



تحقیقات غلات

دوره نهم / شماره چهارم / زمستان ۱۳۹۸ (۳۱۴-۲۹۹)

بررسی بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با تحمل به خشکی در برنج (*Oryza sativa* L.)

محمد محسن‌زاده گلفزانی^۱، سمانه آقائی‌پور لیموی^۲، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^{۳*} و شاپور عبداللهی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر تنش اسمزی ناشی از اعمال ماده پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ بر مولفه‌های جوانه‌زنی بذر و تعیین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی، ۲۱ ژنوتیپ برنج در سه سطح تنش اسمزی (صفر، ۷/۵- و ۱۵- مگاپاسکال) با آرایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمام ژنوتیپ‌ها در صفات مورد بررسی شامل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن تر ساقه‌چه و وزن خشک ساقه‌چه، دارای تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلف تنش اسمزی بودند. اثر ژنوتیپ و برهمکنش ژنوتیپ و تنش اسمزی در تمامی صفات بررسی‌شده معنی‌دار بود. بر اساس صفات اندازه‌گیری شده، لاین ۴۱۶ و ژنوتیپ IR28 به ترتیب به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش اسمزی انتخاب شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، الگوی بیان چهار ژن واکنش‌دهنده به تنش خشکی (*SOD*، *FNR*، *APX* و *NDH*) در تیمارهای صفر، ۴، ۸، ۱۰ و ۲۴ ساعت تنش دهیدراسیون در مرحله گیاهچه‌ای در دو ژنوتیپ IR28 و لاین ۴۱۶ با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن‌های واکنش‌دهنده به خشکی بیان بالاتری در لاین متحمل ۴۱۶ نسبت به ژنوتیپ حساس IR28 داشتند و بیان همه ژن‌ها به جز *FNR* با افزایش تنش، افزایش یافت. همچنین، ژن *APX* در زمان‌های ابتدایی پس از تنش بیان چندانی در هر دو ژنوتیپ نداشت، اما بیش‌ترین میزان بیان خود را در ۲۴ ساعت پس از تنش در ژنوتیپ حساس IR28 نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌اتیلن گلیکول، تنش اسمزی، مولفه‌های جوانه‌زنی بذر، cDNA، Real Time PCR

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

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

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

۴- محقق، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: hsamizadeh@guilan.ac.ir

مقدمه

محیط‌های طبیعی، دربردارنده تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای گیاهان است. گیاهان به‌طور مداوم در برابر تغییرات محیطی قرار دارند و چنانچه این تغییرات سرعت و شدت زیادی داشته باشند، آن‌ها را به‌عنوان تنش تلقی می‌کنند (Mittler, 2002; Ciarmiello *et al.*, 2011). گیاهان وقتی با شرایط تنش مواجه می‌شوند مکانیسم‌های مختلفی را در سطوح مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به‌کار می‌گیرند (Covarrubias and Reyes, 2010). خشکی یک رویداد هواشناختی است که به‌دلیل عدم وقوع بارندگی در یک دوره زمانی اتفاق می‌افتد. با وقوع خشکی، آب قابل دسترس خاک کاهش و تلفات آب از طریق تبخیر و تعرق به‌طور مداوم افزایش می‌یابد (Jaleel *et al.*, 2009). برنج گیاهی است که بیش‌ترین نیاز آبی را در بین بیش‌تر گیاهان زراعی به‌ویژه غلات دارد و خشکی محدودیت زیادی برای برنج ایجاد می‌کند. تنش خشکی از مهم‌ترین دلایل کاهش عملکرد برنج در بیش از ۴۰ میلیون هکتار از مزارع در آسیا به‌حساب می‌آید (Venuprasad *et al.*, 2007).

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به‌عنوان کاتالیزوری که قادر به تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن است، شناخته شده است (Sgherri *et al.*, 2000). SOD اولین ماده تولید شده از احیای یک ظرفیتی اکسیژن یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد و بنابراین به SOD دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن گفته می‌شود. به‌نظر می‌رسد نقش آنزیم SOD در از بین بردن سوپراکسید بسیار مهم است (Alscher *et al.*, 2002).

آنزیم آسکورات پراکسیداز (APX) در چرخه مه‌لر و گلوکاتایون-آسکورات نقش مؤثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند. در چرخه گلوکاتایون-آسکورات با فعالیت آنزیم APX، آسکورات به مونودهدیدروآسکورات اکسید می‌شود و برای ادامه چرخه تائید آسکورات لازم است. به همین منظور در این چرخه آنزیم‌های منوهیدروآسکورات ردوکتاز (MDHAR)، دهیدروآسکورات ردوکتاز (DHAR) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) فعالیت می‌کنند و با استفاده از NADPH و گلوکاتایون، آسکورات را احیا می‌کنند. تحقیقات نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به‌دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و

افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (Mittler, 2002).

فردوکسین (FNR) رادوکتاز (FNR) آنزیم کلیدی در انتقال الکترون فتوسنتزی است. FNR الکترون‌های بین فردوکسین حامل تک‌الکترون و NADP(H) حامل دو الکترون را در پایان زنجیره انتقال الکترون انتقال می‌دهد. FNR همچنین در دیگر فرآیندهای مربوط به چرخه انتقال الکترون اطراف فتوسیستم I و کنترل هموستازی NADPH/NADP⁺ شرکت دارد (Palatnik *et al.*, 1997). خانواده‌های ژنی FNR در برنج شناسایی شده است (Higuchi-*et al.*, 2011).

مهار جذب CO₂ القا شده با تنش گرما، سرما و یا خشکی می‌تواند منجر به احیای بیش از حد زنجیره انتقال الکترون شود که سبب انباشته شدن NAD(P)H می‌شود و به‌دنبال آن، افزایش NAD(P)H دهیدروژناز (NDH) در کلروپلاست باعث کاهش میزان NAD(P)H و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Yao *et al.*, 2001). همچنین نشان داده شده است که گیاهچه‌های جهش یافته برای ژن *ndhB* حساس به تنش خشکی هستند. در این ارتباط اظهار شد که *NDH* ممکن است با فراهم کردن شیب پروتون اضافی سبب به تاخیر انداختن مهار فتوسنتزی شود (Horváth *et al.*, 2000) و افزایش بیان *NDH* تحت شرایط تنش به‌واسطه انتقال الکترون چرخه‌ای ممکن است به کاهش عوامل تنش کمک کند (Wang *et al.*, 2006). در مطالعه‌ای ارقام مقاوم به خشکی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از طریق SOD نشان دادند که در ژنوتیپ حساس به خشکی مشاهده نشد (Sales *et al.*, 2013). در پژوهش دیگری، افزایش میزان بیان ژن SOD در ژنوتیپ مقاوم نسبت به ژنوتیپ حساس برنج دیده شد (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2018). در آزمایش دیگری نیز اعلام شد که میزان فعالیت آنزیم SOD به‌طور مداوم با افزایش سطوح تنش افزایش یافت (Saeedfar *et al.*, 2015). افزایش سطوح درونی SOD در طول تنش خشکی به‌طور گسترده گزارش شده است (Hosseini Salekdeh *et al.*, 2002; Fulda *et al.*, 2011). در مطالعه مشابهی گزارش شده است که فعالیت APX تحت شرایط خشکی در رقم مقاوم به خشکی در مقایسه با رقم حساس به خشکی بیش‌تر است (Khanna-Chopra and Selote, 2007).

با در نظر گرفتن دو عامل ژنوتیپ و سطوح تنش اسمزی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار اجرا شد. سطوح تنش اسمزی شامل صفر (آب مقطر)، ۷/۵- و ۱۵- بار توسط پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ ایجاد شد (Michel and Kaufmann, 1973).

