Crop Biotech.
Winter (2014) 8: 11-20.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هشتم، زمستان ۱۳۹۳ (۲۰-۱۱)

بررسی پاسخ آنزیمی و بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و آسکوربیت پراکسیداز به تنش خشکی تحت تأثیر سیلیکون در گیاه جو

صبا مخلصیان[۱]، رحیم حداد[۲*]، قاسمعلی گروسی[۳]، مریم قنادنیا[۴]
۱، ۲، ۳، ٤، به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشیاران و استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۵)

Study of the Enzymatic Response and Relative Gene Expression of Catalase and Ascorbate Peroxidase to Drought Stress in Barley Plant under Silicon Effect

Saba Mokhlesian[1], Raheem Haddad[2*], Ghasemali Garoosi[3], Maryam Ghannadnia[4]
1, 2, 3, 4, M.Sc. Student, Associate Professors and Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
(Received: Dec. 14, 2014 -Accepted: Feb. 24, 2015)

چکیده

تنش‌های غیرزیستی مختلف در گیاهان منجر به تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و باعث آسیب به پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA می‌شود. برای مقابله با تنش اکسیداتیو در گیاهان دفاع آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و آسکوربیت پراکسیداز برای محافظت از گیاهان فعالیت می‌کند. سیلیکون دومین عنصر رایج موجود در خاک است که دارای اثرات مفیدی در افزایش تحمل به تنش خشکی در گیاهان می‌باشد. بدین منظور اثر ناشی از تنش خشکی در بیان نیمه‌کمی ژن‌های کاتالاز و آسکوربیت‌پراکسیداز و فعالیت آنزیمی آنها در دو لاین گیاه جو دو ردیفه (*Hordeum vulgare* L.) CB-۲۰۳۱۵ (مقاوم) و CB-۲۰۲۱۳ (حساس) در مرحله پنجه‌دهی در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون –خشکی (۲میلی‌مولار سیلیکات‌سدیم/ کیلوگرم خاک) اجرا شد. آنالیز نیمه‌کمی RT-PCR اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن کاتالاز و آسکوربیت پراکسیداز در تیمار سیلیکون–خشکی مشاهده شد. نتایج نشان داد در هر دو رقم کاربرد سیلیکون، فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده را تحت شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد که سیلیکون احتمالا در تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی جهت افزایش مقاومت به خشکی در گیاهان نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های ضداکسنده، سیلیکون، تنش اکسیداتیو، بیان ژن.

Abstract

Various abiotic stresses lead to the overproduction of reactive oxygen species (ROS) in plants and cause to damage to proteins, lipids, carbohydrates and DNA. Antioxidative enzymes such as catalase and ascorbate peroxidase are activated to protect the plants against oxidative stress. Silicon is the second most common element in soil that has beneficial effects in improving plants tolerance to drought stress. Accordingly, the effects of drought stress on semi-quantitative gene expression and enzymatic activities of both catalase and ascorbate peroxidase were investigated in two lines of two-row barley named CB-20315 (resistant) and CB-20213 (sensitive) in tillering stage in a greenhouse. The experiment was performed in a completely randomized design with three replications for three treatments of control, drought and silicon-drought (sodium silicate 2 mg / 1 kg), and analyzed in factorial experiment. RT-PCR semi-quantitative analysis revealed significant differences between treatments. The highest level of gene expression was observed for both enzymes in the silicon-drought treatment. The data showed that silicone application affect antioxidant enzymes activity to increase in both studied lines under drought stress. According to the results of this study it might be concluded that silicon participate in physiological and metabolic changes to enhance plants tolerance to drought stress.

Keywords: Antioxidant enzymes, Silicon, Oxidative stress, Gene expression.

