

(مقاله پژوهشی)

تحقیقات غلات

دوره دهم / شماره سوم / پاییز ۱۳۹۹ (۲۰۲۰-۲۰۷)

الگوی بیان ژن‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی برگ برنج در پاسخ به تنش آهن

مریم پسندیده ارجمند^۱، محمد محسن‌زاده گلفزانی^{۲*} و حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۵

چکیده

سمیت آهن سبب اکسیدشدن رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سرانجام کاهش رشد و عملکرد در برنج می‌شود. با توجه به اهمیت و تاثیر کمبود یا مازاد آهن بر رشد گیاهان زراعی، این پژوهش به منظور بررسی اثر آهن بر میزان بیان نسبی ژن‌های *AOX*، *EX-NDH*، *JN-NDH*، *FTR*، *NDH* و *NTR* در دو ژنوتیپ حساس (IR64) و متحمل (Pokkali) برنج انجام شد. یون آهن در سطوح صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تحت شرایط هیدروپونیک در محلول یوشیدا اعمال شد. نتایج نشان داد که افزایش میزان آهن محلول غذایی، سبب افزایش میزان آهن محلول در برگ در هر دو ژنوتیپ شد. اعمال سطوح مختلف آهن تفاوت معنی‌داری در میزان پتاسیم محلول در برگ ژنوتیپ IR64 ایجاد نکرد، اما سبب افزایش میزان پتاسیم نسبت به نمونه‌های شاهد در ژنوتیپ Pokkali شد. بیان تمامی ژن‌های مورد مطالعه در همه سطوح تنش، به غیر از *NDH* و *IN-NDH* در سطوح ۲۵۰ و ۴۰۰ و *NTR* در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن، در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. افزایش بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali نسبت به IR64 و نیز تفاوت در روند تغییرات بیان ژن در سطوح مختلف آهن ممکن است تاثیر معنی‌داری بر میزان تحمل گیاه به سمیت ناشی از آهن داشته باشد و افزایش بیان این ژن‌ها به تنهایی یا با هم‌دیگر می‌تواند عامل مهمی در خنثی‌سازی تاثیرات مضر انواع گونه فعال اکسیژن باشد.

واژه‌های کلیدی: آلترناتیو اکسیداز، بیان نسبی ژن، پتاسیم، فردوکسین، هیدروپونیک

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

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

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

* نویسنده مسئول: mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com

مقدمه

از آن برای تحمل تنش استفاده می‌کند مسیر تیورکسی‌ردوکسین می‌باشد (He *et al.*, 2017). در گیاهان، TRXها اجزائی از سیستم اکسید و احیا می‌باشند که در اندامک‌های مختلف سلول‌ها یافت می‌شوند (Pessarakli, 1999). سیستم فروکسین در کلروپلاست قرار دارد و شامل فردوکسین (Fd)، یک پروتئین حاوی آهن-گوگرد، فردوکسین-تیورکسی‌ردوکتاز (FTR) و TRXهای *m*، *f*، *x* و *y* می‌باشد (Schürmann and Jacquot, 2000; Gelhaye *et al.*, 2005). نقش TRX بسیار مهمی در تنظیم متابولیسم و همچنین پاسخ به تنش های محیطی دارد (Balsera and Buchanan, 2019) و می‌تواند سبب بهبود عملکرد فتوسنتز در شرایط تنش شود (Nikkanen *et al.*, 2017).

آنزیم *NADPH-dependent thioredoxin reductases (NTR)* از آنزیم‌های کلیدی تنظیم کننده حالت احیا در سیستم thioredoxin (TRX) است که قدرت احیاکنندگی برای پراکسیداز و اکسیدوردکتاز را فراهم می‌کند (Cha *et al.*, 2014). در آراییدوپسیس و برنج سه *NTR* با فعالیت دی‌سولفید ردوکتازی به نام‌های *NTRA*، *NTRB* و *NTRC* که به ترتیب در نواحی مختلف سلولی سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست مکان یافته‌اند، وجود دارد (Cha *et al.*, 2015; Serrato *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد *NTRC* مثالی خوب از پروتئین‌های واجد عملکرد چندگانه با نقش‌های مختلف هستند که وابسته به سوبسترای در دسترس می‌باشند (Zagorchev *et al.*, 2013). نقش حیاتی *NTRC* کلروپلاست در مهار ROS با دیدن فنوتیپ رنگ سبز پریده در برگ‌های آراییدوپسیس‌های جهش یافته در ژن *ntrc* دیده می‌شود (Lepistö *et al.*, 2009). سراتو و همکاران (Serrato *et al.*, 2004) نیز عنوان کردند که بین *NTRC* با تنش‌های محیطی فیزیولوژی، پاسخ به خشکی، شوری، گرما و استرس اکسیداتیو ارتباط وجود دارد.

برنج همانند بسیاری از گیاهان زراعی نسبت به تنش آهن آسیب‌پذیر است و خسارت ناشی از آن یکی از علل عمده کاهش محصول است. لذا در این تحقیق سعی می‌شود تا میزان بیان برخی رونوشت‌های ژن‌ها در شرایط تنش سمیت آهن و بدون تنش، در ژنوتیپ متحمل و حساس برنج با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شود تا شناخت مناسبی برای شناسایی عکس العمل گیاه برنج به تنش آهن فراهم آید.

تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند سمیت و کمبود مواد معدنی، فلزات سنگین، شوری، خشکی، سرما، آفت‌ها و بیماری‌های مختلف سالانه سبب کاهش چشمگیر عملکرد برنج در سراسر جهان می‌شوند (Aung *et al.*, 2018). آهن در تنفس، تقسیم سلولی، سنتز کلروفیل و زنجیره انتقال الکترون نقش بسیار حیاتی دارد، اما به عنوان کاتالیزور در واکنش فنتون (Fenton) نیز شرکت کرده و جذب بیش از حد آن توسط گیاه سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) و آسیب به سلول می‌شود (Onyango *et al.*, 2019). افزایش ROS سبب پراکسیداسیون لیپید، تخریب پروتئین، موتاسیون در DNA و انواع آسیب‌های اکسیداتیو سلولی می‌شود (Avramova *et al.*, 2017).

ارقام متحمل از طریق مکانسیم‌های دفاعی مختلف خسارت کم‌تری نسبت به ارقام حساس می‌بینند (Audebert and Sahrawat, 2000). در شرایط تنش افزایش رادیکال‌های آزاد سبب شروع مسیر علامت‌دهی و فعال شدن سیستم دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی و همچنین تغییر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Nahar *et al.*, 2018; Qureshi *et al.*, 2018).

در زنجیره انتقال الکترون NAD(P)H میتوکندریایی توسط کمپلکس ۱ و سیتوکروم C اکسیداز اکسید شده و در نهایت ATP تولید می‌شود. با کاهش فتوسنتز در شرایط تنش، انرژی دریافتی مازاد در مسیر تنفسی جایگزین که یک مسیر میان‌بر مهم در زنجیره انتقال الکترون گیاهان است، به‌صورت گرما آزاد می‌شود. آنزیم‌های AOX، NAD(P)H دهیدروژناز داخلی و خارجی (IN-NDH) و EX-NDH از آنزیم‌های بسیار مهم در مسیر جایگزین هستند (Wanniarachchi *et al.*, 2018).

