فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۲، شماره ۵۷، آذر و دی‌ماه ۱۴۰۲ صفحه: ۳۵۷-۳۶۷
https://doi.org/10.22034/12.57.357

مقاله پژوهشی

مطالعه تغییرات آنزیمی و ارزیابی بیان برخی ژن‌های مهم در تحمل به شوری در چهار رقم از برنج تحت شرایط هیدروپونیک

سعید نواب‌پور*، ساناز رمضان‌پور، احد یامچی و داریوش عبادی الماس
گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸)

چکیده

شوری، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و تولید برنج در شرایط خشک و نیمه‌خشک جهان است. به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر خصوصیات بیوشیمیایی و بیان برخی ژن‌های القایی در مرحله گیاهچه‌ای برنج، آزمایشی به صورت کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. فاکتور اصلی شامل پنج سطح صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار از کلرید سدیم برای ایجاد تنش شوری بود. سطوح شوری به همراه محلول غذایی یوشیدا در یک سیستم هیدروپونیک اعمال شد. فاکتور فرعی شامل چهار رقم (کشوری، شیرودی، طارم و کوهسار) برنج بود. در این پژوهش شاخص سطح اکسیداسیون سلولی (TBARM)، فعالیت‌های آنزیمی و بیان برخی ژن‌های مهم پاد اکسیدان شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربیک پراکسیداز و فاکتور رونویسی *TCTP* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف بین ارقام و سطوح شوری برای کلیه صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین با افزایش سطح شوری، میزان فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و بیان ژن‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربیک پراکسیداز و *TCTP* افزایش یافت. با توجه به نتایج به‌دست آمده رقم‌های شیرودی و کوهسار به عنوان رقم‌های متحمل به شوری شناسایی شدند.

کلمات کلیدی: برنج، بیان ژن، تنش شوری، صفات بیوشیمیایی

مقدمه

برنج با نام علمی *Oryza sativa* L. بعد از گندم مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا به شمار می‌رود و غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان به خصوص کشورهای در حال توسعه را تشکیل می‌دهد. بیش از ۹۰ درصد برنج جهان، در آسیا تولید می‌شود و در عین حال اغلب آن نیز در این قاره مصرف می‌شود (فتحی، ۱۳۸۷). برنج که جز مهم‌ترین غلات جهان است، توسط بیش از سه میلیارد نفر در سراسر جهان مصرف می‌شود و ۵۰ تا ۸۰ درصد کالری مورد نیاز آن‌ها در روز را تأمین میکند. در سطح جهانی، رشد و تولید برنج تحت تأثیر عوامل محیطی مختلفی قرار می‌گیرد که در این میان تنش شوری خاک یکی از عوامل اصلی تنش است (Vinod *et al.*, 2013). در ایران، شوری یک مسئله فراگیر و محدودکننده تولید پایدار کشاورزی است به، طوری که قسمت‌های زیادی از مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور، به ویژه فلات مرکزی، دشت‌های ساحلی جنوب و دشت خوزستان، مبتلا به سطوح مختلف شوری هستند

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

(Momeni, 2010). شوری خاک‌های زراعی و آب آبیاری را می‌توان جز عمده‌ترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان در اکثر نقاط کشور، خصوصاً مناطق خشک و نیمه‌خشک دانست (Greenway and mauonid,1990). از طرف دیگر برنج تنها گیاه زراعی خانواده غلات است که توانایی رویش در آب را دارد و نیاز به خاکی با ظرفیت نگهداری آب بالا دارد، بنابراین در مناطق ویژه‌ای که سایر گیاهان کشت نمی‌شوند، رشد می‌کنند. آب بستر کشت برنج می‌بایست از کیفیت بالایی برخوردار باشد، در حالی‌که در اکثر مواقع آب مورد استفاده حاوی بسیاری از نمک‌های سدیم و کلرید می‌باشد (Bassam *et al.*, 1991).

گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند میزان رادیکال‌های آزاد را تعدیل کنند. این سیستم دفاعی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز است و سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات متفرقه (از جمله فلاونوئیدها، مانیتول‌ها و پلی‌فنل‌ها) می‌باشد (Blokhina *et al.*, 2003). تحت تنش اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن، سنتز آنزیم‌هایی نظیرگایاکول پراکسیداز و ترکیبات غیرآنزیمی نظیر آسکوربیک اسید و کاروتنوئید در بافت‌های گیاهی افزایش پیدا می‌کند که در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن مؤثر هستند (Molazem and Bashirzadeh, 2017). تعدد و زیادی سیستم‌های دفاعی به این خاطر است که انواع اکسیژن‌های واکنش‌زا (ROS) در سلول‌ها و بخش‌های زیرسلولی مختلف تولید می‌شوند و همچنین در خاصیت‌هایی همچون توانایی انتشار، حلالیت و گرایش به واکنش با مولکول‌های بیولوژیک مختلف، متفاوت هستند. بنابراین به مجموعه به‌هم پیوسته از مولکول‌های دفاعی برای عمل در هر دو مرحله آلی و غشایی در تمام بخش‌های سلول برای غیرفعال کردن رادیکال‌ها به همان سرعتی که شکل می‌گیرند، نیاز است. تحقیقات مختلف نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های پاداکسیدان در گیاهان فتوسنتزکننده وجود دارد (Sairam, 2001). همچنین مطالعه برخی فاکتورهای رونویسی مانند پروتئین انتقالی کنترل‌کننده تومور Translationally-controlled tumor protein (TCTP) که در هنگام تنش‌های محیطی موجب انتقال پیام و رونوشت ژن‌های دفاعی می‌گردند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Bommer and Tile, 2004). بررسی بیان و نحوه تنظیم ژن‌ها یکی از ابزارهای مهم جهت اصلاح برای مقاومت به تنش در گیاهان می‌باشد(Yousfi *et al.*, 2016). براساس آنچه ذکر شد این پژوهش با هدف بررسی تغییرات آنزیمی و بیان برخی ژن‌های مهم پاداکسیدان در ارقام تجاری برنج در مرحله گیاهچه تحت تنش شوری صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با پنج سطح شوری به عنوان فاکتور اصلی شامل صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و چهار سطح فاکتور فرعی شامل ارقام: کشوری، شیرودی، طارم و کوهسار در چهار تکرار انجام شد. آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان انجام شد. برای کشت از صفحات یونولیت و تشت‌های کشت استفاده گردید. بذور به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به ظروف پتری حاوی کاغذ صافی منتقل گردیدند. مقدار کمی آب مقطر استریل به ظروف اضافه شد تا کاغذ صافی و بذور کاملاً مرطوب و خیس شوند. بذور جوانه زده در روز سوم به داخل هر سوراخ و روی شبکه‌های نایلونی (صفحه‌هایی از جنس پلاستیک یا سوراخ‌های ریز که ریشه‌چه‌ها از آن عبور داده شده‌اند) انتقال داده شدند. سپس محلول غذایی یوشیدا به تشت‌ها اضافه شد. محلول غذایی هر هفت روز تعویض شد. pH محلول هفته‌ای سه بار کنترل گردید و با اضافه نمودن HCl و NaOH، pH محلول روی ۵/۵

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

جدول ۱- خصوصیات و توالی آغازگرهای ژن اصلی و ژن خانه‌دار

نام ژن	دمای ذوب	درصد GC	توالی آغازگر	طول محصول (bp)
سوپراکسید	۶۳/۴۲	۶۰	For: 5′TGTGTCCATTGAAGATCGTGTGA3′	۲۲۷
دیسموتاز	۶۳	۵۷/۱۴	Rev: 5′TCTTGTTTCTCGTGGACCACC3′	
کاتالاز	۶۰/۷۴	۶۳/۱۶	For: 5′-AAAAACTCACCGGACGTGAC-3′	۱۰۶
	۶۰/۳۷	۵۵	Rev:5′-TAATTCGCCGGGTTAGTGTC-3′	
اسکوربیک	۶۰	۵۵	For: 5′-AGCCCCAGCCACCTCCGA-3′	۲۲۴
پراکسیداز	۵۹/۶۹	۵۲/۶۳	Rev: 5′-GGCCTCATAATCAGCAAAAA-3′	
TCTP	۶۳/۴۷	۵۷/۶۱	For: 5′-CAAACTGGATACAAAAGCAA-3′	۱۷۶
	۶۰	۶۲	Rev: 5′-CATGGGCTTCCTGATCTG-3′	
GAPDH	۶۰/۴۹	۵۰	For:5′GCTACGCAGAAGACAGTTGATGG3′	۲۰۲
	۶۰/۹۷	۵۵	Rev: 5′-TGGGCACACGGAAGGACATAC-3′	

ثابت نگه داشته شد. گیاهچه‌های برنج در شرایط محیط شاهد به مدت ۳۵ روز در محلول غذایی یوشیدا نگهداری شدند و در شرایط محیط شور گیاهچه‌های برنج تا ۱۴ روز در محلول غذایی یوشیدا و سپس به مدت ۲۱ روز در محیط شور رشد نمودند. سپس نمونه‌گیری جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی و بیان ژن صورت گرفت.