* نویسنده مسئول: رحیم حداد
E-mail: raheemhaddad@yahoo.co.uk

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تنش خشکی یکی از نامطلوب‌ترین عوامل رشد و بهره‌وری گیاهان است و تهدیدی جدی برای تولید محصولات کشاورزی پایدار در شرایط متغیر آب و هوایی در نظر گرفته شده است (Seo *et al*., 2009; Caruso *et al*., 2009). تنش خشکی موجب طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاه از متابولیسم سلولی تا تغییرات در نرخ رشد و بازده محصول می‌شود. درک واکنش‌های بیوشیمیایی و مولکولی خشکی برای یک درک جامع از مکانیسم‌های مقاومت گیاه به شرایط کمبود آب ضروری است (Ahuja *et al*., 2010). تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) یکی از اولین واکنش‌های بیوشیمیایی سلول‌های یوکاریوتی به تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشد (Del Rio *et al*., 2002). تصور می‌شود که در شرایط طبیعی تولید و حذف گونه‌های اکسیژن فعال در حالت تعادل می‌باشند ولی تنش‌های محیطی موجب اختلال شده و موجب افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود (Gratao *et al*., 2005). ROS برای ارگانیسم‌ها بسیار سمی می‌باشد و بر روی ساختار و عملکرد مولکول‌های زیستی تأثیر می‌گذارد (Noctor & Foyer, 2005). اثرات مضر ROS در سیستم بیولوژیکی اغلب در غیر فعال کردن آنزیم‌های حساس، تخریب کلروفیل، فعالیت پروتئین‌ها، لیپیدها، نوکلئیک‌اسیدها، روزنه‌های فتوسنتزی و غشا دیده می‌شود. تمام موجودات هوازی دارای سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی برای خنثی نمودن اثرات گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشند (Gill & Tuteja, 2010). سیلیکون بعد از اکسیژن دومین عنصر فراوان در خاک است. دی‌اکسیدسیلیکون دربرگیرنده ۷۰-۵۰ ٪ توده خاک است. همه‌ی ریشه گیاهان در خاک مقداری سیلیکون در بافت خود دارند. با این حال نقش سیلیکون در رشد و توسعه گیاهان نادیده گرفته شده است (Gong *et al*., 2005). سیلیکون توسط گیاه به صورت باردار $Si(OH)^{4-}$ جذب می‌شود و نهایتاً به صورت رسوب غیرقابل حل (سیلیسیک اسید) در گیاه تجمع می‌یابد. بیشتر منابع سیلیکون به صورت نامحلول هستند و با ترکیبی که توسط گیاه جذب می‌شوند، متفاوت می‌باشند (Soylemezoglu *et al*., 2009). گیاهان مختلف در جذب سیلیکون دامنه‌های متفاوتی از ۰/۱ تا ۱۰ درصد (وزن خشک) را از خود نشان می‌دهند (Ma & Yamaji, 2006). سیلیکون در بافت گیاهی سبب افزایش غلظت نیتروژن و پتاسیم می‌گردد. این ماده با کاهش در میزان کاربرد علف‌کش‌ها و مواد سمی، مانع از آلودگی محیط زیست می‌شود (Gagoonani *et al*., 2011). گزارش شده است که سیلیکون باعث افزایش رشد گیاهان، کاهش حساسیت به عوامل بیماری‌زای قارچی و افزایش تحمل گیاهان در شرایط تنش‌های غیر زیستی گشته است. این ماده در بسیاری از موارد با تحریک رشد و افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده، موجب حفاظت گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود (Balakhnina & Borkowska, 2013). کاتالاز (CAT) پروتئین‌های حاوی هم هستند که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن را کاتالیز و از سلول در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن حمایت می‌کنند. محل تولید کاتالاز، پراکسیزوم و گلای‌اکسیزوم می‌باشد (Kim *et al*., 2008; Ahmad *et al*., 2010). مقدار این آنزیم در بافت ذخیره‌ای چربی، گلای‌اکسیزوم فراوان می‌باشد که در آن H_2O_2 طی بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب تجزیه می‌شود و در پراکسیزوم برگ‌های گیاهان، H_2O_2 در طی تنفس نوری بوسیله تبدیل گلی‌کولات به گلای‌اکسیلات از بین می‌رود (Kiani *et al*., 2008). آسکوربیت پراکسیداز (APX) یک آنزیم ضداکسنده است که در گیاهان عالی و جلبک‌ها وجود دارد. این آنزیم برای حذف H_2O_2 در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون وجود دارد و محل فعالیت آن در سیتوسل، کلروپلاست، میتوکندری