برای انجام آزمایش، ابتدا بذرها با هیپوکلراید سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو شدند. سپس بذرها درون پتری‌دیش و در داخل انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و با محلول‌های دارای غلظت‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول تیمار شدند. به منظور اندازه‌گیری صفات مورد نظر، تعداد بذرها را جوانه زده در هر پتری (که حداقل دارای دو میلی‌متر ریشه‌چه بودند) شمارش و مولفه‌های مختلف جوانه‌زنی اندازه‌گیری شد. زمان پایان جوانه‌زنی نیز زمانی بود که پس از ۲۴ ساعت هیچ بذری جوانه نزد.

صفات اندازه‌گیری شده

اندازه‌گیری طول ساقه‌چه و ریشه‌چه

طول ساقه‌چه و ریشه‌چه (توسط کولیس دیجیتالی) اندازه‌گیری شد. اولین اندازه‌گیری در روز هشتم با انتخاب سه بذر در هر تکرار آغاز و سپس به فاصله زمانی هر سه روز و برای چهار مرتبه انجام شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک گیاهچه

در پایان روز بیستم و اتمام اندازه‌گیری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، ریشه‌چه و ساقه‌چه هر گیاه توسط قیچی جدا و وزن تر آن‌ها به صورت جداگانه توسط ترازو دیجیتال اندازه‌گیری شده و سپس برای محاسبه وزن خشک، هر کدام از آن‌ها جداگانه در داخل فویل پیچیده و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

ضریب آلومتری

ضریب آلومتری از تقسیم طول ریشه‌چه به ساقه‌چه به دست آمد.

درصد آب بافت

درصد آب بافت ریشه‌چه و ساقه‌چه با رابطه ۱ محاسبه شد که در آن FW وزن تر و DW وزن خشک بافت است:

$$PW = \frac{FW - DW}{FW} \times 100 \quad (1)$$

گزارش شده است که در گیاهچه‌های برنج ۱۰-۱۲ روزه که در شرایط آزمایشگاهی رشد کردند و به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش خشکی ۵/۰ تا ۲- مگاپاسکال قرار گرفتند، بیان آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و SOD افزایش و CAT کاهش یافت که نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های متفاوت، می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی به تنش خشکی نشان دهند (Sharma and Dubey, 2005). میتلر (Mittler, 2002) نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش مانند آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و گویاکول پراکسیداز بر اثر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن است. همچنین، افزایش سطح بیان ژن FNR بر اثر تنش خشکی و میزان انتشار FNR غشای تیلاکوئید گزارش شده است (Lehtimäki et al., 2010). بر اساس مطالعه دیگری، اظهار شد که FNR ممکن است نقش مهمی در حفظ نسبت هموستازی DPH/NADP⁺ NA در کلروپلاست تحت شرایط تنش داشته باشد (Palatnik et al., 1997).

اهمیت ژن‌های تولید کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌ویژه آسکوربات پراکسیداز، NAD(P)H دهیدروژناز، فرودکسین NAPDH و سوپراکسیددیسموتاز در خنثی کردن اکسیدان‌ها و شناخت ژن‌های مرتبط با تنش خشکی در برنج و مطالعه آن‌ها زمینه‌ای را جهت تحمل به خشکی فراهم می‌آورد. با توجه به محدودیت تولید برنج در شرایط تنش خشکی و نقش کلیدی ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش، تحقیق حاضر انجام شد که هدف از آن، مطالعه تأثیر تنش اسمزی ناشی از اعمال ماده پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ بر مولفه‌های جوانه‌زنی بذر ۲۱ ژنوتیپ برنج، تعیین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی و سپس بررسی بیان نسبی تعدادی از ژن‌های آنتی‌اکسیدان در دو ژنوتیپ متحمل و حساس برنج با استفاده از تکنیک Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور تعیین میزان تحمل به تنش اسمزی در برنج و تعیین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس جهت بررسی بیان ژن‌های واکنش دهنده به خشکی، ۲۱ ژنوتیپ برنج (جدول ۱) بر اساس نتایج تحقیقات قبلی (Abarshahr et al., 2011; Safaei Chaeikar et al., 2018) انتخاب و مولفه‌های جوانه‌زنی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش

جدول ۱- اسامی و منشا ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه در این تحقیق
 Table 1. Name and origin of rice genotypes studied in this experiment

No.	Genotype	Pedigree- Origin
1	Hassani	Local variety, Guilan, Iran
2	Shahpasand	Local variety, Guilan, Iran
3	Mousa Tarom	Local variety-Mazandran, Iran
4	Hassansaraiee	Local variety, Guilan, Iran
5	Dom Sefid	Local variety, Guilan, Iran
6	Dom Siah	Local variety, Guilan, Iran
7	Dom Zard	Local variety, Guilan, Iran
8	Hashemi	Local variety, Guilan, Iran
9	IR50	IRRI- Philippines
10	IR60	IRRI- Philippines
11	Usen	Egypt
12	Dollar	India
13	IR30	IRRI- Philippines
14	IR58	IRRI- Philippines
15	TE-TEP	IRRI- Philippines
16	KMP-41	IRRI- Philippines
17	IR28	IRRI- Philippines
18	IR36	IRRI- Philippines
19	Shiroodi	Improved cultivar, Mazandran, Iran
20	Lin203	Improved line (Nemat/ Domsiah), Guilan, Iran
21	Lin416	Improved line (Nemat/ Domsiah), Guilan, Iran

درصد جوانه‌زنی

درصد جوانه‌زنی از تقسیم تعداد بذرهای جوانه‌زده (معیار جوانه‌زنی بذر، خروج ریشه‌چه حداقل به اندازه دو میلی‌متر بود) به تعداد کل بذرها محاسبه شد.

تجزیه آماری صفات مرفولوژیک

جهت بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها و برهمکنش ژنوتیپ و تنش خشکی بر صفات اندازه‌گیری شده، تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. جهت گروه‌بندی تیمارها نیز از تجزیه به مولفه‌های اصلی استفاده و با رسم نمودار دو گانه بر اساس مولفه‌های اول و دوم، ژنوتیپ‌ها گروه‌بندی و ژنوتیپ‌های مناسب بر مبنای موقعیت قرارگیری آن‌ها در نمودار انتخاب شدند، به این ترتیب که ابتدا مقادیر عددی دو مولفه اول و دوم در هر یک از ژنوتیپ‌ها، برآورد شد و سپس با رسم نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس این دو مولفه، موقعیت هر ژنوتیپ در محورهای مختصات به دست آمد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ و تجزیه به مولفه‌های

اصلی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و نمودارها نیز به کمک نرم‌افزار Excel رسم شدند.

بررسی بیان ژن

بر اساس نتایج به دست آمده از صفات جوانه‌زنی مورد بررسی، رقم IR28 و لاین ۴۱۶ به ترتیب به عنوان رقم حساس و مقاوم به تنش خشکی در این بررسی انتخاب شدند. بذرهای دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به پتری‌های هشت سانتی حاوی کاغذ صافی استریل منتقل و برای جوانه‌دار شدن در اتاقک کشت و با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و بعد از گذشت شش روز، جوانه‌ها به گلدان و اتاقک کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. گلدان‌ها به نسبت مساوی از خاک‌های ماسه، پیت و خاک باغچه پر شده و هر دو سه روز یک بار آبیاری شدند. نمونه‌گیری جهت بررسی بیان ژن‌ها در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش خشکی در مرحله ۴ تا ۵ برگی از گیاهچه‌ها صورت گرفت. اعمال تنش از طریق کاغذ صافی بر اساس مدل ارائه شده توسط رامپینو و

همکاران (Rampino *et al.*, 2006) و نیز دانیالی و همکاران (Danyali *et al.*, 2019) صورت گرفت.

