکرد این گیاه مهم و استراتژیک باشد (Mittler *et al.*, 2004). هدف از این تحقیق، بررسی بیان چند ژن مهم دخیل در تنش شوری در ارقام برنج ایرانی و مطالعه رفتار آنها در مقایسه با ارقام شاهد متحمل و حساس به شوری بود.

می‌شود. علاوه بر این، سمیت  $Na^+/Cl^-$  ناشی از تنش شوری می‌تواند انتقال الکترون فتوسنتزی را مختل و نشت الکترونی به سمت  $O_2$  را تحریک کند (Slesak *et al.*, 2002). دوم اینکه: کاهش در غلظت  $CO_2$  داخلی، سرعت واکنش‌های چرخه کالوین را کاهش داده و تنفس نوری را به ویژه در گیاهان  $C_3$  القاء می‌کند. در نتیجه مقدار زیادی  $H_2O_2$  در پراکسی‌زوم تولید می‌شود. سوم اینکه: NADPH- اکسیداز متصل به غشاء و دی آمین اکسیداز آپوپلاستی طی تنش شوری فعال می‌شوند و بنابراین در ساخت ROS کمک می‌کنند (Hernandez *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001). چهارم اینکه: تنش شوری باعث افزایش میزان تنفس و در نتیجه نشت الکترون تنفسی به سمت  $O_2$  می‌شود (Fry *et al.*, 1986; Moser *et al.*, 1991; Jeanjean *et al.*, 1993).

آنزیم‌های عمده مهار کننده ROS عبارت‌اند از: سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) که  $O_2^-$  را به  $H_2O_2$  تبدیل می‌کند و پس از آن اقدام هماهنگ مجموعه‌ای از چهار آنزیم کاتالاز (CAT)، اسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و پروکسی ردوکسین‌ها (Prx) باعث احیاء  $H_2O_2$  می‌شود. تمام آنزیم‌های مهارکننده ROS که تا به حال شناسایی شده‌اند، توسط ژن‌های هسته‌ای به‌نحوی رمز می‌شوند که بتوانند به طرز کاملاً صحیحی در اجزای زیرسلولی مختلف انجام وظیفه کنند (Mittler *et al.*, 2004). در کنار آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از جمله اسید اسکوربیک (ویتامین C)، توکوفرول (ویتامین E) و گلوکاتایون (GSH)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز با فعالیت خود به حفظ سطح تعادل و حالت پایدار درون سلولی ROSها کمک می‌کنند که این امر منجر به رشد، نمو، چرخه سلولی، سیگنالینگ هورمون‌ها و پاسخ‌های مناسب به انواع عوامل تنش‌زای زیستی و غیر زیستی می‌شوند (Mittler *et al.*, 2004; Foyer and Noctor, 2005; Van Breusegem and Dat, 2006).

پراکسیدازها شامل گروهی از پراکسیدازهای غیر اهدا کننده خاص هستند که در آنها گایاکول شایع‌ترین اهدا کننده به حساب می‌آید و از این‌رو این دسته از پراکسیدازها به نام گایاکول پراکسیدازها شهرت یافته‌اند. PODs احیاء  $H_2O_2$  را با استفاده از گایاکول (به عنوان عامل کاهنده) انجام می‌دهند و سایر کارکردهای این گروه از آنزیم‌ها هنوز نامشخص می‌باشد (Mika and Luthje,

**مواد و روش‌ها**

به منظور تحلیل بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های کارکردی مرتبط با تحمل به شوری، سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز و میزان  $H_2O_2$  تولید شده در ارقام حساس و متحمل برنج، آزمایشی در محل گلخانه دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۳ به صورت فاکتوریل (با دو عامل ژنوتیپ و زمان) در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. مواد گیاهی آزمایش تعداد چهار رقم

برنج بومی و اصلاح شده ایرانی (یک رقم متحمل بومی، یک رقم حساس بومی، یک رقم متحمل اصلاح شده و یک رقم حساس اصلاح شده) بودند که به همراه دو رقم شاهد متحمل و حساس (به ترتیب FL478 و IR29) به روش گریگوریو و همکاران (Gregorio et al., 1997)، در مرحله گیاهچه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشخصات ارقام مورد مطالعه در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱- نام، منشأ و واکنش به شوری ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1. Name, origin and salinity reaction of the rice genotypes studied in this research

شماره Code	Genotype	ژنوتیپ	منشأ Origin	واکنش به شوری Reaction to salinity
G1	FL478	FL478	IR66946-3R-178-1-1	متحمل Tolereant
G2	Hassani	حسنى	بومی ایران Iranian landrace	متحمل Tolereant
G3	Anbarboo	عنبربو	بومی ایران Iranian landrace	حساس Suceptible
G4	Nemat	نعمت	آمل/سنگ طارم Amol3/Sangetarom	متحمل Tolereant
G5	Khazar	خزر	IR36/TNAU4756	حساس Suceptible
G6	IR29	IR29	IR833-6-2//IR1561-149-1//IR24*4/ON	حساس Suceptible

۱۰۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. نمونه‌گیری جهت بررسی بیان ژن‌ها در شش مرحله زمانی شامل ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری انجام شد. مقدار آب اکسیژنه با استفاده از روش جانا و چادوری (Jana and Choudhuri, 1981) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم بافت برگ‌گی در ۳ میلی لیتر بافر فسفات با  $pH = 6/8$  هموژن و عصاره حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در سانتیفریوژ (Biochrom Libras12) با نیروی ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه گذاشته شد. برای اندازه‌گیری میزان آب اکسیژنه، ۳ میلی‌لیتر از عصاره حاصل برداشته و روی آن یک میلی‌لیتر کلرید تیتانیوم ۰/۱ درصد در اسید سولفوریک ۲۰ درصد (v/v) اضافه شد. پس از آن، محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در داخل سانتیفریوژ با نیروی ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و سپس میزان جذب محلول زرد رنگ حاصله به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf 5804R) در طول موج ۴۱۰ نانومتر ثبت شد ( $0/28 \text{ m.M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  = ضریب خاموشی).

برای ضد عفونی کردن بذرها و جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی، تعداد مورد نیاز بذر ابتدا به طور کامل با آب مقطر شسته شده و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم قرار گرفتند. در پایان این مدت، بذرهای ضد عفونی شده سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو و به پتری منتقل شدند. پس از ضد عفونی، بذرهای هر ژنوتیپ به پتری‌های حاوی کاغذ صافی استریل منتقل و برای جوانه‌دار شدن در اتاقک کشت آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی با دمای ثابت ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. کشت در روز ششم داخل گلخانه با دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام گرفت و بذرهای جوانه‌دار در شرایط هیدروپونیک در محلول غذایی یوشیدا کشت شدند. در طول دوره، دمای محیط بین ۲۴ تا ۳۰ درجه سلسیوس ثابت ماند. بیست روز پس از کشت و در مرحله سه برگگی، گیاهچه‌ها با استفاده از نمک NaCl تحت تنش شوری

محلول شاهد به جای عصاره آنزیمی، ۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) استفاده شد.

هم‌زمان، RNA کل با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن (RNX- Plus Solution)، از ریشه‌های گیاهچه‌های مربوطه استخراج شد. قبل از ساخت cDNA ابتدا تیمار RNA با DNase (Fermentas) انجام گرفت. سپس برای ژن‌های کدکننده آنزیم‌های گلوکاتیون پراکسیداز (*OsGPX1*) و پراکسی ردوکسین (*OsPrx-2F*) موجود در میتوکندری توسط برنامه Perl Primer (Marshall, 2004) آغازگر طراحی (جدول ۲) و با استفاده از دستگاه Real-Time (BioRad- C1000) میزان بیان ژن‌های مورد نظر سنجیده شد. در این آزمایش، از محلول مادری (Maxima ) Real Time PCR (SYBR Green/ROX qPCR Master Mix) و ژن Ubiquitine به‌عنوان ژن مینا استفاده شد (جدول ۲).