Archive of SID

www.SID.ir

و پراکسیزوم می‌باشد (Shigeoka *et al*., 2002; Mittler *et al*., 2004). آنزیم آسکوربیت پراکسیداز با بهره‌گیری از اسیدآسکوربیک و کاهش H_2O_2 به آب و مونو دهیدروآسکوربات فعالیت خود را انجام می‌دهد (Noctor & Foyer, 1998). در مطالعه‌ای Gong و همکاران (۲۰۰۵) اثرات سیلیکون بر روی تغییرات القاء شده به وسیله‌ی خشکی در خسارت اکسیداتیو به رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، لیپیدها و فعالیت برخی آنزیم‌ها را در گیاه گندم رشد یافته در گلدان بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که کاربرد سیلیکون در مقایسه با تیمار شاهد، فعالیت برخی آنزیم‌های ضداکسنده، اسیدهای چرب اشباع نشده لیپیدها، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های محلول را تحت تنش خشکی افزایش می‌دهد. همچنین آزمایشی به‌منظور بررسی اثرات سیلیکون در فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده تحت تنش سرما بر روی چهار رقم خیار تا مرحله دو برگی تحت غلظت‌های مختلف سیلیکون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سیلیکون، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده تحت تنش سرما می‌شود و برگ‌های خیار را از این‌که توسط گونه‌های اکسیژن فعال مورد آسیب قرار بگیرند محافظت می‌کند (Liu *et al*., 2009). جو یکی از مهم‌ترین غلاتی است که در بسیاری از کشورهای جهان کاشته می‌شود. زراعت جو در بسیاری از کشورهای تولیدکننده آن سابقه‌ای بسیار طولانی دارد و علاوه بر آنکه در تغذیه انسان مورد مصرف داشته از مالت آن نیز در صنعت و داروسازی استفاده می‌شود .در حال حاضر در اغلب کشورها از آن نوشابه‌های الکلی و غیر الکلی بدست آمده و در پرورش حیوانات بویژه در تغذیه گاوهای شیری و گوساله‌های پرواری و حتی پرندگان به مقدار زیادی کاربرد دارد. در اغلب کشورها جو بیشتر در مزرعه و در شرایط دیم کشت می‌گردد و اغلب تحت تأثیر کمبود شدید آب در طی فصول خشک قرار می‌گیرد. بنابراین تنش خشکی یکی از مشکلات اساسی تولید جو در این مناطق می‌باشد. بدین منظور در این پژوهش اثر سیلیکون بر بیان نسبی ژن‌های کاتالاز و آسکوربیت پراکسیداز و میزان فعالیت آنزیمی آنها در دو لاین گیاه جو با تحمل متفاوت به خشکی در مرحله پنجه‌دهی در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

در این بررسی از دو لاین گیاه جو دو ردیفه (*Hordeum vulgare* L.) 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 گردید. این تحقیق بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با سه تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون- خشکی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) در سال ۹۳ مورد ارزیابی قرار گرفت. بذور پس از ضد عفونی به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم یک درصد، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک زراعی معمولی در شرایط گلخانه کاشته شدند. میانگین دما در طی رشد(°C ۲±۲۵) و طول روز تقریباً ۱۰ ساعت بود. تنش خشکی با کار گذاشتن بلوک گچی در گلدان‌ها اعمال گردید. نمونه‌برداری در مرحله پنجه‌زنی 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 – به منظور استفاده در سنجش‌های بعدی نگهداری شد.