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷)، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز I با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) و میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز I با روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) و Thiobarbioturic Acid Reactive Materia (TBARM) به روش Hagege و همکاران (۱۹۹۰) محاسبه شد. جهت بررسی بیان ژن، استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج پی بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. سپس سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز صورت گرفت. جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌ها از دستگاه iQ5 شرکت Bio Rad و کیت سایبرگرین که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد استفاده شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *GAPDH* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها بود، استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز براساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش QRT-PCR طراحی شدند (جدول ۱). در پایان واکنش و پس از دریافت نمودار منحنی ذوب، اطلاعات به نرم‌افزار REST منتقل شده و تجزیه داده‌ها انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین ارقام مورد مطالعه و سطوح مختلف شوری در تمامی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین برای میزان TBARM نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان TBARM تقریباً در تمام ارقام مورد مطالعه سیر صعودی منظمی داشت. ارقام کشوری و طارم میانگین کمتری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۱).

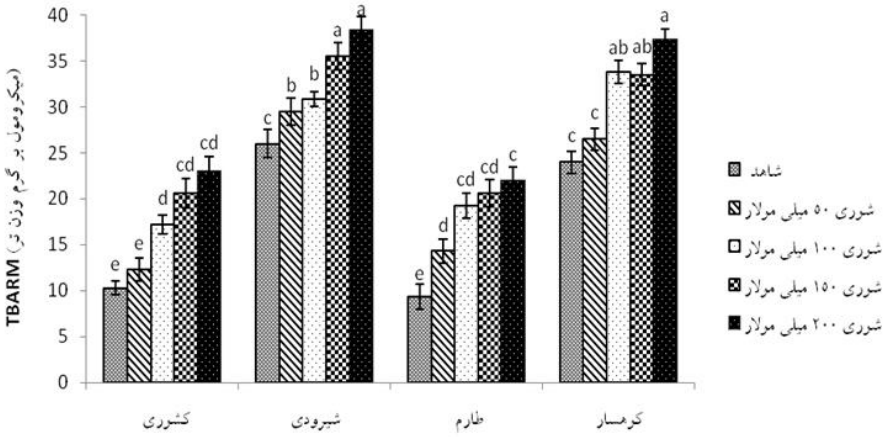
نتایج مقایسه میانگین برای میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تقریباً در تمام ارقام مورد مطالعه سیر صعودی منظمی داشت. ارقام کشوری و طارم میانگین کمتری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۲).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

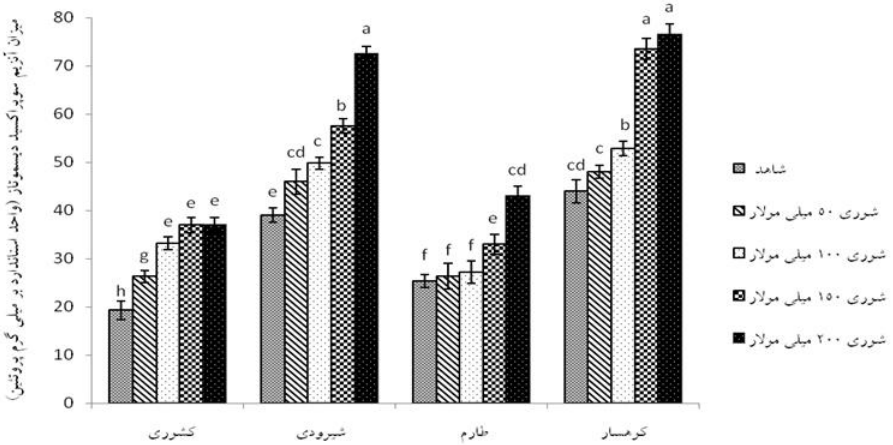
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی در ارقام برنج تحت القای سطوح مختلف شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		TBARM	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	اسکوربیک پراکسیداز
بلوک	۳	۰/۱۱^{ns}	۰/۱۲^{ns}	۰/۰۰۰۷۹^{ns}	۰/۰۰۶۸^{ns}
شوری	۴	۱۵۷/۲۸**	۲۵۸۹/۰۹**	۱۰/۴۶**	۵۶۳/۰ ۹**
خطا	۱۲	۰/۰۱۶	۰/۹۸	۰/۰۱۷۳	۰/۰۹۳
رقم	۳	۱۲/۶۸**	۱۱۶/۹۰**	۰/۰۱۱**	۰/۰۴۹**
رقم × شوری	۱۲	۰/۲۲**	۶/۷۴**	۰/۰۰۸۱**	۰/۰۳۶**
خطا	۴۵	۰/۰۱۲	۰/۷۷	۰/۰۰۸۶	۰/۰۲۲

