



ارزیابی فعالیت برخی از آنزیم‌های دفاعی مهم در برنج جهش یافته‌ی مقاوم به بیماری بلاست

داریوش عبادی الماس^۱، سعید نواب پور*^۱، احد یامچی^۱، خلیل زینلی نژاد^۱، علی مومنی^۲، قادر میرزاقادری^۳
۱. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸، گرگان - ایران
۲. مؤسسه‌ی تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، صندوق پستی: ۹۱۹۵۱-۴۶۱۹۱، آمل - ایران
۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه کردستان، صندوق پستی: ۶۶۱۷۷-۱۵۱۷۵، سنندج - ایران

چکیده: بیماری بلاست، که توسط قارچ مگناپورت گریسیا، با فرم غیرجنسی پریکولاریا گریسیا، ایجاد می‌شود از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی برنج در منطقه‌های گرمسیری و معتدل دنیا و هم‌چنین ایران است. گیاهان جهش یافته‌ی حاصل از اصلاح جهشی به دلیل داشتن زمینه‌ی ژنتیکی یکسان با والدشان، مواد آزمایشی مناسبی برای تجزیه‌های مقایسه‌ای و تشریح سازوکارهای مولکولی هستند. بدین منظور در آزمایشی بذریه‌های دو ژن‌مانه‌ی برنج شامل رقم جهش یافته‌ی (پویا) و رقم والد مربوط به آن (موسی طارم) از مؤسسه‌ی تحقیقات برنج ایران تهیه شده و در آزمایش‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. ارزیابی مؤلفه‌های مقاومت نشان داد که رقم جهش یافته‌ی پویا دارای نوع مقاوم و رقم موسی طارم دارای نوع حساس هستند. بررسی‌های زیست‌شیمیایی در شرایط کنترل و القای بیماری نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در رقم جهش یافته‌ی پویا بیش‌تر از رقم موسی طارم بود، درحالی‌که میزان اکسایش سلولی کم‌تری نسبت به آن داشت. با توجه به نقش مثبت آنزیم‌های دفاعی در کنترل پیشرفت بیماری بلاست، رقم جهش یافته‌ی پویا با فعالیت بیش‌تر آنزیم‌های دفاعی وضعیت بهتری نسبت به رقم والد خود نشان داد که بیانگر مقاومت آن در برابر بیماری بلاست است.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های دفاعی، رقم جهش یافته، برنج، بیماری بلاست

Evaluation of Several Important Defense Enzyme Activities in Mutant Rice Resistant to Blast Disease

D. Ebadi Almas¹, S. Navabpour*¹, A. Yamchi¹, K. Zaynali Nezhad¹, A. Moumeni², G. Mirzaghaderi³

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan -Iran
2. Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, P.O.Box: 46191-91951, Amol - Iran
3. Group Science and Plant Breeding Department, Faculty of Agricultural, University of Kurdistan, P.O.Box: 66177-15175, Sanandaj - Iran

Abstract: Blast disease, caused by fungus *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, with asexual form *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc, is the main fungal disease of rice in the tropical and temperate regions of the world and also in Iran. Mutant plants derived from mutation breeding due to having the same genetic background with their wild-type are useful experimental material for comparative analysis and dissecting molecular mechanisms. For this purpose, seeds of two rice genotypes, including mutant variety (Pooya) and its wild-type parent cultivar (Mosatarom), were prepared from the Rice Research Institute of Iran and used in greenhouse tests. Evaluation of resistance components showed that Pooya mutant variety was resistant and Mosatarom cultivar was susceptible. The biochemical analysis under control and inoculated conditions revealed that the enzyme activities of catalase, peroxidase, polyphenol oxidase in the Pooya mutant variety were more than, while the TBARM index was lower than, the Mosatarom cultivar. According to the positive role of defense enzymes in controlling disease progression, the Pooya mutant variety had better than its wild-type parent cultivar against the blast disease, due to the maximum defense enzyme activity.

Keywords: Defense Enzymes, Mutant Variety, Rice, Blast Disease

**۱. مقدمه**

خودبه‌خود با فراوانی خیلی کم رخ می‌دهند، شیوه‌های القای جهش ابزار مناسبی برای ایجاد سریع و افزایش تنوع در گونه‌های گیاهی هستند [۵]. مرسوم‌ترین روش القای جهش، استفاده از پرتوهای گاما با چشمه‌ی کبالت-۶۰ است. مزیت مهم اصلاح جهشی قابلیت اصلاح یک یا چند صفت بدون تغییر منبع‌های ژنی است [۶]. گیاهان جهش‌یافته‌ی حاصل از اصلاح جهشی به دلیل داشتن زمینه‌ی ژنتیکی یکسان با والدشان، مواد آزمایشی مناسبی برای تجزیه‌های مقایسه‌ای و تشریح سازوکارهای مولکولی هستند [۷]. برای مثال، مقایسه‌ی جهش‌یافته‌های برنج مقاوم به بیماری بلاست با والد حساس آن، عملکرد آنزیم‌هایی مانند کیتیناز^(۷) و آسکوربات پراکسیداز^(۸) را در پاسخ‌های دفاعی به این بیماری نشان داد [۸]. هم‌چنین در پژوهشی دیگر که بر روی جهش‌یافته‌های برنج مقاوم به بیماری سوختگی باکتریایی انجام شد، نقش آنزیم گلیکولوات اکسیداز^(۹) در مقاومت در برابر این بیماری مشخص شد [۹]. از این رو، پژوهش حاضر به منظور درک بهتر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی (مانند فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و ارزیابی سطح اکسایش سلولی) در برنج جهش‌یافته‌ی مقاوم به بیماری بلاست انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها**۲.۱. مواد گیاهی و شرط‌های رشد**