استخراج RNA

استخراج RNA توسط کیت RNX-plus شرکت سیناکلون از نمونه‌های برگ یخزده، طبق دستورالعمل صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده توسط

Archive of SID

www.SID.ir

الکتروفورز روی ژل ۱/۵ درصد تعیین گردید. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی 28S و 18S در روی ژل نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. برای بررسی کمی میزان استخراج از اسپکتوفتومتر استفاده شد. در مرحله بعدی RNA استخراج شده با آنزیم DNase1 بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز تیمار شد. بدین منظور یک میکروگرمRNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (U) آنزیم DNase1 و با آب DEPS به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷+ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوب‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

ساخت cDNA

تهیه cDNA با استفاده از RevertAid M-MuLVReverse Transcriptase شرکت سیناکلون صورت گرفت. ابتدا µg ۱ از محلول RNA کل به همراه µl ۱ Oligo-dT و µl۶ آب دیونیزه درون میکروتیوب مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داد شد. مقدار µl۲ از محلول بافر واکنش، µl ۱ از آب دیونیزه، µl ۲ از مخلوطdNTP و µl۱ از آنزیم RT به مخلوط واکنش اضافه گردید. تیوب‌ها به مدت min ۶۰ در دمای ۴۵+ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به منظور توقف واکنش در دمای ۷۰+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

طراحی آغازگرها برای کمیت سنجی با واکنش زنجیر های پلیمراز

برای طراحی آغازگرها ابتدا توالی ژن‌های کاتالاز، آسکوربیت پراکسیداز و ژن خانه‌دار اکتین از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار oligo5 آغازگرهای مورد نظر طراحی شد (جدول۱). واکنش PCR جهت بررسی سنتز cDNA در ۳۵ چرخه دمایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی واکنش انجام گردید که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۰ ثانیه بود. همچنین 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. سپس نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۲ (w/v) درصد بارگذاری شدند و پس از الکتروفورز ژل بوسیله دستگاه ترانس‌ایلومینیاتور UV ساخت شرکت UVP آمریکا مشاهده و عکس‌برداری شد. برای کمی کردن میزان بیان ژن‌ها، تصاویر بدست آمده با استفاده از برنامه Image J آنالیز شدند.

جدول۱- مشخصات آغازگرها

نام آغازگر	توالی آغازگر (´3-´5)	طول قطعه	TM (°C)
APX	CTC AGG CAG GTG TTT TCC A	182	57/58
	CCT TCC TTC TCC CCA CTC A		57/91
CAT	GTT CGC CGT CAA GTT TTA CA	72	56/98
	ATG AAG AAG ACG GGG AAG TT		56/45
ACTIN	ACC CAA AAG CCA ACA GAG AG	143	58/01
	ACC ATC ACC AGA GTC GAG AA		51/08

Archive of SID

www.SID.ir

سنجش فعالیت کاتالاز

استخراج پروتئین با استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدن در حضور ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ و سدیم متابای‌بی‌سولفیت ۱ میلی‌مولار) صورت گرفته و پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰۰ و دمای ۴°C+ توسط دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (Beckman Culter مدل Allegra–64R) انجام شد. عصاره با ۲۵ درصد حجم از گلیسرول ۵۰ درصد (v/v) ترکیب و در دمای ۸۰- تا زمان مصرف ذخیره گردید. به منظور محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi (۱۹۸۴) استفاده شد. محلول‌هایی که برای سنجش فعالیت ویژه این آنزیم استفاده شد شامل ۷۵۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۷۰ میلی‌مولار محلول در بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۷، ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۷، ۱۵۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه برحسب Abs/min اندازه‌گیری شد.

برای سنجش و رنگ‌آمیزی این آنزیم روی ژل از روش Robertson و همکاران (۱۹۸۷) استفاده گردید. جهت انجام آزمایش، ژل Native-PAGE جداکننده ۶ درصد و ژل متراکم‌کننده ۴ درصد به‌کار برده شد. بافر ژل جداکننده (۱۰ میلی‌لیتر) شامل ۵۹۴۱ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۵۰۰ میکرولیتر آکریل‌آمید ۴۰٪، ۲۵۰۰ میکرولیتر تریس هیدروکلراید ۱/۵ مولار با pH ۸/۸، ۵۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰٪، ۹ میکرولیتر تمد و بافر ژل متراکم‌کننده (۵ میلی‌لیتر) شامل ۳۲۱۹ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵۰۰ میکرولیتر آکریل‌آمید ۴۰٪، ۱۲۵۰ میکرولیتر تریس هیدروکلراید ۰/۵ مولار با pH ۶/۸، ۲۵ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰٪، و ۶ میکرولیتر تمد بود.