نسبت میزان رونویسی RNA هدف به میزان رونویسی یک RNA مرجع داخلی، به‌عنوان میزان بیان ژن از رابطه ۱ ارزیابی شد. ارزش نرمال شده این نسبت نیز با استفاده از روش  $\Delta\Delta CT$  برای نمونه‌ها محاسبه شد (روابط ۲ و ۳):

$$\Delta\Delta CT = \Delta\Delta CT_{\text{treated}} - \Delta\Delta CT_{\text{untreated}} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{treated}} - \Delta CT_{\text{untreated}} \quad (2)$$

$$\Delta CT = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{reference gene}} \quad (3)$$

برای رسم نمودارهای مربوط به بیان ژن‌های مورد نظر از نرم‌افزار EXCEL و برای مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH = ۷ استفاده شد. برگ‌های برنج به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی پودر شدند. مقدار ۰/۵ گرم از پودر آسیاب شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و با افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، نخست ورتکس شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. با انتقال عصاره رویی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و عصاره رویی به میکروتیوب‌های با همان حجم منتقل شد و در نهایت در فریزر -۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز وابسته به گایاکول از روش چانس و ماهلی (Chance and Maehly, 1955) استفاده شد. در این روش از بافر  $H_2O_2$  با غلظت ثابت (۲۲۵ میلی مولار) و بافر گایاکول در غلظت‌های مختلف ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ میلی مولار استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، بافر  $H_2O_2$  به مقدار ۴۹۵ میکرولیتر و بافر گایاکول به همان مقدار در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) در کورت یک میلی لیتری مخلوط و پس از اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به این مخلوط، مقدار جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر طی دو دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. در

جدول ۲- توالی و شماره دسترسی آغازگرهای مورد استفاده در NCBI

Table 2. Primers sequence and accession number in NCBI

ژن Gene	توالی آغازگر Primer sequence	دمای ذوب TM (°C)	طول قطعه تکثیری Amplified segment length	شماره دسترسی در NCBI NCBI accession number
<i>Ubq-F</i>	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	54	157	XM_006644067.1
<i>Ubq-R</i>	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'			
<i>OsPrx-2F-F</i>	5'-GAAAGTGGTCATCTTCGGCC-3'	55.5	134	XM_006643970.1
<i>OsPrx-2F-R</i>	5'-CCATTTCAGGGCATAAAGGGTC-3'			
<i>OsGPX1-F</i>	5'-AGCAACCTGCACTTATGCACT-3'	52.4	189	AY100689.1
<i>OsGPX-R</i>	5'CAGCAAGGAAATTTATTGACATGA-3'			

متحمل شاهد FL478 بیشترین فعالیت این آنزیم در ۶ ساعت و کمترین مقدار فعالیت آن در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد (شکل ۱- A)، در حالی که در ژنوتیپ حساس شاهد IR29 این آنزیم در

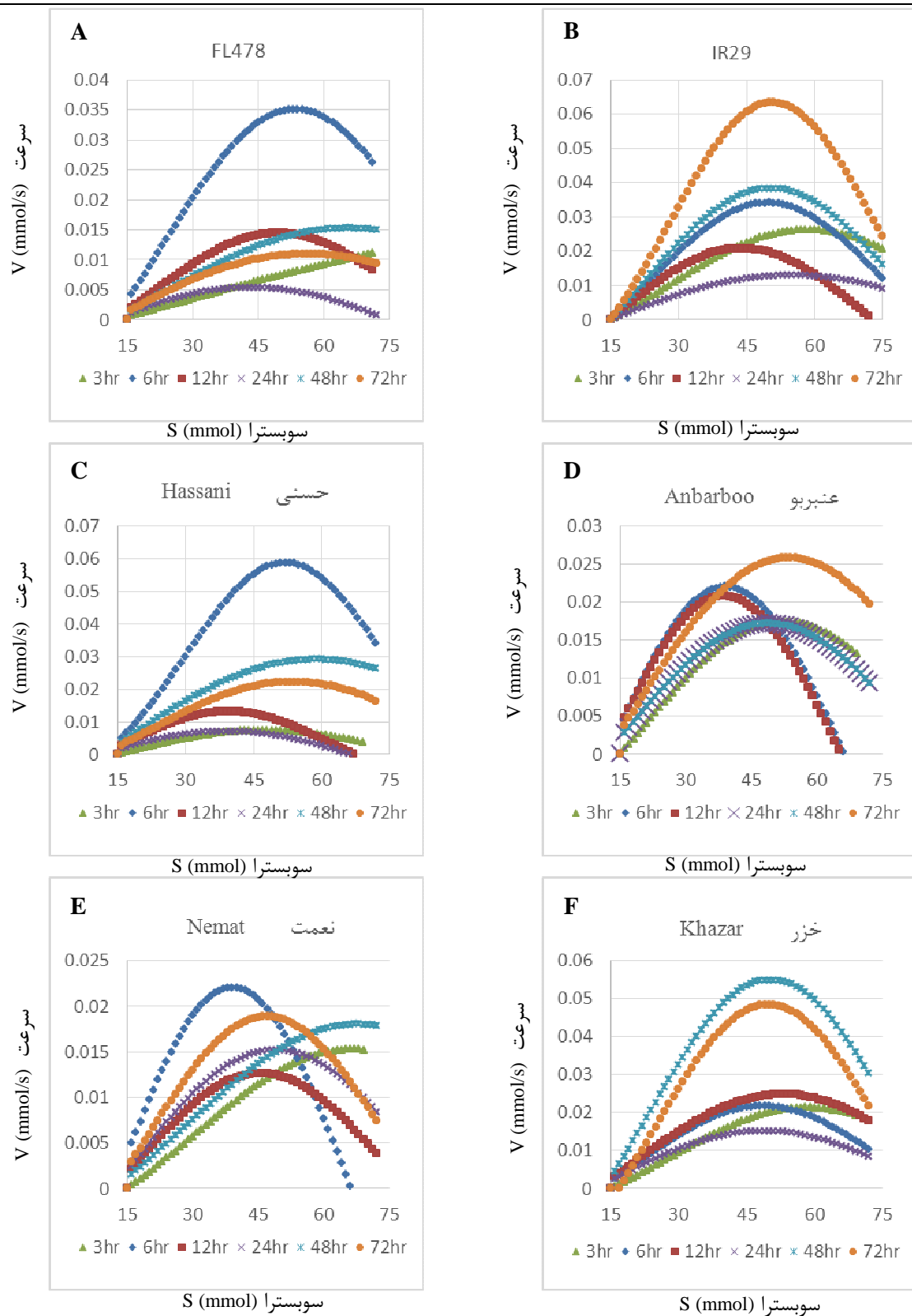
## نتایج

مطالعه فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در ارقام مورد مطالعه، متغیر و در زمان‌های مختلف متفاوت بود، به‌نحوی که در ژنوتیپ