ns و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

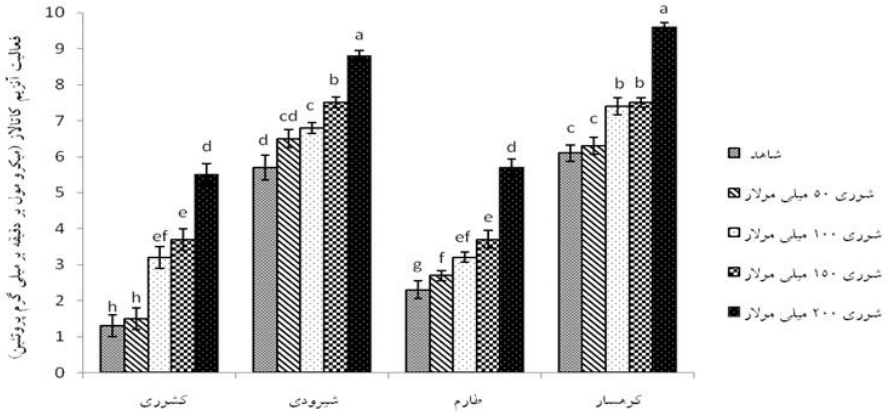


شکل ۱- مقایسه میانگین میزان TBARM ارقام مورد مطالعه برنج در سطوح مختلف شوری. میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

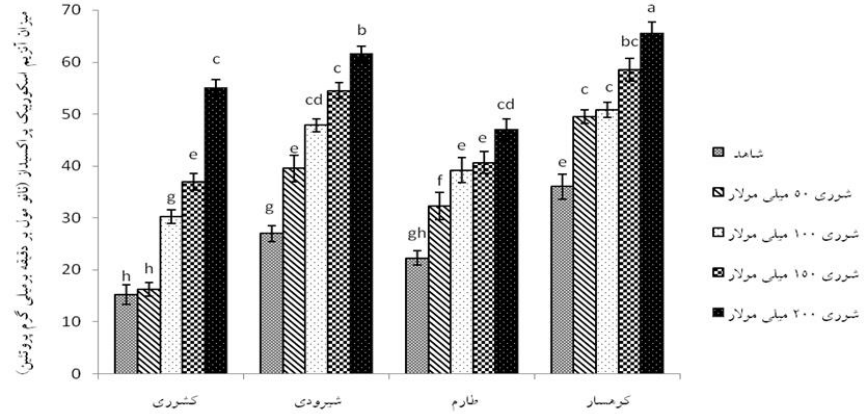


شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ارقام مورد مطالعه برنج در سطوح مختلف شوری، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت میزان آنزیم کاتالاز ارقام مورد مطالعه برنج در سطوح مختلف شوری. میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۴- مقایسه میانگین فعالیت میزان آنزیم اسکوربیک پراکسیداز ارقام مورد مطالعه برنج در سطوح مختلف شوری. میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

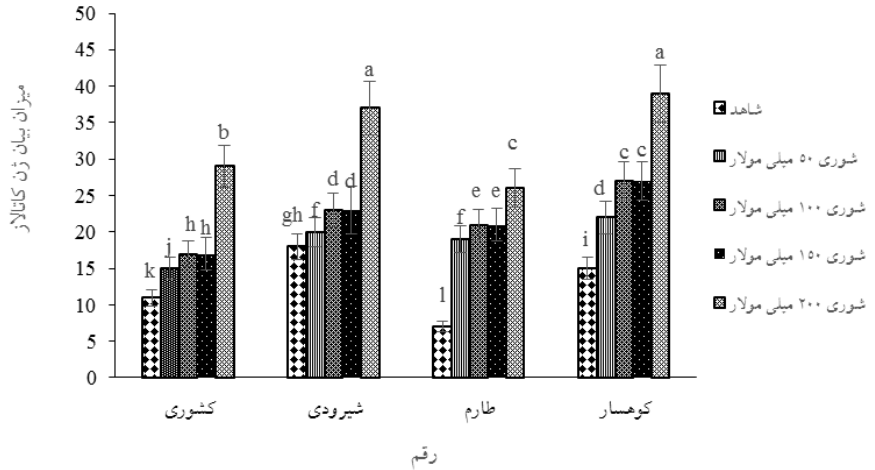
نتایج مقایسه میانگین برای میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تقریباً در تمام ارقام مورد مطالعه سیر صعودی منظمی داشت. ارقام کشوری و طارم میانگین کمتری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۳).

نتایج مقایسه میانگین برای میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز تقریباً در تمام ارقام مورد مطالعه سیر صعودی منظمی داشت. ارقام کشوری و طارم میانگین کمتری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۴).

