

تأثیر سیلیکون بر میزان بیان ژن پراکسیداز و صفات ریخت‌شناسی گیاه جو تحت تنش خشکی

رحیم حداد، Ph.D.^۱، صبا مخلصیان، M.Sc.^{۲*}

- ۱- دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، قزوین، ایران
 ۲- کارشناس ارشد دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، قزوین، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: sabamokhlesian@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۶

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی تأثیر سیلیکون بر شدت بیان ژن پراکسیداز و برخی صفات ریخت‌شناسی آن در دو لاین مقاوم و حساس گیاه جو تحت تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها: میزان پروتئین محلول کل، رنگدانه‌های فتوسنتزی، RNA کل از برگ‌های تیمارهای مختلف استخراج شد. ژن هدف پس از ساخت cDNA با استفاده از RT-PCR به صورت نیمه کمی بررسی شد. همچنین مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش Chance و پرولین نیز با روش Bates تحت تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی (۲ میلی مولار سیلیکات سدیم/ کیلوگرم خاک) با سه تکرار در گلخانه اجرا شد.

نتایج: کاربرد سیلیکون در هر دو لاین، میزان پروتئین محلول کل و رنگدانه‌های فتوسنتزی را تحت شرایط تنش خشکی افزایش داد. آنالیز نیمه کمی RT-PCR اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز در تیمار سیلیکون-خشکی مشاهده شد. افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و بررسی الگوی باندهای این آنزیم‌ها بر روی ژل آکریل آمید نشان داد که شدت باندها در تیمار سیلیکون بیشتر بود. میزان پرولین در شرایط تنش در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت و با کاربرد سیلیکون افزایش بیشتری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: سیلیکون به تأثیر کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن کمک می‌کند و با افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده، موجب حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های ضد اکسنده، بیان ژن، تنش خشکی، سیلیکون

مقدمه

پروپیلن-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و پروپیلن-۵-کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) انجام می‌شود. در واقع در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم P5CS افزایش یافته و مقدار پروپیلن را در داخل سلول به حدی بالا می‌برد که از خسارت زیاد کم آبی به گیاه جلوگیری می‌کند (۱۶). سیلیکون بعد از اکسیژن دومین عنصر فراوان در خاک است. دی‌اکسیدسیلیکون دربرگیرنده ۵۰ تا ۷۰ درصد توده خاک است، در نتیجه همه‌ی ریشه گیاهان در خاک مقداری سیلیکون در بافت خود دارند (۱۷). با این حال نقش سیلیکون در رشد و توسعه گیاهان نادیده گرفته شده است. از آنجایی که فراوانی این عنصر به دلیل نشانه‌های قابل مشاهده در طبیعت، کمبود و یا سمی بودن آن آشکار نیست، به نظر می‌رسد فیزیولوژیست‌های گیاهی تا حدودی آن را نادیده گرفته‌اند. سیلیکون در ریشه‌ها به فرم سالیسیک اسید جذب می‌شود. گیاهان مختلف در جذب سیلیکون مقادیر متفاوتی از ۰/۱ تا ۱۰ درصد وزن خشک را از خود نشان می‌دهند (۱۸). نقش سیلیکون در کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در غلات به اثبات رسیده است. اخیراً در پژوهش‌های صورت گرفته به اثرات مفید و حاصل‌خیزی سیلیکون در زمان بروز تنش‌های محیطی که با افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسند و بالا رفتن محتوای اسمولیت‌ها، نقش مهمی را در ایجاد تحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان ایفا می‌کند، اشاره شده است. این ماده همچنین با کاهش در میزان کاربرد علف‌کش‌ها و مواد سمی، مانع از آلودگی محیط زیست از اثرات مضر ناشی از استعمال سموم کشاورزی می‌شود (۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲).

جو یکی از مهم‌ترین غلاتی است که در بسیاری از کشورهای جهان کاشته می‌شود. در این کشورها جو بیشتر در مزرعه و در شرایط دیم کشت می‌شود و اغلب تحت تاثیر کمبود شدید آب در طی فصول خشک قرار می‌گیرد. بنابراین تنش خشکی یکی از مشکلات اساسی تولید جو در این مناطق می‌باشد و شناسایی راه‌های افزایش محصول و کاربرد موادی که در بالا بردن مقاومت گیاهان به این تنش‌ها موثر هستند، ضروری می‌باشد. بدین منظور در این تحقیق، تاثیر سیلیکون بر محتوای پروتئین محلول کل، رنگدانه‌های فتوسنتزی، میزان بیان ژن POX، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و پروپیلن در دو لاین جو با تحمل متفاوت به خشکی در شرایط گلخانه بررسی شد.