نمونه‌برداری، استخراج RNA و سنتز cDNA

بعد از نمونه‌برداری از برگ‌ها، نمونه‌ها داخل فویل آلومینیومی پیچیده و در نیتروژن مایع غوطه‌ور و سپس به فریزر -۷۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت RNAX-Plus و مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام شد. بعد از اتمام این مرحله، سنجش کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز افقی ژل آگارز و مشاهده باندهای مجزای مربوط به 28S و 18S ریبوزومی تحت نور UV در دستگاه ژل داگ (BIORAD) و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ انجام شد و مقدار مورد نیاز RNA تیمار شده با DNase، از هر نمونه برحسب ng/ml محاسبه شد. علاوه بر غلظت، شاخص جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر نسبت به ۲۸۰ نانومتر نیز قرائت و ثبت شد. از آنجایی که این شاخص بیان‌گر میزان آلودگی پروتئینی نمونه‌های RNA است، در طول آزمایش نمونه‌های با غلظت بیش از ۵۰ ng/ml و با شاخص جذب بین ۱/۸ تا ۲ برای سنتز مورد استفاده قرار گرفتند. برای سایر نمونه‌ها استخراج مجدداً انجام شد. جهت سنتز cDNA از کیت Thermo Scientific RevertAid First cDNA Synthesis Kit #K1621 از شرکت سیناژن استفاده و مطابق دستورالعمل کیت یاد شده عمل شد. در روند سنتز cDNA از آنزیم‌های Ribolok RNase Inhibitor # EO0381، DNase I RNase-free # EN0521 نیز استفاده شد. پس از پایان سنتز، دو میکرولیتر EDTA به تیوپ اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت تا باقیمانده آنزیم حذف و از صدمات احتمالی به cDNA جلوگیری شود.

بررسی فرآورده‌های PCR کنترل ساخت cDNA در فرآیند الکتروفورز ژل آگارز یک درصد

به‌منظور صحت ساخت cDNA برای همه نمونه‌ها کیفیت آن‌ها در PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن *Actin* (Yang *et al.*, 2007; Marmagne *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Aliakbari and Razi, 2013; Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2018; Vahedi *et al.*, 2019) کنترل شد و پس از

عکس‌برداری از ژل در دستگاه ژل‌داگ صحت ساخت cDNA با مشاهده باند مورد نظر در مکان مناسب روی ژل مورد بررسی قرار گرفت و باندهایی با طول 150bp که مورد انتظار بود، مشاهده شدند.

طراحی آغازگر اختصاصی

بررسی بیان ژن با روش Real time PCR

پس از تایید cDNA ساخته شده میزان بیان ژن‌های *Real time SOD* و *FNR APX NDH* در فرایند PCR در ژنوتیپ حساس (IR28) و متحمل (لاین ۴۱۶) مورد مقایسه قرار گرفت. در این آزمایش از ژن *Actin* به‌عنوان ژن مبنا جهت نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد (Yang *et al.*, 2007; Marmagne *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Aliakbari and Razi, 2013; Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2018; Vahedi *et al.*, 2019). با توجه به طول ژن و توالی قطعه تکثیر شده PCR، چرخه‌های تکثیر ژن‌ها در روش Real time PCR طراحی شد. در این آزمایش از مستر Real time (Syber Green Master Mix) استفاده شد. چرخه حرارتی مورد استفاده شامل سه دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵°C، سپس ۴۰ چرخه به‌صورت ۱۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۵°C، ۲۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای اتصال اختصاصی هر آغازگر (جدول ۲)، ۱۵ ثانیه مرحله بسط در دمای ۷۲°C بود (Mohsenzadeh *et al.*, 2018). به‌منظور مقایسه بیان نسبی ژن‌های مورد نظر در فرایند Real time-PCR از روابط ۲ تا ۴ استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). نتایج منحنی ذوب برای ژن‌ها نشان داد که هر دو جفت آغازگرهای مورد استفاده به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند (شکل ۱).

$$\Delta CT = CT_{\text{Target Gene}} - CT_{\text{Reference Gene}} \quad (۲)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Treated}} - \Delta CT_{\text{Untreated}} \quad (۳)$$

$$RGEC = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (۴)$$

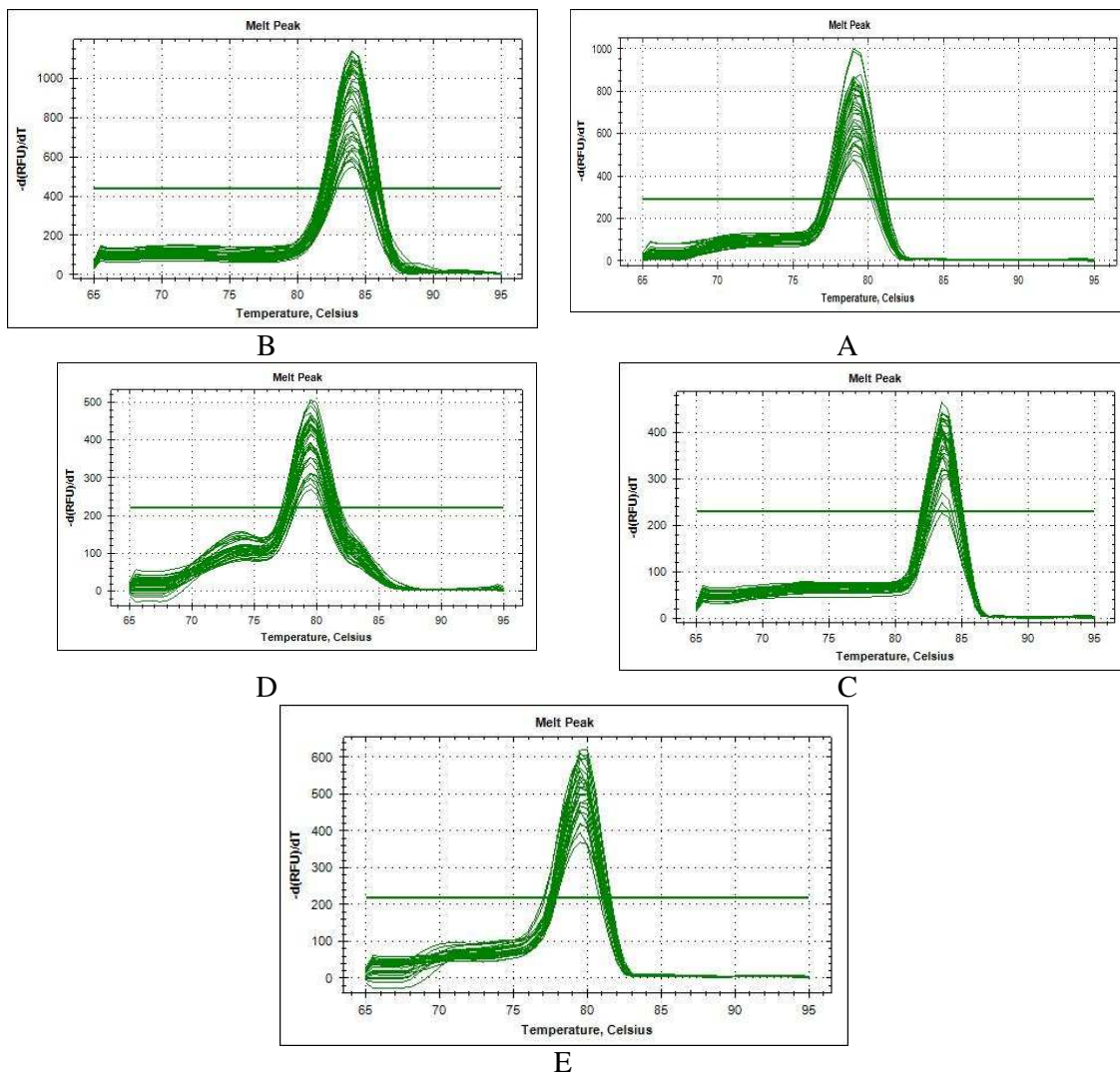
که در آن، RGEC میزان تغییر نسبی بیان ژن است. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند. همچنین سطح معنی‌داری بیولوژیکی دو برابر بیان نسبی در نظر گرفته شد (Vahedi *et al.*, 2019).