از دو ژن‌مانه^(۱۰)ی برنج شامل رقم جهش‌یافته (پویا) و رقم والد مربوط به آن (موسی طارم) به عنوان مواد گیاهی استفاده شد. رقم جهش‌یافته‌ی مورد بررسی، توسط جهش‌زای فیزیکی گاما با هدف زودرسی، مقاومت در برابر خوابیدگی و عدم آلودگی به بیماری بلاست رقم موسی طارم در سال ۱۳۷۶ تولید شد و در سال ۱۳۸۵ به عنوان گونه‌ی جدید با نام تجاری پویا در آژانس بین‌المللی انرژی اتمی ثبت شد (جدول ۱) [۱۰]. بذر این ژن‌مانه‌ها از مؤسسه‌ی تحقیقات برنج کشور در مازندران- آمل تهیه شده و در آزمایش‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا بذر ژن‌مانه‌ها با محلول ۲۰٪ سفیدکننده (سدیم هیپوکلریت ۱٪) ضدعفونی سطحی و پس از شستشو با آب در جعبه‌های پلاستیکی به ابعاد ۱۰cm×۲cm×۳cm حاوی خاک نرم زراعی شامل مخلوطی از کودهای شیمیایی (۲۴ گرم ازت، ۳ گرم فسفر و ۳ گرم پتاسیم به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم خاک) با سه تکرار و به تعداد ۱۸ بذر در هر ردیف کشت شد. سپس گیاهچه‌ها تا مرحله‌ی چهار برگی در گلخانه نگه‌داری شدند.

بیماری بلاست برنج توسط قارچ مگناپورت گریسیا^(۱)، با فرم غیرجنسی پریکولاریا گریسیا^(۲) ایجاد می‌شود و مهم‌ترین بیماری‌های قارچی برنج در منطقه‌های گرمسیری و معتدل دنیا و هم‌چنین ایران است [۱]. این بیماری در اغلب مرحله‌های رشد برنج از گیاهچه تا تشکیل دانه، آن را مورد حمله قرار می‌دهد و علائم مختلفی را ایجاد می‌کند که سبب بلاست برگ، گره و خوشه می‌شود [۲]. در سال‌های اخیر سازوکارهای دفاعی گیاهان به ویژه سازوکارهای زیست‌شیمیایی پاسخ به پاتوژن‌ها و آفت‌ها مورد توجه قرار گرفته است. گیاه، عامل‌های بیماری‌زا را تشخیص و به صورت زیست‌شیمیایی به آن‌ها پاسخ می‌دهد تا از بروز حمله پیشگیری نموده یا از تجمع عامل‌های بیماری‌زا در سلول‌های گیاهی ممانعت کند. یک برهم‌کنش ناسازگار بین گیاهان و قارچ‌های بیماری‌زا موجب القای پاسخ مقاومتی می‌شود، که طی آن فعالیت مسیرهای زیست‌شیمیایی موضعی و منظم افزایش یافته و به طور مستقیم موجب محدود شدن تجمع عامل‌های بیماری‌زا می‌شود. ترکیب‌های ضد میکروبی گیاه مانند فیتوالکسین‌ها که در پاسخ به هجوم عامل‌های بیماری‌زا ساخته می‌شوند، قادر هستند که مهاجم‌های بیماری‌زا را به دام انداخته یا از فعالیت آن‌ها جلوگیری نمایند [۳]. از طرفی نقطه‌ی اشتراک اغلب تنش‌های زنده و غیرزنده تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن از جمله یون- رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($\cdot OH$) است. غلظت‌های متعادل این رادیکال‌ها به عنوان انتقال پیام در روند تنظیم بیان ژن ایفای نقش می‌نمایند ولی غلظت‌های بالای آن‌ها موجب بروز تنش اکسیداتی و خسارت به مولکول‌های حیاتی می‌شود [۴]. گیاهان، سازوکارهای مختلفی برای کاهش اثر مخرب رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند. از جمله‌ی این سازوکارها تولید آنتی‌اکسیدان (ضد‌اکسنده)های آنزیمی و غیر آنزیمی است. از جمله‌ی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توان به آنزیم‌های کاتالاز^(۳)، پراکسیداز^(۴)، پلی‌فنول اکسیداز^(۵) و سطح اکسایش سلولی^(۶) اشاره کرد.