سنجش فعالیت آسکوربیت پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربیت‌پراکسیداز (APX) با روش Nakano و Asada (۱۹۸۷) اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش شامل ۲۵۵۰ میکرولیتر آسکوربیت ۰/۵ میلی‌مولار، محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ۴۵۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۲ میلی‌مولار محلول در آب دوبار تقطیر استریل بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر و مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه بر حسب Abs/min قرائت گردید. به منظور سنجش ژلی این آنزیم از روش Rao و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. در این روش از ژل جداکننده ۱۰ درصد و ژل متراکم‌کننده ۴ درصد مشابه آنزیم کاتالاز استفاده گردید. در نهایت بررسی داده‌ها با نرم‌افزار SPSS16 انجام گرفت و میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال مربوطه با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث

سیستم‌های دفاعی ضداکسنده آنزیمی در گیاهان به منظور کاهش خسارت اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال به وجود آمده است. در این تحقیق، اثر رقم، تیمار و اثر متقابل رقم در تیمار برای بیان نیمه‌کمی و فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده CAT و APX مورد بررسی قرار گرفت.

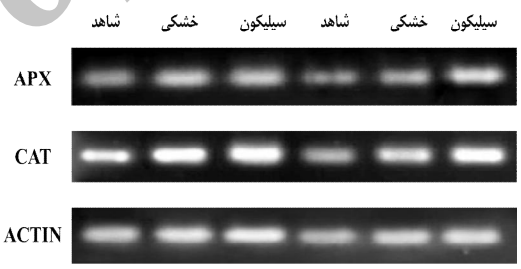
تأثیر سیلیکون بر میزان بیان ژن و فعالیت کاتالاز

بر اساس جدول تجزیه واریانس، نتایج حاصل از سنجش بیان ژن CAT به‌صورت نیمه‌کمی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف، دو لاین و اثر متقابل لاین×تیمار در سطح احتمال یک درصد و برای میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، بین تیمارهای مختلف و نیز بین دو لاین در سطح احتمال یک درصد و در اثر متقابل لاین×تیمار در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). تحت تنش خشکی میزان بیان ژن CAT نسبت به

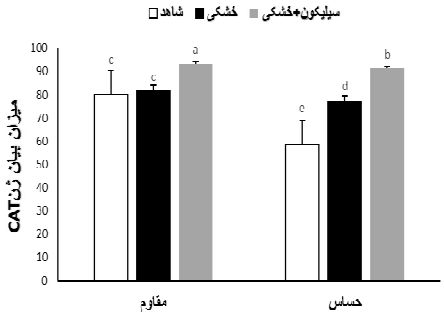
Archive of SID

www.SID.ir

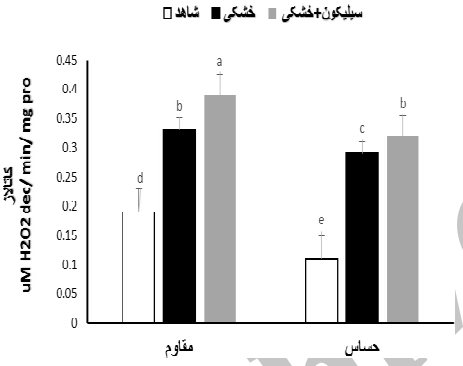
تیمار شاهد در هر دو لاین مقاوم و حساس افزایش یافت و تحت تیمار سیلیکون نسبت به تیمار شاهد و خشکی در میزان بیان ژن افزایش بیشتری مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). نتایج بدست آمده از میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز با نتایج بیان ژن مطابقت داشت. تحت تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار شاهد در هر دو لاین مقاوم و حساس افزایش یافت و تحت تیمار سیلیکون نسبت به حالت شاهد و خشکی میزان فعالیت با افزایش بیشتری همراه بود (شکل ۳). نتایج بدست آمده از ژل Native-PAGE نیز با نتایج حاصل از اسپکتوفتومتری مطابقت داشت. شدت باند آنزیم کاتالاز در تیمار خشکی نسبت به شاهد در هر دو لاین از شدت بیشتری برخوردار بود و بیشترین شدت باند در تیمار سیلیکون+خشکی مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۱- الگوی بیان ژن CAT و APX تحت تیمارهای مختلف در دو لاین مقاوم و حساس