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها در برنج

Table 2. Primer pairs used for relative expression analyses of genes in response to in rice

Gene [†]	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Size (bp)	NCBI accession number
<i>Actin</i>	Forward: GCAACTGGGATGACATGGAG Reverse: GCGACATACATAGCTGGCAC	59	150	XM_015761709.2
<i>APX</i>	Forward: GTGAAGAATGCCACCTGAG Reverse: TTACCCCATCCACTACGCTC	57	174	XM_015762991.2
<i>FNR</i>	Forward: CCGTTCCGCTCATTCTTGTG Reverse: ATCGACCCGGAAGTTCTCTG	57	170	XM_015785494.1
<i>NDH</i>	Forward: GTACATCAACCCGGAGACCA Reverse: GAAGCGTGTACTCTGACAGC	57	153	XM_015781804.2
<i>SOD</i>	Forward: CTGGGAATCAATGCAGCCAG Reverse: CAAGACAAGCCAAACCCAGC	59	171	XM_015787009.1

[†]: APX, Ascorbate peroxidase; FNR, Ferredoxin; NADP⁺, Oxidoreductase; NDH, NAD(P)H dehydrogenase; SOD, Superoxide dismutase.



شکل ۱- منحنی ذوب ژن‌ها در واکنش real time-PCR: A) *Actin*, B) *SOD*, C) *APX*, D) *FNR*, E) *NDH*
Figure 1. Melting curve in real time PCR: A) *Actin*, B) *SOD*, C) *APX*, D) *FNR*, E) *NDH*

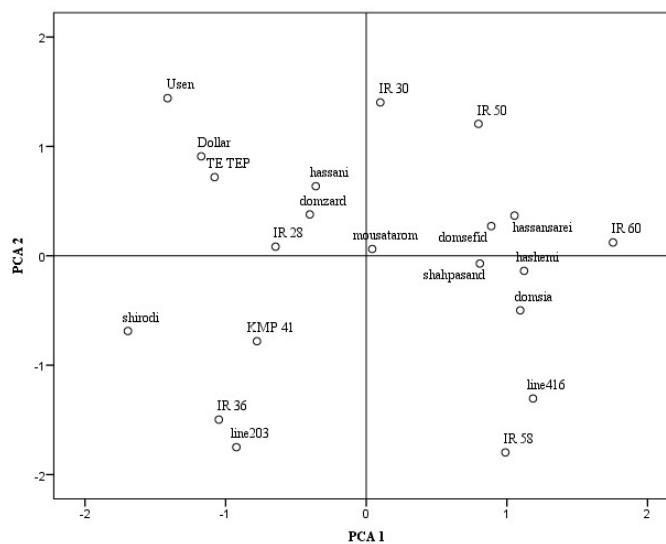
نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیک

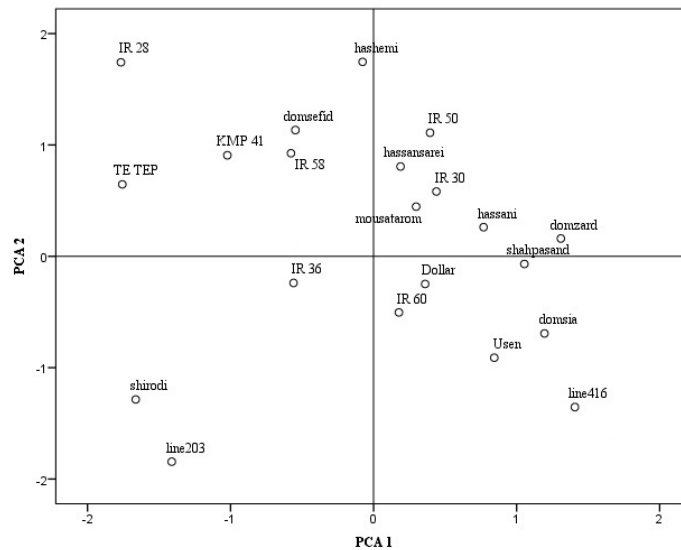
نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش اسمزی بر تمامی صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر ژنوتیپ و برهمکنش ژنوتیپ و تنش خشکی در تمام صفات معنی‌دار شد (نتایج نشان داده نشد). ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم بر اساس صفات گیاهچه از قبیل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (ضریب آلومتریکی) انتخاب شدند. بررسی ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه نشان داد که بالاترین همبستگی بین وزن خشک ریشه‌چه و نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه و کم‌ترین ارتباط بین طول ساقه‌چه و وزن تر ریشه‌چه و طول ریشه‌چه و وزن تر ساقه‌چه در شرایط نرمال و تنش وجود داشت. نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز نشان داد که در شرایط نرمال، دو مولفه اصلی (به ترتیب دارای همبستگی بالا با صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه) و در شرایط تنش، سه مولفه اصلی (به ترتیب دارای همبستگی بالا با صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و وزن تر ریشه‌چه) با داشتن مقادیر ویژه بیش‌تر از یک به ترتیب ۷۳/۲ درصد و ۷۹/۶ درصد از تنوع کل صفات را توجیه کردند. نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه بیانگر نوعی مکانیسم تحمل نسبت به تنش‌های محیطی است. هر چند این نسبت تحت کنترل عوامل ژنتیکی است، ولی

تا حدودی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز قرار دارد. محققان در بررسی اجزای جوانه‌زنی بذر کلزا و ماشک در شرایط تنش شوری دریافته‌اند که تاثیر تنش شوری بر ضریب آلومتریکی معنی‌دار بود و با افزایش سطوح تنش شوری از میزان ضریب آلومتریکی کاسته شد (Zeinali et al., 2002). این نتیجه در این آزمایش نیز مشاهده شد و به این ترتیب، با توجه به مشاهدات عینی در این آزمایش و نتایج آزمایش‌های دیگران، ارتباط بین ضریب آلومتریکی و تنش خشکی به اثبات می‌رسد.