ساعات اولیه تنش، فعالیت کمی داشت، اما با گذشت زمان فعالیت آن افزایش یافت و بیشترین فعالیت این آنزیم در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش شوری ثبت شد (شکل ۱-B). نکته جالب توجه اینکه با وجود اینکه فعالیت آنزیم POD در رقم IR29 در ساعات ابتدایی تنش اندک بود اما فعالیت آنزیم در هر دو رقم حساس و متحمل در ۶ ساعت پس از تنش تقریباً یکسان بود و در مجموع رقم IR29 فعالیت بیشتری نسبت به FL478 از خود نشان داد. به این ترتیب، مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو ژنوتیپ FL478 و IR29 در شرایط تنش شوری نشان داد که ژنوتیپ FL478 در ساعات اولیه تنش بیشترین فعالیت را داشت و به مرور زمان از فعالیت آن کاسته شد و کمترین فعالیت آن در ساعات انتهایی تنش مشاهده شد، در حالی که وضعیت در ژنوتیپ IR29 کاملاً برعکس بود، به طوری که فعالیت آنزیم در ساعات اولیه تنش خیلی چشم‌گیر نبود، ولی با گذشت زمان فعالیت آن افزایش یافت و بیشترین فعالیت آن در انتهای تنش در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش ثبت شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ارقام متحمل و حساس بومی (حسنی و عنبربو) از روند مشابهی با نوع بین‌المللی تبعیت می‌نمودند. مقایسه میزان فعالیت آنزیم در دو ژنوتیپ حسنی و عنبربو در شرایط تنش شوری نشان داد که ژنوتیپ حسنی با اینکه در ساعات اولیه تنش بیشترین فعالیت را داشت (۶ ساعت پس از تنش)، ولی در ساعات پایانی تنش نیز همچنان فعالیت آن افزایش یافت، به نحوی که در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش نیز افزایش فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل ۱-C). جالب توجه اینکه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم حسنی به مراتب بیشتر از رقم FL478 بود. عنبربو نیز به‌عنوان یک رقم حساس بومی، روند مشابهی را از رقم حساس بین‌المللی (IR29) در پیش گرفت. آنزیم پراکسیداز در این رقم با وجود اینکه مثل IR29 در ساعات پایانی تنش بیشترین فعالیت را داشت، اما در ساعات ۶ و ۱۲ ساعت نیز فعالیت مناسبی را از خود نشان داد (شکل ۱-D). از جهتی مقایسه فعالیت این آنزیم با نوع بین‌المللی نشان می‌دهد که هر دو رقم در ۱۲ ساعت پس از تنش، فعالیت یکسانی از خود نشان دادند. فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم متحمل نعمت نسبت به دو رقم متحمل دیگر تا حدودی متمایز بود. برای مثال فعالیت آنزیم در رقم FL478 تا ۶ ساعت پس از تنش افزایشی بوده و در ۶

ساعت به حداکثر مقدار خود رسیده است اما از ۱۲ ساعت به بعد روند صعودی و نزولی متناوبی را از خود به نمایش گذاشته است. بدین نحو که در ۱۲ و ۴۸ ساعت حالت صعودی و سرعت آن به ۰/۱۵ نزدیک شده اما در ۲۴ و ۷۲ ساعت از سرعت کاسته شده و به ۰/۰۱ رسیده است. اما در نعمت به گونه دیگری بوده است. در این رقم درست است که مثل FL478 بیشترین مقدار فعالیت در ۶ ساعت پس از تنش بوده است، اما با مقایسه ساعات آتی تنش بدین نتیجه می‌رسیم که فعالیت این آنزیم به مرور زمان افزایش یافته است و در ۷۲ ساعت پس از تنش به ۰/۰۲ نزدیک شده است. اما این رقم نسبت به حسنی نیز از روند متفاوتی تبعیت می‌نمود. در حسنی نیز (مشابه FL478) تا ۶ ساعت پس از تنش افزایشی بوده و در ۶ ساعت به حداکثر مقدار خود رسیده است اما از ۱۲ ساعت به بعد روند صعودی و نزولی متناوبی را از خود به نمایش گذاشته است، هرچند که میزان فعالیت آنزیم در حسنی در ساعات پایانی تنش به مراتب بیشتر از رقم FL478 می‌باشد. رقم خزر نیز حالت مشابهی داشت. بدین نحو که میزان فعالیت این آنزیم در رقم خزر از ۳ تا ۴۸ ساعت روند افزایشی داشته است و در ۴۸ ساعت به حداکثر مقدار خود رسیده است اما در ۷۲ ساعت پس از تنش از میزان فعالیت این آنزیم کاسته شده است. اما روند فعالیت آنزیم در IR29 متفاوت بود. در IR29 تا ۶ ساعت پس از تنش مقدار فعالیت آنزیم افزایش یافت اما در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تنش فعالیت آنزیم به نحو چشم‌گیری کاهش یافت. سپس مجدداً در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش فعالیت این آنزیم افزایش یافت و در ۷۲ ساعت پس از تنش به حداکثر مقدار خود رسید. عنبربو نیز حالت مشابهی با IR29 داشت. بدین نحو که تا ۶ ساعت پس از تنش مقدار فعالیت آنزیم افزایش یافت، اما در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تنش فعالیت آنزیم به نحو چشم‌گیری کاهش یافت. مجدداً در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش فعالیت این آنزیم افزایش یافت و در ۷۲ ساعت پس از تنش به حداکثر مقدار خود رسید (شکل ۱-F). این روند متفاوت در ارقام مختلف نشان می‌دهد که گیاهان از مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی متعددی در تحمل یا حساسیت به تنش شوری استفاده می‌کنند و اگرچه فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام حساس نسبت به متحمل بیشتر بود، اما گیاهان متحمل با به‌کارگیری سایر اجزای دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌توانند تحمل به شوری را در خود افزایش دهند.



شکل ۱- سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های مختلف سوبسترا در زمان‌های مختلف (A) ژنوتیپ FL478، (B) ژنوتیپ IR29، (C) ژنوتیپ حسنی، (D) ژنوتیپ عنبربو، (E) ژنوتیپ نعمت، (F) ژنوتیپ خزر