شکل ۲- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان بیان ژن CAT در دو لاین مقاوم و حساس



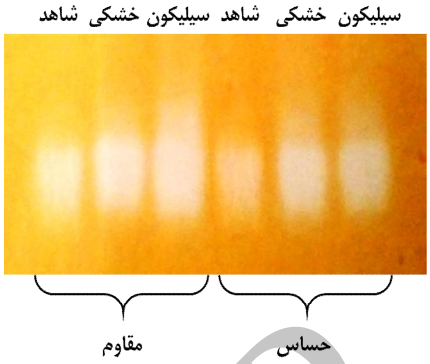
شکل ۳- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در دو لاین مقاوم و حساس

جدول ۲- میانگین مربعات صفات مورد آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	Gene CAT	Gene APX	فعالیت کاتالاز	فعالیت آسکوربیت پراکسیداز
لاین	1	402/514**	40/117**	0/018**	1/848**
تیمار	2	794/516**	634/738**	0/07**	1/829**
لاین × تیمار	2	165/151**	27/660**	0/001*	0/048^{ns}
خطا	12	1/435	1/141	0/00	0/020
ضریب تغییرات		6/83	7/21	2/81	2/78

Archive of SID

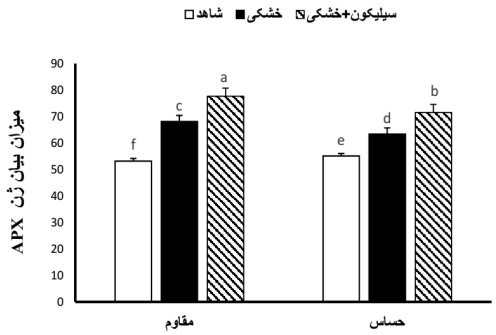
www.SID.ir



شکل ۴- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر روی ژل Native- PAGE در دو لاین مقاوم و حساس