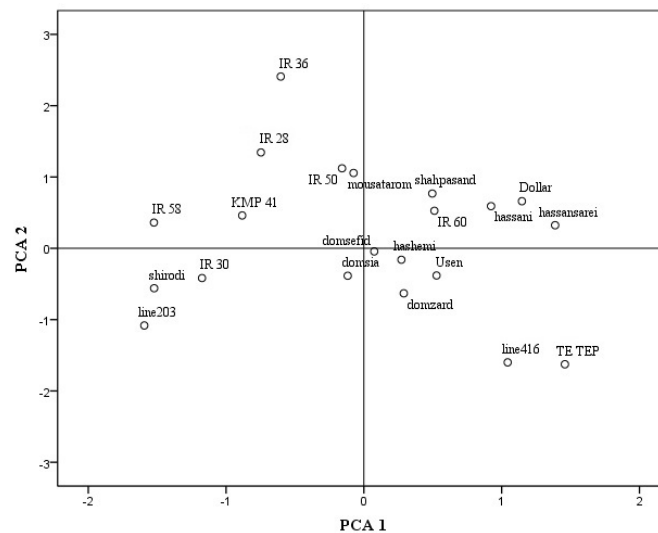
نمودار گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس مولفه‌های اول و دوم حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی در تیمارهای شاهد و سطوح خشکی در شکل‌های ۲ تا ۴ ارائه شده است. از آنجایی که مقادیر بالاتر صفات ساقه‌چه و ریشه‌چه و مقادیر کم‌تر ضریب آلومتریکی مطلوب است، بنابراین ژنوتیپ‌هایی که مقادیر بالاتر مولفه اول و مقادیر کم‌تر مولفه دوم را دارند و در ناحیه چهارم محورهای مختصات قرار می‌گیرند، ژنوتیپ‌های با پاسخ مطلوب به تنش هستند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان متحمل به تنش خشکی در مرحله جوانه‌زنی معرفی کرد. در مقابل، ژنوتیپ‌های موجود در ناحیه سوم از نظر پاسخ به تنش ضعیف‌ترین ژنوتیپ‌ها و حساس به تنش خشکی هستند. بر اساس هر سه نمودار، لاین ۴۱۶ (با والدین (نعمت/دمسیاه) به‌عنوان متحمل و ژنوتیپ IR28 (با والدین fb24/taichong 68) به‌عنوان حساس به تنش شناخته شدند.



شکل ۲- تجزیه به مولفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های برنج تحت شرایط بدون تنش
Figure 2. Principal component analysis of rice genotypes under non-stress conditions



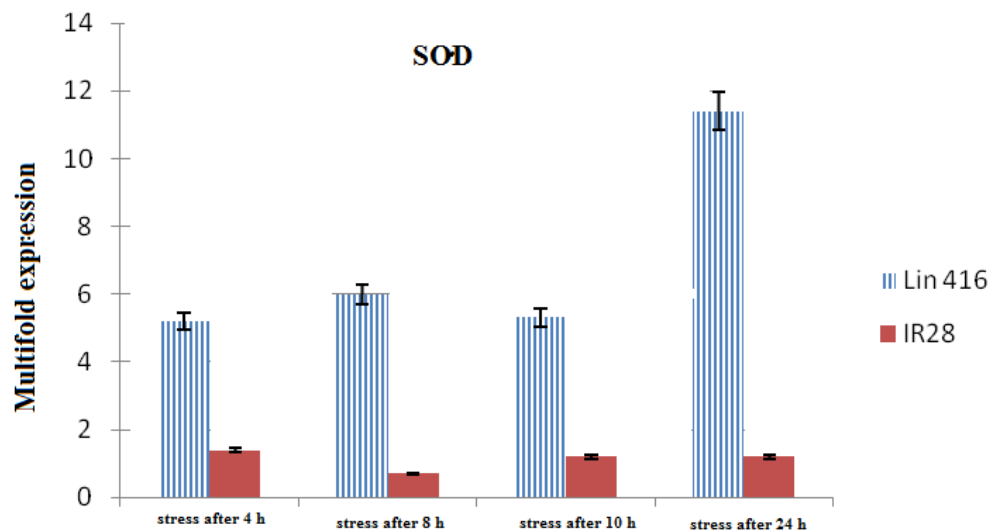
شکل ۳- تجزیه به مولفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های برنج تحت شرایط تنش اسمزی ۷/۵- مگاپاسکال
Figure 3. Principal component analysis of rice genotypes under -7.5 MPa osmotic stress cinditions



شکل ۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های برنج تحت شرایط تنش اسمزی ۱۵- مگاپاسکال
Figure 4. Principal component analysis of rice genotypes under -15 MPa osmotic stress cinditions

ژن *SOD* در ۴، ۸ و ۱۰ و سپس افزایش میزان بیان در ۲۴ ساعت ممکن است سبب افزایش تحمل گیاه به تنش شود. زیرا افزایش بیش از حد مقدار *SOD* می‌تواند سبب تولید مازاد پراکسید هیدروژن و آسیب به بافت شود. احتمالاً گیاه متحمل با ثابت نگهداشتن میزان بیان *SOD* و افزایش بیان نسبی این ژن، مانع از خسارات ناشی از تنش می‌شود. این در حالی است که افزایش زمان تنش سبب کاهش بیان ژن *SOD* در ژنوتیپ حساس شد.

میزان بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*)
مطالعه میزان بیان نسبی ژن *SOD* در این پژوهش نشان داد که بیان آن در پاسخ به تنش خشکی در ژنوتیپ حساس IR28 به مقدار بسیار کم بود، اما در لاین متحمل ۴۱۶ در ابتدا افزایش، سپس کاهش و بعد دوباره افزایش یافت و بیش‌ترین مقدار آن در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش مشاهده شد. این موضوع نشان داد که ژن *SOD* در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن در زمان بیش‌تر از وقوع تنش دخیل بوده است (شکل ۵).



شکل ۵- الگوی بیان ژن *SOD* با روش real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم برنج حساس و متحمل به خشکی
Figure 5. Expression pattern of *SOD* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible and tolerant rice genotypes

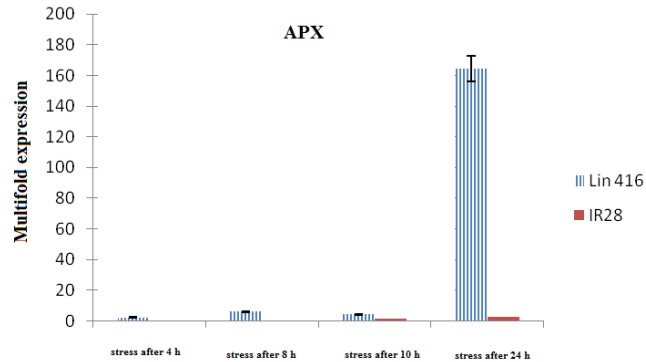
میزان بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز (*APX*) نتایج به دست آمده از مقایسه بیان ژن *APX* در دو رقم برنج مورد مطالعه نشان داد که این ژن در ژنوتیپ متحمل بسیار بیش تر از ژنوتیپ حساس بیان شده است و بیش ترین مقدار بیان این ژن در رقم متحمل در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش مشاهده شد. در گیاه حساس نیز با بیش تر شدن تنش، بیان *APX* افزایش یافت، ولی این مقدار قابل توجه نبود (شکل ۶). شاید بتوان گفت افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ Lin416 می تواند به علت ارتباط بین فراوانی ژن *APX* و مقاومت به خشکی در لاین ۴۱۶ باشد.

گزارش شده است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بیش ترین سهم را برای ایجاد مقاومت گیاهان به تنش خشکی در اثر حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند (Arora et al., 2002). افزایش تحمل به تنش اغلب با افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله *APX* در گیاهان همراه است (Xu et al., 2008). ساروار و همکاران (Sarowar et al., 2005) گزارش کردند که افزایش *APX*، فعالیت پراکسیدازی را افزایش می‌دهد و سیستم پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن را تقویت می‌کند و منجر به افزایش تحمل به تنش اکسایشی می‌شود. بیان بالای ژن *APX* باعث فعال شدن سایر ژن‌های دخیل در مسیر انتقال سیگنال شده و به برقراری هموستازی در درون سلول کمک می‌کند.