خشکی علت اصلی کاهش رشد گیاهان و عملکرد آن‌ها در مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب شده و موجب تحریک سلسله پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود (۱). تنش خشکی با علائم کاهش محتوای آب، کم شدن پتانسیل آب برگ‌ها، کاهش حالت تورم سلول‌های نگهبان روزنه، بستن روزنه‌ها و کاهش در توسعه و رشد سلول مشخص می‌شود (۲، ۳ و ۴). پیری، تنش و تحریکات رشدی در گیاه باعث افزایش مقادیر مختلف اکسیژن فعال از قبیل: آنیون سوپراکساید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن منفرد می‌شود. این مولکول‌های فعال موجب صدمه به ماکرومولکول‌ها و نیز ساختار سلولی شده یا اینکه به‌عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند. گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی برای دفاع در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) استفاده می‌کنند (۵ و ۶). سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌های ضد اکسند مانند کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX) و گلوکاتاتیون ردوکتاز (GR) بوده که وظیفه عمده این آنزیم‌ها تجزیه پراکسید هیدروژن می‌باشد (۷، ۸). از پاسخ‌های بیوشیمیایی به تنش نیز می‌توان به تجمع متابولیت‌هایی که قابلیت انحلال داشته ولی متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند، اشاره کرد. این مواد که به اسمولیت‌ها معروف هستند شامل قندها و متابولیت‌های دارای بار الکتریکی مثل گلیسین بتائین و اسیدهای آمینه‌ای چون پروپیلن است (۹، ۱۰ و ۱۱). تجمع پروپیلن در شرایط تنش شوری و بی‌آبی صورت می‌گیرد، به‌طوری‌که پروپیلن در بسیاری از گیاهان به‌عنوان نشانگر بیوشیمیایی برای تشخیص تحمل به تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). پروپیلن یکی از تنظیم‌کننده‌های اسمزی است که موجب سازش سلول گیاهی برای زنده ماندن در شرایط تنش‌زا و حفاظت آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی در برابر تغییرات ساختاری می‌شود. جهت حفظ لیپیدهای غشا از خسارت القا شده توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن، افزایش پروپیلن مشاهده می‌شود و با افزایش مقدار و فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین‌های دفاعی، در حفظ ساختمان کلروپلاست دستگاه فتوسنتز و کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش نقش دارد (۱۳، ۱۴ و ۱۵). تجمع پروپیلن در سلول از طریق دو کاتالیز متوالی به‌وسیله

مواد و روش‌ها

استخراج و اندازه‌گیری میزان کلروفیل نیز از روش Arnon استفاده شد (۲۴). بدین‌منظور ۲۰۰ ماکرولیتر بافت خرد شده برگ را با ۸۰۰ ماکرولیتر استون ۱۰۰ درصد (v/v) مخلوط کرده و مخلوط حاصله به آرامی ورتکس شده و به مدت یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول رویی را برداشته و برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. مقادیر جذب در طول موج‌های $A=645$ و $B=663$ نانومتر قرائت شده و اعداد به دست آمده در فرمول‌های زیر بر حسب ($\mu\text{g/ml}$) محاسبه گردید.

$$a \text{ کلروفیل} = (12.7 \times B) - (2.96 \times A)$$

$$b \text{ کلروفیل} = (22.9 \times A) - (4.68 \times B)$$

$$\text{کلروفیل کل} = (20.2 \times A) + (8.02 \times B)$$

استخراج RNA استخراج RNA توسط کیت RNX-plus شرکت سیناکلون از نمونه‌های برگ فریز شده، طبق دستورالعمل صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل ۱/۵ درصد تایید شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S در روی ژل نشان‌دهنده کیفیت سلامت RNA تخلیص شده بود. برای بررسی کمی میزان استخراج از اسپکتروفتومتر استفاده شد. در مرحله بعد RNA استخراج شده با آنزیم DNase1 بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد.

ساخت cDNA تهیه cDNA با استفاده از کیت RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase شرکت سیناکلون صورت گرفت. ۰/۱ تا ۵ میکروگرم از محلول RNA کل به همراه ۱ میکرولیتر Oligo-dT و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه درون میکروتیوپ مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵+ درجه سانتی‌گراد و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. مقدار ۲ میکرولیتر از محلول بافر واکنش، ۱ میکرولیتر از آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP و ۱ میکرولیتر از آنزیم RT به مخلوط واکنش اضافه شد. تیوپ‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۵+ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به منظور توقف واکنش در دمای ۷۰+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این بررسی از دو لاین گیاه جو دوردیفه (*vulgare L.* (Hordeum) با تحمل متفاوت به خشکی به نام CB-۲۰۳۱۵ (مقاوم) و CB-۲۰۲۱۳ (حساس) تهیه شده از بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج استفاده شد. این تحقیق بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با سه تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) در سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ مورد ارزیابی قرار گرفت. بذرها پس از ضد عفونی به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک زراعی معمولی در شرایط گلخانه کاشته شدند. میانگین دما در طی رشد (25 ± 2) درجه سانتی‌گراد) و طول روز تقریباً ۱۰ ساعت بود. تنش خشکی با کار گذاشتن بلوک گچی در گلدان‌ها کنترل شد. نمونه‌برداری در مرحله چهارم برگی زمانی که پتانسیل آب خاک در تیمارهای خشکی و سیلیکون-خشکی به ۱- مگاپاسگال رسید، انجام شد. نمونه‌های یک گرمی از برگ‌های سالم هر بوته برداشت شده و پس از انجماد فوری در نیتروژن مایع در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به منظور استفاده در سنجش‌های بعدی نگهداری شد.