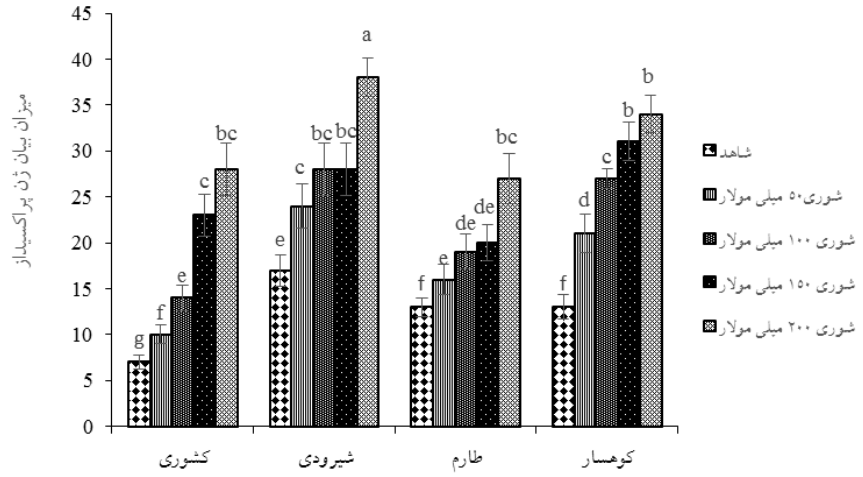
در مقایسه نسبی الگوی تظاهر ژن کاتالاز با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن کاتالاز افزایش یافت و در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بیشترین میزان بیان نسبت به شاهد مشاهده گردید. ارقام کشوری و طارم میانگین پایین‌تری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۵).

در مقایسه نسبی الگوی تظاهر ژن اسکوربیک پراکسیداز با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن اسکوربیک پراکسیداز افزایش یافت و در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بیشترین میزان بیان نسبت به شاهد مشاهده گردید. ارقام کشوری و طارم میانگین پایین‌تری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۶).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۵- میزان بیان نسبی به شاهد ژن کاتالاز در ارقام مورد مطالعه برنج، (n=۳)



شکل ۶- میزان بیان نسبی به شاهد ژن اسکوربیک پراکسیداز در ارقام مورد مطالعه برنج، (n=۳)

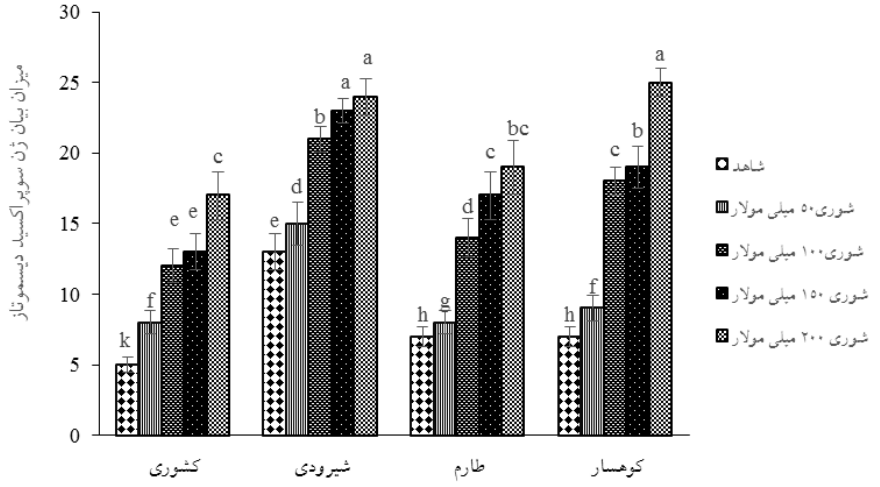
در مقایسه نسبی الگوی تظاهر ژن سوپراکسید دیسموتاز با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت و در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بیشترین میزان بیان نسبت به شاهد مشاهده گردید. ارقام کشوری و طارم میانگین پایین‌تری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۷).

در مقایسه نسبی الگوی تظاهر ژن *TCTP* با افزایش سطح شوری میزان بیان ژن *TCTP* افزایش یافت و در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بیشترین میزان بیان نسبت به شاهد مشاهده گردید. ارقام کشوری و طارم میانگین پایین‌تری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند (شکل ۸).

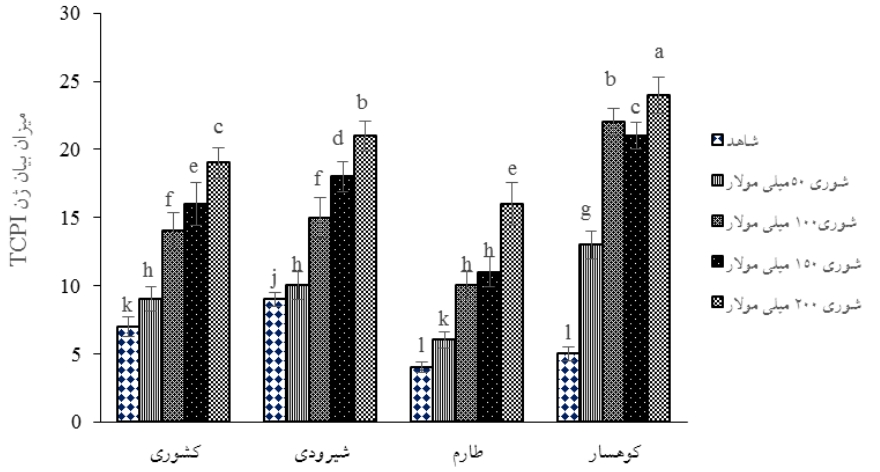
بحث

نتایج بررسی صفات بیوشیمیایی و الگوی بیان ژن‌های پاداکسیدان نشان دادند که با افزایش سطح شوری میزان فعالیت‌های آنزیم‌ها و بیان ژن‌های آن‌ها در ارقام مورد مطالعه برنج، افزایش یافت. بیشترین اختلاف در بالاترین سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. با توجه به شرایط آزمایش چنین به نظر می‌رسد که تفاوت در نتایج به دست آمده نشان‌دهنده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۷- میزان بیان نسبی به شاهد ژن سوپراکسید دیسموتاز در ارقام مورد مطالعه برنج، (n=۳)