فو و هوانگ (Fu and Huang, 2001) گزارش کردند که توانایی سازگاری به تنش خشکی بستگی به حفظ و یا افزایش قابلیت سم‌زدایی رادیکال سوپراکسید توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد. *SOD* و *CAT* با افزایش فعالیت خود نقش کلیدی در حفاظت گیاهان در برابر تنش اکسیداتیو دارند. نتایج پژوهش دیگری نشان داد که این دو آنزیم الگوی تغییرات مشابهی داشتند، به طوری که در تنش خشکی ملایم، فعالیت آنزیم‌های *SOD* و *CAT* افزایش یافت، اما وقتی گیاه در معرض تنش شدیدتر خشکی قرار گرفت، کارایی این آنزیم‌ها کاهش یافت (Schwanz et al., 1996). در آزمایش دیگری مشاهده شد که *SOD* در ابتدای تنش خشکی افزایش یافت، اما با طولانی تر شدن دوره تنش خشکی، فعالیت این آنزیم کاهش یافت (Zhang and Kirkham, 1996). به طور کلی، محققان افزایش، کاهش و یا عدم تغییر *SOD* را در گونه‌های مختلف در شرایط خشکی گزارش کرده‌اند (Gunes et al., 2008; Tohidi-Moghadam et al., 2009). با توجه به این که *SOD* اولین سد دفاعی در برابر ROSها است، افزایش بیان *SOD* می‌تواند نشان‌دهنده تولید ROS بیش تر باشد. وانگ و همکاران (Wang et al., 2009) نشان دادند که با افزایش شدت خشکی، *SOD* کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که این اختلاف ناشی از نوع گونه گیاهی، مرحله رشد و نمو بافت گیاهی و شرایط محیطی باشد.

افزایش می‌یابد (Gill and Tuteja, 2010). کاهش بیان این آنزیم‌ها می‌تواند به علت کاهش سنتز آن‌ها و یا افزایش تخریب آن‌ها به دلیل تجمع گونه‌های فعال اکسیژن باشد (Fidalgo *et al.*, 2004).

افزایش *APX* در شرایط تنش خشکی در برنج نیز گزارش شده است (Boo and Jung, 1999; Morita *et al.*, 1999; Hefny *et al.*, 2000; Bonifacio *et al.*, 2011). در آزمایشی در برنج تراریخته نشان داده شده است که با افزایش تنش خشکی، فعالیت آنزیم *APX*

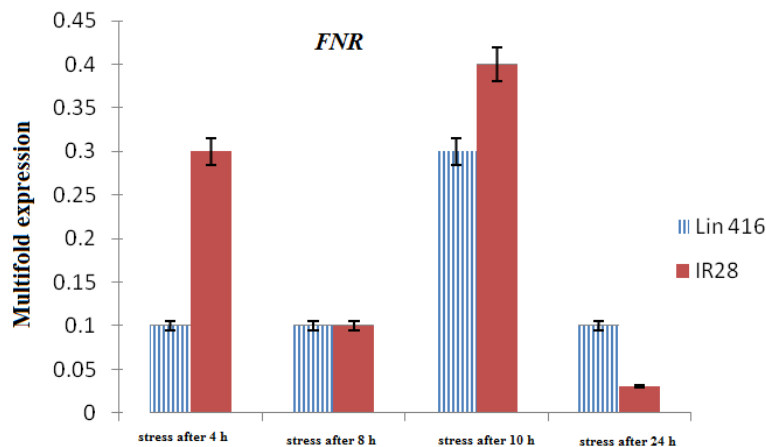


شکل ۶- الگوی بیان ژن *APX* با روش real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم برنج حساس و متحمل به خشکی
Figure 6. Expression pattern of *APX* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible and tolerant rice genotypes

شدن فردوکسین احیا شده می‌شود. از آنجایی که *FNR* وابسته به فتوسیستم I و II می‌باشد، به نظر می‌رسد که با سرکوب بیان این ژن از تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط این فتوسیستم‌ها جلوگیری و گیاه را از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو حفظ می‌کند. سوپراکسید یکی از انواع اکسیژن‌های فعال است که می‌تواند به شدت به غشاهای زیستی صدمه وارد کند، ولی این ترکیب توسط یکسری از آنزیم‌ها مانند سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز حذف می‌شود (Asada, 1999).

میزان بیان نسبی ژن فردوکسین *NADP(H)* ردوکتاز (*FNR*)

نتایج به دست آمده از مقایسه بیان ژن فردوکسین *NADP(H)* ردوکتاز در دو رقم برنج نشان داد که در رقم حساس در زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت پس از شروع اعمال تنش، و در رقم متحمل، در ۱۰ ساعت پس از اعمال تنش، بیش‌ترین مقدار بیان ژن مشاهده شد. به طور کلی، افزایش بیان این ژن در گیاه حساس بیشتر از متحمل بود (شکل ۷). آنزیم *FNR* با احیا کردن $NADP^+$ سبب اکسید



شکل ۷- الگوی بیان ژن *FNR* با روش real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم برنج حساس و متحمل به خشکی
Figure 7. Expression pattern of *FNR* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible and tolerant rice genotypes

در رقم متحمل Line 416 به‌طور کلی با افزایش سطوح تنش مقدار بیان ژن *NDH* نیز افزایش یافت، در حالی که در ژنوتیپ حساس IR28 به‌طور کلی با افزایش سطوح تنش میزان بیان این ژن کاهش یافت، به‌طوری که در رقم حساس در زمان چهار ساعت پس از اعمال تنش بیش‌ترین میزان بیان ژن مشاهده شد و با افزایش زمان، بیان ژن نیز کاهش یافت و در ۲۴ ساعت پس از تنش به کم‌ترین میزان خود رسید. در مقابل، در ژنوتیپ متحمل، در زمان چهار ساعت پس از اعمال تنش، بیان ژن کمی افزایش و در هشت ساعت پس از تنش، مقداری کاهش یافت و پس از آن دوباره افزایش یافت و در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش به بیش‌ترین مقدار خود رسید.

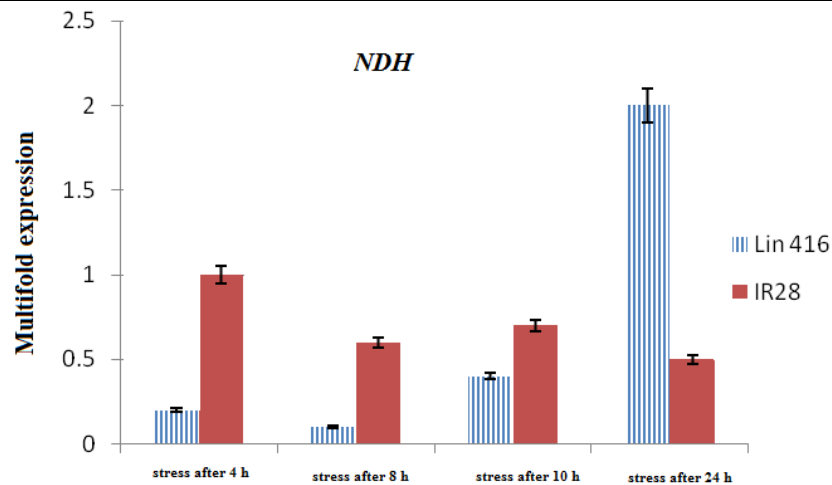
گیاه با انتقال الکترون چرخه‌ای در زمان تنش که تثبیت کربن کاهش می‌یابد، به‌جای تولید ATP و NADPH، از تجمع NADPH جلوگیری می‌کند (Wang et al., 2006). در تحقیق حاضر، میزان بیان ژن *NDH* در ژنوتیپ حساس در مقایسه با ژنوتیپ متحمل در زمان ۴، ۸ و ۱۰ ساعت پس از اعمال تنش، بیش‌تر بود و به‌نظر می‌رسد که میزان NADPH زیاد است و کمپلکس *NDH* در چرخه انتقال الکترون با تبدیل NADPH به NADP^+ سعی در کاهش تنش اکسیداتیو دارد. تاخیر انداختن مهار تنفسی با فراهم کردن شیب پروتون اضافی در مطالعه هوروات و همکاران (Horváth et al., 2000) نیز تأکید شده است. در ژنوتیپ متحمل Lin416 میزان بیان ژن *NDH* در ساعات ۴ و ۸ تغییر معنی‌داری نداشت، اما میزان بیان ژن *NDH* در ۲۴ ساعت افزایش و به بالاترین میزان رسید. می‌توان اظهار داشت که میزان NADPH تولید شده در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش در کلروپلاست زیاد شده و احتمالاً توانسته است با راه‌اندازی این آنزیم موجب کاهش NADPH شود. وانگ و همکاران (Wang et al., 2006) گزارش کردند که فعالیت ژن *NDH* موجب محافظت از زنجیره انتقال الکترون می‌شود.