سنجش میزان پروتئین محلول کل و رنگدانه‌های

فتوستتزی: استخراج پروتئین با استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدین در حضور ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ و سدیم متابای بی‌سولفیت ۱ میلی‌مولار) صورت گرفته و پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰۰ و دمای ۴+ سانتی‌گراد توسط دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (Allegra 64R- Beckman Coulter)، عصاره با ۲۵ درصد حجم از گلیسرول ۵۰ درصد (v/v) ترکیب و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف ذخیره شد. میزان پروتئین محلول کل با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-3200-Labomed) به روش Bradford سنجش شد (۲۳). جهت اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌های گیاهی، با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA)، منحنی استاندارد رسم شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره آنزیمی با یک میلی‌لیتر معرف بردفورد ۲۰ درصد مخلوط شده و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. جهت سنجش ژلی پروتئین محلول کل از ژل SDS-PAGE به روش لاملی استفاده شد. برای

دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ ثانیه بود. مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت سه دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه انجام گرفت. نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (W/V) بارگذاری شدند و پس از الکتروفورز، عکس ژل‌ها با استفاده از برنامه Image J آنالیز شدند.

طراحی آغازگرها برای کمیت سنجی با واکنش زنجیرهای پلیمرز: برای طراحی آغازگرها ابتدا توالی ژن پراکسیداز و ژن خانه‌دار آکتین از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 آغازگرهای مورد نظر طراحی شد (جدول ۱). واکنش PCR جهت بررسی سنتز cDNA در ۳۵ چرخه دمایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در

جدول ۱: مشخصات آغازگرها

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'-3')	طول قطعه	TM (درجه سانتی‌گراد)
POX	AGC TGT CAC CAA ACT TCC AC	132	58/32
	AAC AGT CGT GGA AGA GGA TG		57/25
ACTIN	ACC CAA AAG CCA ACA GAG AG	143	58/01
	ACC ATC ACC AGA GTC GAG AA		51/08

آنالیز آماری

این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون- خشکی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال مربوطه و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

در این تحقیق، اثر لاین، تیمار و اثر متقابل لاین در تیمار برای پروتئین محلول کل، رنگدانه‌های فتوسنتزی، بیان نیمه‌کمی ژن POX و میزان فعالیت پراکسیداز و پرولین مورد بررسی قرار گرفت که خلاصه تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات مختلف در جدول ۲ ارائه شده است.

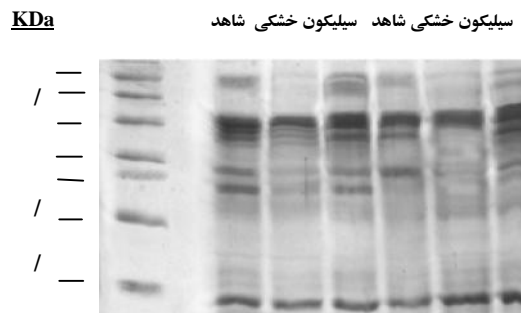
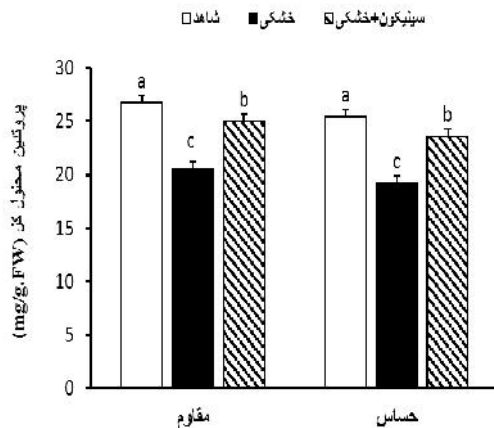
سنجش فعالیت پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش Chance به وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۲۵). مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار با pH=۷، محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۷۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل شده، ۷۵۰ میکرولیتر گوئیکول ۱۰ میلی‌مولار محلول در آب مقطر استریل بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه، اندازه‌گیری شد. برای سنجش این آنزیم روی ژل از روش Hart و همکاران استفاده گردید (۲۶). در این روش ژل جداکننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش پرولین: استخراج پرولین از روش Bates و همکاران با استفاده از بافت تر برگ و معرف ناین هیدرین اسید انجام شد (۲۷). غلظت پرولین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین گردید.