یکی از تفاوت‌های میتوکندری گیاهان نسبت به میتوکندری جانوران وجود آلترناتیو اکسیداز (AOX) است (Feng *et al.*, 2010). آنزیم آلترناتیو اکسیداز یک اکسیداز مقاوم در برابر سیانید است که با دریافت الکترون از یوبی کوینول، احیای اکسیژن به آب را کاتالیز می‌کند (Li *et al.*, 2013). همچنین AOX در بهینه‌سازی متابولیسم تنفسی نقش مهمی دارد (Rasmusson *et al.*, 2009) و در بسیاری از تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Moore *et al.*, 2013; Sunil *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018). AOX توسط یک خانواده چندژنی کوچک هسته‌ای کد می‌شود. مسیر دیگری که در شرایط تنش گیاه

مواد و روش‌ها

کشت هیدروپونیک برنج و اعمال تنش آهن

بذر دو ژنوتیپ Pokkali (متحمل به سمیت آهن) و IR64 (حساس به سمیت آهن) برنج (Dufey *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014) از مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) تهیه شد و این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه گیلان اجرا شد. بذرهای ابتدا با آب مقطر شسته و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی و مجدداً با آب مقطر شستشو شد. پس از آن، بذرهای به‌منظور جوانه‌زنی، به مدت چهار روز در پتری‌دیش استریل در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سلسیوس و روشنایی ۵۵۰۰ لوکس قرار داده شدند. بذرهای دارای ریشه‌چه و ساقه‌چه سالم به محیط کشت هیدروپونیک حاوی محلول یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1971) در گلدان‌های با حجم یک لیتری انتقال داده شدند. تعویض محلول یوشیدا و کنترل اسیدیته آن به طور روزانه انجام شد. به منظور کنترل و تثبیت اسیدیته محلول در میزان ۵/۵ تا ۶ از پتاسیم هیدروکسید (KOH) ۶ مولار (۵۶ گرم بر لیتر) و اسید سولفوریک (H_2SO_4) ۲ نرمال استفاده شد. با توجه به میزان مقاومت ارقام و شرایط محیطی، تنش آهن در سطوح مختلف ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمار شاهد در مرحله چهارم برگی به شکل Fe-EDTA در گلدان‌های حاوی محلول یوشیدا اعمال شد (Mehraban and Abdolzadeh, 2012). همچنین برای هر نمونه از سطح صفر آهن به عنوان شاهد استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان آهن و پتاسیم محلول در برگ

میزان آهن و پتاسیم محلول در برگ در سه تکرار به ترتیب با استفاده از دستگاه‌های اسپکترومتر جذبی اتمی (Atomic Absorption Spectrometer- SpectraAA) و شعله‌سنج (Flame-photometer; ELCO CL 220) اندازه‌گیری شد (Estefan *et al.*, 2013).

اندازه‌گیری بیان نسبی ژن

به منظور استخراج RNA برگ برنج از کیت استخراج RNA دنازیست (S-1010) بر اساس دستورالعمل مربوطه استفاده شد. پس از استخراج، تیمار DNase برای نمونه‌ها اجرا و سپس کمیته و کیفیت نمونه‌های استخراج شده به ترتیب توسط نانودراپ و ژل الکتروفورز آگارز یک درصد اندازه‌گیری شد. جهت یکسان کردن غلظت‌های RNA

استخراج‌شده برای سنتز cDNA از غلظت یکسان ۵۰۰ نانوگرم برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Revert Aid Reverse Transcriptase و M-MLV بر اساس دستورالعمل کیت سنتز شرکت فرمنتاز (Fermentas LIFE SCIENCE; K1621) انجام شد. توالی ژن‌ها بر اساس اطلاعات موجود در NCBI دریافت و آغازگرها با برنامه Primer3 و Tcoffeه طراحی شد (جدول ۱). سپس بر اساس معیارهای درصد GC، طول تکثیر، عدم هم‌چسبی و اختصاصی بودن، آغازگرهای مورد نیاز انتخاب و صحت طراحی آغازگر توسط BLAST در NCBI مجدداً بررسی شد. برای بررسی بیان ژن در Real time PCR از دستگاه Bio-Rad (CFX Manager™) و مستر Real Time (Syber green Master mix) شرکت Bioron Life Science استفاده شد. برای اجرای Real time-PCR مواد مورد نیاز هر نمونه در سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی به‌طور جداگانه اضافه شد. برای کنترل صحت تکثیر هر ژن، یک کنترل منفی حاوی همه مواد مورد نیاز واکنش Real time-PCR به غیر از cDNA نیز در نظر گرفته شد. چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۹ سیکل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، پس از آن اتصال آغازگر بر اساس دمای اتصال (جدول ۱) به مدت ۲۰ ثانیه، سپس مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه بود (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2019; Vahedi *et al.*, 2019).

جهت به دست آوردن راندمان PCR برای ژن‌های مورد مطالعه از یک cDNA رقت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ تهیه شد و بعد از انجام واکنش، کارایی تکثیر ۹۹ درصد به دست آمد. جهت نرمال‌سازی داده‌ها و مقایسه بیان ژن‌های مورد نظر در فرایند Real time-PCR از معادله لیواک (Livak and Schmittgen, 2001) و ژن *Actin* به‌عنوان ژن مینا 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). برای مقایسه ستون‌ها از خطای استاندارد (SE) استفاده و سطح معنی‌دار بیولوژیک نیز دو برابر بیان نسبی در نظر گرفته شد (Pasandideh Arjmand *et al.*, 2017; Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2019; Vahedi *et al.*, 2019).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها در برنج

Table 1. Primer pairs used for relative expression analyses of genes in rice

Gene	Primer sequence	Melting temperature (°C)	PCR production length	NCBI accession number
<i>Actin-F</i>	AGCAACTGGGATGACATGGA	58	176	AF_111812
<i>Actin-R</i>	GCRACATACATRCWGGGAC			
<i>AOX1-F</i>	CGTCGAGTGGAAAGTGGTCT	58	155	AB074005.1
<i>AOX1-R</i>	GGAAGAAGATGTCAGTGGGC			
<i>IN-NDH-F</i>	TAAGCATCTGGGGAGCATGG	58	151	LOC4327426
<i>IN-NDH-R</i>	CCTCCAGCTAACAACACGAG			
<i>EX-NDH-F</i>	CCCATTCCGGTACAAGCATC	60	189	LOC4341876
<i>EX-NDH-R</i>	ATGAACCTCCGAGTCCAGTC			
<i>NDH-F</i>	GTACATCAACCCGGAGACCA	61	176	LOC4336530
<i>NDH-R</i>	GAAGCGTGACTCTGACAGC			
<i>FTR-F</i>	TCTGTTCCGAGAAGTCCGTC	61	167	LOC4346508
<i>FTR-R</i>	TTCCTTCCTCTCACGCATGG			
<i>NTR-F</i>	GACACGGGAGAGGAATCAGT	58	193	LOC4344159
<i>NTR-R</i>	GCCTCCATTCATGATCCTGC			

نتایج و بحث

میزان بیان نسبی ژن *AOX1*

میزان بیان نسبی ژن *AOX1* در تمامی سطوح تنش در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود (شکل ۱). در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی این ژن در Pokkali در بیش‌ترین حد خود بود، به‌طوری که میزان بیان نسبی ژن *AOX1* در این سطح در ژنوتیپ Pokkali تقریباً ۳۰ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن نیز افزایش بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali نسبت به IR64 به‌ترتیب ۶، ۱۶ و ۶ برابر بود. در بسیاری از مطالعات افزایش بیان ژن *AOX* در شرایط تنش‌های محیطی مانند سمیت فلزات سنگین و مواد معدنی، گرما، خشکی، شوری و غیره گزارش شده است (Borovik and Grabelnych, 2018; Panda et al., 2013; Vanlerberghe et al., 2016; Wanniarachchi et al., 2018).