شکل ۸- میزان بیان نسبی به شاهد ژن *TCTP* در ارقام مورد مطالعه برنج، (n=۳)

تفاوت ژنتیکی ارقام مورد مطالعه است. در تمام صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده ارقام کشوری و طارم میانگین کمتری نسبت به دو رقم شیرودی و کوهسار نشان دادند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که با افزایش سطح شوری ظرفیت تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و اثرات منفی آن‌ها افزایش یافت و طی آن گیاه در یک واکنش دفاعی، سطح عوامل پاداکسیدانی و بیان ژن‌های درگیر را افزایش داد. گیاهان مختلف تنش‌هایی را که با آن مواجه می‌شوند از طریق مسیرهای بیوشیمیایی اصلاح می‌کنند. پاک‌سازی سلول از گونه‌های فعال اکسیژن کار معمولی است که سلول‌های زنده آن را از طریق مسیرهای آنزیمی و غیرآنزیمی انجام می‌دهند (Larkindale *et al*., 2005; Gosset *et al*., 1996). حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یکی از مکانیسم‌های مهم مقاومت به تنش شوری در گیاهان است، برای غلبه بر آثار اکسیداتیو القاء شده از شوری و خنثی کردن اثر سمی اکسیژن‌های واکنش‌گر، گیاهان از یک سیستم آنتی‌اکسیدانی پیچیده استفاده می‌کنند که شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مثل کاروتنوئیدها، اسید آسکوربیک و آنزیم‌های جاروبگر ROS مثل گایاکول پراکسیداز می‌باشد (Mudgal *et al*., 2010). گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنولی همانند گایاکول، برای سم‌زدایی و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

تجزیه پراکسید هیدروژن استفاده می‌کند. این آنزیم معمولاً در سیتوپلاسم، دیواره سلولی و واکوئل‌ها دیده می‌شود. همچنین در طی فرآیند سم‌زدایی از گایاکول به عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن استفاده می‌کند (Heidari, 2016). کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز آنزیم‌های مهم در پاک‌سازی سلول از گونه‌های فعال اکسیژن هستند. کاتالاز در پراکسی‌زوم سلول که محل سنتز H_2O_2 است وجود دارد و اولین فاکتور در شکستن H_2O_2 می‌باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که در سطوح بالاتر شوری، فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه نسبت به کنترل افزایش قابل توجهی یافت. با افزایش سطح شوری، افزایش میزان بیان ژن کاتالاز و فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده گردید که با نتایج دیگر محققین مبنی برافزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی در برنج (Liu *et al*., 2022)، گوجه‌فرنگی (Xu *et al*., 2022) و *Trifolium alexandrinum* L. (Rasheed *et al*., 2022) مطابقت داشت. در مطالعه صفات بیوشیمیایی میزان آن در تمامی سطوح شوری نسبت به شاهد افزایش را نشان داد. مولکول H_2O_2 نقش کلیدی در تنش‌ها داشته و محل سنتز آن در پراکسی‌زوم می‌باشد. این مولکول در مسیرهای انتقال سیگنال نقش داشته و سبب بیان ژن‌ها می‌شود (Pitzschke *et al*., 2006). تنش‌های غیرزنده و از آن جمله شوری تجمع انواع اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) را القاء می‌کند که در دزهای بالا برای سلول زیان‌آور هستند. تمام فرم‌های فعال‌شده اکسیژن به شدت فعال و بسیار سمی هستند و ROS به طور معمول با مولکول‌های بیولوژیکی واکنش می‌دهند و سبب خسارت اکسیداتیو به لیپیدهای غشا، خسارت به اسیدآمینه‌ها، اسیدهای نوکلئیک، تخریب و رسوب پروتئین‌ها و تخریب رنگ‌دانه‌ها می‌گردند. آشفتگی متابولیسمی ناشی از وجود تنش‌های غیرزنده تولید ROS را افزایش می‌دهد (Sairam and Tyagi, 2004). از این رو سمیت‌زدایی ROS، یک عامل مهم دفاعی در برابر تنش‌های غیرزنده می‌باشد. به‌طورکلی در شرایط تنش میزان تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، بنابراین میزان و فعالیت آنتی‌اکسیدانت نقش مهمی در تحمل تنش و سمیت‌زدایی و کاهش خسارت ناشی از رادیکال‌های آزاد دارد (Gosset *et al*., 1996). گیاهان برای مقابله با خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو مکانیسم‌های متفاوتی دارند. گیاهان برای حذف ROSها دارای مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هستند. مکانیسم‌های آنزیمی غلظت پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهند. از جمله آنزیم‌های سمیت‌زدا، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنزیم‌های چرخه آسکوربات گلوتاتیون (مانند آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و آنزیم‌های سنتزکننده گلوتاتیون) و پراکسیداز می‌باشند. آنتی‌اکسیدانت‌های تولیدشده توسط مکانیزم‌های غیرآنزیمی در گیاهان نیز شامل آسکوربات، گلوتاتیون، آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها می‌باشند (Sairam and Tyagi, 2004). حذف سوپراکسید توسط سوپراکسید دیسموتاز به تولید هیدروژن منجر می‌شود که پراکسید هیدروژن نیز توسط کاتالاز یا آسکوربات از بین می‌رود (Asada, 1992). نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش سطح شوری، افزایش میزان بیان ژن کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و اسکوربیک پراکسیداز مشاهده گردید، Dengji و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعات خود روی گیاه برنج طی تنش شوری به نتایج مشابهی رسیدند. در مطالعه‌ای، کاهش کاتالاز با افزایش میزان H_2O_2 و همبستگی منفی آن‌ها با همدیگر نشان داده شده است (Costa *et al*., 2002; Agrawal and Rathore, 2007; Wang *et al*., 2010). مولکول H_2O_2 نقش کلیدی در تنش‌ها داشته و در مسیرهای انتقال سیگنال نقش داشته و سبب بیان ژن‌ها می‌شود. در مطالعات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی کردن آن‌ها با همدیگر به علت پیچیده بودن شرایط درون سلول زنده می‌تواند نتایج مناسب‌تری به دست دهد. با افزایش سطح شوری، H_2O_2 به‌عنوان مولکول کلیدی افزایش نسبی پیداکرده و سلول زنده توانایی کنترل آن را دارد، اما با افزایش تنش به علت نفش H_2O_2 در مرگ برنامه‌ریزی سلولی، سبب خسارت به سلول شده و سلول توانایی جبران را ندارد (Pitzschke *et al*., 2006).