القای جهش، روشی برای افزایش تنوع ژنتیکی است که همراه با انتخاب، نوترکیبی و یا ترکیبی از این دو در اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حقیقت جهش با ایجاد تنوع، زمینه را برای ظهور قابلیت‌های ژنتیکی که به طور طبیعی بروز نمی‌کند، فراهم می‌سازد. از آنجایی که جهش‌های

**جدول ۱. صفت‌های بهبود یافته برنج جهش‌یافته‌ی پویا**

رقم والد	رقم جهش‌یافته	صفت‌های بهبود یافته
موسی طارم	پویا	مقاومت در برابر ورس، پاکوتاهی، مقاومت در برابر بلاست و افزایش عملکرد

۲.۲ آماده‌سازی مایه‌ی تلقیح

جدایه‌ی قارچ ام. گریسیا با نام آی-آ-۸۹ که دارای قابلیت و ثبات بیماری‌زایی بالایی بود، از مؤسسه‌ی تحقیقات برنج کشور در مازندران- آمل تهیه و برای مایه‌زنی گیاهچه‌ها استفاده شد. مایه‌ی تلقیح با استفاده از روش مک‌گیل و بونمن [۱۱] بر روی محیط کشت آلو-آگار^(۱۱) (آلو ۳ عدد، لاکتوز ۵ گرم، عصاره‌ی مخمر ۱ گرم، آگار ۱۷ گرم، آب ۱ لیتر) تهیه شد. سپس با استفاده از لام گلبول‌شمار با غلظت ۱۰^۵ (کنیدیوم^(۱۲) در هر میلی‌لیتر) و به میزان ۲۰ تا ۲۵ میلی‌لیتر به ازای هر جعبه آماده شد. چند قطره توین ۲۰^(۱۳) قبل از مایه‌زنی به سوسپانسیون کنیدیوم اضافه و به خوبی هم زده شد.

۳.۲ مایه‌زنی و نمونه‌گیری

مایه‌زنی در اتاقک رشد با اسپری دستی و به صورت یکنواخت بر روی گیاهچه‌های چهار برگی انجام و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگه‌داری شد. سپس دمای اتاقک رشد در ۲۸ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۹۵٪، میزان روشنایی ۱۴ و تاریکی ۱۰ ساعت تنظیم شد. برای ارزیابی‌های زیست‌شیمیایی شامل فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و شاخص اکسایش سلولی، نمونه‌گیری در زمان‌های ۱، ۲ و ۳، ۴ و ۵ روز پس از مایه‌زنی انجام و از گیاهچه‌های تیمار شده با آب مقطر استریل در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز به عنوان کنترل استفاده شد. سپس نمونه‌های برگ‌ی بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر با دمای ۸۰- درجه‌ی سلسیوس منتقل گردید.

۴.۲ ارزیابی مؤلفه‌های مقاومت در برابر بیماری

برای انجام این مهم، هفت روز پس از مایه‌زنی، از هر تکرار پنج گیاهچه به صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد تا شدت بیماری و میزان مقاومت ژن‌مانه‌ها اندازه‌گیری شود. نوع آلودگی براساس مقیاس ۰ تا ۵ اندازه‌گیری شد. ۰ = بدون علائم

آلودگی، ۱ = لکه‌های قهوه‌ای با قطر کوچک‌تر از ۰/۵ میلی‌متر، ۲ = لکه‌های قهوه‌ای به قطر حدود ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر، ۳ = لکه‌های دایره‌وار تا بیضی‌وار به قطر ۱ تا ۳ میلی‌متر و با مراکز خاکستری و حاشیه‌ای قهوه‌ای، ۴ = لکه‌های نوعی دوکی‌شکل به قطر ۳ میلی‌متر یا طویل‌تر با تعدادی محدود یا بدون لکه‌های بهم پیوسته، ۵ = لکه‌های نوع ۴ اما نیمی از پهنک یا بیش از یک برگ از طریق بهم پیوستن لکه‌ها از بین رفته‌اند. بر مبنای این روش مقیاس (۰-۲) دارای نوع مقاوم، (۳) نیمه‌حساس و (۴-۵) حساس است [۱۲]. سطح برگ آلوده شده براساس سیستم ارزیابی استاندارد^(۱۴) اندازه‌گیری شد [۱۳]. تعداد لکه‌های اسپورزا با نوع آلودگی ۳ و بالاتر به عنوان تعداد لکه بر روی هر گیاه شمارش شد.

۳. ارزیابی فعالیت آنزیم‌های دفاعی و سطح اکسایش**سلولی****۱.۳ تهیه‌ی بافر استخراج**

ابتدا ۲/۴۲۳ گرم تریس در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با HCl غلیظ pH آن در ۷/۸ تنظیم شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول به آن اضافه شد و حجم کل با آب مقطر به ۲۰۰ میلی‌لیتر افزایش یافت.

۲.۳ استخراج عصاره‌ی برگ

ابتدا مقدار ۰/۵ گرم نمونه‌ی برگ پودر شده، با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج و با استفاده از دستگاه میکسر ورتکس به خوبی مخلوط شد. آن‌گاه با استفاده از سانتریفوژ با تندی ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در مدت ۱۵ دقیقه فاز بالایی مخلوط به عنوان عصاره‌ی برگ جدا شد و برای سنجش فعالیت سه آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول‌اکسیداز و هم‌چنین مقدار کل پروتئین محلول مورد استفاده قرار گرفت.

۳.۳ آزمون برادفورد برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین در محلول**عصاره‌ی گیاهی**

روش برادفورد [۱۴] یک روش کلرسنجی با استفاده از طیف-نورسنج است که به منظور ساختن یک منحنی استاندارد برای محاسبه‌ی غلظت پروتئین نمونه به کار می‌رود.

**۴.۳ تهیه‌ی معرف برادفورد**

استفاده از دستگاه طیف-نورسنج تعیین شد. میزان فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد [۱۵].

مقدار ۰/۱ گرم کوماسی بریلینت بلو در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪ و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به مدت یک ساعت هم زده شد. سپس ارتوفسفریک اسید ۸۵٪ به صورت قطره قطره به آن اضافه شد و حجم کل با آب مقطر به ۱ لیتر افزایش یافت. محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف شد.