جدول ۲: میانگین مربعات صفات مورد آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	Gene POX	فعالیت پراکسیداز	پروتئین محلول کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پرولین
لاین	1	291/136**	1/814**	8/547**	0/168**	0/690**	1/568**	262/358**
تیمار	2	342/610**	2/055**	61/345**	0/963**	2/979**	7/342**	5108/797**
لاین × تیمار	2	21/837**	0/270**	0.000 ^{ns}	0/009 ^{ns}	0/025 ^{ns}	0/006 ^{ns}	26/922*
خطا	12	1/180	0/026	0/356	0/012	0/029	0/016	4/497
ضریب تغییرات		12/77	4/33	8/29	10/21	3/13	5/86	2/15

داد. تحت تأثیر این تیمار میزان کاهش پروتئین محلول کل نسبت به شاهد ۱/۷۶ و ۱/۷۸ mg/g.FW بود. تفکیک باندهای پروتئینی نشان‌دهنده کاهش میزان پروتئین آنزیم روبیسکو در اثر تنش خشکی می‌باشد ولی با کاربرد سیلیکون شدت باندهای پروتئینی نسبت به خشکی افزایش یافت (شکل ۱).

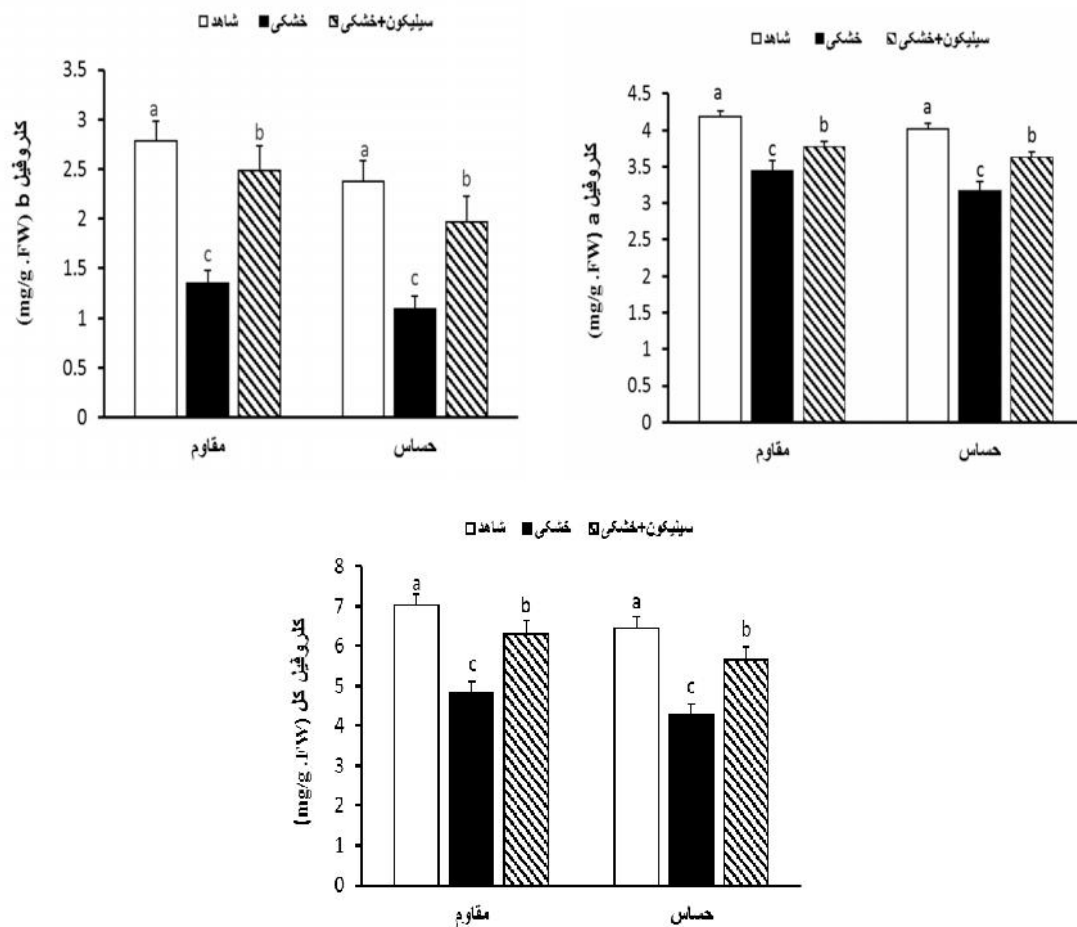


شکل ۱: تغییرات محتوای پروتئین کل (سمت چپ) و باندهای پروتئین محلول کل بر روی ژل SDS-PAGE در تیمارهای شاهد، خشکی و سیلیکون+خشکی در دو لاین مقاوم و حساس.