نتیجه‌گیری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

نتایج نشان داد با افزایش سطح شوری، میزان صفات بیوشیمیایی و الگوی بیان ژن‌های اندازه‌گیری‌شده دارای تفاوت معنی‌داری در ارقام مختلف بود و در تمامی سطوح شوری نسبت به شاهد افزایش را نشان دادند. بیشترین اختلاف در بالاترین سطح یعنی ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده گردید. با وقوع تنش مقدار شاخص اکسیداسیون سلولی افزایش یافت و با افزایش آن مقدار شاخص اکسیداسیون سلولی نیز افزایش چشمگیری یافت. یکی از پاسخ‌های عمومی به گستره وسیعی از تنش‌های زیستی وغیرزیستی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال یا ROS است. تنش شوری باعث تولید ROS در سلول‌ها می‌شود که این پدیده پاسخی بر تنش محسوب می‌شود. سطوح بالای تنش شوری که می‌تواند گونه‌های ROS را تولید کند، باعث آسیب اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند. با افزایش سطح شوری، افزایش میزان بیان ژن‌های کاتالاز سوپراکسید دیسموتاز، اسکوربیک پراکسیداز، TCTP و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و اسید اسکوربیک مشاهده گردید که جهت تعدیل مقدار ROS تولید شده طی تنش و کاهش خسارت تنش در گیاه صورت گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده رقم‌های شیرودی و کوهسار به دلیل بیان ژن بالاتر طی تنش و داشتن شرایط مناسب‌تر از لحاظ صفات بیوشیمیایی طی تنش، به عنوان رقم‌های متحمل به شوری شناسایی شدند و می‌توان از این ارقام در پروژه‌های به‌نژادی بهره برد.

منابع

فتحی، قدرت، الله (۱۳۷۸). رشد و تغذیه گیاهان زراعی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, *105*, 121-126.

Agrawal, S. B. & Rathore, D. (2007). Changes in oxidative stress defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) cultivars grown with and without mineral. *Environmental and Experimental Botany*, *59*, 21-33.

Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, *85*, 235-241.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Analytical Biochemistry*, 196, 80-83.

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, 179-194.

Bommer, U. A. & Thiele, B. J. (2004.) The translationally controlled tumour protein (TCTP). Int. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 379-385.

Costa, H. S., Gallego, M., & Tomaro, M. L. (2002). Effects of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science*, 162, 939-945.