۹.۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه‌یابی فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۴۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه‌ی ۲۲۵ میلی‌مولار و ۴۹۰ میکرولیتر محلول گایاکول ۴۵ میلی‌مولار در دمای پایین (ظرف شامل یخ) با هم مخلوط و به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیم اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف-نورسنج تعیین شد. در محلول شاهد به جای عصاره‌ی آنزیم، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد [۱۶].

۵.۳ تهیه‌ی محلول پایه‌ی پروتئین استاندارد

برای تهیه‌ی پروتئین استاندارد یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مقدار یک میلی‌گرم از پروتئین آلبومین سرم گاوی در یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد.

۶.۳ تهیه‌ی منحنی استاندارد

مقدارهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئین استاندارد، به طور جداگانه در لوله‌های شیشه‌ای وارد و به ترتیب، مقدارهای ۹۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ و صفر میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده به لوله‌ها اضافه شد تا حجم نهایی محلول در هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر باشد. به علاوه از یک لوله‌ی شیشه‌ای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده به عنوان محلول شاهد استفاده شد. سپس پنج میلی‌لیتر از معرف برادفورد به هر کدام از لوله‌ها اضافه و خوب هم زده شد. فاصله‌ی زمانی دو دقیقه تا یک ساعت پس از اختلاط معرف با نمونه‌ها، بهترین زمان برای سنجش نمونه‌ها با دستگاه طیف-نورسنج است. سپس جذب نمونه‌ها نسبت به شاهد در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد رسم شد.

۱۰.۳ اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنول اکسیداز

برای تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، ۴۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه‌ی ۰/۵ مولار و ۴۹۰ میکرولیتر محلول پیروگالول ۰/۲ مولار به ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیم اضافه و تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف-نورسنج تعیین شد. فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد [۱۷].

۷.۳ تعیین پروتئین نمونه‌ی عصاره‌ی برگ

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی برگ در درون لوله‌ی آزمایش وارد و به آن پنج میلی‌لیتر از معرف برادفورد اضافه و پس از دو دقیقه مقدار جذب در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

۱۱.۳ سنجش اکسایش سلولی

در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسایشی است، مقدار مالون‌دی‌آلدئید^(۱۵) که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسایش مولکول‌های بزرگ است اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۵ گرم برگ همگن شده و یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۵٪ به آن اضافه شد. محلول حاصل پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط و در سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه و با تندی ۴۷۵۰ دور در دقیقه تحت عمل جداسازی یا تقسیم قرار گرفت. رسوب حاصل با ۵ میلی‌لیتر استون شسته شد، پس از مخلوط شدن با دستگاه میکسر ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه تحت عمل جداسازی در سانتریفوژ قرار گرفت، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۱٪ و یک میلی‌لیتر تیوباریتیوریک اسید ۰/۶٪ افزوده شده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس قرار

۸.۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیم با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات شامل آب اکسیژنه‌ی ۲ میلی‌مولار مخلوط و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با



۳.۴ فعالیت آنزیم‌های دفاعی و سطح اکسایش سلولی در شرایط القای بیماری

فعالیت آنزیم کاتالاز در ژن‌مانه‌های مورد مطالعه با افزایش زمان بیماری روند نزولی داشت و میزان آن در رقم جهش‌یافته‌ی پویا در زمان‌های یک تا پنج روز پس از القای بیماری افزایش معنی‌داری نسبت به رقم موسی طارم داشت (شکل ۱ الف). بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در زمان یک روز پس از القای بیماری در رقم جهش‌یافته‌ی پویا مشاهده شد (شکل ۱ الف). پس از شناسایی محرک^(۱۶) پاتوژن توسط گیرنده‌های سلولی گیاه، اولین رویداد به صورت یک پیام اکسیدی رادیکال‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن است که نقش انتقال‌دهنده‌ی پیام برای فعال شدن سیستم دفاعی را دارد [۲۰]. بنابراین سلول‌ها بالا رفتن مقدار رادیکال‌های آزاد اکسیژن به صورت کنترل نشده را احساس می‌کنند و از آن به عنوان یک سازوکار انتقال پیام برای فعال کردن پاسخ‌های محافظتی استفاده می‌کنند. برای خنثی نمودن اثرهای سمی و مخرب رادیکال‌های فعال اکسیژن، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول‌های گیاه فعال و مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن به وسیله‌ی این سیستم تنظیم می‌شود. تفاوت عمده‌ی گیاهان حساس و مقاوم، در میزان فعالیت این سیستم‌های دفاعی در برابر تنش‌ها است [۲۱]. آنزیم کاتالاز تقریباً در تمام موجودهای زنده یافت و از دسته‌ی پروتئین‌های آهن‌دار محسوب می‌شود و هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که در محیط سلولی مقدار ماده‌ی پراکسید هیدروژن زیاد باشد. این آنزیم دارای ساختار پروتئینی پورفیرینی چهارتایی با آهن است که وظیفه‌ی شکستن ترکیب‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن را دارد [۲۲].

داده شد. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف و مقدار جذب محلول حاصل، در طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه طیف-نورسنج اندازه‌گیری شد [۱۸].