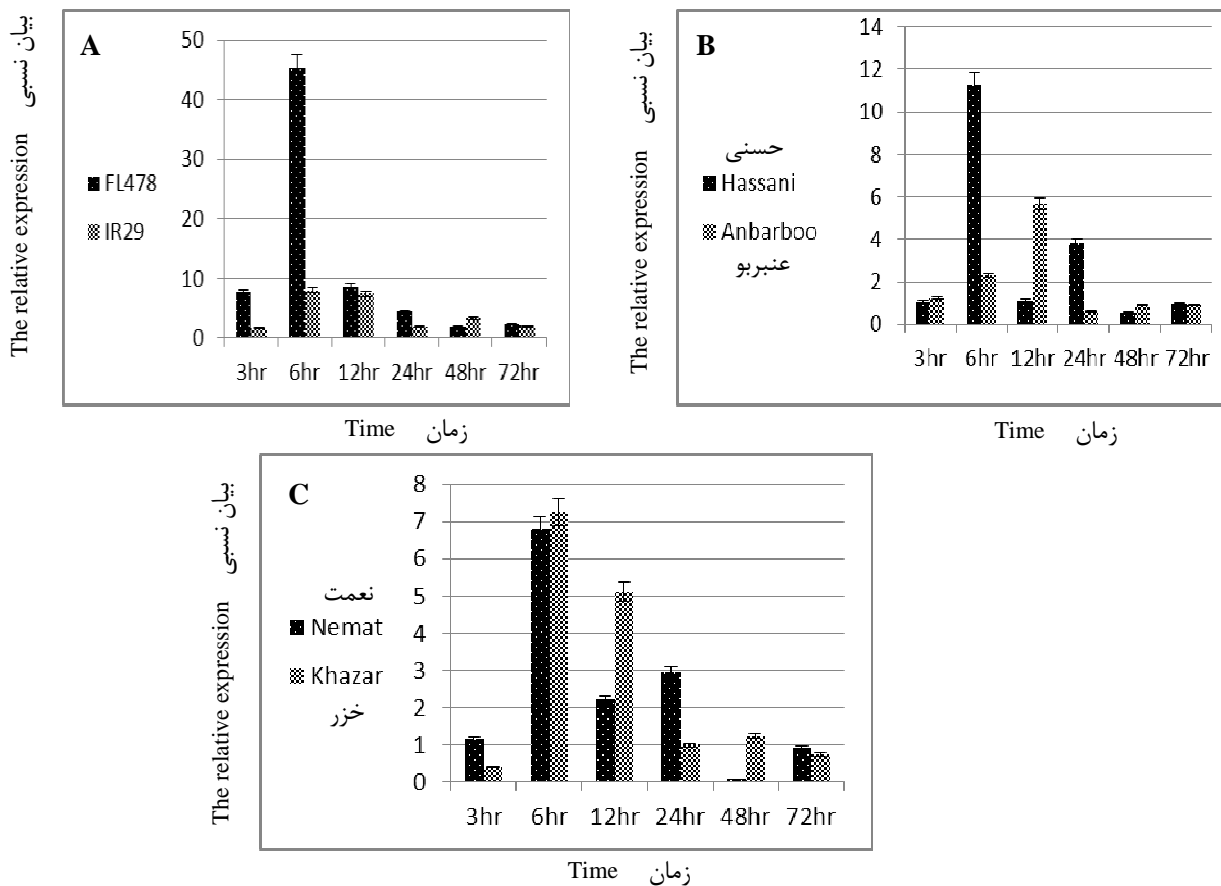
Figure 1. Diagram of peroxidase reaction rate at different times in different substrate concentrations: (A) FL478, (B) IR29, (C) Hassani, (D) Anbarboo, (E) Nemat, (F) Khazar

FL478 در ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد و سپس در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از

مطالعه بیان ژن گلوکاتین پراکسیداز (*OsGPXI*) نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در ریشه رقم

ارقام بومی و اصلاح شده ایرانی بسیار کمتر از ارقام شاهد بین‌المللی (به ترتیب ۲۰٪ و ۱۵٪) بود. مطالعه بیان این ژن در ارقام بومی حسنی و عنبربو نشان داد که این ارقام دارای الگوی مشابهی با ارقام شاهد بین‌المللی بودند، به طوری که بیشترین میزان بیان این ژن در ریشه رقم حسنی در ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد و پس از آن میزان بیان این ژن به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، هر چند که در ۲۴ ساعت پس از تنش نیز به نحو خفیفی بیان این ژن افزایش یافت. در مقابل، بیان این ژن در ژنوتیپ حساس عنبربو با افزایش زمان تنش ابتدا به تدریج افزایش و پس از آن کاهش پیدا کرد، به این ترتیب که با گذشت زمان تنش شوری از ۳ تا ۱۲ ساعت بیان ژن افزایش یافت و در ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش، میزان بیان ژن به بالاترین حد خود رسید و سپس مجدداً کاهش یافت (شکل ۲-ب).

تنش میزان بیان این ژن به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲-ا). بیان ژن *OsGPXI* در ژنوتیپ حساس IR29 نیز با افزایش زمان تنش ابتدا اندکی افزایش و سپس کاهش پیدا کرد، به این ترتیب که در زمان ۶ و ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش به بالاترین میزان خود رسید (هرچند که میزان بیان این ژن نسبت به رقم FL478 در همین زمان بسیار ناچیز بود) و پس از آن مجدداً کاهش یافت و در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش به حداقل مقدار خود رسید. مقایسه میزان بیان این ژن در دو رقم شاهد متحمل و حساس نشان داد که هر چند این ژن در هر دو رقم حساس و متحمل در ساعات اولیه تنش بیان شد، اما میزان بیان این ژن در رقم متحمل به مراتب بسیار بیشتر از رقم حساس و تفاوت آنها معنی‌دار بود. مقایسه میزان بیان نسبی ژن پراکسیداز در این دو رقم شاهد نسبت به ارقام ایرانی مورد مطالعه نشان داد که مقدار بیان آن در



شکل ۲- الگوی بیان ژن *OsGPXI* با روش Real time PCR تحت تنش شوری در گیاهچه‌های برنج. A. بیان ژن در ارقام FL478 و IR29. B. بیان ژن در ارقام حسنی و عنبربو، C. بیان ژن در ارقام نعمت و خزر

Figure 2. The pattern of *OsGPXI* expression using Real-time PCR under salt stress in rice seedlings. Gene expression in A. FL478 and IR29, B. Hassani and Anbarboo, C. Nemat and Khazar



داد که بیان این ژن در رقم نعمت در کل دوره اعمال تنش از روند کاملاً افزایشی برخوردار بود، به طوری که در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش، میزان بیان افزایش دو برابری نسبت به ساعات اولیه تنش از خود نشان داد و در انتها در ۷۲ ساعت پس از تنش به حداکثر مقدار خود رسید (شکل ۳-۲). بیان این ژن در ژنوتیپ حساس خزر نیز با افزایش زمان تنش به تدریج افزایش یافت، به این ترتیب که از ۳ تا ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش دچار تغییرات نوسانی بود، اما در ۲۴ و ۴۸ ساعت به حداکثر میزان خود رسید و مجدداً پس از گذشت ۷۲ ساعت بیان ژن کاهش چشم‌گیری داشت. نکته جالب توجه اینکه بیان نسبی این ژن در ارقام حساس بومی و اصلاح شده در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش به نحو چشم‌گیری بیشتر از ارقام متحمل بود، اما این تفاوت در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش برعکس و بیان ژن در ارقام متحمل بسیار بیشتر از ارقام حساس بود (شکل ۳-۲).

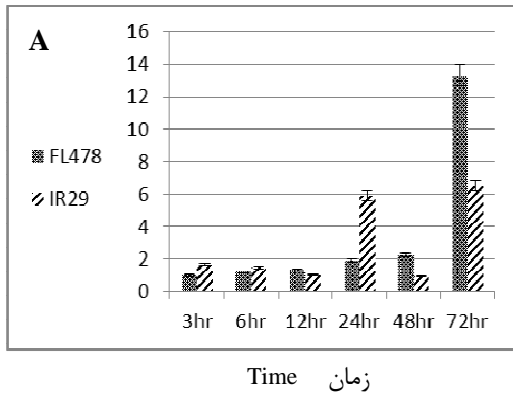
تغییرات مقدار  $H_2O_2$  در ارقام مورد مطالعه در شکل ۴ ارائه شده است. همان‌طور که به خوبی در این شکل نیز نشان داده شده است، مقدار  $H_2O_2$  در ارقام مختلف و در زمان‌های مختلف اعمال تنش شوری تقریباً متفاوت بود. به‌عنوان مثال در رقم FL478 میزان  $H_2O_2$  تا ۶ ساعت پس از اعمال تنش افزایش نشان داد و پس از آن به مرور زمان، مقدار  $H_2O_2$  کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت، در حالی که در دو رقم مقاوم بومی و اصلاح شده ایرانی وضعیت کمی متفاوت بود. به‌عنوان مثال در رقم حسنی میزان  $H_2O_2$  تا ۱۲ ساعت پس از تنش افزایش داشت و پس از آن به مرور زمان کاهش قابل ملاحظه‌ای یافت. در رقم مقاوم نعمت نیز چنین وضعیتی حاکم بود. در این رقم میزان  $H_2O_2$  تا ۱۲ ساعت پس از تنش افزایش داشت، اما این میزان در ۲۴ ساعت پس از تنش تغییری نداشت و پس از کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. در مقابل، رفتار ارقام حساس از نظر  $H_2O_2$  متغیر بود. بدین شکل که در رقم IR29 میزان  $H_2O_2$  تا ۴۸ ساعت پس از تنش افزایش و در ۷۲ ساعت پس از تنش به شکل خفیفی کاهش داشت. در رقم عنبربو نیز میزان  $H_2O_2$  تا ۲۴ ساعت پس از تنش افزایش داشت و از ۴۸ ساعت مقدار آن کاهش یافت. در بین ارقام حساس رقم خزر از هیچ روند خاصی تبعیت نکرد. در این رقم از ساعات ابتدایی تا ساعات انتهایی تنش مقدار  $H_2O_2$  افزایش یافت و هیچ کاهشی در مقدار آن مشاهده نشد.