افزایش بیان ژن *FNR* در IR28 در چهار ساعت اول پس از اعمال تنش باعث افزایش NADPH و در نهایت تنش اکسیداتیو می‌شود (Mittler et al., 2004). این افزایش بیان ژن *FNR* در ساعات ابتدایی که با تولید NADPH مواجه است، اگر از طریق مسیرهای دیگر مصرف نشود، برای گیاه خطرناک خواهد بود. بنابراین به نظر می‌رسد که ژنوتیپ حساس با یک تنش ابتدایی مواجه شده است. میزان بیان ژن *FNR* در ژنوتیپ حساس در هشت ساعت پس از تنش به‌مراتب کم‌تر از چهار ساعت بود و احتمالاً گیاه سعی دارد با سرکوب مسیر انتقال غیرخطی الکترون، میزان NADPH را کاهش دهد، اما مجدداً در ۱۰ ساعت پس از تنش، میزان بیان *FNR* افزایش و در ۲۴ ساعت پس از تنش، میزان بیان این ژن را مجدداً کاهش داد. پالاتنیک و همکاران (Palatnik et al., 1997) بیان کردند که اگر میزان NADPH تولید شده در کلروپلاست توسط سایر عوامل آنتی‌اکسیدان کنترل نشود، خطرات آسیب اکسیداتیو افزایش خواهد یافت. بنابراین تولید NADPH در زمان تنش باید کنترل شود.

بیان ژن *FNR* در ژنوتیپ متحمل Lin416 در ساعات ابتدایی (۴ و ۸ ساعت پس از اعمال تنش) کم بود و گیاه با کاهش بیان این ژن در ساعات ابتدایی، میزان تولید NADPH را کاهش داد که با کاهش این نسبت، تولید گونه‌های فعال اکسیژن نیز کاهش می‌یابد. اما در ۱۰ ساعت پس از اعمال تنش، میزان بیان ژن *FNR* افزایش یافت که نشان می‌دهد گیاه سعی دارد چرخه انتقال غیرخطی الکترون را راه‌اندازی کند و NADPH تولید شده را توسط چرخه کالوین به مصرف برساند. افزایش بیان ژن *FNR* در مطالعه لیتاماکی و همکاران (Lehtimäki et al., 2010) نیز قبلاً گزارش شده است.

میزان بیان نسبی ژن NADP(H) دهیدروژناز (*NDH*)

نتایج کلی به‌دست آمده از مقایسه بیان ژن *NDH* در دو ژنوتیپ متحمل و حساس برنج نشان داد (شکل ۸) که



شکل ۸- الگوی بیان ژن *NDH* با روش real-time PCR تحت تنش خشکی در دو رقم برنج حساس و متحمل به خشکی
Figure 8. Expression pattern of *NDH* gene using real-time PCR under drought stress in two susceptible and tolerant rice genotypes

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، تأثیر سطوح تنش اسمزی ناشی از اعمال ماده پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ بر مولفه‌های جوانه‌زنی بذر ژنوتیپ‌های برنج بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ، سطوح تنش و برهمکنش ژنوتیپ × تنش بر تمام صفات مورد بررسی معنی‌دار بود و صفات طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن آن‌ها در هر دو رقم حساس و متحمل کاهش یافت. کلروپلاست اندامک مهمی است که هنگام تنش خشکی به دلیل افزایش میزان ROS آسیب می‌بیند و باعث اختلال در فتوسنتز می‌شود. با توجه به نقش و اهمیت ژن‌های *FNR*، *SOD*، *NDH* و *APX* در تنظیم میزان ROS حاصل از متابولیسم طبیعی گیاه و تنش، همکاری این ژن‌ها در مدیریت تنش اکسیداتیو اهمیت به‌سزایی دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان همه ژن‌ها به‌غیر از *FNR* با افزایش تنش، افزایش یافت. همچنین، الگوی بیان این چهار ژن در ژنوتیپ‌های متحمل

و حساس در زمان‌های پس از اعمال تنش از الگوی خاصی تبعیت نکرد و به یکدیگر وابسته نبود، ولی در بعضی از ساعت‌ها این همبستگی وجود داشت. در ژنوتیپ متحمل Lin416 با طولانی شدن زمان تنش تا ۱۰ ساعت، واکنش نوری بر خلاف چرخه کالوین ادامه پیدا کرد و در نتیجه باعث افزایش *NADPH* شد و گیاه به‌دنبال راهکاری برای کاهش میزان آن و مقابله با تنش بود. به‌نظر می‌رسد که ژنوتیپ متحمل با کاهش بیان *FNR* در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و افزایش بیان ژن‌های *SOD* و *APX* به ترتیب با کاهش سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و نسبت *NADPH* به $NADP^+$ از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. بیش‌تر بودن میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی و نیز تفاوت در روند تغییرات بیان ژن در ساعات مختلف پس از اعمال تنش در ژنوتیپ متحمل نسبت به حساس، می‌تواند اثر مهمی بر میزان تحمل گیاه به تنش داشته باشد.

References

- Abarshahr, M., Rabiei, B. and Samizadeh Lahiji, H. 2011. Assessing genetic diversity of rice varieties under drought stress conditions. *Notulae Scientia Biologicae* 3: 114-123.
- Aliakbari, M. and Razi, H. 2013. Isolation of *Brassica napus* *MYC2* gene and analysis of its expression in response to water deficit stress. *Molecular Biology Research Communications* 2: 63-71.
- Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 1227-1238.