۱۲.۳ تحلیل آماری

مقدارهای هر صفت، حاصل میانگین سه تکرار مستقل زیست‌فن‌آوری به همراه اشتباه استاندارد آن‌ها بود. تحلیل داده‌ها با آزمون تی‌استیودنت جفت‌شده در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد [۱۹].

۴. یافته‌ها و بحث

۱.۴ مؤلفه‌های مقاومت در برابر بیماری

نتیجه‌های حاصل از ارزیابی مؤلفه‌های مقاومت نشان داد که رقم موسی طارم دارای نوع آلودگی حساس (۵)، تعداد لکه‌ی اسپورزای بالا (۲۱/۳) و سطح برگ آلوده شده‌ی بالا (۱۹٪) و رقم جهش‌یافته‌ی پویا دارای نوع آلودگی مقاوم (۰/۳)، بدون لکه‌ی اسپورزا و سطح برگ آلوده شده‌ی پایین (۰/۱٪) بودند (جدول ۲).

۲.۴ فعالیت آنزیم‌های دفاعی و سطح اکسایش سلولی در شرایط بدون القای بیماری (کنترل)

در شرایط کنترل فعالیت سه آنزیم دفاعی و سطح اکسایشی سلولی در رقم جهش‌یافته‌ی پویا و رقم موسی طارم تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۳). میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در رقم جهش‌یافته‌ی پویا بیش‌تر و سطح اکسایش سلولی کم‌تر از رقم موسی طارم بود (جدول ۳). وجود اختلاف معنی‌دار برای شاخص‌های اکسیدی (CAT, POD, PPO و TBARM) بین ژن‌مانه‌های مورد مطالعه در شرایط کنترل بیان‌گر تأثیر پرتودهی در ایجاد جهش و ایجاد تنوع ژنتیکی از نظر این صفت‌ها است.

جدول ۲. مؤلفه‌های مقاومت رقم جهش‌یافته (پویا) و رقم والد (موسی طارم) پس از مایه‌زنی با عامل بیماری بلاست در شرایط گلخانه

ژن‌مانه	نوع آلودگی	تعداد لکه	سطح برگ آلوده شده (%)	واکنش
موسی طارم	۵	۲۱,۳	۱۹	حساس
پویا	۰,۳	۰	۰,۱	مقاوم

**جدول ۳. فعالیت آنزیم‌های دفاعی و شاخص اکسایش سلولی رقم جهش‌یافته (پویا) و رقم والد (موسی طارم) در شرایط کنترل**

ژن‌مانه	کاتالاز (جذب/ دقیقه/ میلی گرم) (پروتئین)	پراکسیداز (جذب/ دقیقه/ میلی گرم) (پروتئین)	پلی فنول اکسیداز (جذب/ دقیقه/ میلی گرم) (پروتئین)	شاخص اکسایش سلولی (نانومول/ گرم وزن تر)
موسی طارم	۸,۳۹±۰,۵۹	۲۲,۵۹±۲,۰۶	۲۰,۳۶±۰,۷۱	۴,۸۱±۰,۸۸ ^(الف)
پویا	۱۵,۴۷±۱,۰۴ ^(الف)	۳۷,۸۴±۳,۸۶ ^(الف)	۲۵,۵۸±۱,۳۲ ^(الف)	۲,۷۲±۰,۵۶