در سطوح مختلف تنش، میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 تفاوت معنی‌داری نداشت. عدم تغییر در روند بیان ژن در ژنوتیپ IR64 ممکن است سبب کاهش توانایی گیاه در شرایط تنش شود. مسیر آلترناتیواکسیداز یکی از راه‌های مهم کاهش میزان تولید انواع اکسیژن فعال در اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری است (Edreva, 2005; Mittler, 2002). افزایش بیان ژن *AOX1* برای جلوگیری از آسیب رسیدن به فرایند فتوسنتز و تعدیل تولید ROS ضروری است (Fu et al., 2012). فقدان *AOX1* توانایی تحمل و یا رشد را در تنش کاهش می‌دهد. همچنین بیان بیش از حد *AOX1* می‌تواند با تولید ROS کم‌تر

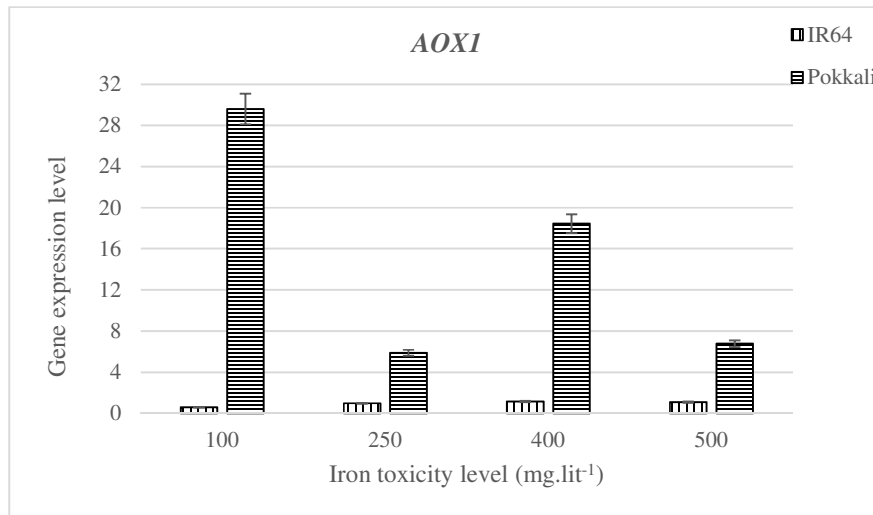
توانایی تحمل به تنش را افزایش دهد (Vanlerberghe et al., 2009). با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali میزان بیان نسبی این ژن حدوداً ۵ برابر کاهش یافت. مجدداً با افزایش سطح تنش به ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن میزان بیان نسبی این ژن حدوداً ۳ برابر افزایش و سپس کاهش یافت. احتمالاً در سطح کم تنش میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ متحمل افزایش می‌یابد تا توانایی تحمل به رادیکال‌های آزاد را افزایش دهد. اعمال سطوح بیش‌تر تنش سبب کاهش بیان این ژن شد و مجدداً بیان افزایش یافت در حالی که میزان بیان نسبی ژن *AOX1* در ژنوتیپ IR64 با افزایش سطح تنش تغییری نداشت.

اعمال تنش آهن در سطوح کم‌تر سبب افزایش بیان ژن *AOX* در رقم متحمل شد تا خسارت ناشی از ROS را کاهش دهد. آلترناتیو اکسیداز سبب اکسیده شدن NADPH بدون تولید ATP می‌شود. فعال شدن این مسیر جایگزین از تشکیل انواع اکسیژن فعال پیشگیری می‌کند و موجب می‌شود که فشار الکترون موجود روی زنجیره انتقال الکترونی کاهش یابد. با فعال شدن آلترناتیو اکسیداز، سلول می‌تواند تولید پراکسیدهدیدروژن را کاهش دهد (Edreva, 2005).

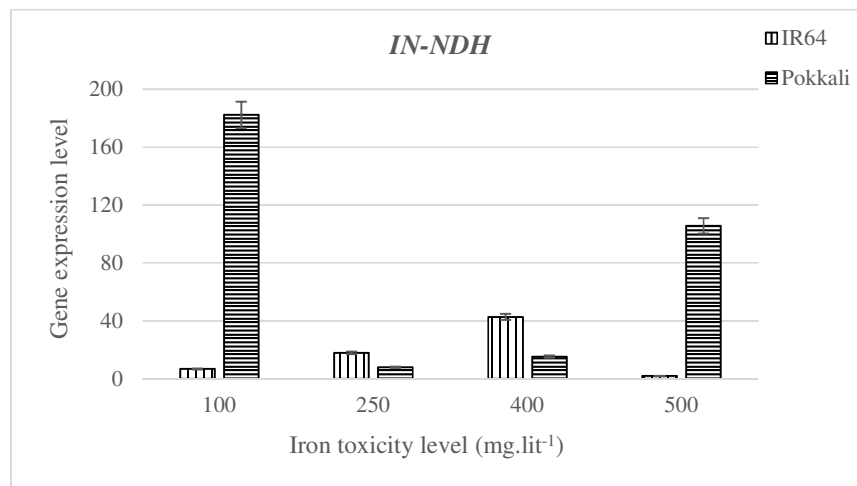
بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *IN-NDH* در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن مشاهده شد (شکل ۲). افزایش سطح تنش سبب شد که میزان بیان نسبی این ژن ۲۰۰ برابر کاهش یابد. میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر حدوداً ۱۰۰ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. افزایش سطح

گندم و سایر گیاهان در شرایط مزرعه نشان داد که در اثر تنش شوری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان ژنوتیپ‌های مورد آزمایش افزایش یافته است (Hidalgo et al., 2006; Stepien and Klobus, 2005). در پژوهشی مشخص شد که ژن‌های مسیر جایگزین مانند *AOX*، *EX-NDH* و *NDH* سبب افزایش مقاومت گیاه آرابیدوپسیس به تنش-های محیطی می‌شوند (Sweetman et al., 2019).

تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ و سپس ۴۰۰ میلی گرم در لیتر در ژنوتیپ IR64 سبب افزایش حدوداً ۳ و ۲ برابر میزان بیان نسبی این ژن شد و در این سطوح این میزان بیشتر از ژنوتیپ Pokkali بود. افزایش سطح تنش از ۴۰۰ به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ IR64 سبب کاهش ۲۳ برابری بیان این ژن شد. بررسی فعالیت آنتی اکسیدان‌ها و تنش اکسیداتیو ناشی از شوری در لاین‌های تریتیکاله و



شکل ۱- الگوی بیان ژن *AOX* با روش real time PCR تحت تنش سمیت آهن در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
Figure 1. Expression pattern of *AOX* gene using real-time PCR under iron toxicity in two rice genotypes, Pokkali and IR64

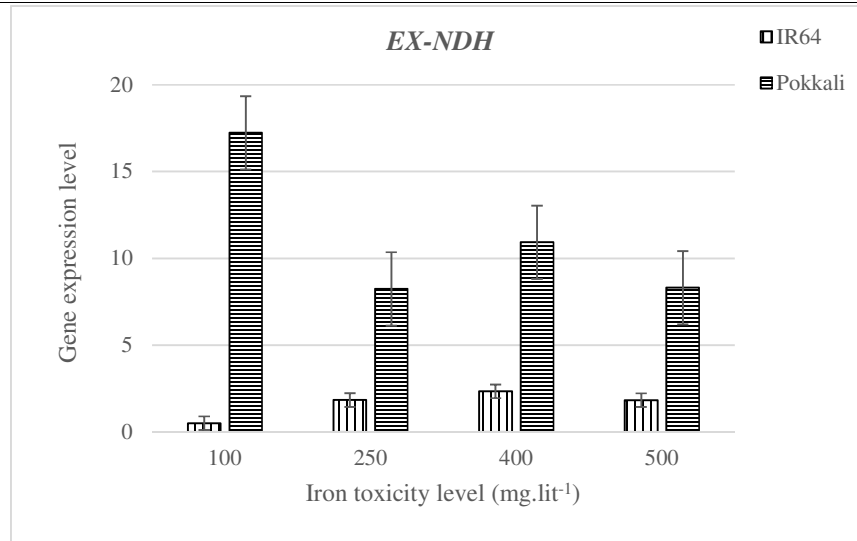


شکل ۲- الگوی بیان ژن *IN-NDH* با روش real time PCR تحت تنش سمیت آهن در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
Figure 2. Expression pattern of *IN-NDH* gene using real-time PCR under iron toxicity in two rice genotypes, Pokkali and IR64

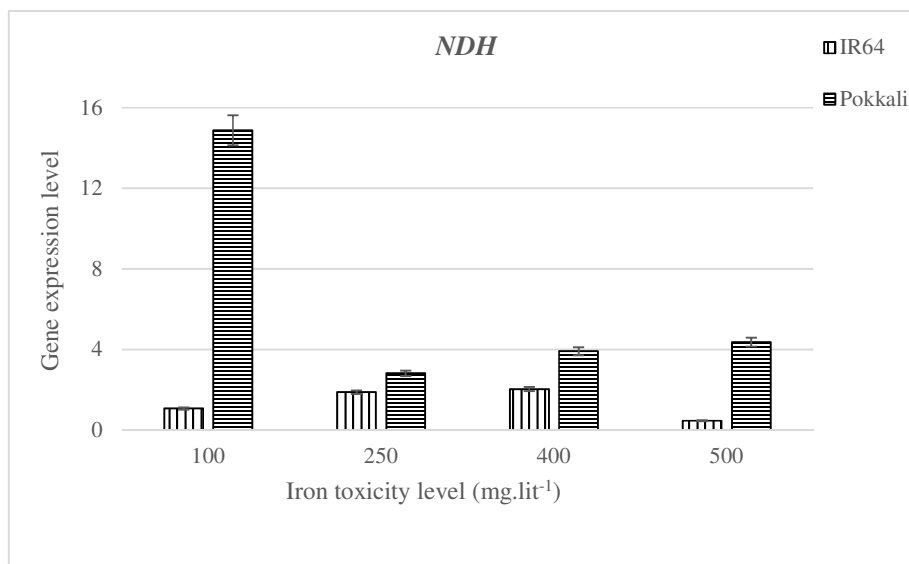
NDH ایجاد نکرد، اما با افزایش سطح تنش آهن به ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش معنی‌دار بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 شد. میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در سطوح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن، به‌ترتیب در حدود ۱۴ و ۴ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود، اما در سطوح ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان بیان نسبی این ژن بین دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 تفاوت معنی‌داری نشان نداد. افزایش بیان هم‌زمان ژن‌های *AOX* و *NDH* در اثر اعمال تنش‌های محیطی و شیمیایی در گیاه برنج قبلاً نیز گزارش شده است (Wanniarachchi *et al.*, 2018).

در کلروپلاست، انتقال الکترون غیرچرخه‌ای سبب تولید *ATP* و *NADPH* می‌شود، در حالی که انتقال الکترون چرخه‌ای فقط باعث سنتز *ATP* بدون تجمع *NADPH* می‌شود (Peng *et al.*, 2011). در انتقال الکترون چرخه‌ای، کمپلکس *NDH* با تبدیل *NADPH* به *NADP⁺* سبب انتقال الکترون به پلاستوکوئنون خواهد شد و از این طریق میزان *NADPH* را کاهش می‌دهد (Wang *et al.*, 2006). گیاه با این انتقال الکترون چرخه‌ای در زمان تنش که تثبیت کربن کاهش می‌یابد، به جای تولید *ATP* و *NADPH*، از تجمع *NADPH* جلوگیری می‌کند. با وجود کاهش معنادار بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali در سطوح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. اعمال تنش آهن به طور کلی سبب کاهش معنی‌دار بیان این ژن شد. کاهش بیان این ژن ممکن است به این دلیل باشد که با اعمال تنش و در نتیجه افزایش انتقال الکترون چرخه‌ای، گیاه سعی در کاهش میزان بیان ژن *NDH* دارد تا انتقال الکترون غیرچرخه‌ای بیش‌تر به وقوع بپیوندد. با این حال، میزان بیان نسبی این ژن در سطوح پایین و بالای تنش آهن در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از IR64 است و به نظر می‌رسد که تفاوت میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ‌های مختلف در سطوح کم و خیلی زیاد سبب تفاوت در میزان مقاومت گیاهان نسبت به تنش آهن می‌شود.

بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *EX-NDH* در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali بود (شکل ۳). در تمام سطوح تنش میزان بیان نسبی ژن *EX-NDH* در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان بیان نسبی ژن *EX-NDH* در ژنوتیپ Pokkali کاهش یافت. افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن تفاوت معناداری در بیان این ژن در ژنوتیپ Pokkali ایجاد نکرد. میزان بیان نسبی ژن *EX-NDH* در ژنوتیپ IR64 با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. افزایش سطوح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن تفاوت معنی‌داری در بیان این ژن در ژنوتیپ IR64 ایجاد نکرد. بیش‌ترین میزان تفاوت در بیان این ژن در ژنوتیپ‌ها در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بود. به طوری میزان بیان نسبی این ژن در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali حدوداً ۳۵ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. اعمال سطوح تنش بیش‌تر سبب کاهش تفاوت میزان بیان نسبی ژن‌ها در دو ژنوتیپ شد، به طوری که میزان بیان نسبی این ژن در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali حدوداً شش برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. در مطالعه‌ای که محسن‌زاده گلفزانی و همکاران (Mohsenzadeh *et al.*, 2017) انجام دادند، گزارش کردند که در ژنوتیپ حساس میزان بیان ژن *EX-NDH* در آغاز اعمال تنش افزایش یافت، ولی در ژنوتیپ متحمل در ساعت پایانی افزایش تصاعدی بیان ژن مورد نظر مشاهده شد. آن‌ها اعلام کردند که با توجه به اهمیت فعالیت ژن‌های *UCP*، *AOX* و *EX-NDH* در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل، کاهش فعالیت این ژن‌ها باعث تشدید تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت این ژن‌ها باعث کاهش تنش اکسیداتیو خواهد شد. بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *NDH* در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۴). افزایش سطح تنش سبب کاهش میزان بیان نسبی این ژن شد. اعمال تنش در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ IR64 تفاوت معنی‌داری در بیان ژن



شکل ۳- الگوی بیان ژن *EX-NDH* با روش Real time PCR تحت تنش سمیت آهن در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
 Figure 3. Expression pattern of *EX-NDH* gene using real-time PCR under iron toxicity in two rice genotypes, Pokkali and IR64



شکل ۴- الگوی بیان ژن *NDH* با روش real time PCR تحت تنش سمیت آهن در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
 Figure 4. Expression pattern of *NDH* gene using real-time PCR under iron toxicity in two rice genotypes, Pokkali and IR64

میلی گرم در لیتر در ژنوتیپ IR64 تفاوت معنی‌داری در میزان بیان نسبی ژن *FTR* ایجاد نکرد. افزایش سطح تنش از ۴۰۰ به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش معنی‌دار بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali شد.