Dengji, L., Houping, V., & Diqiu. Y. (2018). The sucrose non-fermenting-1-related protein kinases SAPK1 and SAPK2 function collaboratively as positive regulators of salt stress tolerance in rice. *BMC Plant Biology*, *18*, 203-221.

Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, *59*, 309-314.

Gosset, D. R., Banks, S. W., Millhollon, E. P., & Lucas, M. C. (1996). Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, but lionine sulfoximine and exogenous glutathione [J]. *Plant Physiology*, *112*, 803-809.

Greenway, H. & Munns, R. (1990). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 141-190.

Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J., & Gaspar, T. (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: Avoidance of pigment interference. *Phytochemistry Anall*, 1, 86-89.

Heidari, M. (2016). Physiology and mechanism of resistance to environmental stress in crops. *Shahrood University of Technology Press*, 232.

Larkindale, J., Hall, D., Knight, J. R., & Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*, *138*, 882-897.

Liu, X., Xie, X., Zheng, C., Wei, L., Li, X., Jin, Y., Zhang, G., Jiang, C., & Liang, Z. (2022). RNAi-mediated suppression of the abscisic acid catabolism gene OsABA8ox1 increases abscisic acid content and tolerance to saline–alkaline stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Journal*, 10, 354-367.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

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).

Molazem, D. & Bashirzadeh, A. (2017). Investigation of the antioxidant enzymes and proline in varieties of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Journal of Molecular and Cellular Research*, *30*(1), 77-90.

Mudgal, V., Madaan, N., & Mudgal, A. (2010). Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: A review. *International Journal of Botany*, *6*, 136-143.

Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbatespecific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, *22*, 867-880.

Vinod, K., Krishnan, S. G., Babu, N. N., Nagarajan, M., & Singh, A. K. (2013). Improving salt tolerance in rice: Looking beyond the conventional. In: Salt Stress in Plants: Signalling Omics and Adaptations. (eds. Ahmad, P., Azooz, M. M., Prasad, M. N. V.) Pp. 219-260. Springer, New York, NY, USA.

Pitzschke A., Forrzani, C., & Hirt, H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*, *8*, 1757-1764.

Rasheed, R., Ashraf, M. A., Ahmad, S. J. N., Parveen, N., Hussain, I., & Bashir, R. (2022). Taurine regulates ROS metabolism, osmotic adjustment, and nutrient uptake to lessen the effects of alkaline stress on *Trifolium alexandrinum* L. plants. *South African Journal of Botany*, *148*, 482-498.

Sairam R. K. & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86, 407-421.

Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. (2001). Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *186*, 63-70.

Wang, S., Xie, B., Yin, L., Duan, L., Li, Z., Eneji, A., Suji, W., & Tsunekawa, A. (2010). Increased UV-B radiation affects the viability, reactive oxygen species accumulation and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) Pollen. *Photochemistry and Photobiology*, *86*, 110-116.

Xu, Z.,Wang, J., Zhen, W., Sun, T., & Hu, X. (2022). Abscisic acid alleviates harmful effect of saline-alkaline stress on tomato seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *175*, 58-67.

Yousfi, S., Marquez, A. J., Betti, M., Araus, J. L., & Serret, M. D. (2016). Gene expression and physiological responses to salinity and water stress of contrasting durum wheat genotypes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58, 48-66.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]

Enzyme changes study and expression evaluation of some important genes in salinity tolerance in four varieties of rice under hydroponic conditions

Saied Nawabpour*, Sanaz Ramadanpour, Ahad Yamchi, Dariush Ebadi Almas

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Natural Resources and Agricultural Sciences, Gorgan, Iran

(Received: 2022/11/22, Accepted: 2023/05/08)

Abstract

Salinity is one of the most important growth limiting factors and rice production in arid and semi-arid regions of the world. In order to investigate the effect of salinity stress on biochemical characteristics and the expression of some inducible genes in the seedling stage of rice, an experiment in the form of chopped plots with a basic design of randomized complete blocks were performed with four replications. The main factor included five levels of zero (control), 50, 100, 150 and 200 mM sodium chloride to create salinity stress. Salinity levels were applied along with Yoshida's nutrient solution in a hydroponic system. The sub-factor included four varieties of rice (Kashuri, Shiroodi, Tarem and Kohsar). In this research, the cellular oxidation level index (TBARM), enzyme activities and expression of some important antioxidant genes, including catalase, superoxide dismutase, ascorbic peroxidase, and the TCTP transcription factor, were investigated. The results of the variance analysis of the data showed that the difference between cultivars and salinity levels for all studied traits was significant at the probability level of 1%. Also, by increasing the salinity level, the activity of the studied enzymes and the expression of catalase, superoxide dismutase, ascorbic peroxidase and TCTP genes increased. According to the obtained results, Shiroudi and Kohsar cultivars were identified as salinity tolerant cultivars.

Keyword: Biochemical traits, Gene expression, Rice, Salinity stress

Corresponding author, Email: s.navabpour@gau.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-25]