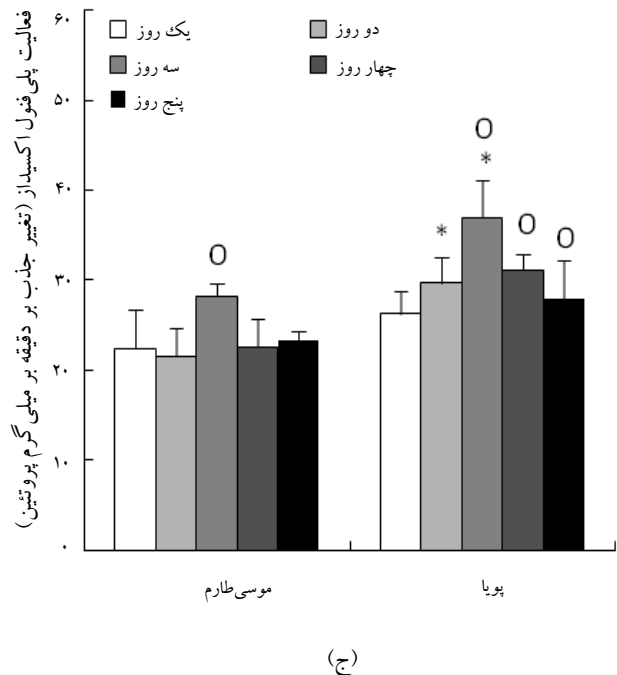
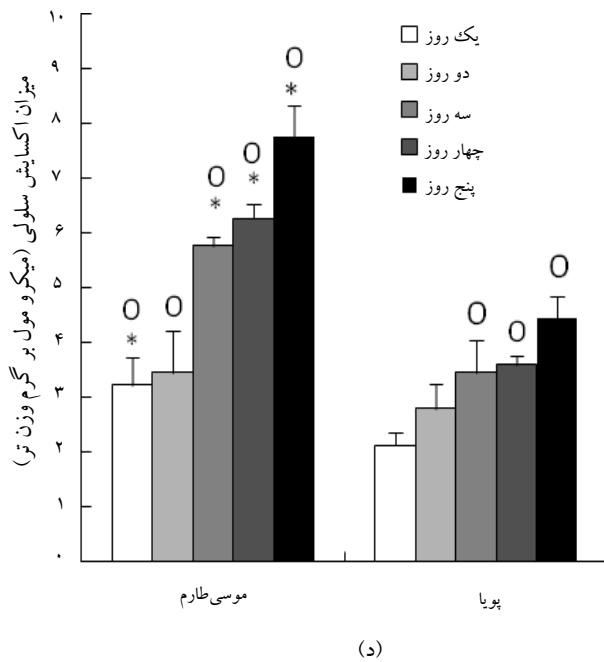
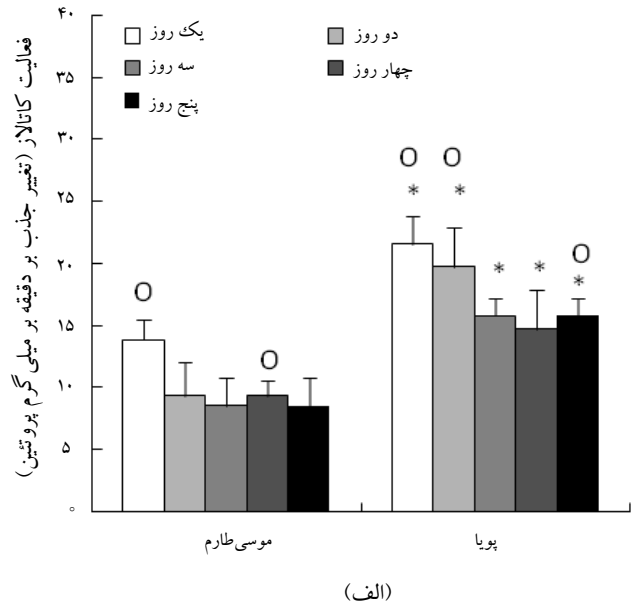
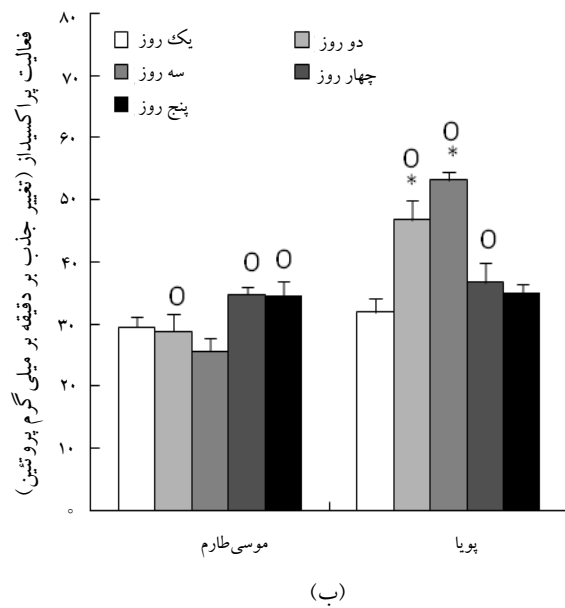
(الف) مقادیرهای نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین رقم جهش‌یافته (پویا) و رقم والد (موسی طارم) براساس آزمون تی‌استیودنت در سطح احتمال ۵ درصد است.

گیاهی طی آلودگی‌های میکروبی می‌شود و همچنین در واکنش‌های تدافعی و فوق حساسیت که سبب مقاومت به قارچ‌ها می‌شود شرکت دارد [۲۷]. در بسیاری از موارد همبستگی نزدیکی ما بین فعالیت افزایش یافته‌ی پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز و غلظت مواد فنولی از یک سو و مقاومت گیاه از سوی دیگر یافت شده است [۲۰]. در پژوهش حاضر روند تغییرهای فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز و آنزیم پراکسیداز در رقم جهش‌یافته‌ی پویا مشابه بود که این امر می‌تواند حاکی از همبستگی عملکرد این دو آنزیم در ایجاد مقاومت به بیماری بلاست باشد.

با افزایش زمان بیماری میزان اکسایش سلولی در هر دو ژن‌مانه‌ی مورد بررسی افزایش یافت (شکل ۱ د). افزایش این شاخص تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده در نتیجه‌های سایر پژوهش‌گران نیز گزارش شده است [۲۸، ۲۹]. با وجود این، در رقم جهش‌یافته‌ی پویا میزان اکسایش سلولی در همه‌ی زمان‌های بیماری به جز روز دوم کاهش معنی‌داری نسبت به رقم موسی طارم داشت (شکل ۱ د). پایین بودن سطح اکسایشی در رقم جهش‌یافته‌ی پویا نسبت به رقم والد خود می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مورد مطالعه‌ی کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنول پراکسیداز در آن باشد [۳۰]. ماهیت اصلی فرایند تنش‌ها ایجاد عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پاکسازی آن‌ها در سلول است که در هر دو نوع تنش زنده و غیرزنده رخ می‌دهد. غلظت بالا و سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن باعث آسیب شدید به ساختارهای پروتئینی، مهار فعالیت آنزیم‌های متعدد از مسیرهای سوخت و سازی و در نتیجه اکسایش درشت مولکول‌هایی از جمله چربی‌ها و DNA می‌شود. بنابراین سنجش TBARM که در آن مالون‌دی‌آلدئید (محصول نهایی و با ثبات نسبی پروکسیددار شدن چربی‌ها و اکسایش سلولی) اندازه‌گیری می‌شود، به عنوان شاخصی از مقدار اکسنده در سطح سلولی و مولکولی قابل ارزیابی است.