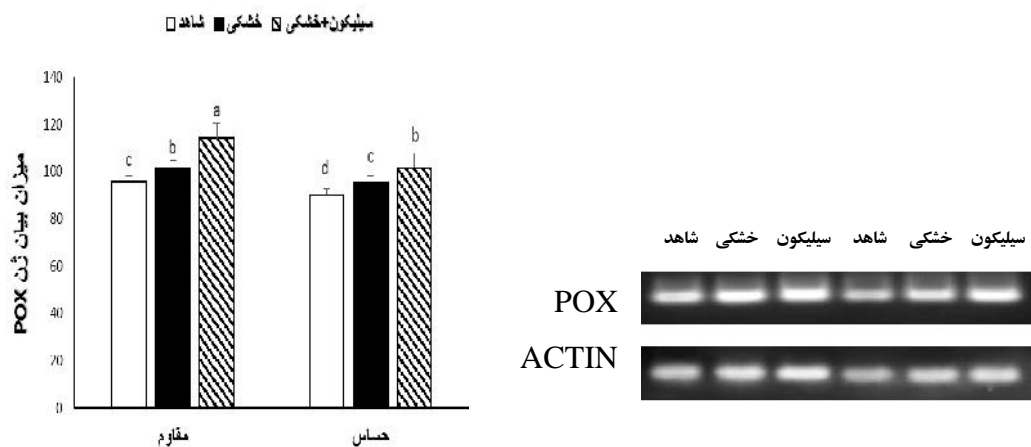
معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف، دو لاین و اثر متقابل لاین×تیمار در سطح احتمال یک درصد نشان داد. تحت تأثیر تیمار خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد در هر دو رقم به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (شکل ۴). در این تحقیق سیلیکون باعث افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو رقم گردید، به‌طوری‌که افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار سیلیکون در مقایسه با تیمار خشکی معنی‌دار بود. همچنین در تغییراتی که در مورد فعالیت آیزوزایم‌های آنزیم پراکسیداز بر روی ژل اکریل آمید مشاهده شد نشان داد که تحت تیمار خشکی و سیلیکون-خشکی شدت باندها نسبت به تیمار شاهد بیشتر است که با نتایج حاصل از سنجش اسپکتروفتومتری انطباق داشت. محتوای پرولین در تیمارهای خشکی و سیلیکون + خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. افزایش محتوای پرولین تحت تیمار خشکی و سیلیکون + خشکی نسبت به شاهد در لاین مقاوم به میزان ۴۶/۲ و ۵۹/۶۷ U mol/g.FW و در لاین حساس به میزان ۴۰/۱۱ و ۵۱/۵۲ U mol/g.FW بود. سیلیکون باعث افزایش میزان پرولین تحت تنش خشکی گردید (شکل ۵).

تحت تنش خشکی، میزان پروتئین کل نسبت به شاهد در هر دو لاین به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش محتوای پروتئین محلول کل در تیمار خشکی نسبت به شاهد در لاین مقاوم و حساس به ترتیب به میزان ۶/۲ و ۶/۲۱ mg/g.FW بود. در حالی که کاربرد سیلیکون میزان پروتئین محلول کل را افزایش

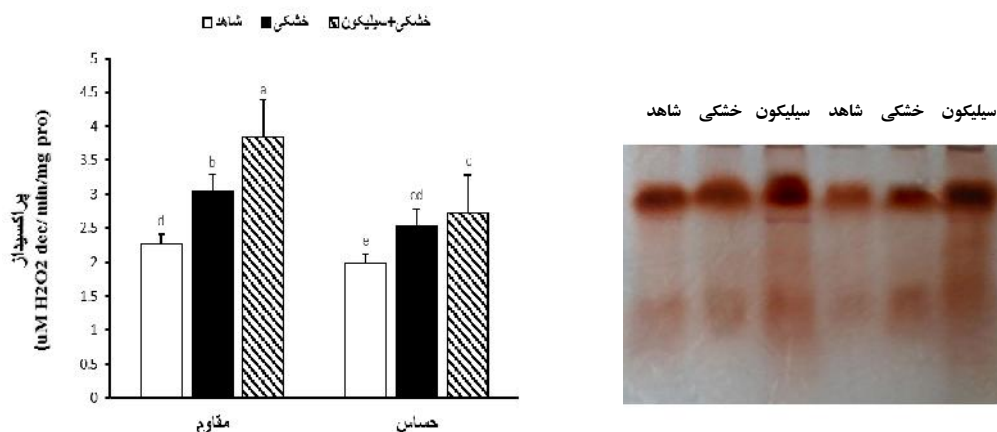
میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تیمار خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در تیمار خشکی کاهش محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در مقایسه با تیمار شاهد در لاین مقاوم به ترتیب ۰/۷۴، ۱/۴۳ و ۲/۱۹ mg/g.FW و در لاین حساس به میزان ۰/۸۶، ۱/۲۹ و ۲/۱۷ mg/g.FW بود. سیلیکون باعث کاهش خسارات ناشی از تنش شده و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در اثر سیلیکون در مقایسه با تیمار خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. به‌طوری‌که میزان کاهش محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در مقایسه با تیمار شاهد در لاین مقاوم به ترتیب ۰/۴۱، ۰/۳ و ۰/۷۱ mg/g.FW و در لاین حساس به میزان ۰/۳۹، ۰/۴۱ و ۰/۸۱ mg/g.FW بود (شکل ۲). نتایج حاصل از سنجش بیان ژن POX به‌صورت نیمه‌کمی اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف، دو لاین و اثر متقابل لاین×تیمار در سطح احتمال یک درصد نشان داد (شکل ۳). میزان بیان ژن POX در تیمار سیلیکون-خشکی در هر دو لاین نسبت به تیمارهای دیگر افزایش داشته و در لاین CB-20315 میزان بیان ژن نسبت به لاین CB-20213 بیشتر بود. تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) برای میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش خشکی اختلاف