بررسی بیان ژن گلوکاتین پراکسیداز (*OsGPXI*) در ارقام اصلاح شده نعمت و خزر نیز نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در ریشه هر دو رقم نعمت و خزر در ۶ ساعت پس از اعمال تنش شوری مشاهده شد و پس از آن با گذشت زمان میزان بیان به طور قابل ملاحظه‌ای در هر دو رقم کاهش یافت. نکته مهم در مورد میزان بیان این ژن در این دو رقم اصلاح شده متحمل و حساس این بود که بر خلاف ارقام شاهد و بومی متحمل و حساس، میزان بیان ژن در رقم حساس خزر در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش شوری بیشتر از رقم متحمل نعمت بود، به طوری که اختلاف بیان ژن در این دو رقم در زمان‌های ۱۲ و ۴۸ ساعت معنی‌دار بود، اما در ۶ ساعت پس از تنش تفاوت آنها معنی‌دار نبود (شکل ۲-۲).

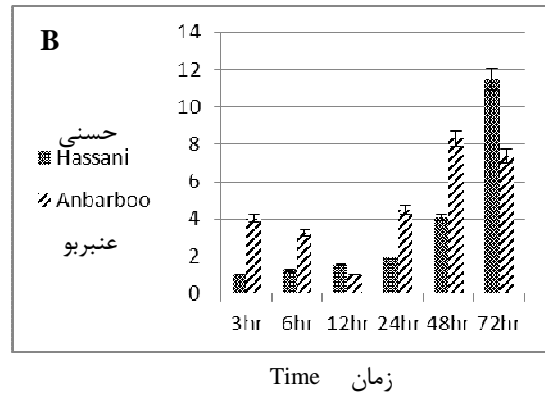
مطالعه ژن پراکسی ردوکسین (*OsPrx-2F*) نشان داد که میزان بیان این ژن در ریشه رقم FL478 در ساعات اولیه پس از اعمال تنش تغییری نکرد، اما در ساعات پایانی تنش (۷۲ ساعت) به نحو چشم‌گیری افزایش یافت (شکل ۳-۱). در ژنوتیپ حساس IR29 نیز میزان بیان این ژن در دو مقطع زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش افزایش داشت و در سایر زمان‌ها تغییری نکرد، اما میزان بیان نسبت به رقم متحمل FL478 به مراتب کمتر بود. بر اساس مشاهدات، هر چند این ژن در هر دو رقم حساس و مقاوم در ساعات انتهایی تنش بیان شد، اما میزان بیان در رقم مقاوم به مراتب بسیار بیشتر از رقم حساس بود. از طرف دیگر، بیان نسبی این ژن در این دو رقم شاهد به مراتب بیشتر از ارقام بومی و اصلاح شده مورد مطالعه بود (شکل ۳-۱). ارقام حسنی و عنبربو نیز الگوی مشابهی با ارقام شاهد بین‌المللی داشتند. بیان این ژن در رقم حسنی از روندی افزایشی تبعیت کرد. به‌نحوی که به مرور زمان به تدریج بیان این ژن افزایش یافت و در ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش به حداکثر مقدار خود رسید (شکل ۳-۲). در رقم حساس عنبربو نیز با افزایش زمان تنش به تدریج افزایش پیدا کرد و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش، میزان بیان ژن به بالاترین حد خود رسید، اما مجدداً در انتها این مقدار کاهش یافت (شکل ۳-۲).

بررسی بیان ژن پراکسی ردوکسین در ارقام نعمت و خزر نیز نشان داد که اگرچه بیان این ژن طی دوره اعمال تنش شوری در این دو رقم اصلاح شده ایرانی افزایش یافت، اما الگوی بیان ژن در آنها اندکی متفاوت از سایر ارقام مورد مطالعه بود. بررسی نتایج تحقیق حاضر نشان

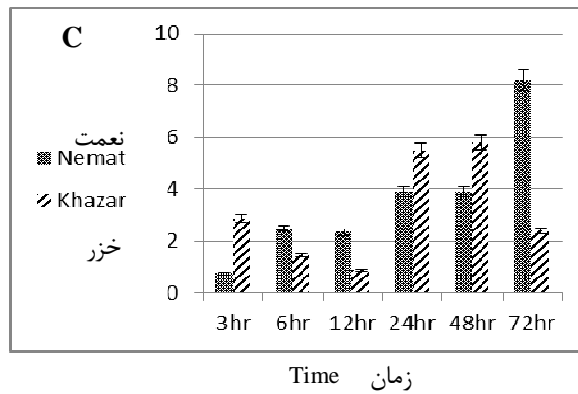
بیان نسبی  
The relative expression



بیان نسبی  
The relative expression

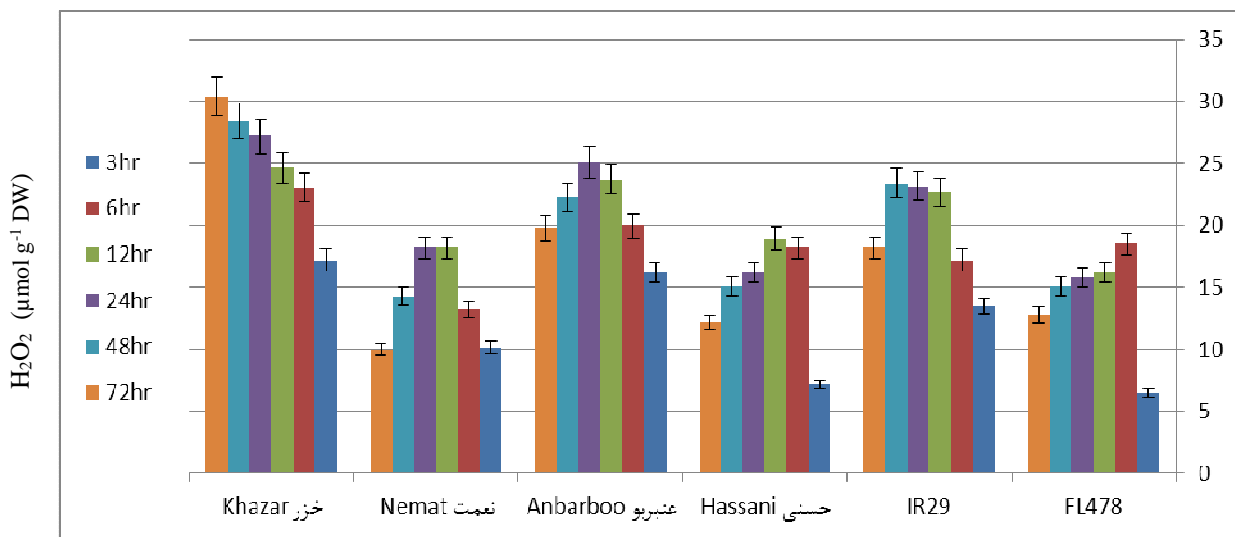


بیان نسبی  
The relative expression



شکل ۳- الگوی بیان ژن *OsPrx-2F* با روش Real time PCR تحت تنش شوری در گیاهچه‌های برنج. (A) ارقام FL478 و IR29، (B) ارقام حسنی و عنبربو، (C) ارقام نعمت و خزر.