روند فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز در رقم جهش‌یافته‌ی پویا مشابه بود به طوری که بیش‌ترین مقدار آن‌ها در روز سوم مشاهده شد و با افزایش زمان بیماری در روزهای چهارم و پنجم کاهش یافت (شکل ۱ ب و ج). هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز در رقم جهش‌یافته‌ی پویا در زمان‌های دو و سه روز پس از القای بیماری افزایش معنی‌داری نسبت به رقم موسی طارم داشتند (شکل ۱ ب و ج). آنزیم پراکسیداز در بسیاری از عملکردهای سوخت و سازی اولیه و ثانویه‌ی مختلف از جمله: در تنفس گیاهان عالی، از طریق اکسایش سوخت‌سازها با واسطه‌ی هیدروژن پراکسید به عنوان پذیرنده‌ی الکترون [۲۳]، ایجاد پل‌های عرضی مونومرهای اکستانسین^(۱۷) پلی ساکاریدهای فرولولیته^(۱۸) در دیواره‌ی سلولی [۲۴]، لیگنین‌دار شدن^(۱۹)، اکسایش فنول و رسوب مواد فنولی بر روی دیواره‌های سلولی در طی واکنش‌های مقاومت و التیام دادن زخم‌ها نقش دارد. به‌علاوه پراکسیدازها در مقاومت گیاه اثر مستقیم داشته و از طریق تولید رادیکال آزاد و هیدروژن پراکسید که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به مقاومت گیاه در برابر بیمارگر می‌شوند [۲۵]. این‌طور به نظر می‌رسد که پراکسیدازها زودتر از دیگر ترکیب‌ها در پراکسیددار شدن مولکول‌های ماده‌ی مورد عمل^(۲۰) درگیر و منجر به تجمع بالای ترکیب‌های سمی یعنی ترکیب‌های فنولی اکسید شده (مانند کینون‌ها) می‌شود. این ترکیب‌ها در مقاومت گیاه از طریق قابلیت ضد قارچی‌اشان شرکت می‌کنند. نکته‌ی قابل توجه این است که در اکثر موارد فعالیت پراکسیداز در واکنش‌های ناسازگار بیش‌تر از واکنش‌های سازگار است [۲۶]. در این بررسی با توجه به این‌که رقم جهش‌یافته‌ی پویا مقاومت و ناسازگاری بیش‌تری در برابر بیماری بلاست نسبت به رقم موسی طارم داشت از این‌رو افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز پس از القای بیماری در رقم جهش‌یافته‌ی پویا نسبت به رقم موسی طارم توجیه‌پذیر است.

پلی فنول اکسیداز سبب اکسایش پلی فنول‌ها به کینون‌ها (ترکیب‌های ضد میکروبی) و لیگنینی شدن دیواره‌ی سلول‌های



شکل 1. الف) فعالیت کاتالاز، ب) فعالیت پراکسیداز، ج) فعالیت پلی فنول اکسیداز، د) سطح اکسایش سلولی در رقم جهش یافته (پویا) و رقم والد (موسی طارم) پس از مایه‌زنی با عامل بیماری بلاست. دایره‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌های کنترل و مایه‌زنی شده، و ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین رقم جهش یافته (پویا) و رقم والد (موسی طارم) بر اساس آزمون تی استیوننت در سطح احتمال 5 درصد است.

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز در رقم جهش‌یافته‌ی پویا بیش‌تر از رقم موسی طارم است، در حالی‌که میزان اکسایش سلولی کم‌تری نسبت به آن داشت. با توجه به نقش مثبت آنزیم‌های دفاعی در کنترل پیشرفت بیماری بلاست، رقم جهش‌یافته‌ی پویا وضعیت بهتری نسبت به رقم والد خود نشان داد که بیان‌گر مقاومت آن در برابر بیماری بلاست است.

5. نتیجه‌گیری

به طور کلی نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش بیان‌گر نقش فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی مهم در دو ژن‌مانه‌ی برنج شامل رقم جهش‌یافته‌ی (پویا) و رقم والد مربوط به آن (موسی طارم) تحت القای بیماری بلاست است. داده‌های حاصل از بررسی‌های زیست شیمیایی در شرایط کنترل و القای بیماری نشان داد که میزان



پی‌نوشت‌ها

1. Magnaporthe Grisea (Hebert) Barr
2. Pyricularia Grisea (Cooke) Sacc
3. Catalase; CAT
4. Peroxidase; POD
5. Polyphenol Oxidase; PPO
6. Thiobarbituric Acid Reactive Material; TBARM
7. Chitinase; Cht
8. Ascorbate Peroxidase; APX
9. Glycolate Oxidase; GLO
10. Genotype
11. Prune-Agar
12. Conidium (نوعی هاگک غیر جنسی در قارچ‌ها و ...)
13. Tween 20
14. Standard Evaluation System for Rice; SES
15. Malondialdehyd; MDA
16. Elicitor
17. Extensin
18. Feruloylated
19. Lingonpicution
20. Substrate