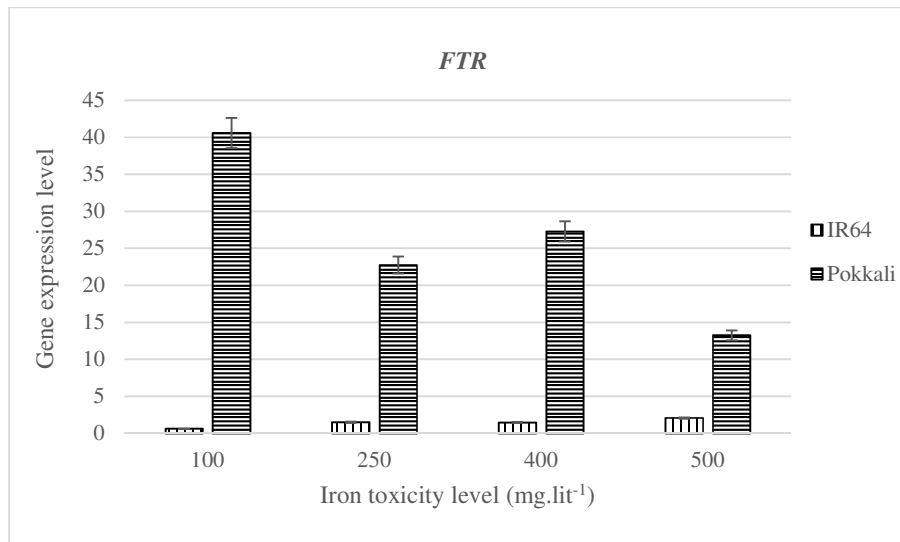
روند بیان نسبی ژن *FTR* در دو ژنوتیپ متفاوت بود، به طوری که با افزایش سطح تنش میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 روند افزایشی و در ژنوتیپ Pokkali روند کاهشی داشت. در سیستم تیروکسی ردوکسین جریان

میزان بیان نسبی ژن *FTR* در تمامی سطوح تنش در ژنوتیپ متحمل بیش‌تر از ژنوتیپ حساس بود (شکل ۵)، به طوری که میزان بیان نسبی این ژن در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در ژنوتیپ Pokkali به ترتیب ۴۰، ۱۵، ۱۸ و ۶ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. با افزایش سطح تنش از ۱۰۰ به ۲۵۰ میلی گرم در لیتر، میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ IR64 تقریباً دو برابر افزایش یافت. اعمال تنش در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰

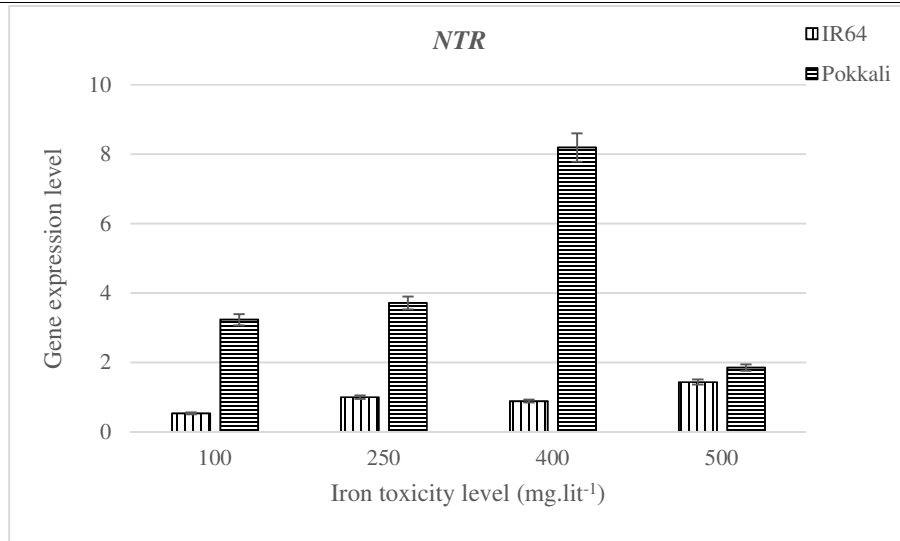
برابر بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. در سطح ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری در بیان نسبی ژن *NTR* در دو ژنوتیپ مشاهده نشد (شکل ۶).

میزان بیان نسبی ژن *NTR* در ژنوتیپ IR64 در همه سطوح تنش تقریباً ثابت باقی ماند. این در حالی است که بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. نقش حیاتی *NTRC* کلروپلاست در مهار ROS با دیدن فنوتیپ رنگ سبز پریده در برگ‌های آرایه‌دوپیسی‌های جهش یافته‌های در ژن *ntrc* دیده می‌شود (Lepistö *et al.*, 2009). احتمالاً عدم تغییر بیان نسبی این ژن در سطوح مختلف تنش ناشی از آهن یکی از دلایل حساسیت ژنوتیپ IR64 است. در سطح پایین تنش میزان بیان نسبی این ژن در Pokkali تغییری نکرد، اما با اعمال تنش در سطح ۲۵۰ و سپس ۴۰۰ میلی گرم در لیتر بیان نسبی این ژن افزایش یافت که احتمالاً گیاه متحمل با افزایش میزان بیان نسبی این ژن سعی در کاهش میزان ROS ناشی از تنش اکسیداتیو و افزایش مقاومت دارد، اما افزایش سطح تنش به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش چهار برابری بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ Pokkali شد. ممکن است در سطوح بالای تنش میزان بیان نسبی این ژن کاهش یافته و سایر مسیرهای مقاومت فعال شده باشند. سراتو و همکاران (Serrato *et al.*, 2004) ارتباط بین *NTRC* و پاسخ به تنش‌های محیطی فیزیولوژیک خشکی، شوری، گرما و استرس اکسیداتیو را گزارش کردند.