تأثیر سیلیکون بر میزان بیان ژن و فعالیت آسکوربیت پراکسیداز

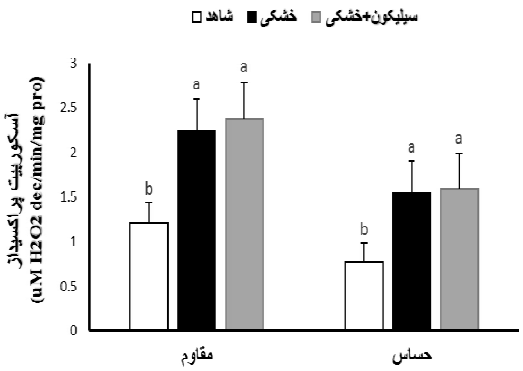
بر اساس جدول تجزیه واریانس، نتایج حاصل از سنجش بیان ژن APX اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف، دو لاین و اثر متقابل لاین×تیمار در سطح احتمال یک درصد و برای میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز نیز بین تیمارهای مختلف و نیز بین دو لاین اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده گردید. در اثر متقابل بین لاین و تیمار در میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۲). تحت تنش خشکی میزان بیان ژن APX نسبت به تیمار شاهد در هر دو لاین مقاوم و حساس افزایش یافت و تحت تیمار سیلیکون نسبت به تیمار شاهد و خشکی بیان ژن با افزایش بیشتری همراه بود (شکل ۱ و ۵). نتایج بدست آمده از میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز اندکی با نتایج بیان ژن تفاوت داشت. در لاین مقاوم تحت تیمار خشکی و تیمار سیلیکون+خشکی میزان فعالیت آنزیم نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت، اما هر دو تیمار خشکی و سیلیکون در یک دسته آماری قرار گرفتند و کاربرد سیلیکون نسبت به تیمار خشکی با افزایش کمی همراه بود. در لاین حساس میزان بیان ژن در تیمار شاهد نسبت به همان تیمار در لاین حساس بیشتر شد، اما میزان فعالیت آنزیم تیمار شاهد در لاین حساس نسبت به لاین مقاوم کمتر بود (شکل ۶). این نتیجه بیانگر این موضوع می‌باشد که این امکان وجود دارد که میزان فعالیت آنزیم بسته به ژنوتیپ گیاه، نوع اندام گیاهی، مرحله رشدی و نیز شرایط آزمایش متفاوت بوده و ممکن است تغییرات پس از رونویسی، مانند غیرفعال شدن آنزیم و یا تخریب آنزیم رخ داده باشد که با وجود افزایش بیان ژن، فعالیت آنزیم کاهش یافته است (Ara *et al.*, 2013). اما در هر حال زمانی که گیاه تحت تنش خشکی قرار گرفت، میزان فعالیت آنزیم نسبت به شاهد با افزایش همراه بود. نتایج بدست آمده از Native-PAGE نیز با نتایج بدست آمده از اسپکتوفتومتری مطابقت داشت. شدت باند آسکوربیت پراکسیداز در تیمار خشکی و سیلیکون+خشکی نسبت به شاهد از شدت بیشتری برخوردار بود (شکل ۷). از این رو به نظر می‌رسد زمانی که گیاه در معرض تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد سلول گیاهی با افزایش سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی موجب محافظت گیاه می‌گردد.



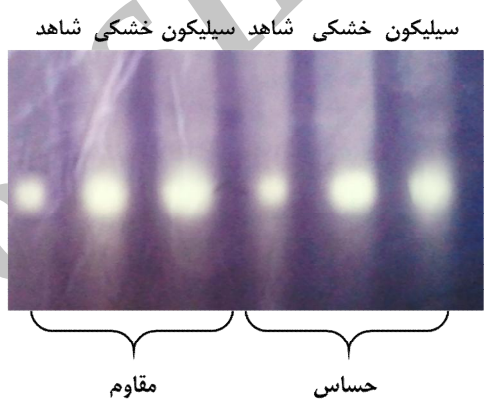
شکل ۵- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان بیان ژن APX در دو لاین مقاوم و حساس

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در دو لاین مقاوم و حساس



شکل ۷- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز بر روی ژل Native-PAGE در دو لاین مقاوم و حساس

محققان نتایج مشابهی را در گیاهان دیگر بدست آوردند، در آزمایشی Li و همکاران (۲۰۰۷) اثر سیلیکون را بر روی میزان تحمل به خشکی گیاه ذرت تحت شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آزمایش نشان داد که تحت شرایط تنش ملایم و شدید، تیمار سیلیکون باعث افزایش عملکرد گردید و در تیمار سیلیکون فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش یافت. سیلیکون همچنین باعث افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی و نرخ فتوسنتزی گردید. اثرات سیلیکون بر روی گیاه لوبیا نیز مورد بررسی قرار گرفت که 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 ضداکسنده در گیاهان تحت تیمار سیلیکون نسبت به گیاهان شاهد بالاتر بود. نتایج نشان داد که سیلیکون مقاومت گیاهان را با افزایش فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده افزایش می‌دهد (Polanco *et al*., 2014). در آزمایشی Mittal و همکاران (۲۰۱۲) توانایی دو رقم حساس و متحمل گیاه کلزا (*Brassica juncea* L.) را در انطباق با محیط‌های نمکی در مزرعه مورد آزمایش قرار دادند. بر اساس این آزمایش مشخص شد که بهبود عملکرد فعالیت رقم مقاوم تحت تنش، مربوط به افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و آسکوربیت پراکسیداز (APX) بوده است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در مرحله پنجه‌دهی سیلیکون با افزایش بیان ژن‌های CAT و APX تحت تأثیر تنش خشکی و افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده و کاهش محتوای رادیکال‌های آزاد در سلول، مانع از خسارات اکسنده به سلول‌های گیاهی 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 شاخص‌های فیزیولوژیکی دیگر از قبیل، تجزیه چربی‌ها و آسیب‌های غشاء و نیز پارامترهای رشدی گیاه نیز اندازه‌گیری گردد.