مرجع‌ها

- [1] M. Amanzadeh, A. Moumeni, M. Okhovat, M. Javan-Nikkhah, V. Khosravi, Evaluation of resistance of rice to leaf and panicle blast in Mazandaran province, JWSS-Isfahan University of Technology, 11 (2008) 209-219.
- [2] D.H. Long, F.N. Lee, D.O. TeBeest, Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistance cultivars, Plant Dis, 84 (2000) 403-409.
- [3] J.D. Paxton, J. Groth, Constraints on pathogens attacking plants, Crit. Rev. Plant Sci, 13 (1994) 77-95.
- [4] S.A.H. Mackerness, C.F. John, B. Jordan, B. Thomas, Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide, FEBS Lett, 489 (2001) 237-242.
- [5] M. Maluszynski, K. Nichterlein, L. Vanzanten, B.S. Ahloowalia, Officially released mutant varieties- the FAO/IAEA Database, Mut. Breed. Rev, 12 (2000) 1-84.
- [6] A. Wani, M. Anis, Gamma Ray- and EMS-Induced Bold-Seeded High-Yielding mutants in chickpea (*Cicer arietinum*), Turk. J. Biol, 32 (2008) 1-5.
- [7] K.C. Lin, W.S. Jwo, N.N.P. Chandrika, T.M. Wu, M.H. Lai, C.S. Wang, C.Y. Hong, A rice mutant defective in antioxidant-defense system and sodium homeostasis possesses increased sensitivity to salt stress, Biologia Plantarum, 60 (2016) 86-94.
- [8] X. Chen, S. Fu¹, P. Zhang, Z. Gu¹, J. Liu¹, Q. Qian, B. Ma, Proteomic analysis of a disease-resistance enhanced lesion mimic mutant spotted leaf 5 in rice, Rice, 6 (2013) 1-10.
- [9] M. Chern, W. Bai, X. Chen, P.E. Canlas, P.C. Ronald, Reduced expression of glycolate oxidase leads to enhanced disease resistance in rice, Peer J, (2013) 1: e28, DOI 10.7717/peerj.28.
- [10] International Energy Agency (IAEA), Mutant Variety Database [Onvariety], Available at <https://mvd.iaea.org> (2004).
- [11] A.O. Mackill, J.M. Bonman, New hosts of *Pyricularia oryzae*, Plant Dis, 70 (1986) 123-129.
- [12] D.J. Mackill, J.M. Bonman, Inheritance of blast resistance in near-isogenic varieties of rice, Phytopathology, 82 (1992) 746-749.
- [13] International Rice Research Institute; IRRI, Standard Evaluation System (SES) for rice, IRRI, LosBanos, Laguna, Philippines (1996).
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem, 72 (1976) 248-254.
- [15] H. Luck, Methods in Enzymatic Analysis, 2nd Ed, Academic Press, New York (1974).
- [16] B.C. In, S. Motomura, K. Inamoto, M. Doi, G. Mori, Multivariate analysis of relation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses, Japan. Soc. Hort. Sci, 76 (2007) 66-72.
- [17] A. Shatta, Z. El-Shamei, Differentiation of eggplant (*Solanum melongena* L.) polyphenoloxidase, laccase and peroxidase using selective substrates and inhibitors, Adv. Food Sci, 21 (1999) 79-83.



- [18] D. Hagege, A. Nouvelot, J. Boucard, T. Gaspar, Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference, *Phytochem. Anal*, 1 (1990) 86-89.
- [19] SPSS Inc, SPSS for Windows, released version 16.0. SPSS Inc., Chicago, (2007).
- [20] R.N. Goodman, Z. Kiraly, K.P. Wood, Biochemical and physiological aspects of plant disease, University of Missouri Press, (1986) 433.
- [21] M.F. Abdel-Monaim, Improvement of biocontrol of damping-off and root rot/wilt of faba bean by salicylic acid and hydrogen peroxide, *Mycobiology*, 41 (2013) 47-55.
- [22] Y.Y. Du, P.C. Wang, J. Chen, C.P. Song, Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*, *J. Integr. Plant Biol*, 50 (2008) 1318-1326.
- [23] F. Fric, Oxidative enzymes, In Heitefuss, R. and P. H. Williams (Eds.) *Encyclopedia of plant physiology*, Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1976) 617-631.
- [24] S.C. Fry, Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, *Ann. Rev. Plant Physiol*, 37 (1986) 165-186.
- [25] M. Peng, J.A. Kuc, Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks, *Phytopathology*, 82 (1992) 696-699.
- [26] J.M. Daly, P. Ludden, P.M. Seevers, Biochemical comparisons of resistance to wheat stem rust disease controlled by the Sr11 alleles, *Physiol. plant pathol*, 1 (1971) 397-407.
- [27] T. Kosuge, The role of phenolics in response to infection, *Ann. Rev. Phytopathol*, 7 (1969) 195-222.
- [28] Z. Hao, L. Wang, F. Huang, R. Tao, Expression of defense genes and antioxidant defense responses in rice resistance to neck blast at the preliminary heading stage and full heading stage, *Plant Physiol. Biochem*, 57 (2012) 222-230.
- [29] S. Navabpour, K. Morris, E. Harrison, S. Makerness, V. Buchanan-Wollaston, Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress, *J. Exp. Bot*, 54 (2003) 2285-2292.
- [30] S. Navabpour, S.S. Mirkarimi, A. Mazandarani, Evaluation of enzymatic and non-enzymatic defense mechanism in response to charcoal rot disease during growth stage in soybean, *Crop Biotech*, 5 (2013) 63-73.