الکترون به وسیله تبادلات حدواسط تیول-دی سولفیدی از Fd (احیا شده در نور به وسیله فتوسیستم I) به پروتئین هدف انتقال می‌یابد (Buchanan and Scheibe, 1991; Balmer, 2005). این سیستم در تاریکی در حضور اکسیژن به شکل اکسید تبدیل می‌شود (Montrichard *et al.*, 2009). FTR آنزیم مرکزی سیستم فردوکسین است که انتقال یک سیگنال ردوکس دریافت شده از Fd به TRX توسط یک مکانیسم منحصر به فرد شامل 4Fe-4S و یک پل دی سولفید را شامل می‌شود، در نتیجه سیگنال از یک "سیگنال الکترون" به "سیگنال تیول" تبدیل می‌شود (Schürmann, 2003; Buchanan *et al.*, 2005). احتمالاً تفاوت در روند بیان نسبی ژن FTR بر فردوکسین مؤثر بوده و نقش در میزان مقاومت گیاه به تنش‌های اکسیداتیو دارد. اعمال سطوح مختلف تنش آهن تفاوت معناداری در میزان بیان نسبی ژن *NTR* در ژنوتیپ IR64 ایجاد نکرد (شکل ۶). بیان نسبی این ژن در سطوح تنش ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali تفاوت معناداری نداشت. در این ژنوتیپ افزایش سطح تنش از ۲۵۰ به ۴۰۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش ۲ برابری میزان بیان نسبی ژن *NTR* شد. با افزایش سطح تنش از ۴۰۰ به ۵۰۰ میلی گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali میزان بیان نسبی این ژن حدوداً ۴ برابر کاهش یافت. میزان بیان نسبی ژن *NTR* در سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر آهن در ژنوتیپ Pokkali به ترتیب تقریباً ۶، ۴ و ۹



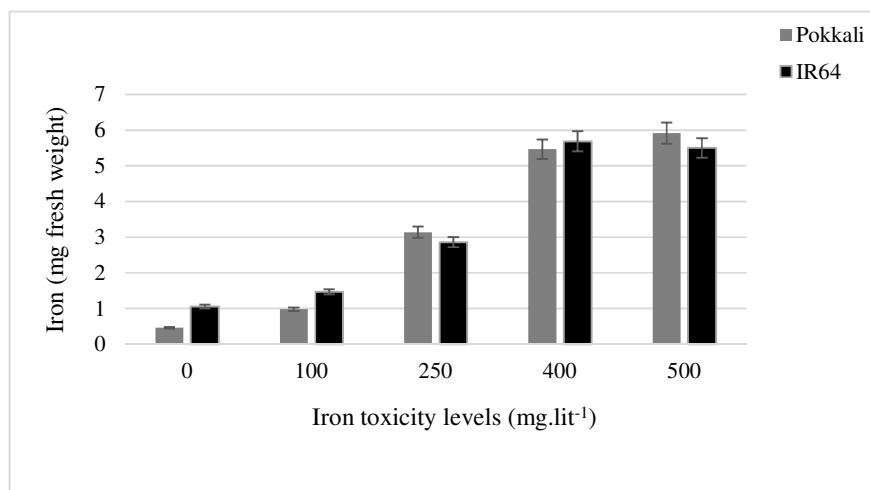
شکل ۵- بیان ژن *FTR* با روش real time PCR تحت تنش سمیت آهن در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
Figure 5. Expression pattern of *FTR* gene using real-time PCR under iron toxicity in two rice genotypes, Pokkali and IR64



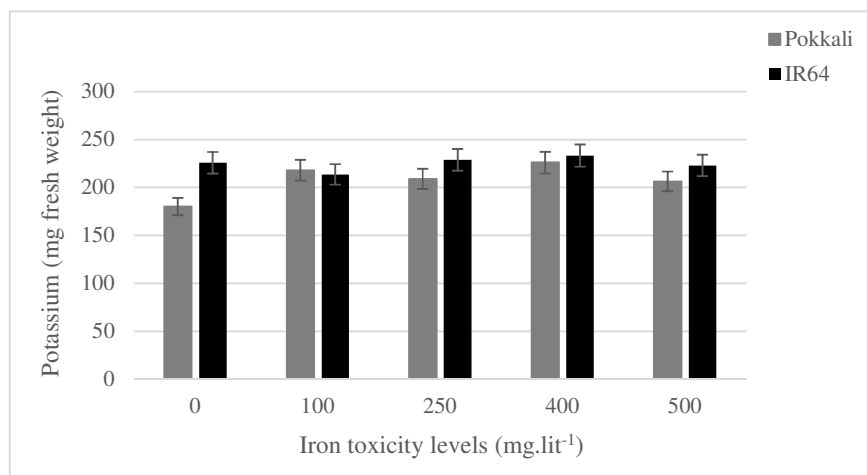
شکل ۶- الگوی بیان ژن *NTR* با روش real time PCR تحت تنش سمیت آهن در ژنوتیپ‌های IR64 و Pokkali
Figure 6. Expression pattern of *NTR* gene using real-time PCR under iron toxicity in two rice genotypes, Pokkali and IR64

در ارقام خزر، هاشمی، شفق و صدری برنج نشان داد در شرایط سمیت آهن میزان آهن در برگ و ریشه افزایش می‌یابد (Mehraban *et al.*, 2008). در آزمایشی اعمال تنش آهن در سطوح ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن در محلول غذایی پوشیدا در برنج سبب افزایش آهن محلول در برگ شد. به طوری که با افزایش سطح تنش میزان آهن محلول در برگ نیز افزایش یافت و بیش‌ترین تجمع آهن در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن وجود داشت (De Dorlodot *et al.*, 2005). تجمع آهن در سطوح شدید سمیت در رقم متحمل بیش‌تر از رقم حساس بود. افزایش جذب و انتقال آهن سبب تجمع آن در گیاه می‌شود. میزان پتاسیم محلول در برگ در ژنوتیپ IR64 تحت شرایط بدون تنش آهن، ۱/۲۵ برابر بیش‌تر از ژنوتیپ Pokkali بود (شکل ۸). در سطح ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری از نظر پتاسیم محلول در برگ در بین دو ژنوتیپ وجود نداشت. اعمال سطوح تنش مختلف آهن تفاوت معناداری در میزان پتاسیم محلول در برگ ژنوتیپ IR64 نسبت به شاهد ایجاد نکرد. در مطالعه‌ای اعمال تنش آهن سبب کاهش معنی‌دار پتاسیم در ارقام برنج شد و کم‌ترین میزان کاهش در متحمل‌ترین رقم مشاهده شد (Mehraban *et al.*, 2008).

اثر تنش آهن بر میزان آهن و پتاسیم محلول در برگ
اعمال تنش آهن در هر دو ژنوتیپ سبب افزایش میزان آهن برگ شد (شکل ۷). اعمال تنش آهن در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب شد در ژنوتیپ Pokkali و IR64 مقدار آهن در برگ به ترتیب ۰/۹۸ و ۱/۴۷ میلی‌گرم در هر گرم برگ گیاه شود که اختلاف معناداری نسبت به یک-دیگر نداشت. در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر میزان آهن اندازه‌گیری شده در دو ژنوتیپ Pokkali و IR64 به ترتیب ۳/۱۴ و ۲/۸۶ میلی‌گرم در هر گرم برگ گیاه بود. در سطح ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان آهن اندازه‌گیری شده در دو ژنوتیپ به ترتیب ۵/۴۶ و ۵/۶۸ و در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۵/۹۱ و ۵/۵ میلی‌گرم در هر گرم برگ گیاه بود. میزان آهن اندازه‌گیری شده در بین دو ژنوتیپ در سطوح مختلف تنش آهن اختلاف معنی‌داری نداشت. بیش‌ترین میزان تجمع آهن در سطوح ۲۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن وجود داشت. به طوری که اعمال تنش در ژنوتیپ Pokkali در این سطوح به ترتیب سبب افزایش ۷، ۱۲ و ۱۳ برابری در میزان آهن برگ و همچنین اعمال تنش در ژنوتیپ IR64 سبب افزایش ۳، ۵ و ۵ برابری میزان آهن برگ نسبت به نمونه‌های شاهد شد. در پژوهشی اعمال Fe-EDTA صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر



شکل ۷- اثر سطوح تنش آهن بر میزان آهن محلول در برگ در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
Figure 7. The effect of iron toxicity on iron content of rice leaves in two genotypes, Pokkali and IR64



شکل ۸- اثر سطوح تنش آهن بر میزان پتاسیم محلول در برگ در ژنوتیپ‌های Pokkali و IR64
Figure 8. The effect of iron toxicity on potassium content of rice leaves in two genotypes, Pokkali and IR64

آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود که می‌تواند مرتبط با تحمل به سمیت ناشی از آهن در ژنوتیپ Pokkali باشد. افزایش بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali نسبت به IR64 و نیز تفاوت در روند تغییرات بیان ژن در سطوح مختلف تنش آهن ممکن است تاثیر معنی‌داری بر میزان تحمل گیاه به سمیت ناشی از آهن داشته باشد. در مجموع، به‌نظر می‌رسد افزایش بیان این ژن‌ها به‌تنهایی یا با هم‌دیگر عامل مهمی در کاهش و یا خنثی‌سازی تاثیرات مضر انواع گونه‌های فعال اکسیژن است.

نتیجه‌گیری کلی

بیش‌ترین میزان بیان نسبی تمام ژن‌های مورد بررسی در ژنوتیپ Pokkali در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آهن بود. بیان همه ژن‌های مورد بررسی در تمامی سطوح تنش به‌غیر از دو ژن *NDH* و *IN-NDH* در سطوح ۲۵۰ و ۴۰۰ و ژن *NTR* در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، در ژنوتیپ Pokkali بیش‌تر از ژنوتیپ IR64 بود. به‌طور کلی، مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در دو ژنوتیپ نشان داد که در بیش‌تر موارد میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر

References

- 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.
- Audebert, A. and Sahrawat K. L. 2000.** Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition** 23: 1877-1885.
- Aung, M. S., Masuda, H., Kobayashi, T. and Nishizawa, N. K. 2018.** Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues. **Soil Science and Plant Nutrition** 64: 370-385.
- Avramova, V., Abdelgawad, H., Vasileva, I., Petrova, A. S., Holek, A., Mariën, J., Asard, H. and Beemster, G. T. S. 2017.** High antioxidant activity facilitates maintenance of cell division in leaves of drought tolerant maize hybrids. **Frontiers in Plant Science** 8: 84.
- Balsera, M., and Buchanan, B. B. 2019.** Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine** 140: 28-35.
- Borovik, O. A. and Grabelnych, O. I. 2018.** Mitochondrial alternative cyanide-resistant oxidase is involved in an increase of heat stress tolerance in spring wheat. **Journal of Plant Physiology** 231: 310-317.
- Buchanan, B. B. and Balmer, Y. 2005.** Redox regulation: a broadening horizon. **Annual Review of Plant Biology** 56: 187-220.
- Buchanan, B. B., Schürmann, P., Wolosiuk, R. A. and Jacquot, J. P. 2005.** The ferredoxin/thioredoxin system: From discovery to molecular structures and beyond. In: Govindjee, B. J. T., Gest, H. and Allen, J. F. (Eds.). Discoveries in photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration. Vol. 20. Springer, Dordrecht. pp: 859-866.
- Cha, J.-Y., Dhirendra, N. B., Min, G. K. and Woe-Yeon, K. 2015.** Stress defense mechanisms of NADPH-dependent thioredoxin reductases (NTRs) in plants. **Plant Signaling and Behavior** 10: e1017698.
- Cha, J. Y., Kim, J. Y., Jung, I. J., Kim, M. R., Melencion, A., Alam, S. S., Yun, D. J., Lee, S. Y., Kim, M. J. and Kim, W. Y. 2014.** NADPH-dependent thioredoxin reductase A (NTRA) confers elevated tolerance to oxidative stress and drought. **Plant Physiology and Biochemistry** 80: 184-191.
- De Dorlodot, S., Lutts, S. and Bertin, P. 2005.** Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. **Plant Nutrition** 28: 1-20.
- Dufey, I., Hakizimana, P., Draye, X., Lutts, S. and Bertin, P. 2009.** QTL mapping for biomass and physiological parameters linked to resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. **Euphytica** 167: 143-160.
- Edreva, A. 2005.** Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 106: 119-133.
- Estefan, G., Sommer, R. and Ryan, J. 2013.** Methods of soil, plant, and water analysis. **A manual for the West Asia and North Africa Region** 3: 65-119.
- Feng, H., Wang, Y., Li, H., Wang, R., Sun, K. and Jia, L. 2010.** Salt stress-induced expression of rice AOX1a is mediated through an accumulation of hydrogen peroxide. **Biologia** 65: 868-873.
- Fu, A., Liu, H., Yu, F., Kambakam, S., Luan, S. and Rodermel, S. 2012.** Alternative oxidases (AOX1a and AOX2) can functionally substitute for plastid terminal oxidase in Arabidopsis chloroplasts. **The Plant Cell** 24: 1579-1595.
- Gamble, P. E. and Burke, J. J. 1984.** Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system I. Alterations in glutathione reductase activity. **Plant Physiology** 76: 615-621.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N. and Jacquot, J. P. 2005.** The plant thioredoxin system. **Cellular and Molecular Life Sciences** 62: 24-35.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T. and Xi, Ma. 2017.** Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cellular Physiology and Biochemistry** 44: 532-553.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. and Piscozzi, R. 2006.** Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). **Cereal Science** 44: 182-193.
- Lepistö, A., Kangasjärvi, S., Luomala, E. M., Brader, G., Sipari, N., Keränen, M., Keinänen, M. and Rintamäki, E. 2009.** Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in Arabidopsis. **Plant Physiology** 149: 1261-1276.