REFERENCES

Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105: 121-126.

Ahmed M, Hassen FU, Qadeer U, Aslam MA (2011) Silicon application and drought tolerance mechanism of sorghum. Afr J Agric Res. 6: 594-607.

Archive of SID

www.SID.ir

Ahuja I, de Vos RCH, Bones AM, Hall RD (2010) Plant molecular stress responses face climate change. Trends Plant Sci. 15: 664-674.

Ara N, Nakkanong K, Lv W, Yang J, Hu Z, Zhang M (2013) Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two Cucurbit species (*Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*) and their interspecific inbred line Maxchata. Int. J. Mol Sci. 14**:** 24008-24028.

Balakhnina T, Borkowska A (2013) Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses: review. Int. Agrophys. 27: 225-232.

Caruso G, Cavaliere C, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A (2009) Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. Plant Sci. 177: 570-576.

Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. J. Exp. Bot. 53:1255-1272.

Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept oxidative stress in a physiological context. Plant Cell Environ. 28: 1056-1071.

Gagoonani S, Enteshari S, Delavar K, Behyar M (2011) Interactive effects of silicon and aluminum on the malondialdehyde (MDA), proline, protein and phenolic compounds in *Borago officinalis* L. J. Med. Plants Res. 24: 5818-5827.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.

Gong HZ, Chen K, Wang S, Zhang C (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. Elesevier Sci, Shannon, Ireland. 169: 313-321.

Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal stressed plants a little easier, Funct. Plant Biol. 32: 481-494.

Kiani SP, Maury P, Sarrafi A, Grieu P (2008) QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. Plant Sci. 175:565- 573.

Kim YH, Khan AL, Waqas M, Shim JK, Kim DH, Lee KY, Lee IJ (2014) Silicon application to rice root zone influenced the phytohormonal and antioxidant responses under salinity stress. Plant Growth Regul. 33: 137-149.

Li L, Yi H (2012) Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in Arabidopsis plants. Plant Physiol. Biochem**.** 58: 46-53.

Liu JJ, Lin SH, Xu PL, Wang XJ, Bai JG (2009) Effects of exogenous silicon on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in chilling-stressed cucumber leaves. Agr. Sci. China. 8: 1075-1086.

Ma JF, Yamaji N (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. Trends plant Sci. 11: 392-397.

Mittal S, Kumari N, Sharma V (2012) Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. Plant Physiol. Biochem**.** 54: 17-26.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9:490-498.

Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiol. 28: 131-

Archive of SID

www.SID.ir

140.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. 49:249-279.

Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Cruz MFA, Curvelo CRS, DaMatta FbM, Vale FXR (2014) Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. Trop. Plant Pathol. 39: 35-42.

Rao ST, Rossmann MG (1973) Comparison of super-secondary structures in proteins. J. Mol. Biol. 76: 241-256.

Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, Reeves HC (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Annu. Rev. Biochem. 167: 290-294.

Seo PJ (2009) TheMYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. Plant Physiol. 151: 275-289.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J. Exp. Bot. 53:1305-1319.

Soylemezoglu G, Demir K (2009) Effect of silicon on antioxidant and stomatal response of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) rootstocks grown in boron toxic, saline and boron toxic-saline soil. Sci. Horticult. 123(2): 240-246.

Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M (2009) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. Plant J. 57: 1065-1078.

Archive of SID

www.SID.ir