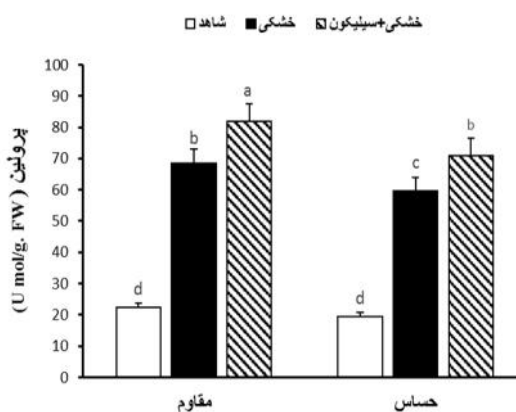
شکل ۲: تغییرات محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در تیمارهای شاهد، خشکی و سیلیکون+خشکی در لاین مقاوم و حساس.



شکل ۳: بیان ژن POX تحت تیمارهای شاهد، خشکی و سیلیکون+خشکی در دو لاین مقاوم و حساس.



شکل ۴: تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز (سمت چپ) و فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ژل Native-PAGE در تیمارهای شاهد، خشکی و سیلیکون+خشکی.



شکل ۵: تغییرات محتوای پرولین در تیمارهای شاهد، خشکی و سیلیکون+خشکی.

پروتئین‌های جدید و یا افزایش سطح پروتئین‌های مرتبط با سازگاری و تطابق گیاه با تنش خشکی می‌باشد که می‌توان به آنزیم‌های ضد اکسند اشاره کرد که در تیمار سیلیکون به میزان زیادی افزایش پیدا کرده است (۷). کمبود آب به علت کاهش دادن رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش در فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی به ویژه آنزیم روبیسکو، کاهش فتوسنتز و رشد، نتیجه خود را به صورت کاهش عملکرد نمایان می‌سازد. در تحقیقات مختلف بین میزان فتوسنتز برگ و محتوای کلروفیل در واحد سطح همبستگی مثبتی به دست آمده است. در این تحقیق خشکی سبب کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی گردید، اما کاربرد سیلیکون سبب افزایش میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل گردید. در آزمایش انجام شده توسط Shen و همکاران (۲۸)، اثر سیلیکون و اشعه ماوراء بنفش را در جوانه‌زنی گیاه لوبیا در شرایط تنش خشکی مطالعه کردند. نتایج نشان داد

بحث

در برخی از منابع پیشنهاد شده است که سیلیکون می‌تواند تحمل به خشکی را در گیاهان افزایش دهد. بدین منظور در این تحقیق اثرات سیلیکون بر تنش خشکی در دو لاین گیاه جو بررسی شد. در نتایج تحقیق ما مشاهده شد که در هر دو رقم تیمار خشکی سبب کاهش میزان پروتئین می‌شود که این کاهش توسط سیلیکون به طور قابل توجهی جبران گردید. Tale Ahmad و همکاران در آزمایشی اثر سیلیکون را در گیاه گندم تحت تنش خشکی در سه مرحله رشدی مورد بررسی قرار دادند. به این منظور از سه تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی استفاده کردند. نتایج نشان داد که در تیمار سیلیکون+خشکی، سیلیکون مانع از کاهش پروتئینی در شرایط تنش می‌شود. به نظر می‌رسد که افزایش در میزان پروتئین محلول در تیمار سیلیکون در مقایسه با تیمار خشکی، به دلیل سنتز

پروکلین، ولی در مقابل باعث کاهش میزان H_2O_2 می‌شود. توانایی پروکلین به واسطه تنظیمات اسمزی، ایجاد ثبات در ساختارهای سلولی و رادیکال‌های آزاد به خوبی شناخته شده است و افزایش پروکلین نقش مهمی در حفاظت از آنزیم‌های دخیل در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی در برابر اثرات مخرب تنش شوری دارد. کاهش در میزان H_2O_2 به علت افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد که نقش مهمی را در حفاظت گیاهان از تنش‌های محیطی بازی می‌کنند. در آزمایشی دیگر (۳۲) Moussa اثر سیلیکون را در شرایط تنش شوری در گیاه ذرت مورد مطالعه قرار داد. میزان پروکلین در تیمار شوری و تیمار سیلیکون بدون NaCl افزایش یافت، ولی در اثر تیمار سیلیکون-شوری تجمع میزان پروکلین در مقایسه با نمونه شاهد معنی‌دار نشد.