- Li, C. R., Liang, D. D., Xu, R. F., Li, H., Zhang, Y, P., Qin, R. Y., Li, L., Wei, P. C. and Yang, J. B. 2013.** Overexpression of an alternative oxidase gene, OsAOX1a, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. **Genetics and Molecular Research** 12: 5424-5432.
- 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.
- Mehraban, P. and Abdolzadeh, A. 2012.** Effects of iron excess on the antioxidant activity and patterns of protein electrophoresis in *Oryza sativa* var. Shafagh. **Plant Production** 19 (1): 85-106. (In Persian with English Abstract).
- Mehraban, P., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H. R. 2008.** Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. **Plant Sciences** 7: 251-259.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7: 405-410.
- 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).
- Mohsenzadeh Golfazani, M., Pasandideh Arjmand, M., Hassani Kumleh, H., Samizadeh Lahiji, H., Vahedi, R. and Ramezanzadeh Bishegahi, S. 2019.** The effect of iron toxicity on some of morphological traits, relative gene expression of G6PDH and peroxidase enzyme activity in resistant and susceptible genotypes of rice (*Oryza sativa*). **Cereal Research** 9: 207-220. (In Persian with English Abstract).
- Mohsenzadeh Golafazani, M., Samizadeh Lahiji, H. and Hassani Kumleh, H. 2017.** Patterns of mitochondrial gene expression in rapeseed leaves (*Brassica napus* L.) at early growth stage in response to drought stress. **Iranian Journal of Field Crop Science** 48: 67-77. (In Persian with English Abstract).
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. J. and Buchanan. B. B. 2009.** Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. **Proteomics** 72: 452-474.
- Moore, A. L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. and Ito, K. 2013.** Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. **Annual Review of Plant Biology** 64: 637-663.
- Nahar, S., Vemireddy, L. R., Sahoo, L. and Tanti, B. 2018.** Antioxidant protection mechanisms reveal significant response in drought-induced oxidative stress in some traditional rice of Assam, India. **Rice Science** 25: 185-196.
- Nikkanen, L., Toivola, J., Diaz, M. J. and Rintamäki, E. 2017.** Chloroplast thioredoxin systems: prospects for improving photosynthesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 372: 20160474.
- Onyango, D. A., Entila, F., Dida, M. M., Ismail, A. M. and Drame, K. N. 2019.** Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 1. Morpho-physiological and biochemical responses. **Functional Plant Biology** 46: 93-105.
- Panda, S. K., Sahoo, L., Katsuhara, M. and Matsumoto, H. 2013.** Overexpression of alternative oxidase gene confers aluminum tolerance by altering the respiratory capacity and the response to oxidative stress in tobacco cells. **Molecular Biotechnology** 54: 551-563.
- 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).
- Peng, L., Yamamoto, H. and Shikanai, T. 2011.** Structure and biogenesis of the chloroplast NAD (P) H dehydrogenase complex. **Biochimica et Biophysica Acta** 1807: 945-953.
- Pessaraki, M. 1999.** Handbook of plant and crop stress. CRC Press.
- Qureshi, M. K., Munir, S., Shahzad, A. N., Rasul, S., Nouman, W. and Aslam, H. 2018.** Role of reactive oxygen species and contribution of new players in defense mechanism under drought stress in rice. **Agriculture and Biology** 20: 1339-1352.
- Rasmusson, A. G., Fernie A. R. and Dongen, J. T. V. 2009.** Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? **Physiologia Plantarum** 137: 371-382.

- Samaras, Y., Bressan, R. A., Csonka, L. N., Garcia-Rios, M. G., Paino, D. and Rhodes, D. 1995.** Proline accumulation during drought and salinity. **Environment and Plant Metabolism, Bios Scientific Publishers, Oxford** 161-187.
- Scheibe, R. 1991.** Redox-modulation of chloroplast enzymes A common principle for individual control. **Plant Physiology** 96: 1-3.
- Schürmann, P. 2003.** Redox signaling in the chloroplast: the ferredoxin/thioredoxin system. **Antioxidants and Redox Signaling** 5: 69-78.
- Schürmann, P. and Jacquot, J. P. 2000.** Plant thioredoxin systems revisited. **Annual Review of Plant Biology** 51: 371-400.
- Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C. and Cejudo, F. J. 2004.** A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Biological Chemistry** 279: 43821-43827.
- Stepien, P. and Klobus, G. 2005.** Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. **Physiologia Plantarum** 125: 31-40.
- Sunil, B., Saini, D., Bapatla, R. B., Aswani, V. and Raghavendra, A. S. 2019.** Photorespiration is complemented by cyclic electron flow and the alternative oxidase pathway to optimize photosynthesis and protect against abiotic stress. **Photosynthesis Research** 139: 67-79.
- Sweetman, C., Waterman, C. D., Rainbird, B. M., Smith, P. M. C., Jenkins, C. D., Day, D. A. and Soole, K. L. 2019.** AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress. **Plant Physiology** 181: 774-788.
- 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).
- Vanlerberghe, G. C., Cvetkovska, M. and Wang, J. 2009.** Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? **Physiologia Plantarum** 137: 392-406.
- Vanlerberghe, G. C., Martyn, G. D. and Dahal, K. 2016.** Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. **Physiologia Plantarum** 157: 322-337.
- 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. **Experimental Botany** 62: 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, Y., Berkowitz, O., Selinski, J., Xu, Y., Hartmann, A. and Whelan, J. 2018.** Stress responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Free Radical Biology and Medicine** 122: 28-39.
- Wanniarachchi, V. R., Dametto, L., Sweetman, C., Shavrukov, Y., Day, D. A., Jenkins, C. L. D. and Soole, K. L. 2018.** Alternative respiratory pathway component genes (AOX and ND) in rice and barley and their response to stress. **Molecular Sciences** 19: 915.
- Wu, L. B., Shhadi, M. Y., Gregorio, G., Matthus, E., Becker, M. and Frei, M. 2014.** Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. **Rice** 7: 8.
- Yang, B., Srivastava, S., Deyholos M. K. and Kav, N. N. 2007.** Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Science** 173: 156-171.
- Yoshida, S., Forno, D. A. and Cock, J. H. 1971.** Laboratory manual for physiological studies of rice. Los Baños, Philippines. pp: 1-61.
- Zagorchev, L., Seal, C. E., Kranner, I. and Odjakova, M. 2013.** A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. **Molecular Sciences** 14: 7405-7432.



University of Guilan
Faculty of Agricultural
Sciences

doi: 10.22124/cr.2021.18472.1642

(Research Article)

Cereal Research
Vol. 10, No. 3, Autumn 2020 (207-220)

The Pattern of mitochondrial and chloroplast gene expression in Rice leaves in response to iron stress

Maryam Pasandideh Arjmand¹, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani^{2*} and Habibollah Samizadeh Lahiji³

Received: July 26, 2020

Accepted: October 11, 2020

Abstract

Iron toxicity lead to oxidation of photosynthetic pigments, increasing of free radicals and as a result rice yield to be severely damaged. This study was performed to investigate the effect of iron toxicity on relative expression of alternative oxidase, external alternative NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductase, internal alternative NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductase, NADH dehydrogenase, NATPH-thioredoxin reductase and ferredoxin-thioredoxin reductase genes in two rice genotypes, IR64 (susceptible) and Pokkali (tolerant). Iron ion was applied at the levels of 0 (check), 100, 250, 400 and 500 mg.lit⁻¹ under Yoshida hydroponic conditions. Results showed that the iron cosentration in leaves increased with increasing of stress levels. There was not a significant difference among IR64 treatments samples for leaves potassium cosentration. But it increased in Pokkali genotype relative to non stress samples. The expression levels of genes in Pokkali except *NDH* and *IN-NDH* in 250 and 400 mg li⁻¹ and *NTR* in 500 mg li⁻¹ samples were higher than IR64. In all, the difference of morphological traits and relative over expression of genes in Pokkali. In all, the difference of morphological traits and relative over expression of genes in Pokkali indicated that the gene could considerably effect on the tolerant level of pokkali by reducing ROS production under Fe-toxicity .Our results showed that high activity of the mitochondrial and genes, alone or together, could also be an important factor in iron tolerance in rice by detoxifying the harmful effects of the ROS.

Keywords: Alternative oxidase, Ferredoxin, Hydroponic, Potassium, Relative gene expression

1. Ph. D. Student, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

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

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

* Corresponding author: mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com