- Asada, K. 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology* 50: 601-639.
- Bonifacio, A., Martins, M. O., Ribeiro, C. W., Fontenele, A. V., Carvalho, F. E. L., Margis-Pinheiro, M. and Silveira, J. A. G. 2011.** Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant, Cell and Environment* 34: 1705-1722.
- Boo, Y. C. and Jung, J. 1999.** Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *Journal of Plant Physiology* 155: 255-261.
- Ciarmiello, Loredana F., Pasqualina Woodrow, Amodio Fuggi, Giovanni Pontecorvo and Petronia Carillo 2011.** Plant genes for abiotic stress. In: Shanker, A. and Venkateswarlu, B. (Eds.). *Abiotic stress in plants: Mechanisms and adaptations*. InTechOpen Publications. pp: 283-308.
- Covarrubias, A. A. and Reyes, J. L. 2010.** Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell and Environment* 33: 481-489.
- Danyali, S. F., Moghaddam Vahed, S. M., Alavikia, S. S., Samizadeh Lahiji, H. and Norouzi, M. 2019.** Effects of drought on expression patterns of genes encoding the antioxidant enzymes associated with chloroplasts in wheat. *Biologia Plantarum* 63: 575-585.
- Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I. and Salema, R. 2004.** Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annals of Applied Biology* 145: 185-192.
- Fu, J. and Huang, B. 2001.** Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105-114.
- Fulda, S., Mikkat, S., Stegmann, H. and Horn, R. 2011.** Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biology* 13: 632-642.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A. and Coban, S. 2008.** Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress. I: Growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 1885-1903.
- Hefny, M., Abdel-Kader, D. Z., Abdel-Kader, D. Z., Able, A. J., Sutherl, M. W., Guest, D. I., Acar, D., Turkan, L., Ozdemir, F. and Aebi, H. E. 2000.** Water-induced oxidative stress and antioxidant defenses in rice plants. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 1: 59-71.
- Higuchi-Takeuchi, M., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, K., Hasegawa, Y., Kawashima, M., Sonoike, K., Mori, M., Hirochika, H. and Matsui, M. 2011.** Functional analysis of two isoforms of leaf-type ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase in rice using the heterologous expression system of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157: 96-108.
- Horváth, E. M., Peter, S. O., Joët, T., Rumeau, D., Cournac, L., Horváth, G. V., Kavanagh, T. A., Schäfer, C., Peltier, G. and Medgyesy, P. 2000.** Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiology* 123: 1337-1350.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2009.** Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology* 11: 100-105.
- Khanna-Chopra, R. and Selote, D. S. 2007.** Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60: 276-283.
- Lehtimäki, N., Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Aro, E. M. and Mulo, P. 2010.** Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer. *Journal of Plant Physiology* 167: 1018-1022.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Marmagne, A., Brabant, P., Thiellement, H. and Alix, K. 2010.** Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: Transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New Phytologist* 186: 216-227.
- Michel, B. E. and Kaufmann, M. R. 1973.** The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.

- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** 9: 490-498.
- 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: 1-13. (In Persian with English Abstract).
- Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T. and Tanaka, K. 1999.** Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress: The involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. **Plant and Cell Physiology** 40: 417-422.
- Palatnik, J. F., Valle, E. M. and Carrillo, N. 1997.** Oxidative stress causes ferredoxin-NADP+ reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. **Plant Physiology** 115: 1721-1727.
- Pasandideh Arjmand, M., Samizadeh Lahiji, H. and Mohsenzadeh Golfazani, M. 2017.** The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*). **Crop Biotechnology** 7: 31-42. (In Persian with English Abstract).
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G. and Perrotta, C. 2006.** Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant, Cell and Environment** 29: 2152-2143.
- Safaei Chaeikar, S., Rabiei, B. and Rahimi, M. 2018.** Evaluation of drought tolerance indices in rice genotypes (*Oryza sativa* L.). **Journal of Crop Breeding** 10: 7-18. (In Persian with English Abstract).
- Hosseini Salekdeh, Gh, Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B. and Bennett, J. 2002.** Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics** 2: 1131-1145.
- Saeedfar, S., Negahban, M. and Soorestani, M. M. 2015.** The effect of drought stress on the essential oil content and some of the biochemical characteristics of anise hyssop. **European Journal of Molecular Biotechnology** 8: 103-114.
- Sales, C. R., Ribeiro, R. V., Silveira, J. A., Machado, E. C., Martins, M. O. and Lagoa, A. M. M. 2013.** Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry** 73: 326-336.
- Sarowar, S., Kim, E. N., Kim, Y. J., Ok, S. H., Kim, K. D., Hwang, B. K. and Shin, J. S. 2005.** Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. **Plant Science** 169: 55-63.
- Schwanz, P., Häberle, K. H. and Polle, A. 1996.** Interactive effects of elevated CO₂, ozone and drought stress on the activities of antioxidative enzymes in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karsten) grown with luxurious N-supply. **Journal of Plant Physiology** 148: 351-355.
- Sgherri, C. L. M., Maffei, M. and Navari-Izzo, F. 2000.** Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal of Plant Physiology** 157: 273-279.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. 2005.** Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation** 46: 209-221.
- Tohidi-Moghadam, R., Shirani-Rad, A. H., Nour-Mohammadi, G., Habibi, D. and Mashhadi-Akbar-Boojar, M. 2009.** Effect of super absorbent application on antioxidant enzyme activities in canola (*Brassica napus* L.) cultivars under water stress conditions. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences** 4: 215-223.
- 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: 15-28. (In Persian with English Abstract).
- Venuprasad, R., Lafitte, H. R. and Atlin, G. N. 2007.** Response to direct selection for grain yield under drought stress in rice. **Crop Science** 47: 285-293.
- Wang, N., Qian, W., Suppanz, I., Wei, L., Mao, B., Long, Y., Meng, J., Müller, A. E. and Jung, C. 2011.** Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) is associated with allelic variation in the *FRIGIDA* homologue *BnaA.FRI.a*. **Journal of Experimental Botany** 62 (15): 5641-5658.

- Wang, P., Duan, W., Takabayashi, A., Endo, T., Shikanai, T., Ye, J.-Y. and Mi, H. 2006.** Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. **Plant Physiology** 141: 465-474.
- Wang, W.-B., Kim, Y.-H., Lee, H.-S., Kim, K.-Y., Deng, X.-P. and Kwak, S.-S. 2009.** Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiology and Biochemistry** 47: 570-577.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y. and Shi, J. 2008.** Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food chemistry** 106: 545-551.
- Yang, B., Srivastava, S., Deyholos, M. K. and Kav, N. N. V. 2007.** Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Science** 173: 156-171.
- Yao, Z. J., Ye, J. Y. and Mi, H. 2001.** The role of chloroplast Ndh complex in resisting heat stress in tobacco strain. Proceedings of The 12th International Congress on Photosynthesis. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Zeinali, E., Soltani, A. and Galeshi, S. 2002.** Response of germination components salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Iranian Journal of Agricultural Science** 33: 137-145. (In Persian with English Abstract).
- Zhang, J. and Kirkham, M. B. 1996.** Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. **New phytologist** 132: 361-373.



Studying expression of some genes associated with drought stress in rice (*Oryza sativa* L.)

Mohammad Mohsenzadeh Golfazani¹, Samaneh Aghaeepour Limoe², Habibollah Samizadeh Lahiji^{3*} and Shapour Abdollahi⁴

Received: November 3, 2019

Accepted: January 19, 2020

Abstract

To investigate the effect of osmotic stress induced by polyethylene glycol 6000 on seed germination components and identifying drought tolerant and susceptible genotypes, 21 rice genotypes were studied at three levels of osmotic stress (0, -7.5 and -15 MPa) with factorial arrangement in a completely randomized design with three replications. The results indicate that there were significant differences among genotypes in different levels of osmotic stress for all studied traits including radicle length, shoot length, radicle to shoot length ratio, radicle fresh weight, radicle dry weight, shoot fresh weight and shoot dry weight. The effect of genotype and genotype osmotic stress interaction were significant in all studied components. Based on measured traits, the genotypes IR28 and Line 416 were selected as susceptible and tolerant genotypes to osmotic stress, respectively. After RNA extraction and cDNA synthesis, the expression pattern of four drought responsive genes (*SOD*, *FNR*, *APX* and *NDH*) in two genotypes, IR28 and 416, at seedling stage under treatments of 0, 4, 8, 10 and 24 hours of the dehydration stress were studied using real time PCR technique. The results of this study showed that drought responsive genes had higher expression in the tolerant Line 416 than the sensitive genotype IR28 and the expression of all genes except *FNR* increased with increasing osmotic stress. Also, *APX* gene didn't show the significant expression in either genotype, but showed the highest expression at 24 hours after stress in the sensitive genotype IR28.

Keywords: cDNA, Osmotic stress, PEG, Real Time PCR, Seed germination components

1. Assist. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Graduated M. Sc., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

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

4. Researcher, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht, Iran

* Corresponding author: hsamizadeh@guilan.ac.ir