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که سیلیکون با افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندگی تحت اثر تنش خشکی و کاهش محتوای رادیکال‌های آزاد در سلول، مانع از خسارات اکسندگی به سلول‌های گیاه جو می‌شود. همچنین سیلیکون موجب افزایش میزان پروتئین محلول کل، رنگدانه‌های فتوسنتزی و میزان تجمع پروکلین در هنگام تنش خشکی در این گیاه شد. در نتیجه سیلیکون می‌تواند در بهبود تحمل گیاه جو نسبت به تنش خشکی نقش داشته باشد. با توجه به اینکه این پژوهش در شرایط گلخانه‌ای انجام شد، پیشنهاد می‌شود که در شرایط مزرعه و در شرایط تنش‌های مختلف محیطی نیز مورد ارزیابی قرار بگیرد و مقادیر مختلف این عنصر بر روی این گیاه یا گیاهان دیگر برای تولید گیاهان مقاوم به تنش استفاده گردد.

منابع

1. Sharma P, Dubey RS. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes at growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 2005; 46(3): 209-221.
2. Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*. 2011; 6(9): 2026-2032.
3. Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances*. 2010; 28(1): 169-183.

که تنش خشکی سبب کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود که با افزودن تیمار سیلیکون خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو به رنگدانه‌های فتوسنتزی کاهش می‌یابد. آن‌ها نشان دادند که سیلیکون باعث افزایش محتوای کلروفیل و در نهایت افزایش فتوسنتز شد. نتایج نشان داد که سیلیکون میزان بیان ژن POX و نیز میزان فعالیت آنزیم را نسبت به تیمار خشکی و شاهد افزایش می‌دهد. این نتایج با نتایج محققین دیگر مشابه بود. Bai و همکاران (۲۹) تحت شرایط تنش خشکی تأثیر سیلیکون بر میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندگی را در گیاه ذرت بررسی کردند. تحت شرایط تنش خشکی تغییر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با نمونه‌های شاهد مشاهده نگردید. ولی سیلیکون باعث افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندگی POX ، APX ، SOD ، CAT در هر دو رقم شد. به طوری که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار سیلیکون+خشکی در مقایسه با تیمار خشکی معنی‌دار بود. Sharma و همکاران (۱) افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر تنش خشکی در برنج را نیز گزارش کردند. در بررسی‌هایی که بر روی برنج در مرحله نشاء صورت گرفت، مشخص شد که افزایش فعالیت پراکسیداز در گیاهان تحت تنش خشکی با واکنش‌های اکسیدکننده به وجود آورنده رادیکال‌های آزاد و پراکسیدهای آلی همبستگی دارد و POX نقش موثری در پاکسازی H_2O_2 دارد. در آزمایش اثرات سیلیکون بر گیاه لوبیا توسط Polanco و همکاران (۳۰)، غلظت سیلیکون در برگ‌های گیاهان تحت تیمار سیلیکون در مقایسه با گیاهان شاهد به میزان ۳۳ درصد افزایش یافت. جذب کربن خالص، سرعت هدایت روزنه‌ای، مقدار تعرق و فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندگی در گیاهان تحت تیمار سیلیکون نسبت به گیاهان شاهد بالاتر بود. نتایج نشان داد که سیلیکون مقاومت گیاهان را با افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندگی افزایش می‌دهد. سیلیکون باعث افزایش قابل توجه‌ای در میزان پروکلین در شرایط تنش خشکی می‌شود. اخیراً به نقش حفاظتی پروکلین در جلوگیری از مرگ سلولی ایجاد شده توسط تنش‌های اکسیداتیو توجه زیادی شده است. در این تحقیق در شرایط تنش خشکی میزان پروکلین افزایش یافت، ولی با کاربرد سیلیکون افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان تجمع پروکلین در شرایط تنش خشکی مشاهده شد. Ozturk و همکاران (۳۱) نیز اثرات تنش شوری بر میزان پروکلین در برگ‌های نخود در شرایط مزرعه مورد آزمایش قرار دادند. نتایج آزمایش نشان داد که تنش شوری موجب افزایش محتوای

4. Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, et al. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2009; 1814- 959608(305): 100-105.
5. Srivalli S, Khanna-Chopra R. Delayed wheat flag leaf senescence due to removal of spikelets is associated with increased activities of leaf antioxidant enzymes, reduced glutathione/oxidized glutathione ratio and oxidative damage to mitochondrial proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009; 47:663-670.
6. Ariano S, Bartolomeo D, Cristos X, Andras M. Antioxidant defences in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*. 2005; 32:45-53.
7. Tale Ahmad S, Haddad R, Study of silicon effects on antioxidant enzyme activitie and osmotic adjustment of wheat under drought stress. *Czech Journal of Genetics and Plant Breed*. 2011; 47(1): 17-27.
8. Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*. 2005; 16(2): 123-132.
9. Yamchi A, Rastegari jazi F, Ghobadi S, Mosavi A, et al. Abundant expression of *p5cs* gene with the aim of increasing resistance to osmoti stresses in transgenic tobacco plants. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 2004; 4: 31-39.
10. Rains D.W. Plant tissue and protoplast culture: application to stress physiology and biochemistry. In: Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B. (eds.), *Plants Under Stresses: Biochemistry, Physiology and Ecology and their Application to Plant Improvement*. Cambridge University Press, Cambridge. 1989; pp: 181-196.
11. Hsu SY, Hsu YT, Kao CH. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biol. Plant*. 2003; 46: 73-78.
12. Srinivas V, Balasubramanian D. Proline is a protein-compatible hydrotrope. *Langmuir*. 1995; 11(7): 2830-2833.
13. Yancey P.H. Compatible and counteracting solutes. In: Strange, K. (eds.), *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1994; pp: 81-109.
14. Kavi Kishore PB, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi PS, et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci*. 2005; 88(3): 424-438.
15. Ashraf M, Foolad M. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 2007; 59(2): 206-216.
16. Delauney AJ, Verma DPS. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*. 1993; 4(2): 215-223.
17. Balakhnina T, Borkowska A. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. *International Agrophysics*. 2013; 27(2): 225-232.
18. Lovering TS, Engel C. Significance of accumulator plants in rock weathering. *Bulletin of the Geological Society of America*. 1959; 70(12): 781-800.
19. Sonobe K, Hattori T, An P, Tsuji W, et al. Diurnal variations in photosynthesis, stomatal conductance and leaf water relation in sorghum grown with or without silicon under water stress. *Journal of plant nutrition*. 2009; 32(3): 433-442.
20. Liu JJ, Lin SH, Xu PL, Wang XJ, et al. Effects of exogenous silicon on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in chilling-stressed cucumber leaves. *Agricultural Sciences in China*. 2009; 8: 1075-1086.
21. Lee SK, Sohn EY, Hamayun M, Yoon JY, et al. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. *Agroforestry systems*. 2010; 80(3): 333-340.
22. Ma JF, Yamaji N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in plant science*. 2006; 11(8): 392-397.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
24. Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*. 1949; 24(1):1-15.
25. Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology*. 1955; 2: 764-775.
26. Hart MA, Tyson H, Bloomberg R. Measurement of activity of peroxidase isoenzymes in flax (*Linum usitatissimum*). *Canadian Journal of Botany*. 1971; 49: 2129-2137.
27. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*. 1973; 39: 205-207.
28. Shen X, Zhou Y, Duan L, LI Z, et al. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-

B radiation. Journal of plant physiology. 2010; 167(15): 1248-1252.

29. Bai L, Sui F. Effect of soil drought stress on leaf of maize. Pedosphere. 2006; 16(3): 326-332.

30. Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Cruz MFA, et al. Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. Tropical Plant Pathology. 2014; 39(1): 35-42.

31. Ozturk L, Demir Y, Unlukara A, Karatas I, et al. Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. Rom Biotech Lett. 2012; 17: 7227-7236.

32. Moussa HR. Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). International Journal of agriculture and Biology. 2006; 8(2): 293-297.

Effect of Silicon on the Peroxidase Gene Expression and Morphological Traits of Barley Under Drought Stress

Haddad R. Ph.D.¹, Mokhlesian S. M.Sc.^{2*}

1. Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. MSc of Agricultural Biotechnology, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, iran

* Email corresponding author: sabamokhlesian@yahoo.com

Received: 27 Dec. 2014

Accepted: 13 Jan. 2015

Abstract

Aim: The purpose of the present research project was evaluation of the effect of silicon on the severity of peroxidase genes expression and some morphological traits in both resistant and susceptible barley lines under drought stress.

Material and Methods: Total soluble protein content, photosynthetic pigments, and total RNA were extracted from the leaves affected by various treatments. Target gene was evaluated by Semi-quantitative RT-PCR analysis using synthesized cDNA. Both the peroxidase enzyme activity by Chance method and proline with Bates method were also evaluated under drought stress treatment. Accordingly, the experiment was analyzed in a factorial test based on the completely randomized design with three treatments of control, drought and silicon-drought (sodium silicate 2 mg / 1 Kg soil) with three replications in a greenhouse.

Results: Silicon application caused to increase the amount of total soluble protein and photosynthetic pigments in both lines under drought stress. Semi-quantitative RT-PCR analysis of treatments observed significant differences. Maximum of peroxidase gene expression was observed in the silicon-drought treatment. Antioxidant enzyme activities were at the highest level as shown by gene expression pattern of polyacrylamide gel analysis for treated silicon samples. A further increase was exhibited for proline accumulation caused by silicon application rather than such accumulation in stress treatment compared to control.

Conclusion: Silicon reduces oxidative damage induced by reactive oxygen species and with the increase in antioxidant enzyme activities caused to protect plants against environmental stresses.

Keywords: antioxidant enzymes, gene expression, drought stress, silicon