Figure 3. The pattern of *OsPrx-2F* expression using Real-time PCR under salt stress in rice seedlings. A: FL478 and IR29, B: Hassani and Anbarboo, C: Nemat and Khazar.



شکل ۴- الگوی رفتار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تحت تنش شوری در گیاهچه‌های برنج  
Figure 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behavior under salt stress in the rice seedlings

## بحث

مقابل تنش اکسیداتیو می‌توان استنباط کرد که افزایش فعالیت این آنزیم باعث کاهش آثار تنش اکسیداتیو و بهبود وضعیت گیاه در تحمل به تنش می‌شود (Sairam, *et al.*, 2002). محققین دیگر نیز گزارش کردند که تحمل به شوری می‌تواند در نتیجه افزایش فعالیت سیستم دفاع آنزیمی آنتی‌اکسیدانی بهبود یابد (Hernandez *et al.*, 2003; Stepien and Klobus, 2005).

بیان نسبی دو ژن Prx و GPX نیز در این تحقیق افزایش یافت. GPXs و Prxs آنزیم‌های جایگزین برای حذف  $H_2O_2$  هستند. عملکرد اصلی GPXs احیای فسفولیپید هیدروکسی پراکسید به شکل الکل مربوطه با استفاده از تیوردوکسین‌ها (TRX) به‌عنوان اهدا کننده الکترون می‌باشد (Navrot *et al.*, 2006). این آنزیم‌ها می‌توانند  $H_2O_2$  را در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون نیز مهار کنند (Foyer *et al.*, 1997). در این مطالعه، میزان پروکسی ردوکسین در ارقام متحمل به مراتب بیشتر از ارقام حساس بود. در مطالعات قبلی نیز برای Prxs نقش‌های مختلفی در سلول‌هایی که در معرض تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار گرفته‌اند تعیین شده است. به طور خاص، عملکرد آنها، دفاع آنتی‌اکسیدانی، سم‌زدایی ROS و RNS، القای علامت در حین تنش اکسیداتیو و دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی است (Rouhier and Jacquot, 2005; Tripathi *et al.*, 2009). بازسازی شکل احیاء شده Prx توسط سیستم‌های احیاء کننده مختلف (شامل Trx، Grx، سیکلوفین در سیستم‌های یوکاریوتیک و AhpF و AhpD در باکتری‌ها) انجام می‌گیرد و از این‌رو جای تعجب ندارد که فعالیت این ژن در گیاه در حین تنش افزایش یابد (Tripathi *et al.*, 2009; Bhatt and Tripathi, 2011; Fomenko *et al.*, 2011). در مجموع گیاهان متحمل به شوری میزان بیان ژن Prx بیشتری از خود نشان دادند. این مساله را می‌توان به نقش این ژن در کاهش پروتئین ATP سنتاز، کاهش اکسیداسیون اسکوربیت و کاهش تخریب پروتئین‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی در حین تنش نسبت داد (Baier and Dieckz, 1999; Baier *et al.*, 2000). این نتایج نشان می‌دهد که سیستم دفاعی گیاه نیاز به سطح بالایی از Prx جهت محافظت از سلول‌ها در مقابل تنش اکسیداتیو دارد و یکی از عوامل حساسیت به تنش، کاهش میزان Prx در سلول‌های گیاهی است. بر اساس مطالعات اخیر، اعضای خانواده Prx، پروتئین چند

در این تحقیق میزان فعالیت عوامل سم‌زدای ROS تحت تنش شوری مورد مطالعه قرار گرفت. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش شوری در تمامی ارقام به شدت افزایش یافت. در مطالعات قبلی مشخص شده است که پراکسیداز در متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژن، بیوسنتز دیواره سلولی گیاهان با تسریع آخرین مرحله از سنتز لیگنین و سوبرین، نقش ایفا می‌کنند (Quiroga *et al.*, 2000). شوری با تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب القاء فعالیت پراکسیداز می‌شود. مانند این مطالعه، بسیاری از محققین فعالیت این آنزیم را به‌عنوان یک عامل کلیدی جهت حفاظت گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی عنوان نموده‌اند. اشرف و علی (Ashraf and Ali, 2005) مشاهده کردند که تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ کلزا و کاهش آثار مخرب تنش شوری شد. ملونی و همکاران (Meloni *et al.*, 2008) با مطالعه پنبه در شرایط تنش شوری مشاهده کردند که افزایش فعالیت این آنزیم تحت تأثیر تنش شوری منجر به کاهش میزان  $H_2O_2$  و کاهش تخریب غشاهای سلولی و آسیب دیدگی گیاه پنبه شد. در آزمایش حاضر ارقام متحمل به شوری در مقایسه با ارقام حساس، در بالاترین سطح تنش شوری بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و کمترین میزان  $H_2O_2$  را داشتند. ساریام و همکاران (Sairam *et al.*, 2004) گزارش کردند که تجمع یون سدیم تحت تأثیر تنش شوری در ارقام گندم منجر به افزایش تخریب غشاهای سلولی شد، در حالی که تحقیقات نشان داده است که آنزیم پراکسیداز نقش به‌سزایی در کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از تنش شوری و تجمع یون سدیم در برگ و ریشه گیاهان زراعی دارد. در این تحقیق نیز آنزیم POD در رقم متحمل سریع‌تر از رقم حساس افزایش فعالیت داشت. به طور حتم افزایش فعالیت این آنزیم پاسخی از جانب گیاه به افزایش ROSها است. البته باید توجه داشت که مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی متعددی در مقاومت یا حساسیت گیاهان به تنش شوری دخالت دارند. فعالیت آنزیم POD به عنوان یکی از آنزیم‌های اصلی در سم‌زدایی ROSs (به طور خاص  $H_2O_2$ ) تحت تنش‌های محیطی به ویژه شوری افزایش می‌یابد (Vaidyanathan, *et al.*, 2003; Kumar, *et al.*, 2009). با توجه به نقش این آنزیم در

پژوهش افزایش غلظت  $H_2O_2$  در موتانت‌های مورد مطالعه با افزایش غلظت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز همراه بود. در یک آزمایش تکمیلی، اسپری ترکیبات مانع کننده فعالیت آنزیم کاتالاز روی برگ گیاهان جو، سویا و تنباکو، با افزایش میزان  $H_2O_2$  منجر به بالا رفتن میزان غلظت و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز شد (Smith, 1985). در مطالعه حاضر نیز روند مشابهی ملاحظه شد، بدین ترتیب که در هر دو رقم حساس و مقاوم با افزایش میزان  $H_2O_2$ ، میزان آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز به نحو چشم‌گیری افزایش یافت و پس از کاهش مقدار  $H_2O_2$  مقادیر آنزیم نیز کاهش یافت. این حالت نقش این آنزیم در سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال را به خوبی نشان می‌دهد. پراکسی ردوکسین نیز حالت مشابهی با ژن قبلی داشت و افزایش در میزان  $H_2O_2$  میزان این ژن را افزایش داد. این ژن نیز در مطالعات قبلی به‌عنوان یک عامل سم‌زدای قوی گونه‌های فعال اکسیژن معرفی شده است.

#### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که ارقام متحمل به شوری بومی و اصلاح شده برنج ایرانی همانند رقم متحمل FL478 از نظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از الگوی تقریباً مشابهی پیروی کردند. تحت شرایط تنش شوری فعالیت این آنزیم در ارقام حساس نسبت به ارقام مقاوم بیش‌تر بود. بررسی میزان بیان ژن‌های گلوکاتایون پراکسیداز (*OsGpx*) و پراکسی ردوکسین (*OsPrx*) در ارقام متحمل و حساس نیز نشان داد که بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز در ارقام متحمل و حساس در ساعات اولیه تنش اتفاق افتاد، در حال‌که بیان ژن پراکسی ردوکسین در ساعات انتهایی تنش صورت گرفت، هر چند که میزان بیان این ژن در ارقام متحمل به مراتب بیشتر از ارقام حساس بود. علاوه بر آن، نتایج نشان داد که کارکرد مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌تواند منجر به سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن شود و بنابراین به دلیل اینکه مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی متعددی در تحمل یا حساسیت گیاهان به تنش شوری دخالت دارند، جهت درک هر چه بهتر عوامل سم‌زدای ROS بایستی مطالعه جامعی روی کل سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه انجام شود.

منظورهای را رمزگذاری می‌کنند که می‌توانند به عنوان تنظیم‌کننده انتقال علامت، چپرون‌های مولکولی و تنظیم‌کننده پاسخ به آسیب به DNA تحت تنش اکسیداتیو در مخمر و گیاهان عمل کنند (Morgan and Veal, 2007; Fomenko et al., 2011).

نتایج این آزمایش نشان داد که میزان بیان ژن گلوکاتایون پراکسیداز (*OsGpx*) در ریشه ارقام متحمل به نحو چشم‌گیری بیشتر از ارقام حساس بود که وسعت عمل و اهمیت این ژن را نشان می‌دهد. با توجه به انحصاری بودن نقش این ژن در احیاء مستقیم فسفولیپید هیدروژناز و کمپلکس هیدروپروکسی برای حفاظت غشای سلولی در برابر تنش اکسیداتیو (از این‌رو، GPXها غشای سلولی را از آسیب اکسیداتیو مصون نگه داشته و از این طریق تمامیت سلول را حفظ می‌کنند)، گستردگی حضور این ژن در اندام‌های مختلف توجیه‌پذیر به نظر می‌رسد. آنها می‌توانند با مهار پراکسید در پاسخ به هر دو تنش زیستی و غیر زیستی نقشی اساسی ایفا می‌کنند (Navrot et al., 2006). این موضوع در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است (Herbette et al., 2002; Jung et al., 2002).

نتایج برخی مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های واجد بخش پروتئینی تیول نقش مهمی در واکنش به رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند (Foyer and Noctor, 2005; Larkindale et al., 2005). از مهم‌ترین این آنزیم‌ها گلوکاتایون پراکسیداز است که نقش مهمی در مقابله با تنش اکسیداسیونی و ایجاد تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. چنین نقشی ممکن است به طور مستقیم با واکنش بدون واسطه یا از طریق ساز و کار آنزیمی با کاهش غلظت پراکسید هیدروژن صورت گیرد (Anne and Bruno, 1997; Pitzschke et al., 2006). شواهد روشنی مبنی بر تأثیر غلظت  $H_2O_2$  بر میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز وجود دارد. این موضوع توسط اسمیت و همکاران (Smith et al., 1984) در آزمایشی روی موتانت‌های فاقد فعالیت نسبی آنزیم کاتالاز (آنزیم فعال کاهش‌دهنده  $H_2O_2$ ) بررسی شد. در سایر مطالعات نیز مشخص شده است که در برگ برنج تحت تنش شوری، فعالیت SOD، POD، GPX و APX ترجیحاً افزایش و CAT کاهش می‌یابد (Lee et al., 2001). گوست و همکاران (Gossett et al., 1994) نیز گزارش کردند که در پنبه، شوری باعث افزایش فعالیت GPX و GR و کاهش فعالیت CAT و APX شد. در این

## References

- Akhani, H. and Ghorbanli, M. 1993.** A contribution to the halophytic vegetable and flora of Iran. In: Leith, H. and Almasson, A. A. (Eds.). Towards the rational use of high salinity tolerant. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers.
- Anne, C. L. and Bruno, T. 1997.** Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity,  $\text{SO}_4^{2-}$  uptake and oxidative stress response in intact canola roots. **Plant Physiology** 114: 177-183.
- Ashraf, M. and Ali, Q. 2008.** Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). **Environmental and Experimental Botany** 63: 266-273.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971.** Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 44 (1): 276-287.
- Bhatt, I., and Tripathi, B. N. 2011.** Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances** 29 (6): 850-859.
- Baier, M. and Dieckz, K. J. 1999.** Protective function of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in photosynthesis: Evidence from transgenic *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 119: 1407-1414.
- Baier, M., Noctor, G., Foyer, C. H. and Dietz, K. J. 2000.** Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. **Plant Physiology** 124: 823-832.
- Chance, B. and Maehly A. C. 1955.** Assays of catalases and peroxidases. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (Eds.). Methods in enzymology. Academic Press, New York. pp: 764-775.
- Choukr, A. R. 1996.** The potential halophytes in the development and rehabilitation of arid and semiarid zones: Halophytes and biosalin. **Agriculture** 5: 3-13.
- Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Fuggi, A., Pontecorvo, G. and Carillo, P. 2011.** Plant genes for abiotic stress. In: Shanker, A. and Venkateswarlu, B. (Eds.). Abiotic stress in plants: Mechanisms and adaptations. InTech. pp: 284-308.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. and Shinozaki, K. 2011.** Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. **BMC Plant Biology** 11 (163): 1-14.
- Dietz, K. J. 2008.** Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. **Plant Physiology** 133: 459-468.
- FAO. 2007.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics: FAOSTAT agriculture. from <http://fao.org/crop/statistics>.
- Fomenko, D. E., Koc, A., Agisheva, N., Jacobsen, M., Kaya, A., Malinouski, M., Rutherford, J. C., Siu, K. C., Jin, D. Y., Winqe, D. R. and Gladyshev, V. N. 2011.** Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 108: 2729-2734.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. 2005.** Oxidant and antioxidant signaling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment** 28: 1056-1071.
- Fry, I. V., Huflejt, M., Erber, W. W. A., Peschek, G. A. and Packer, L. 1986.** The role of respiration during adaptation of the freshwater *Cyanobacterium synechococcus* 6311 to salinity. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 244: 686-691.
- Gossett, D. R., Millhollon, E. P. and Lucas, M. C. 1994.** Antioxidant response to NaCl stress in salt tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. **Crop Science** 34: 706-714.
- Gregorio, G. B., Senadhira, D. and Mendoza R. 1997.** Screening rice for salinity tolerance. IRRI. Discussion Paper No. 22. Los Banos, Philipines.
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. L., Drevet, J. R. and Roeckel Drevet, P. 2002.** Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. **European Journal of Biochemistry** 269: 2414-2420.
- Hernandez, J. A., Aguilar, A. B., Portillo, B., Lopez-Gomez, E., Beneyto, J. M. and Garcia-Legaz, M. F. 2003.** The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants. **Functional Plant Biology** 30: 1127-1137.
- Hernandez, J. A., Ferrer, M. A., Jimenez, A., Barcelo, A. R. and Sevilla F. 2001.** Antioxidant systems and  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology** 127: 817-831.

- Horling, F., Koning, J. and Dietz, K. J. 2002.** Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: Its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. **Plant Physiology and Biochemistry** 40: 491-499.
- Jana, S. and Choudhuri, M. 1981.** Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. **Aquatic Botany** 12: 345-354.
- Jeanjean, R., Matthijs, H. C. P., Onana, B., Havaux, M. and Joset, F. 1993.** Exposure of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis. **Plant and Cell Physiology** 34: 1073-1079.
- Jung, B. G., Lee, K. O., Lee, S. S., Chi, Y. H., Jang, H. H. and Kang, S. S. 2002.** A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-independent peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry** 277: 12572-12578.
- Kamali, E., Shahmohammadi Heydari, Z., Heydari, M. and Feyzi, M. 2011.** Effects of irrigation water salinity and leaching fraction on soil chemical characteristic, grain yield, yield components and cation accumulation in safflower in Esfahan. **Iranian Journal of Field Crops Science** 6: 339-545. (In Persian with English Abstract).
- Kumar, V., Shriram, V., Nikam, T. D., Narendra, J., and Mahadeo, G. S. 2009.** Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in indica rice genotypes differing in salt tolerance. **Archives of Agronomy and Soil Science** 55: 379-394.
- Larkindale, J. D., Hall, J. R., Knight, M. and Vierling, E. 2005.** Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermo-tolerance. **Plant Physiology** 138: 882-897.
- Lee, D. H., Kim, Y. S. and Lee, C. B. 2001.** The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology** 158: 737-745.
- Lin, C. C. and Kao C. H. 2001.** Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. **Plant and Soil** 230: 135-143.
- Marshall, O. J. 2004.** PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics** 20: 2471-2472.
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. 2003.** Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 15: 12-21.
- Miao, Y., Lu, D., Wang, P., Wang, X. C., Chen, J., Miao, C. and Song, C. P. 2006.** An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. **The Plant Cell** 18: 2749-2766.
- Mika, A. and Luthje, S. 2003.** Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from root plasma membrane. **Plant Physiology** 132: 1489-1498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** 9: 490-498.
- Momeni, A. 2010.** The geographic distribution of soil salinity levels in Iran. **Iranian Journal of Soil Research** 24: 203-215. (In Persian with English Abstract).
- Morgan, B. A. and Veal, E. A. 2007.** Functions of typical 2-Cys peroxiredoxins in yeast. **Subcell Biochemistry** 44: 253-265.
- Moser, D., Nicholls, P., Wastyn, M. and Peschek, G. A. 1991.** Acidic cytochrome c6 of unicellular cyanobacteria is an indispensable and kinetically competent electron donor to cytochrome oxidase in plasma and thylakoid membranes. **International Journal of Biochemistry** 24: 757-768.
- Navabian, M. and Aghajani, M. 2012.** Evaluating the effect of fresh and saline water irrigation management on Hashemi rice yield. **The Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science** 16: 45-54. (In Persian with English Abstract).
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D. B., Issakidis, E., Jacquot, J. P. and Rouhier, N. 2006.** Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology** 142: 1364-1379.
- Pitzschke, A., Forzani, C. and Hirt, H. 2006.** Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants and Redox Signaling** 8: 1757-1764.
- Puri, Y. P. and Williams, W. A. 1985.** Evaluation of yield components as selection criteria in barley breeding. **Crop Science** 22: 927-931.

- Rouhier, N. and Jacquot, J. P. 2005.** The plant multigenic family of thiol peroxidases. **Free Radic Biol Med** 38: 1413–1421.
- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. 2002.** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science** 163: 1037-1046.
- Sairam, R. K. and Tyagi, A. 2004.** Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science** 86 (3): 407-421
- Singh, B. D. 2001.** Plant breeding: Principles and methods. Kalyani Publisher. 898 p.
- Slesak, I., Miszalski, Z., Karpinska, B., Niewiadomska, E., Ratajczak, R. and Karpinski, S. 2002.** Redox control of oxidative stress responses in the C-3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology and Biochemistry** 40: 669-677.
- Smith, I. K., Kendall, A. C., Keys, A. J., Turner, J. C. and Lea, P. J. 1984.** Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science Letters** 37: 29-33.
- Smith, I. K. 1985.** Stimulation of glutathione synthesis in photo respiring plants by catalase inhibitors. **Plant Physiology** 79: 1044-1047.
- Stepien, P. and Klobus, G. 2005.** Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. **Physiologia Plantarum** 125: 31-40.
- Tripathi, B. N., Bhatt, I. and Dietz, K. J. 2009.** Peroxiredoxins: A less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. **Protoplasma** 235: 3-15.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. and Thomas, G. 2003.** Scavenging of reactive oxygen species in NaCl stressed rice (*Oryza sativa* L.): Differential response in salt tolerant and sensitive cultivars. **Plant Science** 165: 1411-1418.
- Van Breusegem, F. and Dat, J. F. 2006.** Reactive oxygen species in plant cell death. **Plant Physiology** 141: 384-390.
- Van Weert, F., Van der Gun, J. and Reckman, J. 2009.** Global overview of saline groundwater occurrence and genesis. International Groundwater Resources Assessment Centre. 105 p.



University of Guilan  
Faculty of Agricultural  
Sciences

**Cereal Research**  
Vol. 6, No. 1, Spring 2016 (15-30)

## **Biochemical characteristics and expression analysis of some oxidative pathway genes in rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress conditions**

**Mojtaba Kordrostami<sup>1</sup>, Babak Rabiei<sup>2\*</sup> and Seyyed Hassan Hassani Kumleh<sup>3</sup>**

Received: September 12, 2015

Accepted: January 9, 2016

### **Abstract**

In this research, the expression of glutathione peroxidase (*OsGpx*) and peroxy redoxin (*OsPrx*) genes and content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and guaiacol dependent peroxidase (POD) in Iranian local (Hassani and Anbarboo) and improved (Nemat and Khazar) rice varieties in response to 100 mM salt stress were assessed and compared to two well-known international salt tolerant (FL478) and sensitive (IR29) varieties as checks. The results showed that the activity of peroxidase (POD) was different in the studied cultivars at different times and its activity in sensitive cultivars was more than tolerant cultivars under salinity stress conditions. The results also showed that the activity of this enzyme reached its maximum at early hours of stress in the tolerant cultivars and at late hours in the susceptible ones. The highest gene expression of glutathione peroxidase (*OsGpx*) was observed in the roots of tolerant varieties at 6 hours after stress and then at 12, 24, 48 and 72 hours after stress significantly decreased. In contrast, the expression of this gene in susceptible varieties increased at all studied times, however the most expression was observed at 6 and 12 hours after salinity stress. The study of peroxy-redoxin (*OsPrx*) gene expression showed that at the early hours after stress, tolerant varieties did not show any change in the gene expression, but at the final hours of stress (72 hours) gene expression was significantly increased. However, there was no consistent pattern for this gene expression in the susceptible cultivars. The results showed that there was a direct relationship between reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and increased activity of antioxidant enzymes and genes expression. The result of this research indicated that activity of a set of antioxidant enzymes can lead to detoxification of reactive oxygen species. Therefore, for better understanding the ROS detoxifier factors, a comprehensive study should be done on the antioxidant system.

**Keywords:** Glutathione peroxidase, Guaiacol peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Peroxy-redoxin

---

1. Ph. D. Candidate, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Assist. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran

\* Corresponding author: [rabiei@guilan.ac.ir](mailto:rabiei@guilan.ac.ir)